**République Algérienne Démocratique et Populaire**

***Ministère de l'Enseignement Supérieur***

***et de la Recherche Scientifique***

**Université**

**Yahia FARES de MEDEA**

**F**aculté de **T**echnologie

Département de génie des procédés et environnement

# THESE DE DOCTORAT

**Spécialité** : Génie de l'environnement

# SYNTHESE ET ETUDE D'UNE BIOMOLECULE EN VUE D'UNE APPLICATION ENVIRONNEMENTALE

Présentée par

**MIHOUBI Nadia**

Devant le jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| O. BENKORTEBI | Pr. Université Yahia FARES de Médéa | Président |
| Y. KERCHICH | Dr. Ecole Nationale Polytechnique. Alger | Examinateur |
| S. SEDDARI | Dr. Université Yahia FARES de Médéa | Examinatrice |
| S. FERHAT | Dr. Université Yahia FARES de Médéa | Encadreur |
| M. NEDJHIOUI | Pr. Université Yahia FARES de Médéa | Co- Encadreur |

**الملخص**

الهدف من عملنا هو تقييم قدرة ثلاث سلالات بكتيرية *Marinobacter hydrocarbonoclasticus :M.*Sdk644 و *Marinobacter :M.* SF و *klebsiella pneumonia* قصد تفعيلها في المعالجة الحيوية لملوثات مختلفة، فضلاً عن قدرتها على إنتاج مخفضات توتر السطح الحيوية. تم عزل سلالة بكتيرية *M.* SF مع تعيين العوامل المثالية لنموها وإنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي بواسطة السلالات الثلاث باستخدام مصادر الكربون المختلفة (الديزل، زيت الزيتون). أفضل سلالة منتجة لمخفض التوتر الحيوي السطحي هي *M.* Sdk644 باستخدام زيت الزيتون كمصدر وحيد للكربون , انتجت 1.137 غ / 300 مل من مخفض السطح الحيوي هذا الاخير قادر على تقليل التوتر السطحي لوسط الاستزراع حتى 32.5 ملي نيوتن / م مع مؤشر مستحلب $E_{24}$ بنسبة 75 ٪، و تركيز مذيلي حرج = 750 ملغ / لتر.
كشف توصيف المواد الخافضة للتوتر السطحي أن المنتجات الثلاثة عبارة عن شحميات سكرية (غليكوليبيدات ) .أخيرًا أدى استخدام السلالات البكتيرية والمواد الخافضة للتوتر السطحي المنتجة في معالجة تلوث المياه إلى تقليل التلوث بشكل جيد. تم تقييم تحلل المواد العضوية في مياه الصرف الصحي من المسلخ من خلال مراقبة العديد من العناصر الكيميائية مثل الطلب الكيميائي للأكسجين DCO والطلب البيولوجي للأكسجين $DBO_5$, النترات , الفوسفات , الأمونيوم والمواد الصلبة العالقة.

تسببت السلالة المعزولة وخافض التوتر السطحي الخاص بها في تخفيض جيد للمادة العضوية، وسمح لنا بالوصول إلى كفاءة تنقية عالية (P = 80٪ مع البكتيريا و96٪ مع العامل الحيوي). أجرينا دراسة وظيفية عن طريق اختبار هذه البكتيريات على وسط معدني مكمل بمبيدين مختلفين يستخدمان كمصدر وحيد للكربون.
البكتيريا المعزولة لديها قدرة عالية على التحليل في وجود المبيدات. كانت الظروف المثلى لنمو البكتيريا وتدهور المبيدات هي التركيز الأولي 20 ملغ / لتر من مصدر الكربون، درجة حرارة 30 درجة مئوية، نسبة حموضة تساوي 7.0 مع نسبة لقاح 4٪.(حجم/حجم)

تم تقييم تمعدن المبيد الأولي عن طريق القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية وقياس الطلب الكيميائي على الأكسجين (DCO).

**الكلمات المفتاحية**: النفايات ، التوصيف، التحلل البيولوجي ,*Marinobacter*

## Résumé

L'objectif de notre travail est d'évaluer la capacité de dégradation de trois souches bactériennes *Marinobacter hydrocarbonoclasticus : M.*SdK644, *Marinobacter : M.*SF et *klebsiella pneumonia* vis à vis de différents polluants, ainsi que leur capacité à produire des biosurfactants. Une souche bactérienne *M.* SF a été isolée avec une optimisation des paramètres de croissance, des biosurfactants ont été produit par les trois souches mises en œuvre avec l'utilisation de différentes sources de carbone (gasoil, huile d'olive). La meilleure souche productrice de biosurfactant est la *M.* SdK644 en utilisant l'huile d'olive comme seule source de carbone, a donné 1.137 g/300 ml de biosurfactant capable de diminuer la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 32.5 mN/m avec un index d'émulsion $E_{24}$ de 75 %, la concentration micellaire critique étaient de 750 $mg.L^{-1}$.

La caractérisation des biosurfactants a révélé que les trois produits sont des glycolipides. Finalement, l'application des souches et leurs biosurfactants produits dans la dépollution des eaux a donné une bonne réduction de la pollution. La dégradation des matières organiques dans les eaux usées de l'abattoir, a été évalué par le suivie de plusieurs éléments chimiques tels que la demande chimique en oxygène (DCO) et la demande biochimique en oxygène( DBO5), les nitrates, les phosphates, l'ammonium et les matières en suspension. La souche isolée et son biosurfactant ont provoqué une bonne dégradation de la matière organique, et nous a permis d'atteindre une efficacité d'épuration élevée (P = 80% avec la souche et 96 % avec le biosurfactant).

Nous avons mené une étude fonctionnelle en testant ces isolats sur un milieu minimum additionné de deux différents pesticides utilisés comme seule source de carbone.

Les bactéries isolées ont une forte capacité de dégradation en présence des pesticides. Les conditions optimales pour la croissance bactérienne et la dégradation des pesticides étaient une concentration initiale de 20 $mg.L^{-1}$ de substrat, une température de 30 °C, un pH égal à 7,0 avec un ratio d'inoculum de 4 % (v/v). La minéralisation du pesticide initial a été évaluée par spectrophotométrie UV et par mesure de la demande chimique en oxygène (DCO).



**Mots clé** : effluents, caractérisation, biodégradation, *Marinobacter*

## Summary

The aim of our work is to evaluate the degradation capacity of three bacterial strains *Marinobacter hydrocarbonoclasticus M.*SdK644, *Marinobacter M.*SF and *klebsiella pneumonia* towards different pollutants, as well as their capacity to produce biosurfactants.

A bacterial strain *M.* SF was isolated with optimised growth parameters, biosurfactants were produced by the three strains implemented with the use of different carbon sources (diesel, olive oil). The best biosurfactant producing strain is *M.* SdK644 using olive oil as the only carbon source given 1.137 g/300 ml of biosurfactant capable of decreasing the surface tension of the culture medium to 32.5 mN/m with an emulsion index $E_{24}$ of 75%, the critical micellar concentration was 750 mg.L-1. Characterisation of the biosurfactants revealed that all three products are glycolipids. Finally, the application of the strains and their produced biosurfactants in water remediation gave a good reduction of pollution. The degradation of organic matter in the wastewater of the slaughterhouse was evaluated by monitoring several chemical elements such as chemical oxygen demand(COD) and biochemical oxygen demand (BOD5), nitrates, phosphates, ammonium and suspended solids. The isolated strain and its biosurfactant caused a good degradation of organic matter, and allowed us to achieve a high purification efficiency (P = 80% with the strain and 96% with the biosurfactant).

We conducted a functional study by testing these isolates on a minimal medium with two different pesticides used as the sole carbon source.

The isolated bacteria have a high capacity to degrade in the presence of pesticides. The optimal conditions for bacterial growth and pesticide degradation were an initial substrate concentration of 20 mg/L-1, a temperature of 30 °C, a pH of 7.0 and an inoculum ratio of 4% (v/v). The mineralization of the initial pesticide was assessed by UV spectrophotometry and by measuring the chemical oxygen demand (COD).

**Key words**: effluents, characterization, biodegradation, *Marinobacter*





# Remerciements

Je tiens particulièrement à exprimer fortement ma gratitude et mes sincères sentiments respectueux à ma directrice de thèse Madame FERHAT Samira, enseignant chercheur à l'université Yahia Farès de Médéa, pour ses aides précieuses, ses conseils, ses discussions constructives et commentaires, ses encouragements et surtout d'avoir bien voulu diriger ce travail et de m'avoir accordé sa confiance, son expertise et son support tout au long de mes travaux ont été grandement profitables. Ce travail représente les fruits de ses discussions, ses rigueur scientifique, ses clairvoyance et ses perspicacité en même temps que son amabilité et gentillesse m'ont été d'un grand apport au cours de ce travail. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma reconnaissance pour tous cela. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect pour vos directives et vos conseils tout au long de mes travaux de master et de thèse.

J'adresse mes remerciements les plus vifs et mes respects les plus profonds à Monsieur NEDJHIOUI Mohamed, professeur à l'université Yahia FARES de Médéa d'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon Co-encadreur. Je le remercie également pour ses conseils qu'il a su me faire bénéficier, de sa très grande culture scientifique, pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer, pour ses conseils judicieux qu'il m'a prodigués et pour ses discussions constructives qu'il n'a cessé de m'orienter vers le bon chemin de la recherche.

Je remercie les membres du jury, qui ont bien voulu examiner ce travail , merci à monsieur BENKORTEBI Othmane, professeur à l'université Yahia FARES de Médéa ,monsieur KERCHICH Yacine ,Maître des Conférences (A) à l'Ecole Nationale Polytechnique. Alger, madame SEDDARI Soumia Maître des Conférences (A) à l'université Yahia FARES de Médéa.

Je tiens à remercier vivement Monsieur ANNOUN Mohamed Directeur de Laboratoire matériaux et Environnementaux (LME), et Monsieur BOUAZIZ Mohamed Nadjib directeur de laboratoire des biomatériaux et des phénomènes de transport (LBMPT) pour leur sympathie et leur bienveillance à nos besoins dans les laboratoires.

Je remercie également Monsieur MOULOUD Sofiane directeur du hall technologique qui a eu la bienveillance de m'accueillir au sein du Hall Technologique, je le remercie pour sa confiance et sa gentillesse.

Mes plus vifs remerciements iront à Madame BENFERRAH Rachida, Madame EULDJI Fouzia, et Mademoiselle BENHAOUA Meriem ingénieurs aux laboratoires du hall de Technologie pour leur soutien permanent, leur gentillesse, leur accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité leur aide, ainsi que pour leurs multiples encouragements. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec elles.

Je tiens à remercier Madame GHRIBI Fahima, Ingénieur au laboratoire d'analyse de l'hôpital Mohamed BOUDIAF de Médéa.

Je remercie chère Madame Saida Secrétaire du Laboratoire LBMPT, pour ses efforts lors des préparations de mes dossiers administratifs. J'exprime vraiment mes sentiments de reconnaissance pour cette admirable dame.

je remercie tous mes amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les moments difficiles, je cite tout particulièrement : Selma LOUNIS , Amira GASMI, Amina BABA ALI, doctorantes à l'université Yahia FARES de Médéa.

Je tiens enfin à remercier, sans exception, tous ceux qui, de près ou de loin, qui m'ont aidé et soutenu afin d'accomplir ce présent travail. J'en oublie certainement encore et je m'en excuse.



# TABLE DES MATIERES

RESUME
REMERCIEMENT
TABLE DES MATIERES
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
LISTE DES ABREVIATIONS
INTRODUCTION GENERALE 18
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE 22

**Partie I**

**Revues bibliographiques**

**Chapitre I. Généralité sur la pollution des eaux**

I. I.1. Introduction 26
I.2. Classement des effluents 26
I. 2. 1. Les eaux usées domestiques 27
I. 2. 2. Les eaux pluviales 27
I. 2. 3. Les eaux industrielles 27
I. 3. La pollution des eaux 28
I. 3. 1. Pollution naturelle 28
I. 3. 2 .Pollution chimique 29
I. 3. 2. 1. Matière organique biodégradable 29
I. 3. 2. 2. Matière organique non biodégradable : Polluants émergents, récalcitrants et toxicité des effluents résiduaires 29
I. 3. 3. les pesticides 30
I. 3. 3. 1. la métribuzine 31
I. 3. 3. 2. L'acétamipride 35
I. 4. Les indicateurs de pollution 36
I. 4. 1. Matières solides en suspension (MES) 36
I. 4. 2. DCO 36
I. 4. 3. DBO5 36

I. 4. 4. Nitrates 37
I. 4. 5. Azote ammoniacal 37
I. 4. 6. NTK 37
I. 4. 7. Pt 38
I. 4. 8. Paramètres biologiques 38
I. 5. Principe du traitement biologique 38
I. 5. 1. Classification des bactéries épuratrices 38
I. 5. 2. Présentation de la biomasse épuratrice de la boue activée 39
I. 6 .L'utilisation d'inoculum bactérien spécialisé 41
I. 7. Les paramètres généraux de mise en œuvre d'un procédé de biodégradation en milieu liquide 42
I. 7. 1. Les conditions d'oxygénation 42
I. 7. 2. Le pH du milieu de traitement 43
I. 7. 3. Complémentation en nutriments pour la croissance microbienne 43
I. 7. 4. Temps de séjour 43
I. 8. Efficacité des microorganismes dans le traitement de la pollution des eaux 44
I. 9. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 45
I. 9. 1. Métabolisme 45
I. 9 .2. Importance 46
Références bibliographique 47
**Chapitre II Les biosurfactants**
II .1. Introduction 54
II. 2. Définition 54
II. 3. Propriétés des biosurfactants 55
II. 3. 1. La tension de surface 55
II. 3. 2. La tension inter faciale 55
II. 3 .3. La concentration micellaire critique 55
II. 4. Classification des biosurfactants 56
II .4. 1. Les biosurfactants de faible poids moléculaire 58
II. 4. 1. 1. Les Glycolipides 58
II. 4. 1. 2. Les acides gras et les phospholipides 58
II. 4. 1. 3.Les lipopeptides 58
II. 4. 2. Les biosurfactants de haut poids moléculaire 58

II. 5. Application industrielle des biosurfactants 59
II. 6.Production des biosurfactants 60
II. 6. 1. Paramètres influençant la production 60
II. 6. 2. Extraction des biosurfactants 60
II. 6. 3. Mode d'action 61
II. 6. 4. Toxicité et biodégradabilité 61
II. 7. Intérêt et utilisation des biosurfactants 62
II. 8. Application biotechnologique des biosurfactants 62
Références 64

**Partie II**

**Matériels et méthodes**

Hypothèses 68
Objectifs 68
II. 1. Matériel biologique 68
II. 1. 1. Isolement de la souche M*arinobacter* S 70
II. 1. 2. Caractéristiques physico-chimiques 70
II. 1. 3. Isolement, purification et conservation des souches 70
II. 1. 4. Détermination des conditions optimales et des paramètres de croissance 71
II. 1. 4. 1. Effet de la concentration en NaCl sur la croissance 71
II. 1. 4. 2. Effet de la température sur la croissance 71
II. 1. 4. 3. Effet du pH sur la croissance 71
II. 1. 5. Caractérisation phylogénétique 71
II. 2. Milieux de culture 72
II.3. Production du biosurfactant 72
II.3.1. Optimisation des paramètres opératoires pour la production de biosurfactant produit par la souche *Marinobacter* SF 72
II.3.1.1. Sélection de la source de carbone et de sa concentration 72
II.3.1.2. Sélection de la source d'azote et de sa concentration 73
II.3.1.3. Optimisation du rapport C/N 73
II.3.2. Préparation de l'inoculum 73
II.3.3. Tests de production des biosurfactants 73

II.3.3.1. Mesure de la croissance bactérienne 73
II.3.3.2. Déplacement de l'huile (Oil displacement) 74
II.3.3.3. Activité d'émulsification 74
II.3.3.4. Détermination de la tension superficielle 75
II.3.4. Extraction du biosurfactant 75
II.4. Caractérisation du biosurfactant 75
II.4.1. Détermination de la Concentration Micellaire Critique (CMC) 75
II.4.2.Pouvoir émulsifiant 76
II.4.3. Spectrophotométrie infrarouge IR 76
II. 5. Caractérisation des échantillons 76
II.5.1. Métribuzine 70% 76
II.5.2. Acétamipride 20% 77
II.5.3. Effluent industrielle : Rejet d'abattoir 78
II. 6. Analyses physico-chimiques des échantillons 79
II.6.1. Mesure de la température et du pH 79
II.6.2. Conductivité électrique et salinité 79
II.6.3. Demande Chimique en Oxygène 79
II.6.4. Demande Biologique en Oxygène 79
II.6.5. Dosage des paramètres chimiques 79
II.6.6. Dosage des matières en suspension 80
II.7. Etude de la biodégradation de l'effluent d'abattoir 80
II.8. Traitement du rejet d'abattoir avec les biosurfactants produits 81
II.9. Elimination des pesticides 81
II.9.1. Etude préliminaire : Adsorption des pesticides sur charbon actif 81
II.9.2. Etude de la biodégradation des pesticides 82
II.9.3. Criblage des facteurs affectant la croissance 82
II.10. Elimination des pesticides avec les biosurfactants produits 84

**Partie III**

**Résultats et discussions**

III.1. Caractérisation de la souche *Marinobacter* SF 86

III.1.1. Détermination des conditions optimales et des paramètres de croissance de la souche *Marinobacter* SF 86
III.1.2. Analyse phylogénétique 87
III.1.3. Affiliation phylogénétique de la souche *M*. SdK644 88
III. 2. Production de biosurfactants 89
III. 2. 1. Evaluation de la production des biosurfactants 89
III. 2. 1. 1. Croissance bactérienne 89
III. 2. 1. 2. Déplacement de l'huile (Oil displacement) 90
III.2.1.3. Activité d'émulsification 91
III. 2. 2. Caractérisation des biosurfactants 93
III. 2. 2. 1. Détermination de la CMC 93
III.2.2.2. Spectre infrarouge 95
III. 3.Application environnementale 98
III. 3 .1.Caractérisation de l'échantillon 98
III. 3. 2. Traitement d'un rejet d'abattoir par la souche bactérienne *M*. SF. 99
III. 3. 3. Traitement d'un rejet abattoir par le biosurfactant produit par la souche *M*. SF 101
III. 3. 4. Traitement d'un rejet abattoir par la souche bactérienne *M*. SdK644 103
III. 3. 5. Traitement du rejet d'abattoir avec le biosurfactant produit par la souche *M*. SdK644 105
III. 4 .Etude de l'adsorption des pesticides sur le charbon actif en poudre (CAP) 106
III. 4. 1. Effet des différents paramètres sur l'adsorption 106
III. 4. 1.1. Effet du temps de contact 106
III. 4. 1. 2. Influence du pH 107
III. 4. 1. 3. Effet de la teneur initiale en pesticides 108
. III. 4. 1. 4. Effet de la masse du CAP 109
III. 4. 2. Modélisation de l'adsorption 110
III. 4. 2. 1. Modélisation selon Langmuir 111
III. 4. 2. 2. Modélisation selon Freundlich 112
III. 4. 3. Conclusion 113
III. 5. Biodégradation de la métribuzine par *la Marinobacter* SdK644 114
III. 5. 1. Effet de la concentration du pesticide sur la croissance

bactérienne 114
III. 5. 2 .Effet du pH sur la croissance 115
III. 5. 3. Effet de la température sur la croissance 116
III. 5. 4. Effet de la concentration de l'inocculum sur la croissance 117
III. 5. 5. Dégradation de la métribuzine par la souche *M*. SdK644 118
III. 6. Etude de l'influence des différents paramètres par le plan d'expérience 120
III. 6. 1. Biodégradation de l'acétamipride avec la *Marinobacter* SdK644 120
III. 6. 2. Biodégradation de l'acétamipride par la *Klebsiella pneumonie* ATCC259 125
III. 7. Traitement des pesticides par les biosurfactants produits 129

**Conclusion** 134
**Références bibliographiques** 136
**ANNEXE I** 143
**ANNEXE II** 144

# Liste des figures


| | | |
|---|---|---|
| Figure. 1 | Classification des pesticides | 31 |
| Figure. 2 | Structure chimique de la Métribuzine | 33 |
| Figure. 3 | Dégradation de la métribuzine dans les sols | 34 |
| Figure. 4 | Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant | 56 |
| Figure. 5a | Souche *M*. SdK644 | 69 |
| Figure. 5b | Souche *klebsiella* | 69 |
| Figure. 6 | Test de déplacement d'huile | 74 |
| Figure. 7 | Courbe d'étalonnage de la metribuzine | 77 |
| Figure. 8a | Formule chimique de l'acétamipride | 78 |
| Figure. 8b | Courbe d'étalonnage de l'acétamipride | 78 |
| Figure. 9 | Incubation des échantillons | 80 |
| Figure. 10 | Influence du pH (a), de la température (b) et de la Concentration de NaCl (c) sur la croissance bactérienne | 86 |
| Figure. 11 | Arbre phylogénétique basé sur 1500 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche *M*. SF | 87 |
| Figure. 12 | Arbre phylogénétique de la souche *M*. SdK644 | 88 |
| Figure. 13 | Test du DDH pour les différentes souches | 91 |
| Figure. 14 | Pouvoir émulsifiant des biosurfactants sur les hydrocarbures et les huiles | 92 |
| Figure. 15 | Evolution de la TS en fonction de la concentration du biosurfactant | 94 |
| Figure.16a | Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *M.* SF | 96 |
| Figure. 16b | Spectre de IR du biosurfactant de la souche *M.* SdK644 | 97 |
| Figure. 16c | Spectre de IR du biosurfactant de la souche *Kp* | 98 |
| Figure. 17 | Variation de : a) DCO, $DBO_5$, b) phosphates, ammonium, c) nitrates et d) matières en suspension ; après 120 heures de (traitement avec la *Marinobacter* SF isolée) | 100 |
| Figure. 18 | Variation de : a) DCO, $DBO_5$, b) phosphates, ammonium, c) nitrates et d) matières en suspension ; après 120 heures de traitement avec le biosurfactant produit par la souche *M*. SF | 102 |
| Figure.19a | Variation de la DCO, $DBO_5$ et MES en fonction du temps | 103 |
| Figure. 19b | Variation des paramètres chimiques | 104 |

| | | |
|---|---|---|
| Figure. 20 | Variation des paramètres chimiques (traitement avec le BS SF | 105 |
| Figure. 21 | a) échantillon brut, b) échantillon traité | 106 |
| Figure. 22 | Evolution du rendement d'élimination en fonction du temps de Contact | 107 |
| Figure. 23 | Effet du pH sur le taux d'élimination | 108 |
| Figure. 24 | Effet de la concentration de l'adsorbat sur le taux d'élimination | 109 |
| Figure. 25 | Effet de la masse de l'adsorbant sur le rendement d'élimination | 110 |
| Figure. 26 | Isotherme d'adsorption | 111 |
| Figure. 27 | Linéarisation du modèle de Langmuir appliquée à l'isotherme d'adsorption | 111 |
| Figure. 28 | Linéarisation du modèle de Freundlich | 112 |
| Figure. 29 | Effet de la concentration du pesticide sur la croissance bactérienne | 115 |
| Figure. 30 | Effet du pH sur la croissance bactérienne | 116 |
| Figure. 31 | Effet de la température sur la croissance | 117 |
| Figure. 32 | Effet de la concentration de l'inoculum sur la croissance | 118 |
| Figure. 33 | Dégradation de la métribuzine au cours du temps | 119 |
| Figure. 34 | Cinétique de variation de la DCO au cours du temps | 119 |
| Figure. 35a | L'écart entre la DO mesurée et la DO calculée | 121 |
| Figure. 35b | L'écart entre le rendement mesuré et le rendement calculé | 122 |
| Figure. 36a | Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur la croissance. | 123 |
| Figure. 36b | Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur le rendement | 124 |
| Figure. 37 | Effet des paramètres sur les deux réponses | 124 |
| Figure. 38a | L'écart entre la DO mesurée et la DO calculée | 126 |
| Figure. 38b | L'écart entre le rendement mesuré et le rendement calculé | 127 |
| Figure. 39a | Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur la croissance | 128 |
| Figure. 39b | Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur le rendement. | 128 |
| Figure. 40 | Effet des paramètres sur les deux réponses (souche *kp)* | 129 |
| Figure. 41a | Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *M.* SdK644 (Mesure de la DCO) | 131 |

Figure. 41b Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *M.* SdK644 (Mesure de la concentration des pesticides) 131
Figure. 42a Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *Kp* (Mesure de la concentration des pesticides) 132
Figure. 42b Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *Kp* (Mesure de la concentration des pesticides 133

# Liste des tableaux


| | | |
|---|---|---|
| Tableau.1 | Quelques caractéristiques physicochimiques de la métribuzine | 32 |
| Tableau.2 | Quelques correspondances entre polluants et bactéries épuratrices | 40 |
| Tableau.3 | Les biosurfactants de haut poids moléculaire | 57 |
| Tableau.4 | Les biosurfactants de faible poids moléculaire | 57 |
| Tableau.5 | Les différentes applications des biosurfactants | 59 |
| Tableau.6 | Caractéristiques de l'Acétamipride | 77 |
| Tableau.7 | Caractéristiques du charbon actif utilisé | 81 |
| Tableau.8 | Criblage des facteurs affectant la croissance | 83 |
| Tableau.9 | Différents niveaux de chaque facteur | 84 |
| Tableau.10 | Évaluation de la croissance bactérienne | 90 |
| Tableau.11 | Quantités des biosurfactants produites | 95 |
| Tableau.12 | Paramètres physico-chimiques du rejet et leurs valeurs limites | 99 |
| Tableau.13 | Paramètres des modèles de Langmuir et de Freundlich | 113 |
| Tableau.14 | Résultats expérimentaux de la biodégradation de l'acétamipride par souche bactérienne *M.* SdK644 | 120 |
| Tableau.15 | Résultats expérimentaux de la souche bactérienne *Kp* | 125 |
| Tableau.16 | Traitement des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *M.* SdK644 | 130 |
| Tableau.17 | Traitement des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *Kp* | 13 |

# Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| % | Pourcentage |
| A | Conductivité de l'échantillon en µS / cm |
| ADN | Acide désoxyribonucléique. |
| ARN | Acide ribonucléique. |
| C0 | Concentration initiale de l'adsorbat (mg/l). |
| Ce | Concentration à l'équilibre du l'adsorbat (mg/l). |
| CMC | Concentration Micellaire Critique |
| DBO5 | Demande Biologique en Oxygène |
| DCO | Demande Chimique en Oxygène |
| $DCO_E$ | Demande Chimique en Oxygène à l'entrée |
| $DCO_S$ | Demande Chimique en Oxygène à la sortie. |
| DDH | Diamètre de déplacement d'huile. |
| DO | Densité optique. |
| $E_{24}$ | Indice d'émulsification. |
| FTIR | Infra-Rouge à Transformée de Fourier. |
| h | heure |
| KF | Constante d'équilibre relative au modèle de Freundlich. |
| KL | Constante d'équilibre relative au modèle de Langmuir |
| LB | Luria Bertani (milieu). |
| m | Masse initiale de l'adsorbant |
| MES | Matières en suspension |
| MM | Milieu minimum. |
| mN/m | Mesure de la tension superficielle en milli Newton/mètre. |
| MSM | Milieu de sels minéraux |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NTK | Azote total Kjeldahl |
| P | La teneur en matières en suspension en $mg.L^{-1}$ |
| PCR | Réaction de Polymérisation en Chaîne |
| pH | Potential Hydrogène |
| Pt | Le phosphore total |
| qe | Quantité d'adsorbat présente sur l'adsorbant (mg/g). |
| R | Rendement eliminatoire(%) |
| S | Salinité |
| TS | Tension de surface. |
| UV | Ultrat violet |
| v | Volume de l'échantillon en ml |
| v/v | Rapport volume/volume |
| Vmax | Taux de croissance spécifique |

# Introduction générale

L'homme a toujours eu comme souci de préserver et aussi accroître ses ressources en eau dont la pollution est fondamentalement causée par le développement considérable de ses activités domestiques et industrielles [1] elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des hydrocarbures.

L'utilisation intensive et abusive des ressources et le rejet anarchique des déchets dans l'environnement contribuent à détériorer notre milieu et à l'apparition de nouveaux risques pour l'équilibre des écosystèmes (air, eau et sol) [2].

En Algérie, les cours d'eau fortement pollués traversent ou passent à proximité d'agglomérations urbaines et de zones industrielles majeures causant ainsi beaucoup de problèmes sanitaires et d'insalubrité aux riverains et Les oueds et leur capacité de dilution et d'autoépuration ne suffit plus à résorber la charge polluante [3].

Les principaux polluants xénobiotiques de l'environnement sont : les pesticides et leurs résidus de chloration, combustion de matières organiques composées, eaux résiduaires diverses, rejets des mines de charbon, dérivés de traitement du pétrole, colorants, produits pharmaceutiques et pétrochimique.

Dans le but de préserver et de restaurer l'environnement et d'éliminer ces polluants, il est donc nécessaire de développer des méthodes fiables et efficaces de dépollution. Les méthodes physiques et chimiques sont appliquées [4], La plupart de ces techniques sont coûteuses et non respectueuses de l'environnement [4]. Toutefois, une approche biologique par bioremédiation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse [5].

Les procédés de dépollution par voie biologique basés sur la biotransformation microbienne des polluants s'adresse aujourd'hui à la plupart des polluants organiques et prend de plus en plus d'importance [6,7].

Afin de développer et d'optimiser les procédés de dépollutions d'effluents industriels et agricoles, contenants de fortes concentrations des polluants, les différents microorganismes du sol représentent les principaux acteurs de ce processus ,où ils permettent de générer grâce à leurs systèmes enzymatiques qui sont très diversifiés des métabolites qui sont souvent moins complexes et toxiques que la molécule du départ [8].C'est pourquoi on assiste dans ces

dernières années à l'émergence d'un ensemble des études ont le but d'isoler, d'identifier, de caractériser et parfois aussi de construire de nouveaux microorganismes doués de nouvelles voies métaboliques et qu'ont la capacité de biodégrader les pesticides ou d'autre polluants connu comme étant persistants [9].

Divers auteurs exposent des études basées sur l'utilisation de ces substances comme principale source de carbone et d'énergie par des microbiotes complexes ou par des souches pures [10].

Pan et al. 2016 [11] ont étudié la dégradation du 1, 1, 1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophényl) éthane (DDT) par une nouvelle bactérie qui a été isolée à partir d'un sol contaminé et identifiée comme *Stenotrophomonas sp.* Par ailleurs il existe plusieurs autres microorganismes comme le cas *d'Escherichia coli, Klebsiella pneumonia*. *Pseudomonas aeruginosa. Bacillus species* capables de dégrader le DDT [12] et à des pourcentages ne dépassant pas les (1%) de dégrader les cyperméthrines [13].

Les souches *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas mendocina* ont également une grande capacité de biodégrader la cyperméthrine et la perméthrine dont la réduction peut atteindre jusqu'à 90% dans un délai de 15 jours [14]. Bordjiba et al. [15] ont isolé diverses espèces de champignons provenant de sols contaminés par des pesticides. En observant que les espèces les plus fréquemment isolées étaient *Aspergillus fumigatus, A. niger, A. terreus, Absidia et Rhizopus microsporus*. Dans ce rapport, 53 des espèces isolées ont été notées pour leur capacité à dégrader l'herbicide métribuzine en milieu liquide. Il a été démontré, en même temps, que l'herbicide a favorisé la croissance des genres *Absidia et Fusarium*. Ces genres étaient capables d'éliminer les 50% du composé après 5 jours. Dans la même étude l'espèce *Botrytis cinerea* ainsi que plusieurs autres bactéries, pourraient éliminer presque complètement l'herbicides métribuzine.

*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* est un halophile modéré qui a été efficace pour réduire l'azote total (TN), le nitrate, le nitrite et l'ammonium [16,17], elle a été identifiée par plusieurs chercheurs. Par exemple : Li et al. [18] ont rapporté que cette souche peut se développer en présence de 20-120 g/l de solution saline et éliminer 94,2 % de nitrate et 80,9 % d'azote total de l'eau synthétique.

On a également signalé que *Marinobacter* sp. F6 était capable d'éliminer tous les nitrates ainsi que 50 % de l'azote total [19].

En général, les micro-organismes identifiés comme dégradateurs de pesticides ont été isolés d'une grande variété de sites contaminés par des pesticides, et les dégradateurs d'hydrocarbures sont isolés de sites contaminés par des hydrocarbures et les dégradateurs d'hydrocarbures sont isolés de sites contaminés par des hydrocarbures.

Il est nécessaire de combiner différentes techniques de traitements entre elles, et l'ajout des biosurfactants pour favoriser la désorption des molécules est souvent choisi. Les tensioactifs, ou "surfactants" ("Surface Active Agent") sont des molécules capables de réduire les tensions interfaciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide. Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants [20]

L'emploi d'agents tensioactifs (surfactants) représente une solution prometteuse aux problèmes de biodisponibilité. Ils peuvent faciliter la désorption et la solubilisation des polluants hydrophobes afin d'augmenter leur accessibilité aux micro-organismes.

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés de pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [21]. 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.

En général, les biosurfactants sont considérés comme l'un des principaux produits de la bioéconomie en raison de leurs diverses activités économiques [22], de leur faible toxicité et de leurs propriétés physicochimiques utiles, ils sont prometteurs pour les activités de bioremédiation environnementale. Notamment le nettoyage des déversements d'hydrocarbures, l'élimination des contaminants de métaux lourds et le traitement des eaux usées [23,24]. Parmi les biosurfactants, nous pouvons citer les rhamnolipides et autres biosurfactants qui peuvent jouer un rôle crucial dans la décontamination des eaux et des sols contaminés [25]. Ces composés tensioactifs naturels peuvent remplacer les tensioactifs. Il existe une énorme demande dans le monde entier pour les tensioactifs dans les différents domaines mentionnés ci-dessus. En raison de l'épuisement des sources fossiles, les agents de surface synthétiques seront un jour menacés d'extinction.

Le but principal de ce travail consiste à déterminer si des micro-organismes métabolisant des HAP posséderaient aussi la faculté de dégrader des pesticides et les utiliser comme source de carbone, ainsi que la production et la caractérisation de leurs biosurfactants.

Le présent mémoire se subdivise en trois parties. La première représente une analyse de la littérature scientifique où sont exposées la pollution des eaux et le traitement biologique. La connaissance des propriétés et des modes d'action des biosurfactants a aussi fait l'objet de cette première partie bibliographique.

La seconde partie, est réservée à la présentation de la méthodologie adoptée pour la réalisation de notre travail. La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale et des perspectives.

# Références

[1] Khalfaoui .B, Hassen Meniai. A, Rafael. Borja. (1995).Removal the copper from waste water by raw charcoal obtained from reeds. *J. Chem. Tech. Biotechnol*. 64, 153-156.

[2] Ortiz-Hernández. M.L, Sánchez-Salinas.E, Olvera-Velona. A and Folch-Mallol. J.L.(2011) Pesticides in the environment: impacts and their biodegradation as a strategy for residues treatment. *ACADEMIA, Accelerating the world's research*.

[3] Garnier. J, Marescaux. A, Guillon. S, Vilmin. L, Rocher,V and al.(2019).Ecological Functioning of the Seine River : From Long-Term Modelling Approaches to High-Frequency Data Analysis. *The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg.* 90 : 1–28.

[4] Azubuike.C.C, Chikere. C.B, Okpokwasili. G.C. (2016). Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32 (11): 180.

[5] Nikitha. T, Satyaprakash. M, Vani. S.S, Sadhana. B, Padal. S. (2017). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: their transport, fate and biodegradation in the environment. *Int. J .Curr. Microbiol .Appl. Sci*, 6(4): 1627-1639.

[6] Navacharoen. A, Vangnai. A. S. (2011). Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 65: 818–82.

[7] Wang. J, Liu. G. F., Lu .H, Jin. R. F, Zhou .J. T, Lei .T. M. (2012). Biodegradation of Acid Orange and its auto-oxidative decolorization product in membrane-aerated biofilm reactor. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 67: 73–77.

[8] Doolotkeldieva .T, Konurbaeva. M & Bobusheva. S. (2018) .Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environmental Science and Pollution Research*. 25(32) : 31848-31862.

[9] Sharma .A.K, Pandit. J, Gautam .V & Shirkot P. (2019) .Optimisation of culture conditions for maximizing Extracellular Organophosphorus hydrolase activity in *Pseudomonas* strains with Chlorpyrifos degradation potential. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 8(1): 322-326

[10] Afzal. M, Iqbal .S, Rauf. S, Khalid .ZM. (2007). Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *J Hazard Mater.* 149 : 60–66.

[11] Pan .X, Lin. D, Zheng .D, Zhang.Q, Yin. Y, Cai. L, Fang .H et Yu. Y. (2016). Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: Characterization and genome functional analysis .*Sci. Rep*. 6: 21332.

[12] Chauhan. A, Singh .J. (2015). Biodegradation of DDT. *J Textile Sci Eng* 5: 183.

[13] Murugesan. A.G, Jeyasanthi. T, Maheswari .S. (2010) Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from Brinjal cultivated soil. *African Journal of Microbiology Research* .4: 10-13.

[14] Mendoza .J. C, Perea .Y et Salvador .J. A. (2011). Bacterial biodegradation of permetrina and cipermetrina pesticides in a culture assemblage, *Avancesen Cienciase Ingenieria.* 2(3): 45–55.

[15] Bordjiba .O, Steiman. R, Kadri .M, Semadi .A, Guiraud P. (2001). Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*. 30(2): 418-426.

[16] Vitte.R. Duran ,G. Hernandez-Raquet, J. Mounier, R. Jézéquel, V. Bellet, P. Balaguer, P. Caumette & C. Cravo-Laureau. (2013). Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations *Applied Microbiology and Biotechnology* . 97: 4199–4211

[17] Hoang. T. H, Shahsavari. E, Bott. N. J, Ball. A.S. (2021). Bioaugmentation of seafood processing wastewater enhances the removal of inorganic nitrogen and chemical oxygen demand, *Aquaculture*. 542: 736818

[18] Li. R, Zi. X, Wang. X, Zhang. X, Gao. H, Hu. N. (2013). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus NY-4*, a novel denitrifying, moderately halophilic marine bacterium. *Springer Plus*. 2: 1–9

[19] Zheng. H.-Y., Liu. Y, Gao. X.-Y, Ai. G.-M, Miao. L.-L, Liu. Z.-P. (2012). Characterization of a marine origin aerobic nitrifying–denitrifying bacterium.*J. Biosci. Bioeng* . 114 : 33–37.

[20] Banat. I.M, Makkar. R.S, Cameotra. S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 53 : 495–508.

[21] Vipulanandan.C, Ren. X.(2000) Enhanced Solubility and Biodegradation of Naphthalene with Biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering.* 126(7):629.

[22] Płaza. Get Achal. V. (2020).Biosurfactants: Eco-Friendly and Innovative Biocides against Biocorrosion. *Int. J. Mol. Sci. 21*(6): 2152.

[23] Guemiza. K, Coudert. L, Metahni,.S, Mercier. G, Besner. S, Blais. J. F. (2017). Treatment technologies used for the removal of As, Cr, Cu, PCP and/or PCDD/F from contaminated soil: A review.*J Hazar. Mater*.333 **:**194 -214.

[24] Mulligan. C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *environmental pollution*, 133(2), 183-198.

[25] T. Malkapuram, V. Sharma, S. P. Gumfekar, S. Sonawane, S. Sonawane, G. Boczkaj,S. M. M. Seepana.(2021). A review on recent advances in the application of biosurfactants in wastewater treatment. *Sust. Ene. Tech. Asse*. 48 :101576.

# Partie I

# Revues bibliographiques

# Chapitre I

# Généralité sur la pollution des eaux

## I. 1 Introduction

La question du traitement et du devenir des eaux usées a revêtu une importance croissante au début des années 1970, compte tenu de la préoccupation mondiale face au problème de plus en plus important de la pollution de l'environnement humain, de l'atmosphère, des lacs, des rivières, des océans et des eaux souterraines. Les eaux usées sont des eaux altérées par les activités humaines à la suite d'un usage domestique, industriel, artisanal, agricole ou autre. Ces eaux sont considérées comme polluées et ne peuvent être rejetées dans les eaux réceptrices sans traitement préalable. En effet, les cours d'eau ont une capacité naturelle d'épuration, mais cette capacité a pour effet de consommer l'oxygène de la rivière et n'est pas sans conséquences sur la faune et la flore aquatique. Lorsque l'importance du rejet excède la capacité d'autoépuration de la rivière, la détérioration de l'environnement peut être durable. Les zones privées d'oxygène par la pollution entraînent la mort de la faune et de la flore ou créent des barrières infranchissables empêchant notamment la migration des poissons. Pour protéger la santé publique et l'environnement, il est nécessaire de connaître

(1) les constituants qui composent les eaux usées.

(2) les impacts de ces constituants quand les eaux usées sont dispersées dans 'environnement,

(3) la transformation et le cheminement (la destination) à long terme de ces constituants dans les processus de traitement

(4) les méthodes de traitement qui peuvent être utilisées pour enlever ou modifier les constituants trouvés dans les eaux usées.

## I. 2 Classement des effluents

Les effluents résiduaires peuvent se classer en effluents domestiques, effluents industriels et effluents urbains [1]

### I. 2. 1 Les eaux usées domestiques

Elles proviennent des différents usages domestiques de l'eau. Elles sont essentiellement porteuses de pollution organique. Elles se répartissent en eaux ménagères, qui ont our origine les salles de bains et les cuisines, et sont généralement chargées de détergents, de graisses, de solvants, de débris organiques, etc. et en eaux "vannes" ; il s'agit des rejets des toilettes, chargés de diverses matières organiques azotées et de germes fécaux.

La pollution journalière produite par une personne utilisant de 150 à 200 litres d'eau est évaluée à :

a) de 70 à 90 grammes de matières en suspension.

b) de 60 à 70 grammes de matières organiques.

c) de 15 à 17 grammes de matières azotées.

d) 4 grammes de phosphore.

e) plusieurs milliards de germes pour 100 ml [2].

### I. 2. 2 Les eaux pluviales

Elles peuvent, elles aussi, constituer la cause de pollutions importantes des cours d'eau, notamment pendant les périodes orageuses. L'eau de pluie se charge d'impuretés au contact de l'air (fumées industrielles), puis, en ruisselant, des résidus déposés sur les toits et les chaussées des villes (huiles de vidange, carburants, résidus de pneus et métaux lourds...). En outre, lorsque le système d'assainissement est dit "unitaire", les eaux pluviales sont mêlées aux eaux usées domestiques. En cas de fortes précipitations, les contraintes de préservation des installations d'épuration peuvent imposer un déversement ("délestage") de ce "mélange" très pollué dans le milieu naturel. Enfin, dans les zones urbaines, les surfaces construites rendent les sols imperméables et ajoutent le risque d'inondation à celui de la pollution [2].

### I. 2. 3 Les eaux industrielles

Elles sont très différentes des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des hydrocarbures. Certaines d'entre elles doivent faire l'objet d'un prétraitement de la part des industriels avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte. Elles sont mêlées aux eaux domestiques que lorsqu'elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution [2].

Les effluents industriels sont diversifiés. Ils s'opposent en cela aux rejets domestiques dont la composition est relativement constante. L'appréciation de la pollution par ces rejets est donc difficile parce que chaque type d'industrie pose un cas particulier**.**

Une classification des effluents doit être pris menée pour assurer un traitement efficace. Même si toute classification de ces effluents parait arbitraire

Il est tout de même possible de distinguer ces effluents de par leur caractère minéral ou organique. Il est classique, par exemple, de distinguer, les eaux usées à caractère minéral dominant) les eaux usées à caractère organique dominant) les eaux usées mixtes.

Dans la première catégorie (eaux usées à caractère minéral dominant), on trouve les exploitations de mines, les traitements de minerais et de terre, les industries métallurgiques et les industries chimiques minérales. Dans la deuxième catégorie, celle des eaux usées à caractère organique dominant, on peut placer les abattoirs et les ateliers de traitement des os et des déchets animaux, les industries alimentaires en général (laiterie, sucreries, distilleries, brasserie, fabrique de conserve). Les principales composantes de ces eaux usées sont : les matières solides de lavage (Terre, sable, argile) ; des déchets végétaux ou animaux (souvent fermentescibles), des enzymes divers et des sels dissouts. Dans les eaux dites mixtes, on situera les industries textiles, les industries de produits forestiers (papetières), les industries de caoutchouc, les industries de cuir et les distilleries de bois et de charbon. On trouvera dans ces eaux, à divers degrés, les apports que venons de citer pour les deux catégories précédentes.

### I. 3 La pollution des eaux

La pollution de l'eau peut se présenter sous différente formes : naturelle, chimique (pesticides, hydrocarbures, nitrates, phosphates, métaux lourds), bactériologique (virus, bactéries), thermique [3].

### I. 3. 1 Pollution naturelle

La pollution des ressources en eau peut avoir de multiples origines. Il y a, bien sûr, toutes les formes de pollution consécutives aux activités humaines, qu'il s'agisse des pollutions domestiques et urbaines, industrielles ou agricoles. Mais, il existe aussi des pollutions "naturelles" de l'eau, qui rendent celle-ci impropre à la consommation par l'homme.

Certains phénomènes naturels ; par exemple, le contact de l'eau avec les gisements minéraux, peut, par érosion ou dissolution, engendrer des concentrations inhabituelles en métaux lourds, en arsenic, etc. Des éruptions volcaniques, des épanchements sous-marins d'hydrocarbures...peuvent aussi être à l'origine de pollutions [4].

### I. 3. 2 Pollution chimique

#### I. 3. 2. 1 Matière organique biodégradable

Un produit est dit biodégradable si après usage il peut être décomposé (digéré) naturellement par des organismes vivants. La biodégradabilité est un des paramètres les plus importants pour caractériser l'impact environnemental d'un produit organique. Par exemple, une feuille morte est biodégradable à 100% en quelques semaines alors qu'une bouteille plastique nécessite environ 4.000 ans [5].

Comme exemple de cette catégorie de matière organique on peut citer les abattoirs qui constituent sans doute l'exemple-type de ces industries où l'eau est utilisée pour le lavage des sous-produits (abats) et l'élimination des déchets (matières fécales, débris de panse et de sang). En Europe, les volumes d'eau usée rejetés sont évalués entre 6 et 9 litres par kg de carcasse de bovins, et de 5 à 11 litres par Kg de carcasse de porcins [6]. Les effluents, de ces abattoirs sont caractéristiques et nécessitent des traitements adaptés (séparation des déchets solides et des graisses, traitements spécifiques). Plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation et au traitement de ce type d'eaux usées par le biais des stations d'épuration soit par des procédés aérobies [7,8]. Soit par de procédés anaérobies [9,10]. D'autres procédés de traitement sont adoptés pour l'épuration des eaux usées d'abattoir à savoir l'infiltration sur sable [11] et l'électrocoagulation.

La plupart des données sur la qualité des eaux usées d'abattoir ont été produites en Europe [12,13], Australie [14], les Etats-Unis [15] et l'Afrique [16,17] et peu d'information existe sur la caractérisation et le traitement des eaux usées d'abattoir au Maroc.

#### I. 3. 2. 2 Matière organique non biodégradable : Polluants émergents, récalcitrants et toxicité des effluents résiduaires

Depuis le 20$^{ème}$ siècle, une industrialisation intense et incontrôlable se développe dans plusieurs pays du monde et ce, dans divers secteurs d'activités : industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques, pétrolières, etc. Cette industrialisation intense entraîne dans l'environnement l'apparition de polluants émergents réfractaires. Au nombre de ces polluants couramment décelés dans les rejets industriels et urbains, se trouvent des hormones et dérivés hormonaux, des pesticides, des colorants , des composés phénoliques , des antibiotiques, des organochlorés, des produits cosmétiques etc., ces composés rentrent pour la plupart dans la catégorie des polluants émergents appelés perturbateurs endocriniens (PE).[18] Ces substances ont la capacité d'altérer le bon fonctionnement du système hormonal humain ou animal [19].

Elles sont à l'origine des nombreuses perturbations de la faune aquatique (féminisation des populations et disparition de la faune aquatique, etc.) et constituent également un risque pour la santé humaine (naissance prématurée, malformation des organes génitaux, baisse du quotient intellectuel, etc.) [20], tel que mentionné par plusieurs auteurs [21], les rejets issus des stations d'épuration sont l'une des causes principales de l'apport des composés perturbateurs endocriniens dans l'environnement. Des concentrations allant jusqu'à 100 ng. L-1 peuvent être décelées dans les eaux usées résiduaires) [22], alors que des concentrations aussi faibles que 0.1 ng. L-1 peuvent entraîner des effets ostrogéniques chez les organismes aquatiques [22]. Ces composés sont souvent présents à l'état de trace, c'est à dire à des niveaux de concentrations allant du ng. L-1 à quelques dizaines de µg.L-1, dépendamment du type dépollution (pollution diffuse ou ponctuelle). Ces composés ne participent globalement qu'à une très faible proportion de la matière organique dissoute (1% du COD), mais leur présence dans les eaux est à prendre en considération en raison de la toxicité potentielle pour l'homme. La présence de ces composés organiques persistants dans l'environnement constitue ainsi une des problématiques émergeantes associées aux traitements des eaux usées. Ces composés réfractaires sont nombreux et échappent pour la plupart à l'épuration classique des eaux usées comprenant un prétraitement physico-chimique suivi d'un traitement biologique par biomasse libre (boue activée) ou fixée (bio-filtration).

### I. 3. 3 Les pesticides

Les pesticides sont définis comme étant des substances toxiques destinées à lutter contre les parasites d'origine animale ou végétale. Grâce à leurs propriétés (insecticide, nématoïde, acaricide, herbicide), leurs domaines d'utilisation sont très variés. C'est ainsi qu'ils permettent d'éliminer les parasites des cultures (champignons, bactéries, nématodes, mauvaises herbes...) ou tout au moins les réduire à un seuil économiquement tolérable. Ils sont également utilisés lors du stockage des denrées alimentaires des semences pour les protéger des attaques de parasites divers. L'agriculteur n'est pas le seul utilisateur de pesticides, de nombreux autres industriels les utilisent (les services des parcs et jardins des grandes villes). Les rejets d'industrie de fabrication de pesticides dans les rivières, via des égouts, sont également de sources de pollution de l'environnement et des eaux [23]

Les principales familles chimiques des pesticides sont classées ci-dessous :

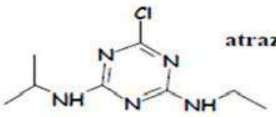
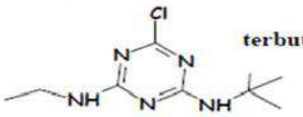
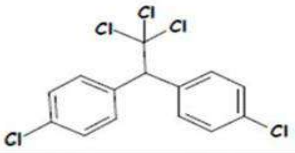
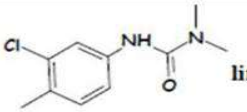
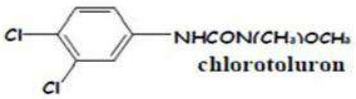
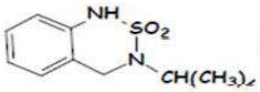
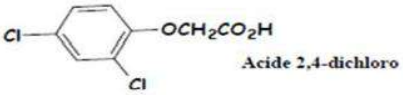
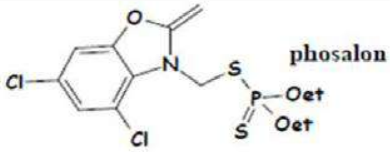
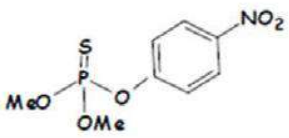
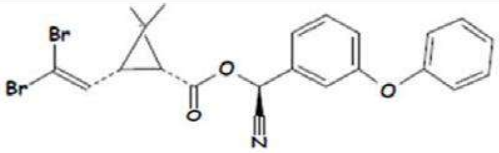
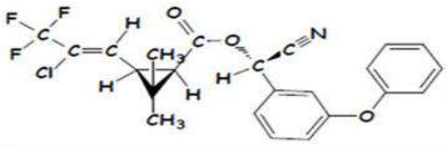
| Famille chimique | Exemple de pesticides |
|---|---|
| Triazines |  atrazine  terbutylazine |
| Organochlorés |  DDT |
| Urées substituées |  linuron  chlorotoluron |
| Acides et amines |  bentazone  Acide 2,4-dichloro |
| Organophosphorés |  phosalon  Mathyl parathion |
| Pyréthrenoide |  deltaméthrine  lambdacyhalothrine |

**Figure. 1** Classification des pesticides [24]

Parmi ces pesticides, la Métribuzine et l'Acétamipride sont des herbicides appartenant à la famille des triazines et des néonicotinoïdes respectivement, ils présentent un intérêt important vue leur utilisation dans les zones agricoles en Algérie (région de Médéa).

### I. 3. 3. 1 La Métribuzine

#### a- Définition

La métribuzine appartient à la famille des herbicides. Elle est introduite dans l'environnement par son application aux plantes et/ou aux sols. Cet herbicide subis une variété de processus de dégradation et de transport. Il est commercialisé pour la première fois par « The American Cyanamid Company ». Ce type d'herbicide est préconisé pour le contrôle des mauvaises herbes

dans les champs de cultures légumineuses, de céréales, de tournesol et d'arachide et utilisés au l'Algérie dans les champs de pomme de terre.

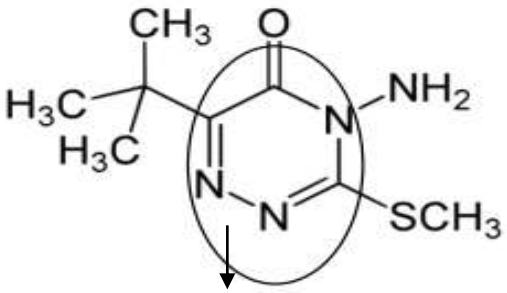
La Métribuzine (C8H14N4OS) est un herbicide sélectif, sa matière active est homologuée pour utilisation sur certains végétaux (luzerne, asperge, orge, carotte, pois-chiche, féverole, maïs de grande culture, lentilles, pois, pomme-de-terre, soja, lupin blanc doux, tomate et blé), les arbres fruitiers (pommier, abricotier, cerisier, pêcher, poirier et prunier) pour combattre les graminées annuelles et les dicotylédones [25].

**b- Propriétés physico-chimiques** [26]

Les principales caractéristiques physico-chimiques et environnementales de la Métribuzine sont données sur le tableau I.

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques et environnementales de la Métribuzine

| **Fonction** | **Herbicide** |
|---|---|
| Groupe Chimique | Triazinone |
| Matière active | Métribuzine |
| Nom chimique | amino-4 tert-butyl-6 (méthylthio)-3 triazine-1,2,4 one-5 |
| Les propriétés chimiques | Formule moléculaire : $C_8 H_{14} N_4 OS$<br>Masse Moléculaire : 214.3 g /mol<br>Point de fusion : 257 ° F, 126.2 °C<br>Solubilité maximale dans l'eau : $1{,}05\times10^{+3}$ mg/l à 20 °C<br>Tension de vapeur à 20 °C : est inférieur à $1{,}3\times10^{-3}$ PA<br>Toxicité : DL50 chez les rats est de 2200 mg/kg<br>DJA est de 0,025 mg/kg/jour<br>PKa: 1.0 à 21.8°C<br>Density: 1,31g/cm3 a 20 °C |
| Description physique | La Métribuzine est un solide cristallin blanc incolore avec une faible odeur |




Groupe de triazines

**Figure. 2** La structure chimique de la Métribuzine

Ce groupe des triazines présente une structure cyclique, sont en général peu solubles dans l'eau. Leur persistance peut ainsi atteindre 6 à 12 mois pour certains. Elles possèdent une grande stabilité chimique et sont assez fortement adsorbées sur le complexe argilo-humique, c'est en raison de l'importance de la contamination des eaux.

**c- Comportement de la métribuzine dans l'environnement**

Au niveau de sa dispersion dans l'environnement, la Métribuzine présente des qualités intéressantes lorsqu' elle est utilisée avec un surfactant approprié. Le degré de la lixiviation dans la nappe phréatique est une fonction inverse de la teneur du sol en matières organiques. Les demi-vies mesurées ont été indiquées entre 5 et 50 jours [27].

**d- Comportement de la Métribuzine dans l'eau**

Aujourd'hui, les herbicides sont reconnus comme des substances chimiques relativement dangereuses pour les écosystèmes [28]. La concentration maximale de la Métribuzine dans l'eau potable est fixée à 0,08 mg/l [29]. Sa demi-vie dans les eaux stagnantes est d'environ sept jours. Les types les plus communs d'herbicides trouvés dans l'eau extérieure des Etats-Unis et du Canada sont l'atrazine et la métribuzine.

**e- Comportement de la métribuzine dans les sols**

La métribuzine est de persistance modérée dans le sol, La demi-vie de ce polluant dans le sol change selon son type et les conditions climatiques [30]. Comme il est faiblement absorbé dans les sols, donc son potentiel de lixiviation vers les eaux souterraines est élevé, ce sont les

microorganismes qui dégradent la métribuzine non absorbée par les plantes et non adsorbée par le sol. Les pertes par la volatilisation et/ou photo dégradation sont négligeables.

**f- Dégradation de la Métribuzine**

La décomposition de la métribuzine dans l'environnement est due en grande partie aux processus microbiologiques et chimiques et la dégradation microbienne est la principale voie d'élimination de la métribuzine du sol [31]. Elle serait rapidement détoxifiée par désamination par le champignon du sol [32].

La dégradation de la métribuzine augmente avec l'augmentation du pH. En conséquence, le pH est directement lié à sa phytotoxicité et sa mobilité vers les écosystèmes. Par ailleurs, comme l'adsorption augmente graduellement quand le pH diminue jusqu'au pKa de la métribuzine (la protonation du groupement amine due à l'adsorption de la métribuzine sur la matière organique.

La figure 3 montre les métabolites de dégradation de la métribuzine dans les sols. Les métabolites de la métribuzine sont la déaminoMétribuzine (DA), la déaminodiketo métribuzine (DADK) et la dikétoMétribuzine (DK) [32].

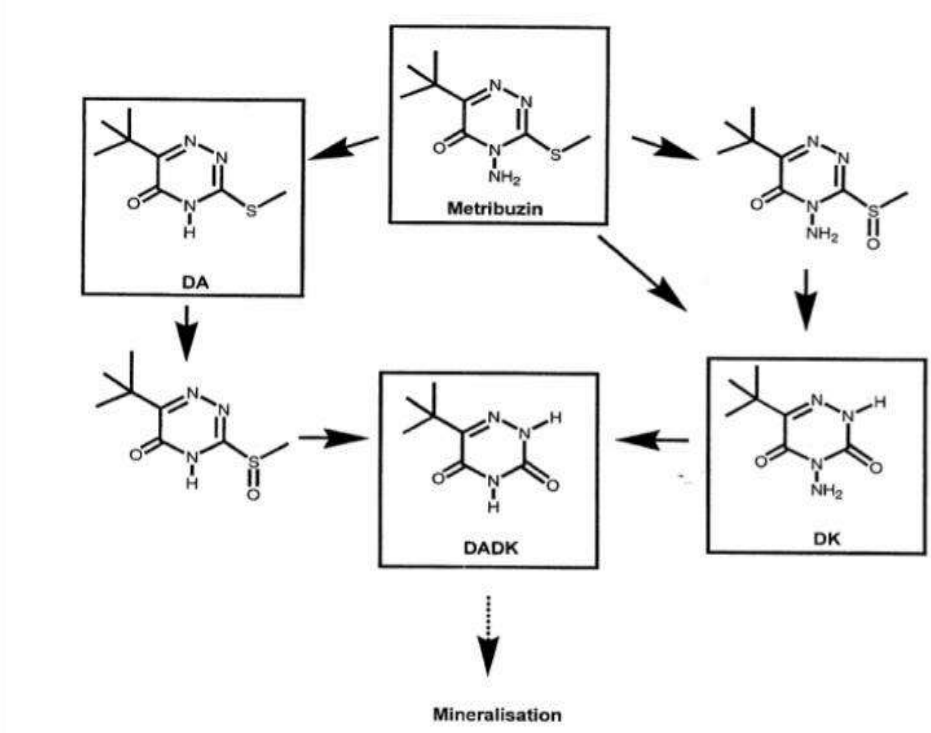



**Figure.3.** Dégradation de la métribuzine dans les sols [32].

Des rapports indiquent, les métabolites identifiés dans les tissus sont le métabolite désaminé, le métabolite dicéto est de 2 à 3 fois plus toxique pour les rats que le composé mère, ,alors que les métabolites désaminé et dicéto désaminé ont une toxicité équivalente [33].
Bien que la métribuzine subisse une certaine dégradation non biologique, la métabolisation microbienne demeure le principal mécanisme d'élimination de cette substance dans le sol. Les constantes relatives aux vitesses de dégradation de la métribuzine sont étroitement liées à l'activité microbienne et fortement corrélées avec la quantité d'herbicide disponible dans la solution de sol, le coefficient d'absorption de Freundlich, la teneur en argile, en sable et en matières organiques du sol et la quantité de potassium disponible [34].

### I.3.3.2 L'acétamipride

#### a-Définition

L'acétamipride est un insecticide appartenant à la famille des néonicotinoïdes.
De formule moléculaire $C_{10}$ $H_{11}CN_4$, il est un nouvel insecticide structurellement proche des autres insecticides nicotinoides originaires de l'imidaclopride qui a été mis sur le marché depuis 1992 [35]. C'est une molécule découlant de la nicotine, importante dans la protection globale des cultures en raison de son large spectre d'efficacité, de son action translaminaire, de son activité résiduelle et de son mode d'action unique [36]. Ce qui fait de lui l'insecticide le plus utilisé à travers le monde.

#### b-Caractéristiques physico-chimiques [37]

L'acétamipride ou (E)-N 1 -[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N 2 -cyano-N 1 –methyl
est soluble dans l'eau mais n'est pas volatile selon ses propriétés physico-chimiques (Tableau 2). Il est également soluble dans les solvants organiques. Le coefficient de partage octanol / eau indique que l'acétamipride ne se lie pas fortement à la matière organique et a donc peu de potentiel de bioaccumulation. Il n'est pas persistant dans le sol et est stable à pH compris entre 4 et 7.

#### c-Caractéristiques toxicologiques de l'acétamipride

L'acétamipride comme un "peu probable" cancérogène pour l'homme parce qu'il n'existe aucune preuve de cancérogénicité, neurotoxicité, mutagène et/ou de perturbation endocrinienne. L'acétamipride présente une toxicité aiguë et chronique chez les mammifères. L'exposition par voie alimentaire est la plus élevée chez les enfants (1 à 6 ans) et est estimée à 0,039606 mg/kg de poids corporel (95eme percentile d'exposition) (EPA,

2002).[38] Zhang et al. (2011) [39] ont montré chez des souris mâles exposées à l'acétamipride une altération du système reproducteur suite à un effet au niveau du poids des testicules, de l'épididyme, de la vésicule séminale, de la prostate, de la quantité de sperme, du taux de testostérone, de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes. L'acétamipride entraîne également l'épuisement et l'appauvrissement.

### I. 4 Les indicateurs de pollution

#### I. 4. 1 Matières solides en suspension (MES)

La distinction porte sur la taille des composés contenus dans l'eau.

*les matières en suspension · taille supérieure à 1 micron, responsables essentiellement de troubles de l'eau ; les plus lourdes sédimentent rapidement et constituent les matières décantables, ces produits peuvent être d'origine minérale (sable, limons, argiles) ou organique (produits de la décomposition des matières végétales ou animal.

*les matières dissoutes ou liquides taille inférieure à 1/1000 micron. Certains de ces liquides (huile, hydrocarbures, ...) ne se mélangent pas à l'eau. Disposés en fines gouttes, on dit qu'ils forment alors des émulsions.

*Matières colloïdales : la taille intermédiaire, qui participent au trouble et à la coloration de l'eau. Ces matières colloïdales ne sont pas décantables [40].

**I. 4. 2 DCO :** Elle correspond à une estimation des matières oxydables présentes dans l'eau, quel que soit leur origine organique ou minérale [40].

**I. 4. 3 DBO5 :** Demande Biologique en Oxygène (DBO) est la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes pour assimiler la pollution biodégradable sur une période définie. En effet, une période allant de 21 à 28 jours serait nécessaire aux micro-organismes pour assimiler la totalité de la pollution biodégradable. Il a été déterminé qu'une période de 5 jours correspondait à l'assimilation de la pollution biodégradable carbonée (oxydation), et qu'ensuite les micro-organismes assimilaient la pollution biodégradable azotée (nitrification) [40].

**I. 4. 4 Nitrates :** Les nitrates qui se trouvent naturellement dans les eaux proviennent, majoritairement, de l'action de l'écoulement des eaux sur le sol qui constitue le bassin versant. Leurs concentrations naturelles ne dépassent pas 3 mg /L dans les eaux superficielles et quelques mg/l dans les eaux souterraines. La nature des zones de drainage joue donc un rôle essentiel dans leur présence et l'activité humaine accélère le processus d'enrichissement des eaux en nitrates. La teneur en nitrates est en augmentation ces dernières années, de l'ordre de

0,5 à 1 mg/l/an, voire 2 mg/l/an dans certaines régions. Cette augmentation est due principalement, à l'agriculture intensive avec utilisation massive d'engrais azoté et les rejets d'effluents d'élevage. Cette source représente les 2/3 de l'apport en nitrates dans le milieu naturel. Ainsi, les rejets des eaux épurées des stations d'épuration où l'élimination de l'azote n'est pas total, donnent des nitrates ou des ions ammonium qui se transforment en nitrates dans le milieu naturel. Une source urbaine qui représente les 2/9 des apports en nitrates. Sans oublier les rejets des industries minérales, en particulier, de la fabrication des engrais azotés, qui constituent la troisième source industrielle et qui représente 1/9 des apports en nitrates [41].

**I. 4. 5 Azote ammoniacal :** Pour désigner l'azote ammoniacal, on utilise souvent le terme d'ammoniaque qui correspond au formes ionisées ($NH_4^+$) et non ionisées ($NH_3$) de cette forme d'azote.

L'ammoniaque constitue un des maillons du cycle de l'azote. Dans son état primitif, l'ammoniac ($NH_3$) est un gaz soluble dans l'eau, mais, suivant les conditions de pH, il se transforme soit en un composé non combiné, soit sous forme ionisée ($NH_4^+$). Les réactions réversibles avec l'eau sont fonction également de la température et sont les suivantes

$$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4OH \longrightarrow NH_4^+ + OH^- \quad [42]$$

**I. 4. 6 NTK :** azote total Kjeldahl est une appellation qui désigne la somme de l'azote ammoniacal et de l'azote organique ($N_{org}$ + N-$NH_4$). Par la méthode Kjeldahl, l'azote ammoniacal et l'azote organique sont dosés simultanément. Ces deux formes d'azote sont présentes dans les détritus organiques soumis aux processus biologiques naturels. La présence d'azote organique dans les eaux résiduaires provient des abattoirs, de certaines usines chimiques utilisant de l'azote organique dérivé des protéines animales, de la décomposition de la matière organique et l'épandage d'engrais [43].

**I. 4. 7 Pt :** Le phosphore total est la somme du phosphore organique et le phosphore minéral. La présence du phosphore dans les effluents industriels provient surtout des détergents, des engrais et de la décomposition de la matière organique [44].

Dans la plus part des cas l'élimination de la pollution qu'elle soit carbonée phosphatée ou azotée, par voie biologique, s'appuie toujours sur des procédés qui reproduisent artificiellement ou non les phénomènes naturels d'autoépuration existant dans la nature [45].

### I. 4. 8 Paramètres biologiques

La composition des eaux usées est extrêmement variable, en fonction de leur origine industrielle ou domestique. Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux microorganismes Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. L'ensemble de ces microorganismes est classé en quatre grands groupes : les bactéries, les protozoaires, les virus et les helminthes [46].

## I. 5 Principe du traitement biologique

Les procédés de décontamination biologiques sont les plus couramment utilisés en assainissement des eaux résiduaires. En effet, ces procédés où les bactéries sont les principaux acteurs de la dégradation sont relativement peu coûteux et aisés à mettre en place. Leur efficacité pour l'élimination des polluants plus difficile ment biodégradables peut être améliorée par utilisation de microorganismes spécifiques et par fixation de ceux-ci sur des supports, ce qui leur permet de mieux supporter les chocs toxiques et les débits très variables. Généralement économique, le traitement biologique est choisi lorsque l'effluent contient des composés biodégradables et non toxiques. Deux voies sont possibles pour réaliser la transformation des composés organiques : la voie aérobie si l'oxygène de l'air est associée et la voie anaérobie si la dégradation s'effectue à l'abri de l'air (en milieu réducteur) [47].

### I. 5. 1 Classification des bactéries épuratrices

Les bactéries qui participent au processus d'épuration des eaux usée sont classées :

Selon leurs sources de carbone :

- Bactéries autotrophes : Elles utilisent le carbone du $CO_2$.
- Bactéries hétérotrophes : contrairement aux autotrophes, les bactéries hétérotrophes ne peuvent pas utiliser le $CO_2$ comme source de carbone, elles doivent donc oxyder les composés organiques afin de récupérer le carbone qui les compose.

Selon la source d'énergie :

- Bactéries lithotrophes : utilisent les composés minéraux (inorganiques) comme source d'énergie.
- Bactéries chimiotrophes : utilisent des composés organiques comme source d'énergie.
- Bactéries phototrophes : utilisent la lumière comme source d'énergie.

Selon l'affinité avec l'oxygène :

- ❖ Bactéries aérobies obligatoires : comprend les bactéries qui ne peuvent se développer en absence de l'oxygène. Elles consomment alors la matière organique et la transforment au moyen de leur métabolisme aérobie en partie en nouvelle biomasse microbienne et en partie en dioxyde de carbone $CO_2$ en eau et en matière minérale.
- ❖ Bactéries anaérobies obligatoires : comprends les bactéries qui ne peuvent se développer enprésence de l'oxygène et conduit à la formation essentiellement du méthane $CH_4$, le dioxyde de carbone $CO_2$, et de l'eau.
- ❖ Bactéries anaérobies facultatives : comprends les bactéries qui se développent avec ou sans oxygène [9].

### I. 5. 2 Présentation de la biomasse épuratrice de la boue activée

L'épuration biologique due à l'action des bactéries permet la décomposition de la matière organique par une nitrification en zone aérobie, une dénitrification en absence d'oxygène et éventuellement une zone anaérobie en profondeur qui assure la digestion d'autre composés organiques (phosphate et sulfate).

#### a) Les bactéries réduisant les carbonates

Ce sont les bactéries anaérobies capables d'oxyder les composés organiques, qui sont principalement représentées par les bactéries méthanogènes productrices du méthane $CH_4$, tel que *Méthanococcus, Méthanobacillus* sporulés et *Methanobacterium*, non sporulés.

#### b) Les bactéries nitrifiantes

Ces bactéries strictement aérobies vivent dans les eaux, même polluées, ou elles participent à l'épuration biologique, les Nitrosomonas oxydent l'azote ammoniacal $NH_4^+$ en Nitrite $NO_2^-$ alors que les Nitrobacters oxydent les Nitrites en Nitrates $NO_3^-$.

#### c) Les bactéries réduisant les nitrates

On les appelle également les bactéries dénitrifiâtes elles sont strictement hétérotrophes, consommatrices de la pollution carbonée. Un certain nombre possède la faculté de se servir de l'oxygène fixé dans la molécule $NO_3^-$, lorsqu'elles se trouvent plongées dans des conditions d'anoxie. L'azote libéré sous forme de diazote $N_2$ gazeux se volatilise par la suite en retournant vers l'atmosphère, c'est ce qu'on appelle la dénitrification.

#### d) Les bactéries déphosphatantes

Les bactéries considérées comme étant les spécialistes de la déphosphatation biologique sont principalement les *Acinebactèr/ Moraxella*. Le processus de la phosphatation se fait par alternance des séquences anaérobies/ aérobies en modifiant l'équilibre enzymatique et induit par la suite des phases de suraccumulation de phosphore. En condition d'anaérobiose, la bactérie relargue du phosphore, puis dès que la concentration en oxygène remonte, elle le réabsorbe. L'assimilation du phosphate par la bactérie peut servir par la suite soit de réserve d'énergie soit de réserves de phosphore [9]. Les bactéries impliquées dans l'épuration des eaux usée sont regroupées dans le tableau 1 [9].

**Tableau.2.** Quelques correspondances entre polluants et bactéries épuratrices **[9]**

| | |
|---|---|
| Nitrates | *Thiobacillus,paracoccus,pseudomenas* |
| Phosphates | *Acinetobacter,moraxella,bordtella, pseudomenas,falvobactérium* |
| Dioxines | *Brevibactérium* |
| Cyanures | *Thiobacillus* |
| Composés soufrés | *Thiobacillus, desulfovibrio, thiotrix, mirohtrix* |
| Huiles et graisses | *Pseudomenas, xanthomonas, Thiobacillus* |
| Hydrocarbures | *Acinetobacter, falvobactérium, bacillus, Pseudomenas, achromobacter, arthrobacter* |
| Métaux lourds | *Thiobacillus, zooglea* |
| Caoutchoucs | *Thiobacillus, sulfolobus* |

Les recherches actuelles portent d'abord sur l'activité des bactéries qui sont les plus nombreuses et les plus actives dans les processus de biodégradation. Pour assouvir à leur besoins d'énergie, ces bactéries se nourrissent de composés organiques de minéraux ou de lumière entrainant ainsi un processus de biodégradation.

Dans certain cas cette biomasse est suffisamment active naturellement, pour permettre de réduire l'impact de pollution, ce concept récent doit être cependant biens évalué, il faut parfois activer la population microbienne par des réactifs, voir injecter de la biomasse et effectuer ainsi une bio augmentation.

Tout cela suppose des analyses poussées : isolement de familles de bactéries actives et des processus bactériens avec les moyens de la biologie moléculaire, puis extrapolation du principe

de l'échelle laboratoire au pilote semi industrielle. Enfin dernière étape avec la mise en œuvre industrielle d'un procédés de traitement.

### I. 6 Utilisation d'inoculum bactérien spécialisé

L'apport de souches ou de consortia microbiens sélectionnés dans les procédés de traitement des effluents pour augmenter la dégradation des composés cibles est appelé bioaugmentation. Cette technique est prometteuse pour optimiser l'efficacité des réacteurs de traitements biologiques. Il peut néanmoins être difficile de déterminer avec précision l'impact de l'inoculation du fait de la complexité des réactions et des interactions entre les populations de micro-organismes au sein du système de traitement [48]. En effet, ces populations peuvent avoir des comportements différents en fonction des évolutions physico-chimiques et biologiques du milieu [49]. Le principe de la bioaugmentation est donc de profiter de micro-organismes spécialement adaptés au milieu à traiter plutôt que d'optimiser l'adaptation des micro-organismes déjà présents dans les substrats. Bien qu'elle s'avère généralement efficace, cette adaptation nécessite une phase d'acclimatation des bactéries endogènes [50].
Souvent l'utilisation de consortia ou de cultures mixtes est préférée à l'inoculation d'une souche pure car cela permet d'élargir les voies métaboliques potentielles et l'adaptation de l'inoculum aux variations de composition du milieu et aux polycontaminations [51]. Ainsi, une bioaugmentation efficace permet la réduction de la toxicité du milieu de traitement, ce qui engendre une coopération entre les différentes populations microbiennes (endogènes et inoculées) pour dégrader en synergie les composés récalcitrants [52].

La principale stratégie utilisée pour sélectionner l'inoculum est d'utiliser des souches isolées dans l'environnement à partir de milieux contaminés par les produits ciblés par le traitement, et ensuite d'acclimater progressivement ces isolats à des doses élevées de ces même produits [53]. Selon Yu et Mohn (2002)[54], les inocula utilisés doivent répondre au minimum à trois critères ; être capables de dégrader les polluants cibles ; survivre dans le milieu de traitement et s'implanter au sein des populations microbiennes endogènes du milieu d'introduction.
La bioaugmentation peut ne pas fonctionner, principalement par le manque d'efficacité mesurée en réacteur comparativement aux résultats obtenus au laboratoire [55]. Les raisons de l'échec de la bioaugmentation peuvent être dues notamment au manque de nutriments [56], à la compétition ou à l'inhibition par les micro-organismes endogènes [57]. Cela peut conduire à

l'observation d'un effet temporaire de la bioaugmentation qui n'est alors efficace que sur une courte période de temps dans le réacteur après l'inoculation [58].

Plusieurs techniques permettent d'optimiser les chances de succès de la bioaugmention. L'une d'elle consiste en l'apport répété de l'inoculum produit pour favoriser son implantation.L'immobilisation des souches peut également permettre une augmentation significative des performances de dégradation, notamment en protégeant les cellules de la toxicité des polluants [59]. L'utilisation de matériaux servant à la fois de sorbants pour les molécules et de support pour les souches bactériennes peut également permettre d'améliorer la dégradation du polluant [60].

## I. 7 Les paramètres généraux de mise en œuvre d'un procédé de biodégradation en milieu liquide

Les traitements biologiques fonctionnent tous sur le même principe qui consiste à utiliser une biomasse bactérienne endogène ou inoculée, que l'on place dans des conditions idéales pour métaboliser les effluents à traiter. La sélection de ces conditions s'appuie sur de nombreux facteurs dépendant d'une part du type de micro-organismes présents et d'autre part des caractéristiques physico-chimiques et biologiques des effluents.

### I. 7. 1 Les conditions d'oxygénation.

Les processus de dégradation de résidus phytosanitaires sont souvent réalisés en conditions aérobies obtenues à l'aide d'un système d'agitation et/ou de bullage adapté. L'aération de l'effluent contribue au bon développement de micro-organismes dégradant progressivement les molécules visées et formant de la biomasse [61]. Ainsi, la plupart des travaux sont réalisés dans des conditions aérobies en système batch. Cependant, il est reconnu que l'efficacité de la dégradation des molécules varie en fonction de la présence d'oxygène et donc des voies métaboliques mises en œuvre [62]. Par exemple, les conditions favorables aux réactions de déshalogénation réductrice pour la dégradation des PF chlorés sont les conditions anaérobies, proches de celles favorables à la méthanogénèse ou à la réduction des sulfates [63]. Les processus de dégradation microbiens et les voies métaboliques utilisées dans la dissipation/dégradation d'un mélange complexe de molécules organiques sont donc très dépendants des conditions oxydo-réductrices qui, dans un système de traitement en réacteur dépendent elle-même du choix et de la qualité du système d'agitation et/ou d'aération. Les procédés actuels à destination de ce genre de mixture sont principalement basés sur une oxygénation des réacteurs de traitements, mais ils se développent des process à

traitement séquentiel bi-phasique couplant une phase anaérobie suivie d'une phase aérobie (Bhatnagar et Sillanpaa, 2010) [64].

### I. 7. 2 Le pH du milieu de traitement

D'une manière générale, les micro-organismes requièrent pour leur croissance optimale, un pH proche de la neutralité. Le milieu de traitement devra donc se rapprocher au mieux de cette condition. L'influence du pH sur le processus d'adsorption des molécules est plus largement étudiée que l'influence de ce paramètre sur la capacité de biodégradation de micropolluants. Cependant, Urase et Kikuta (2005) [65] ont étudié la dégradation de dix composés pharmaceutiques dans un bioréacteur à membrane (immergée). Une importante élimination de molécules pharmaceutiques acides a été obtenue dans des conditions de pH faible (pH<5), car à ces conditions, ces produits ne sont pas ionisés et augmentent leur hydrophobicité, ce qui augmente la tendance à l'adsorption de ces molécules sur la biomasse (Mailler, 2015) [66]. Les auteurs affirment que les molécules adsorbées n'ont pas été accumulées dans le bioréacteur, et elles ont été biologiquement dégradées.

La sorption de molécules à caractère neutre est généralement peu impactée par une évolution du pH. Aux pH rencontrés dans l'eau (6,5 à 7,5), les molécules à caractère acide présentent une charge négative alors que celles à caractère basique présentent une charge positive [67]. Ainsi, Hörsing et ses collaborateurs (2011) [68] ont démontré que les molécules chargées positivement se sorbaient plus facilement sur la matière organique, que les molécules neutres, qui elles-mêmes ont une capacité de sorption plus élevée que les molécules chargées négativement.

### I.7. 3 Complémentation en nutriments pour la croissance microbienne

La présence d'un minimum de nutriments (C, N, P, K et oligo-éléments) est indispensable pour la croissance des micro-organismes et donc la métabolisation des substrats qu'on souhaite dégrader. Il n'est admis qu'un rapport carbone/azote/phosphore de 100/5/1 représente un ratio idéal pour l'activité microbienne [69]. Les effluents issus du lavage et rinçage des matériels de pulvérisation de PF peuvent ne pas suffire à assurer ce minimum, car ils ne contiennent, théoriquement que les résidus phytosanitaires, comme seul apport nutritionnel.

### I. 7. 4 Temps de séjour

Le temps de séjour des effluents dans le réacteur de traitement est variable. Par exemple Celis et ses collaborateurs (2008) [70] ont étudié le traitement SBR aérobie par boues activées sur la

dégradation de l'isoproturon et du 2,4 D (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique). Avec un temps de séjour hydraulique de 48h, et un âge de boues de 30 jours, le 2,4D, à une concentration initiale de 500 mg. L-1 peut être totalement dégradé, mais pas l'isoproturon. Un temps de séjour hydraulique de 30 jours est mis en œuvre pour les procédés biologiques STBR® et CASCADE TWIN®, tandis que le procédé VITIMAX® dure deux fois plus longtemps avec 2 mois de traitement , alors que le procédé UTP® dure seulement 15 jours. Ainsi, le temps de séjour de l'effluent à traiter est à définir en fonction du procédé utilisé, de son efficacité, de la composition et de la concentration en molécules à dégrader. La définition du temps de séjour permet de dimensionner le système de traitement en fonction du volume global à traiter sur une période donnée.

### I. 8 Efficacité des microorganismes dans le traitement de la pollution des eaux

L'étude de Ramteke (2000), visait l'adsorption du nickel par une souche de *Pseudomonas stutzeri*. La cinétique de biosorption a été étudiée et a prouvé que l'âge de la biomasse n'a pas d'influence sur l'adsorption du métal [71]. L'étude proposée par Bai et Abraham (2001), visaient à quantifier la capacité de sorption de Chrome VI sur une biomasse *Rhizopus nigricans.* Une cinétique très rapide a été enregistrée. En effet, le temps optimal est de 30min ce qui correspond à une élimination de 75% d'ions Chrome VI. Un taux de 100% est obtenu après 8 h [72]. Aksû et al. (2002), ont étudié l'élimination du Chrome (VI) et des Nickel (II) en solution aqueuse dans un système en batch par une boue activée. L'étude a concerné les ions pris séparément et simultanément. L'influence du pH a été déterminée et les optimums enregistrés sont de 1 et 4,5 pour le Chrome VI et le Nickel.

II respectivement. [73]. L'étude effectuée par Ferraz et al. (2004), a montré l'importance de la régénération des biomatériaux ; en effet, la sorption du chrome (III) sur une levure *Saccharomyces C*, s'est effectué pendant 30min [74]. Sahin et Ozturk (2005), ont étudié la bio sorption du chrome hexavalent en solution aqueuse sur des cellules végétales mélangées à des spores *Bacillus thuringiensis*. L'étude effectuée en batch a pris en considération l'effet du pH, la concentration initiale et la température. et les modèles d'adsorption de Langmuir et Freundlich ont été testés. Il s'avère que les deux modèles peuvent décrire l'adsorption du chrome (VI) sur le mélange pris en considération [75]. L'étude effectuée par Iddou et Ouali (2006), visait la biosorption du nickel par *Penicellium chrysogenum* et *Aspergillus niger,* isolé au laboratoire. Les résultats ont révélé un temps de contact de 60 min et une efficacité de la biomasse à pH=7. Des taux d'élimination de 90 % ont été obtenus ce qui correspond à une capacité d'adsorption de 90mg/g pour *Aspergillus niger* [76].

**La souche de *Sphingomonas yanoikuyae*** peut dégrader les carbamates et les pyréthrines (OP) avec une grande efficacité dans la méthode de culture enrichissante (Ouyang et al. 2008) [77].
***Pseudomonas*** souche ***ADP, Ralstonia, Clavibacter, Agrobacterium***). Responsables de la degradation de l'atrazine Pelmont, 2005) [78].
***Aspergillus fumigatus, A. niger, A. terreus, Absidia*** et ***Rhizopus microsporus.*** ont été notées pour leur capacité à dégrader l'herbicide métribuzine en milieu liquide. Bordjiba et al. 2001) [79].

Cinq souches de bactéries halotolérantes ont été isolées et identifiées comme étant *Marinirhabdus* sp., *Vibrio* sp., *Alteromonas* sp., *Alteromonas macleodii*, et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* sur la base d'une analyse phylogénétique de la séquence d'ARNr 16S. *Marinirhabdus* sp. et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ont montré des rendements d'élimination significativement plus élevées de DCO, des nitrates et nitrites [80].
*Bacillus* sp. N1, a été isolé. Cette souche se développe en utilisant la métribuzine à 5,0 % (v/v) comme seule source d'azote dans un milieu liquide. Le zang optimal de métribuzine [81].

### I. 9 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a d'abord été isolée près d'une raffinerie de pétrole en Méditerranée, c'est une bactérie gram- négative en forme de bâtonnet, qui n'est pas capable de sporuler, extrêmement halotolérant, elle peut pousser dans un environnement avec une concentration de Na Cl de 0,08 à 3,5 M. Les bactéries se développent habituellement et vivent dans un environnement à une température de 10 à 45 °C et un pH de 6 à 9.5 [82].

### I. 9. 1 Métabolisme

*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* présente des activités catalase, oxydase, tweenase et lécithinase, qui permet à la bactérie de dégrader les substances hydrophobes dans un environnement aérobie. La cellule est capable de dégrader les alcanes cycliques et non cyclique, comme les hydrocarbures pétroliers, elle est capable de les dégrader et de les utiliser comme source de carbone et d'énergie. Par conséquent cette bactérie est un agent potentiel pour la bioremédiation, en outre les bactéries *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ne sont pas limitées aux hydrocarbures pour les sources d'énergie et de carbone, elles peuvent utiliser les nitrates ou nitrite comme accepteur final d'électrons pour former un produit gazeux tel que le $N_2O$ , en consommant d'autres substances organiques, par conséquent ,ils sont considérés comme des dénitrifiant qui pourraient croitre dans un environnement anaérobie [82].

### I. 9. 2 Importance

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants qui peuvent causer de graves dommages aux écosystèmes marins composés principalement des chaines d'alcanes non cycliques, sont hydrophobes et récalcitrant par nature ce qui les rend extrêmement difficiles à éliminer.

La *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* joue un rôle important dans la bio remédiation, elle peut également aider à l'avancement technologique de la bio remédiation en servant de modèle pour étudier la biodégradation des hydrocarbures [82]. Ainsi les microorganismes jouent un rôle important dans la dégradation des polluants de l'eau et du sol, les efforts en matière de protection de l'environnement n'ont cessé de s'intensifier notamment en vue de l'obtention de nouvelles molécules actives d'origine biologique. Est le cas des bio surfactants qui sont très utilisés dans un grand nombre d'applications industrielles. Compte tenu de leur potentialité et de leur innocuité, ils sont aujourd'hui utilisés dans différent domaines d'application tel que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie ou encore la cosmétologie.

# Références


[1] ZAVISKA. F. modélisation du traitement de micropolluants organiques par oxydation électrochimique. Thèse de doctorat en sciences de l'eau. Université du Québec *Institut National de la Recherche Scientifique Centre Eau Terre Environnement* (2011).

[2] Dr. bessedik .Madani**.** Traitement et épuration de l'eau.

[3] AZZOUZ.A. Etude comparative de la capacité d'adsorption des matériaux naturels vis-à-vis de certains polluants Thèse de magister. *Université des sciences et de la technologie d'oran Mohamed BOUDIAF*. (2011).

[4] Mayet. J. La pratique de l'eau. Paris 1994.

[5] Guerree. H, Gomella. C, Les eaux usées dans les agglomérations urbaines ou rurales. Ed. Eyrolls. Paris 1978.

[6] V. Johan et M. O**.** Mizier. (2004). Traitement des eaux industrielles. Effluents d'abattoirs : une pollution biodégradable. *Eau, Industrie, Nuisances*. 269 : 33-43.

**[7]** DA. Lovett, SM. Travers et KR. D. avey. (1984).Activated sludge treatment of abattoir wastewater I. Influence of sludge age and feeding pattern. *Wat. Res* . 18: 429-434.

[8] D. Couillard et S. Gariepy. (1990). Faisabilité du procédé aérobie thermophile pour un effluent abattoir. *Can. J. Chem. Eng.* 68: 018-1023.

[9] R. Borja et MM. Duran. (1993). Influence of the support on the kinetics of anaerobic purification of slaughterhouse wastewater. *J. Biores. Technol*. 44 : 57-60.

[10] V. Reginatto, R.M. Teixeira, F. Pereira, W. Schmidell, A. Furigo, R. Menes, C. Etchebechere and H.M. Soqres. (2003). Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 22: 593-600.

[11] Gnagne et F. Brissaud .(2002). Etude des limites de l'épuration par infiltration sur sable des eaux usées fortement chargées en matières oxydables de l'abattoir de Ougadougou au Burkina Faso. *Sud Sciences & Technologies*. N°9.

[12] M. A. Bull, R.M. Sterritt and J.N. (1982).The treatment of wastewaters from the meat industry. *Environmental technology letters* 3: 117-126.

[13] WP. Tritt et F. Shuchard. (1992).Materials flow and possibilities of treating liquid and solid wastes from slaughterhouse in Germany. *Biores. Technol*. 41 : 235-245

[14] M. R. Johns**.** (1995).Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: A review. *Bioresource technology* .54: 203-216

[15] K.Q. Camin. (1970).Cost of waste treatment in the meat packink industry. In Proceeding of the 25th industrial waste conference. *Ann Arbour, mi: Ann Arbour Science.* 193-202

[16] J. Wéthé, M**.** Kientga, D. Koné et N. Kuéla.(2002). Profil du recyclage des eaux usées dans l'agriculture urbaine à Ouagadougou. Visite d'étude et Atelier International sur la réutilisation des eaux usées en agriculture urbaine : un défi pour les municipalités en Afrique de l'Ouest. Rapport final, Ouagadougou - Burkina Faso. 183p.

[17] Gnagne et F**.** Brissaud. (2003). Etude des potentialités d'épuration d'effluents d'abattoir par infiltration sur sable en milieu tropical. *Sud Sciences & Technologies. N°11*.

[18] Falconer. I.R, H.F. Chapman, M.R. Moore, G. Ranmuthugala. (2006).Endocrine-disrupting compounds: a review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environmental Toxicology*, 21(2):181-191.

[19] M.D. Jürgens , K.I.E. Holthaus, A.C. Johnson, J.J.L. Smith, M. Hetheridge et R.J. Williams. (2002).The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in *English rivers. Environ. Toxicol. Chem*., 21:480-488.

[20] Y.Yoon , P Westerhoff , S.A. Snyder, E.C. Wert, J. Yoon. (2007). Removal of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by nanofiltration and ultrafiltration membranes. *Desalination*, 202(1-3): 16-23.

[21] Hartmann .N, M. Erbs**,** F.E. Wettstein, R.P. Schwarzenbach, T.D. Bucheli. ( 2007). Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng.L-1 level in aqueous environmental samples using deuterated internal. standards.*Journal of chromatography. A*, 1138(1-2) : 132-140.

[22] Auriol. M, Y. Filali-Meknassi et R.D. Tyagi. (2007). Occurrence and fate of steroid hormones in wastewater treatment plants. *Revue des Sciences de l'Eau*, 20(1): 89-108.

[23]A. Bouhaouss , A. Bensaoud , M. Azzouzi , C. Perrin-Ganier , M. Schiavon. (2001). Etude par spectroscopie ultraviolet et infrarouge de L'adsorption des pesticides par les apatites. *Phys. Chem. News* 1 : 115-118

[24] Boland .J, Koomzn. I, Van Lidth. J, Jeude .DE, Oudejans. J. (2004**).** Les pesticides : compositions, utilisation et risques. *Edition Agrosdok.*

[25] Document de décision de réévaluation- RRD 2006-15. Réévaluation de la métribuzine.(ARLA) de Santé Canada, 2006.

[26] O. Kitous, A. Cheikh, H. Lounici, H. Gri, A. Pauss, N. Mameri, (2009). Application of the electrosorption technique to remove Metribuzin pesticide. *Journal of Hazard. Mater*. 161: 1035–1039.

[27] K. Majumbdar, N. Singh. (2007).Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils. *Chemosphere*, 66: 630-637.

[28] Louchahi .M. Rabie. Enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'algérois et la perception des agriculteurs des risques associés à leur utilisation. Thèse de Magister *Ecole nationale supérieure d'agronomie* 2015.

[29] E. Ayranci, N**.** Hoda. (2010). Studies on removal of metribuzin, bromacil, 2,4-D and atrazine from water by adsorption on high area carbon cloth. *Hazardous Materials*. 11 : 163-168.

[30] A. Medjoub. Evaluation des effets métaboliques d'un gavage les pesticides (Mancozèbe, Métribuzin) chez le rat Wister. Thèse de doctorat, Université de Tlemcen. 2013

[31] C. Arvalis. Solutions concrètes pour réduire l'impact des produits phytosanitaires. Guide pratique, édition Est, Paris, 96, 2012.

[32] K. Li, B. Xing, W. A. Torello. (2005).Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environ. Pollut*, 134: 178-194

[33] P**.** O'Neill. Environmental chemistry. 2ème édition, CHAPMAN & HALL. Chapitre 1 (p 148, p186-188).1985

[34] Mikiko .U, Eiki .W, Shigekazu. I, Seiji. I, Shiro .M. (2012). Development of immunoassay based on monoclonal antibody reacted with the neonicotinoid insecticides .*Sensors* . *12* (11) : 15858-15872

[35] Herbert. GT, Chetan .R, Jie. F, Jorge .LP, Chaouki .TA. (2012). Finite abstractions for hybrid systems with stable continuous dynamics. *Discrete Event Dynamic Systems* . 22 (1 ): 83-99

[36] US-EPA (United States Environmental Protection Agency). 2012. Acetamiprid; Pesticide Tolerances. EPA-HQ-OPP-2011-0403; FRL-9340-7 *Federal Register.* 77 (60): 18710-18716.

[37] fdsys/pkg/FR-2012-03-28/html/2012-7461.htmLe bureau des programmes de pesticides (US-EPA) (2012) classe Dynamic Systems, 22(1): 83-99**.**

[38] EPA (United States Environmental protection Agency). 2002. Office of Prevention Pesticides and Toxic Substances (7501C). Aerial Rios Building 1200 Pennsylvania: NW Washington; p4

[39] Zhang. JJ, Wang .Y, Xiang. HY, Li MX, Li .WH. (2011). Oxidative stress: Role in acetamiprid induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China*. 10: 786-796.

[40] Office international de l'eau conception et dimensionnement ; Le traitement par boues activées .DFE/CNFME/L:\utilisat\JP\F07\DOCPDA~1\Traitement par boues activées RP F7.doc\05/04/2005

[41] Rejesek. F. (2002). Analyse des eaux - Aspects réglementaires et techniques. Canopé-CRDP de Bordeaux.

[42] Degremont .Mémento Technique de l'eau .Neuvième édition, 2005

[43] Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. Janvier 2002. Plan National d'Actions pour l'Environnement et le Développement Durable (PNAE-DD). Algérie.

[44] Koller.E. (2004). Traitement des Pollutions Industrielles : Eau. Air. Déchets. Sol. Boues. Ed. Dunod. France.

[45] Deronzier .G, Schétrite. **S,** Racault .Y, Canler .J P, Liénard. A, Héduit. A, Duchène .P. (2001). Qualité et fonctionnement hydrologique des systèmes aquatiques, *Groupement d'Antony UR Parc de Tourvoie.*

[46] N. THEVENIN. Compréhension et optimisation d'un procédé de biodégradation d'effluents agricoles composés de pesticides en mélange .Thèse de doctorat .Université de Haute-Alsace : Biologie des organismes .2016.

[47] Salghi .R, 2011. Chimie des eaux. L'Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir: 8-9.

[48] Sloan.W.T**,** Lunn. M, Woodcock. S, Head. I.M, Nee. S, Curtis.T.P. (2006). Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol.* 8 : 732–740.

[49] Ayala-del-Río, H.L, Callister. S.J, Criddle. C.S, Tiedje. J.M. (2004). Correspondence between community structure and function during succession in phenol- and phenol-plus- trichloroethene-fed sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 4950–4960.

[50] El-Fantroussi.S. et Agathos. S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol*. 8: 268–275.

[51] Boon. N, Goris. J, De Vos. P, Verstraete. W, Top. E.M. (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol*. 66 : 2906–2913.

[52] Wang. M, Yang. G, Min. H, Lv. Z, Jia. X. (2009). Bioaugmentation with the nicotine degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms. *Water Res.* 43:4187–4196

[53] Stephenson. D et Stephenson. T. (1992). Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. *Biotechnol*. *Adv*. 10:549–559.

[54] Yu. Z.T. et Mohn. W.W. (2002). Bioaugmentation with the resin-acid degrading bacteria *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Res.* 36:2793–2801.

[55] Herrero. M et Stuckey. D.C. (2015). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment. *A review. Chemosphere* .140:119-128

[56] Boon. N, De Gelder. L, Lievens. H, Siciliano. S.D,Top. E.M, Verstraete. W. (2002). Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by as low release approach. *Environ Sci Technol*. 36: 4698-4704

[57] Van Veen. J.A, Van Overbeek. L.S, Van Elsas. J.D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol .Mol .Biol Rev*. 61:121–135.

[58] Yu. F.B, Ali. S.W, Guan. L.B, Li.S.P, Zhou. S. (2010). Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *J Hazard Mater*. 176 : 20–26.

[59] Bazot. S et Le beau. T. (2009). Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as free and/or immobilized-cells formulations. *Appl Microbiol Biot*. 77 :1351-1358.

[60] Leglize. P**,** Saada. A, Berthelin J, Leyval. C. (2008). Adsorption of phenanthrene on activated carbon increases mineralization rate by specific bacteria. *J Hazard Mater*. 151:339-347.

[61] Esteve. K. (2007). Procédé de traitement biologique aérobie d'effluents phytosanitaires en viticulture. Thèse de doctorat en science de la vie. Université Bordeaux 1, France. 244p.

[62] Batisson. I, Pesce. S, Besse-Hoggan. P, Sancelme . M, Bohatier. J. (2007). Isolation and Characterization of Diuron-degrading Bacteria from Lotic Surface Water. *Microb Ecol Nov*. 54(4):761-70

[63] Maillard. E, Payraudeau. S, Faivre. E, Grégoire. C, Gangloff. S, Imfeld. G. (2011). Removal of pesticide mixtures in a storm water wetland collecting runoff from a vineyard catchment. *Sci Total Environ*. 409 : 2317–2324.

[64] Bhatnagar. A et Sillanpaa. M. (2010). Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment—A review. Chem Eng J. 157: 277–296.

[65] Urase. T et Kikuta. T. (2005). Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res*. 39: 1289-1300.

[66] Mailler. R. Devenir des micropolluants prioritaires et émergents dans les filières conventionnelles de traitement des eaux résiduaires urbaines des grosses collectivités (files eau et boues), et au cours du traitement tertiaire au charbon actif. Thèse de doctorat en Ingénierie de l'environnement. Université Paris-Est, France. 2015

[67] Seira. J. Rôle de la sorption et de la biodégradation dans l'élimination de micropolluants par des procédés d'épuration biologique : application aux molécules anticancéreuses traitées par bioréacteur à membrane. Thèse de doctorat en Génie des procédés et de l'Environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), Université de Toulouse, France. 351p. 2013.

[68] Hörsing. M, Ledin. A, Grabic. R, Fick.J, Tysklind. M, la Cour Jansen. J, Andersen.H.R. (2011).Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. *Water Res*. 45: 4470-4482.

[69] Castillo de Campins. S. Etude d'un procédé compact de traitement biologique aérobie d'effluents laitiers. Thèse de doctorat en microbiologie et biocatalyse industrielles, INSA, Toulouse. 201p. 2005

[70] Celis. E, Elefsiniotis. P, Singhal. N. (2008). Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. *Water Res*. 3218-3224

[71] Ramteke. P.W. (2000).biosorption of Nickel (II) by *Pseudomonas tutzeri*. *journal of Environmental biology*.21:219-221

[72] Bai. S.R et Abraham.T.E. (2001).biosorption of chrome (VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. *bioresource technology*.79:73-81.

[73] Aksû. Z, Açikel. Ü, Kabasakal. E et Tezer. S. (2002).Equilibrium modolling of individual and simultaneous biosorption of Cr (VI) and Ni (II) on to dried activated sludge. *Water research*.36 : 3063-3073

[74] Ferraz. A.I, Tavares. T et Teixeira. J.A. (2004).Cr (III) removal and recovery from *Saccharomyces serevisiae*. *Chemical engineering journal*.105:11-20

[75] Sahin. Y, Öztîrk. A. (2005).biosorption of Cr (VI) ions from aqueous solution by the bacterium *bacillus thuringiensis*. *Process biochemistry* .40:1895-1901.

[76] Iddou. A , Ouali. M.S. (2006).Removal of Ni (II) by *Penicillium chrysogenum* and *aspegillus niger* biomass. *J. Saudi chem. Soc*.10 :331-338.

[77] Ouyang ,Z. C, Wang .Y. H, Li .X. N, Gao. Y. F, Jiang. G. B & Fang. Y. S**.** (2008). Test of pesticide degradability by *Sphingomonas yanoi kuyae* XJ strain, *journal of South China Agricultural University*.

[78] Pelmont .J. (2005). Biodégradations et métabolismes les bactéries pour les technologies de l'environnement. *EDP sciences*. 624-627

[79] Bordjiba. O, Steiman. R, Kadri. M., Semadi .A, Guiraud. P. (2001) Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*. 30(2): 418-426.

[80] Hoang. T. H.A, Shahsavari. E, Bott. N. J, Ball. A.S. (2021). Bioaugmentation of seafood processing wastewater enhances the removal of inorganic nitrogen and chemical oxygen demand, *Aquaculture*. 542: 736818.

[81] Hao. Z, Yubin. Z, Zhiguang. H, Xian .W, Henan. G, Fengjie .S & Hongyu .P. (2013).Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain *Bacillus sp. N1,"Journal of Environmental Science and Health* .49(2): 79-86

[82] Julie Mounier .Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes. École doctorale sciences exactes et leurs applications (Pau, Pyrénées Atlantiques).2013

# Chapitre II

# Les biosurfactants

## II. 1 Introduction

Grace à leurs effets aux interfaces et à la diversité de leurs structures, les tensioactifs présentent différentes propriétés techno fonctionnelles leur permettant d'être utilisés pour des applications dans de nombreux domaines [1]. Les tensioactifs sont utilisés dans la plus part des actes de la vie courante, l'application la plus connues est la détergence. En effet 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 des 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, l'émulsification etc. Presque tous les tensioactifs sont des dérivés chimiques du pétrole brut. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables.

C'est pourquoi depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants d'origine microbienne : biosurfactants [2].

Les biosurfactants peuvent être aussi efficaces et présentent de nombreux avantages par rapport au surfactants synthétiques .Ils sont hautement spécifiques, biodégradables, biocompatible avec l'environnement et peuvent être synthétisés en grandes quantités sur des ressources renouvelables [3].

## II.2 Définition

Les biosurfactants sont des composés tensioactifs d'origine microbienne, ces biomolécules peuvent réduire la tension de surface et la tension interfaciale [4] ce sont des molécules amphiphile avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ils sont secrétés par les cellules pour faciliter l'absorption d'un substrat insoluble.

Leurs propriétés permettent de créer des micros émulsion ; ils se forment des micelles dans lesquelles les hydrocarbures peuvent se solubiliser dans l'eau ou inversement, la fonction des biosurfactants est de solubiliser les substances hydrophobes pour améliorer leur assimilation par les microorganismes Les biosurfactants sont un groupe structurellement divers de substances tensioactives produites par les micro-organismes. Ces composés sont appelés agents de surface, agents tensio-actifs. Le terme le plus couramment utilisé :
SURFACTANT provient de l'acronyme anglais SURFace ACTive ageNTS. Le groupement hydrophile est constitué de mono, oligo ou polysaccharides, des peptides ou des protéines et un fragment hydrophobe qui contient généralement des acides gras saturés, insaturés, et hydroxylés ou des alcools gras [5] En présence d'un surfactant synthétique ou naturel, la tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/m [6].

### II.3 Propriétés des bio surfactants

**L**es biosurfactants ont l'aptitude à se concentrer aux interfaces réduisant la tension inter faciale ainsi la tension superficielle, les paramètres permettant d'évaluer la production des bio surfactants par différentes bactéries sont la tension de surface, la tension inter faciale, et la concentration micellaire critique(CMC).

#### II.3.1 La tension de surface

C'est la tension entre un liquide et un gaz (eau-air par exemple), un bon surfactant est capable de réduire la tension de surface de l'eau distillée de plus de la moitié.

#### II.3.2 La tension inter faciale

C'est la tension aux interfaces liquide-liquide .Elle se mesure à l'interface d'un liquide typique.

#### II.3.3 La concentration micellaire critique

C'est la concentration minimale à partir de laquelle un biosurfactant est efficace. Pour des concentrations supérieures ou égales à la CMC, la tension de surface diminue considérablement.
La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [7].
Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogènes en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une

façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles [8].
En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau. (Figure 4)

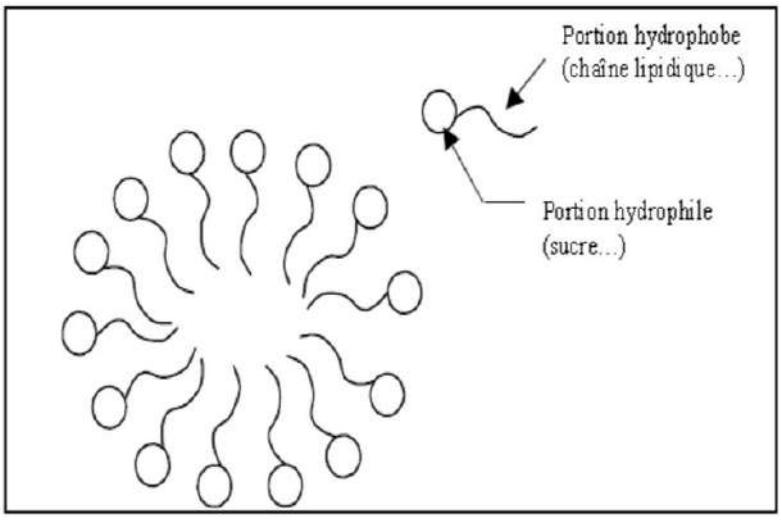



**Figure. 4.** Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant **[9]**

### II. 4 Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, le poids moléculaire, les propriétés physico-chimiques, le mode d'action et l'origine microbienne. Basé sur le poids moléculaire, ils sont divisés en bio surfactants de faible masse moléculaire comprenant les phospholipides les glycolipides et les lipopeptide, et en bio surfactants de haute masse moléculaire contenant des polysaccarides, des protéines, des lipopolysaccarides, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces bio polymères.
Les bio surfactants de haut poids moléculaire sont plus efficaces pour stabiliser des émulsions d'huile dans l'eau, alors que les bio surfactants de faible poids moléculaire sont efficaces dans la réduction des tensions de surface et des tensions inter faciale [10].
Les bio surfactants s'accumulent à l'interface entre deux fluides non miscibles ou entre un liquide et un solide. En réduisant la tension de la surface (liquide-air) et l'interface (liquide – liquide), ils réduisent les forces de répulsion entre deux phases dissemblables et permettre à ces deux phases de se mélanger et d'interagir plus facilement [11].

**Tableau .3.** Les biosurfactants de haut poids moléculaire [10]

| **Biosurfactant** | **Micro-organismes producteurs** |
|---|---|
| RAG-1 emulsan | *A. calcoaceticus RAG-1* |
| Emulsan BD4 | *A. calcoaceticus BD413* |
| Alasan | *A. radioresistens KA53* |
| Biodispersant | *A. calcoaceticus A2* |
| Mannan-lipid-protein | *C. tropicalis* |
| Liposan | *C. lipolytica* |
| Emulsan 378 | *P. fluorescens* |
| Acetyl hetero polysaccharide | *S. paucimobili* |
| Polysaccharides Sulfatés | *H. eurihalinia* |
| PM-factor | *P. marginalis* |

**Tableau .4** les biosurfactants de faible poids moléculaire [10]

| **Biosurfactant** | **Micro-organismes producteurs** |
|---|---|
| Rhamnolipids | P. *aeruginosa* ,*P. fluorescens* |
| Trehalose lipids | *Pseudomonas spp. R. erythropolis* |
| Sophorolipids | *Arthrobacter sp. Mycobacterium sp.*<br>*T. bombicola (yeast*) |
| Viscosine ,Surfactine | *P. fluorescens* ,*B. subtilis* |
| Gramicidine S ,Polymyxins ,Serrawettine | *B. brevis* ,*B. polymyxa* ,*S. marcescens* |
| Phospholipids | *Acinetobacter spp. T. thiooxidans* |
| Acides gras | La plus part des M.O |

### II. 4. 1 Les biosurfactants de faible poids moléculaire

#### II. 4. 1. 1 Les Glycolipides

Les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides sont les glycolipides les plus étudiés. Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaine d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxy aliphatique [12].

Ce sont des détergents très puissants et sont produits commercialement comme agents d'assainissement des sols et de lutte contre la pollution marine par les hydrocarbures, ils sont aussi bien connus pour leur capacité à se lier à des substrats ayant un faible degré de solubilité dans l'eau tel que les polluants hydrophobes **[**13].

#### II. 4. 1. 2 Les acides gras et les phospholipides

Les acides gras considérés comme tensioactif résultent de l'oxydation microbienne des alcanes. Les acides gras saturés les plus actifs sont dans la gamme C-12 à C-14 ce sont des tensioactifs puissants [10].

Les phospholipides sont des lipides contenant un groupe acide phosphorique ce sont les constituants essentiels des membranes microbiennes, en milieu aqueux de telles molécules amphiphiles tendent à s'organiser de telle sorte que seule leur tête hydrophile soit en contact avec les molécules d'eau, ce qui aboutit typiquement à des structures en micelle [12**].**

#### II. 4. 1. 3 Les lipopeptides

Les lipopeptides sont constitués d'un cycle peptidique lié à une chaine d'acide gras, ce sont des molécules amphiphiles dont la partie peptidique est soluble dans l'eau et leur partie lipidique est soluble dans l'huile.

La surfactine produite par *Bacillus subtillis* est un lipopeptide cyclique, elle présente de nombreuses activités biologiques et semble être appliquée dans plusieurs domaines de pétrochimie, agroalimentaire, agriculture, industrie pharmaceutique et cosmétique [11].

### II. 4. 2 Les biosurfactants de haut poids moléculaire

Les bio surfactants les plus étudiés de cette catégorie sont les bioémulsifiants produits par *Acinebactère.* Ce sont des polymères extracellulaires constitués de polysaccarides de protéines, de lipopolysaccarides, de lipoprotéines ou de mélanges complexes de bio polymères ,émulsions

qui peut se trouver fixé à la surface bactérienne formant des mini capsules et permet l'attachement des cellules aux interfaces hydrophobes.

Ce tensioactif ne peut émulsionner les hydrocarbures purs, mais tous les mélanges qui contiennent un mélange approprié d'un composé aliphatique et aromatique émulsionnées efficacement [10].

### II. 5 Application industrielle des bio surfactants

Les structures chimiques et les différentes propriétés de surface des biosurfactants, ainsi que leurs résistances aux conditions extrêmes rend difficile la généralisation du rôle naturel des bio surfactant [11] et fournit des avantages potentiels pour l'exploitation commerciale.

**Tableau. 5.** Les différentes applications des biosurfactants [11]

| **Domaine d'application** | Fonction |
|---|---|
| Cosmétiques, peintures | Emulsifiant et dispersant |
| Pharmaceutique, articles de toilette | Solubilisant et microémulsions |
| Pharmaceutique, industrie textile, peinture | Agent mouillant et pénétrant |
| Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie | Détergent |
| Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais | Agent moussant |
| Peintures | Agent épaississant |
| Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau | Dispersant |
| Récupération assistée de pétrole | Récupération de ressources |

## II. 6 Production des biosurfactants

Les biosurfactants sont produits par une variété de microorganismes incluant les bactéries, les champignons et les levures [14]. Leur production est généralement associée à la croissance des microorganismes sur des n-alcanes. Mais de nombreux travaux ont montrés que cette production était également possible dans un milieu contenant des glucides ou un mélange hydrocarbure et glucide.

D'autres substrats tels que l'huile d'olive ont été utilisés. Le type et la quantité de biosurfactant sont influencés par la composition du milieu minéral, et par la source de carbone utilisée. Ainsi la même souche peut produire des biosurfactants différents, si la composition du milieu de culture change.

Une même souche peut produire deux biosurfactants de même nature mais de structures différentes.

Les bactéries utilisées pour produire les bio surfactants 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 meilleur source de carbone, et d'optimiser le milieu de culture afin d'obtenir un taux de production maximum, le bio surfactant obtenue est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du bio surfactant produit par une souche de Pseudomonas aeruginosaUG2 on obtient un mélange de quatre rhamnolipides [15].

### II. 6. 1 Paramètres influençant la production

Le type et la quantité de biosurfactants produits varient avec plusieurs paramètres :

- La source de carbone.
- La source d'azote.
- Le pH du milieu de culture.
- Concentration des sels minéraux (Magnésium, Potassium, Calcium, Sodium).
- La disponibilité en oxygène à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance.
- La vitesse d'agitation [9].

### II. 6. 2 Extraction des biosurfactants

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple).La récupération des

biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur Localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules).Les techniques les plus utilisées sont les extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle etc, ou des techniques reposants sur la précipitation.

### II. 6. 3 Mode d'action

Les biosurfactants agissent de façons différentes : par mobilisation et par solubilisation.

#### a-Mobilisation

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des biosurfactants à diminuer les tensions inter faciales entre les NAPL (non aqueous phase liquids) et l'eau.

La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de déplacement et une étape de dispersion. Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions inter faciales. La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions [16].

#### b-Solubilisation

La solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols ; elle résulte de la formation de micelles. La solubilisation est basée sur la capacité des solutions micellaires à augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes [9].

Généralement an deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effet sur la plupart des hydrocarbures [17].

Au-dessus de la CMC, le phénomène d'incorporation des hydrocarbures dans les micelles apparait permettant ainsi une augmentation de leur solubilité apparente [9].

Ainsi pour que les micelles se forment, il faut ajouter suffisamment de biosurfactant pour que la concentration en phase aqueuse atteigne la CMC réelle. La sorption dépend donc de la concentration de bio surfactant en solution [15].

### II. 6. 4 Toxicité et biodégradabilité

Des tests de toxicité réalisés par ont montré que les rhamnolipides, les produits par une souche de *Pseudomonas aerugenosa* étaient classés comme produit non irritant et non toxique [18].

Une étude réalisée par reporte que l'UG2, bio surfactant produit par une souche de de Pseudomonas aerugenosa n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à forte concentration. Ces auteurs indiquent de plus que ce biosurfactant était biodégradable [19].

## II. 7 Intérêt et utilisation des biosurfactants

L'utilisation des biosurfactants, particulièrement les rhamnolipides, les lipopeptides pour le lavage de sable contaminés par du pétrole brut a était efficace, d'après 30 et 40 % des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques respectivement ont été éliminés à 8.9 et 7.2 seulement en lavant ces mêmes sols avec de l'eau. Ils sont utilisés aussi pour le nettoyage des bacs de stockage et pour faciliter le transport du pétrole lourd en réduisant sa viscosité [4].

Par rapport à leurs homologues chimiques , les lipopeptides possèdent de nombreux avantages en terme d'exploitation biotechnologique : leur biodégradabilité et leur biocompatibilité est en faveur de leur compétition dans la plupart des application industrielles avec les surfactants d'origine chimique, leur grande tolérance et stabilité dans des conditions extrêmes de pH de salinité et de température, favorisant leur utilisation dans certains procédés industriels impliquant des traitements sous des condition drastiques.

Vue leurs propriétés fonctionnelles, ils sont utilisés comme émulsifiant dans les secteurs alimentaire, pharmaceutique et cosmétique antibactérien et antifongique tels que les lipopeptides ,qui ont la capacité de perturber les membranes biologiques entrainant la lyse cellulaire, par augmentation de la perméabilité membranaire et par conséquent la fuite de métabolites ; ils présentent une capacité anti adhésive car certains biosurfactants présentent une activité anti adhésive vis-à-vis des microorganismes pathogènes, empêchant ainsi leurs adhésions sur les surfaces solides et un pouvoir anti coagulant [20].

## II. 8 Application biotechnologique des biosurfactants

### a) Les lipopeptides à activité insecticide

Les lipopeptides sont aussi doués d'un pouvoir insecticide contre diverses larves d'insectes phytopathogènes d'ordres diptères, lépidoptères et coléoptères [21]**.** En effet, la surfactine de *B subtilis subsp*. Tue aussi bien les larves que les adultes avec une dose létale (DL. L'activité insecticide observée pourrait être liée à une réduction de la tension de surface qui a pour effet une perméabilisation de la cuticule de l'insecte en question grâce à un effet détergent. De même, Assie et al. [22] ont rapporté que les deux isoformes de surfactines C14 et C15 de S499, à 100 ppm, entrainent, après 1 jour de traitement, un taux de mortalité de 85,4 à 92,6 % des adultes de l'insecte des fruits, notamment *drosophila melanogaster*. La surfactine de *ssp.subtilis* est capable par ailleurs de tuer les larves et les adultes avec une dose létale (DL) d'environ 1 µg. $ml^{-1}$ [23]. La DL du lipopeptide tensioactif secrété par DM03 contre la larve d'est de l'ordre de 120±5 mg. $L^{-1}$ après 24 h de traitement [24].

**b) Application des lipopeptides dans la bioremédiation des sols et des eaux**

Plusieurs travaux de recherche se sont orientés vers la remédiation des environnements contaminés par les produits pétroliers. La dégradation microbienne constitue l'un des mécanismes majeurs permettant l'élimination des hydrocarbures contaminants [25].

Néanmoins, la faible solubilité des polluants organiques augmente leur adsorption aux particules de sol et limite et ainsi leur biodégradation [26]. Les biosurfactants peuvent intervenir par augmentation de la biodisponibilité des substrats hydrophobes par l'intermédiaire des phénomènes d'émulsification, solubilisation et mobilisation [27] Dans ce contexte, Mnif et al. [27] ont montré que l'ajout du biosurfactant lipopeptidique de SPB1 dans le milieu, à raison de 0,1%, contribue à une amélioration de la biodégradation du diesel de l'ordre de 38,42 %. Une augmentation de digestion du diesel a été enregistrée en présence d'un mélange lipopeptidique d’An6 [28].

# Références


[1] Noiret. N, Benvegnu. T, Plusquellec. D. (2002)**.** Tensioactifs à base de substances renouvelables. *Actual chim*. 258-9

[2] Seghal Kiran. G, Anto Thomas .T, Selvin .J, Sabarathnam. B. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *brevibavtrium aureum* MSA13 in solidstate culture. *Bioresour Technol* . 101: 2389-96

[3] Shavandi. M, Mohebali .G, Haddadi. A, Shakarami .H, Nuhi .A. (2011). Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, sp. strain TA6. *Colloid.Surf.* 82: 477.

[4] Ali Ahmed. S. Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique.Mémoire Magister,Ecole nationale supérieure agronomique.2011

[5]Georgiou, **(**1992)**.**Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*. 1 : 60-65177.

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

[7] PORE. J. (1992)**.** Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples, *Editions Techniques et Industries des Corps Gras,* 270 p.

[8] HAIGH. S.D. (1996): A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*. 185 :161-170

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

[10] BENDAHA .M**.** Isolement, caractérisation et exploitation des métabolites microbiens en bioremédiation de l'environnement. Thèse de doctorat en biologie. Université. Mustapha Stambouli de Mascara.2016

[11] Banat. I.M. 2000 **:** Les biosurfactants plus que jamais sollicités. *Biofutur.* Vol.198.

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

[13] Wan .J, Chai .L, Lu. X, Lin .Y, Zhang. S. (2011). Remediation of hexachlorobenzene contaminated soils by rhamnolipid enhanced soil washing coupled with activated carbon selective adsorption. *J. Hazard. Materials.* 189 : 458–464

[14] Fiechter. (1992). Biosurfactants moving towards industrial application. *Tibtech*. Vol.10.

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

[16] Bai .G, Brusseau .M. L. et Miller .R. M. (1997). Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. Contam. Hydro*. 25 :157-170.

[17] Pennell. K. D, Abriola .L. M.et Weber .W. J. (1993). Surfactant enhancement solubilization of residual dodecane in soil columns. 1 - Experimental Investigation. *Environ.Sci. Technol*. 27 (12) : 2332-2340

[18] Haba. E, Pinazo .A, Jauregui.O, Espuny M.J, Infante M.R. et Manresa.A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*. 81 (3) : 316-322.

[19] DJERBAOUI. A.N**.** Utilisation des souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremédiation des sols de Hassi Messaoud contaminés par les hydrocarbures. Thèse de doctorat en biologie. Universite KASDI Merbah-OUARGLA.2011.

[20] Benayed .H, Nasri .M. (2016). Les lipopeptides de Bacillus : des molécules bioactives à structure particulière et à forte potentialité d'application *Nutrition & Santé*, *5*(2), 115-125.

[21] Geetha. I, Manonmani .A.M, Paily .K.P. (2010).Identification and characterization of a mosquito pupicidal metabolite of *bacillus subtillis subsp*. strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86: 1737-44.

[22] Assie. L.K, Deleu. M, Arnaud. L, Paquot .M, Thonart .P, Gaspar. CH, Haubruge E. (2002). Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *bacillus subtillis Cohn* (S499 strain). *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd To egep Biol Wet*. 67: 64755.

[23] Das. K, Mukherjee. A.K.(2006). Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *bacillus subtillis* strains.2006; 97: 168-73.

[24] Marchal .R, Penet .S, Solano-Serena. F, Vandecasteele. J.P**.** (2003).Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil gas sci technol* .58: 441-8.

[25] Calvo. C, Manzanera .M, Silva-Castro. GA, Uad .I, González-López .J. (2009).Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *sci total environ* . 407: 3634-40.

[26] Pacwa-Plociniczak .M, Plaza .GA, Piotrowska Seget. Z, Cameotra. S.S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Inter. j mol sci* 12 : 633-54.

[27] Mnif .I, Ghribi. D. (2015). Lipopeptide surfactants. Production, recovery and pore forming capacity.*peptides* .71: 100-12.

[28] Ben Ayed. H, Jemil. N., Maalej. H, Bayoudh. A, Hmidet. N, Nasri .M. (2015).Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amylolique faciens* An6. *Inter Biodeterior Biodegr . 99 : 8-14.*

# Partie II

## Matériels et méthodes

**Hypothèses**

La biodégradation est souvent assimilée au catabolisme de composés organiques par une souche microbienne unique. Toutefois, il est de plus en plus évident que la biodégradation dans l'environnement naturel est effectuée par des communautés bactériennes mixtes, présentées comme plus efficaces.

Puisque certains micro-organismes peuvent croître sur des HAP, alors que ces polluants sont reconnus hautement récalcitrants à la biodégradation, est ce qu'ils posséderaient aussi la faculté de dégrader d'autres polluants et les utiliser comme source de carbone, ainsi que la production de biosurfactants.

**Objectifs**

Pour vérifier cette hypothèse, la démarche expérimentale suivie a consisté à isoler des micro-organismes, capables de dégrader des HAP à partir des sites contaminés, et déterminer leur capacité à dégrader des polluants organiques (pesticides, matières hydrophobes), ainsi que l'étude de leur potentiel à produire des biosurfactants ,en utilisant un substrat facilement assimilable, et déterminer les conditions qui favorisent la production des biosurfactants ,avec la caractérisation de ces derniers, et enfin étudier la capacité des biosurfactants produits à solubiliser les polluants étudiés.

**II. 1 Matériel biologique**

Dans cette étude on a utilisé trois souches bactériennes

***a- Marinobacter* SdK644**

La *Marinobacter* SdK644 a été précédemment isolée à partir d'un milieu marin contaminé par les hydrocarbures du port de Khmisti , c'est une bactérie gram négative en forme de bâtonnet, qui n'est pas capable de sporuler ,extrêmement halotolérante ,elle peut pousser dans un environnement avec une concentration de NaCl de 0,08 à 3,5M. Les bactéries se développent habituellement et vivent dans un environnement à une température de 10 à 45 °C et un pH de 6 à 9,5 et elles ont été conservées dans des milieux de gélose inclinée [1].



**Figure. 5a** souche *M.* SdK644

***b- klebsiella pneumoniae* ATCC25922**

Le genre *klebsiella* de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces dont l'espèce type est *klebtiella pneumoniae* qui est la plus fréquente des bactéries à gram négatif. Cette bactérie est fréquemment isolée de l'environnement (eaux usées, sol, etc.…).la culture sur une gélose nutritive donne des colonies d'aspect muqueux comme le montre la figure 5b. Cette souche nous a été fournie par le laboratoire de l'hôpital Mohamed BOUDIAF de Médéa.



**Figure. 5b** souche *klebsiella*

***c -Marinobacter* SF**

La *Marinobacter* SF est une souche bactérienne aérobie thermophile isolée d'un sol sableux anciennement contaminé par des rejets de forage au niveau des puits du champ de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie. Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à partir de sols de surface (5-20 cm de profondeur).

### II. 1. 1 Isolement de la souche *Marinobacter* SF

Des échantillons de sol contaminés par du pétrole brut ont été collectés dans la région de Hassi Messaoud (sud de l'Algérie). Les échantillons ont été prélevés et transférés directement dans des bouteilles stériles et stockés dans l'obscurité à 4 °C jusqu'à leur utilisation.
L'échantillon a subi un prétraitement pour déterminer le pH, la salinité et la conductivité électrique, une masse d'environ 10 g de sédiment, diluée 10 fois avec de l'eau ultra pure, a été soumise à une agitation mécanique pendant 24 h. Ensuite, une centrifugation à 4500 tr/m pendant 20 minutes et une filtration à travers des filtres Millipore (0,45 µm) ont été effectuées [2].

### II. 1. 2 Caractéristiques physico-chimiques

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Metler Toledo) comprenant une électrode sélective, La conductivité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre du type Consort C831 (Multi-Parameter Analyzer). La salinité (S) d'un échantillon solide est obtenue en comparant le résultat de la conductivité à la conductivité (A) de la solution de KCl de 32,4356 g. $L^{-1}$ (B) selon l'équation suivante (1).

$$S= (A.35) /B$$

Avec S : salinité de l'échantillon ; A : conductivité de l'échantillon en µS / cm ;
B : conductivité de la solution de KCl 32,4356 g. $L^{-1}$ ; 35 : salinité de référence [3]

### II. 1. 3 Isolement, purification et conservation des souches

L'isolement a été effectué selon la méthode des dilutions successives, pour cela deux grammes d'échantillon conservé (sol contaminé par des hydrocarbures) ont été placés dans 50 ml de milieu de culture d'enrichissement basique, contenant 1 % (v/v) de pétrole brut (Le milieu de culture riche utilisé est le milieu Luria-Bertani LB),dont la composition par litre est la suivante:5 g extrait de levure,10 gtryptone et 10 g NaCl).puis incubés à 37 °C à 180 tr/m (agitateur rotatif, GFL3005, Allemagne). Cette culture a été repiquée plusieurs fois dans les mêmes conditions. La souche bactérienne SF utilisée pour produire le surfactant a été maintenue sur la gélose nutritive. Le pétrole brut est utilisé comme seule source de carbone pendant 14 h et 37 °C [4].

### II. 1. 4 Détermination des conditions optimales et des paramètres de croissance

Les conditions optimales de croissance de la souche bactérienne isolée (pH, température et salinité) ont été déterminées en mesurant le taux de croissance spécifique (Vmax) selon l'équation (2).

$$Vmax = (Log (DO)-Log (DO\ to)/ (temps\ incubation) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

$t_0$ est le temps d'incubation initial

#### II. 1. 4. 1 Effet de la concentration en NaCl sur la croissance

Afin d'étudier l'influence de la salinité sur la croissance de la souche performante, la vitesse maximale de croissance a été mesurée en fonction de différentes concentrations en NaCl (0, 10, 20, 30, 50, 100, 150 et 250 g. $L^{-1}$).

#### II. 1. 4. 2 Effet de la température sur la croissance

Afin d'étudier l'effet de la température sur la croissance de la souche performante, la vitesse maximale de croissance a été mesurée en fonction de différentes températures(entre 15 et 70 °C).

#### II. 1. 4. 3 Effet du pH sur la croissance

Des essais ont été réalisés pour étudier l'influence du pH sur la croissance de la souche, en variant les valeurs de ce dernier entre 4 et 11.

### II. 1. 5 Caractérisation phylogénétique

La souche isolée a fait l'objet d'analyses phylogénétiques par séquençage de l'ADN correspondant à la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S). Plusieurs étapes sont nécessaires pour cela [4]. Les différentes étapes de l'identification génotypique de la souche isolée commencent par l'Extraction de l'ADN génomique (centrifugations, incubations), et enfin ,le culot obtenu contenant l'ADN est mis en suspension dans 20 µl d'eau stérile puis stocké à -20 °C), l'électrophorèse et la quantification de l'ADN génomique extrait sur gel d'agarose, l'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) du gène de l'ARNr 16S a été réalisée avec deux amorces universelles, une directe (Fal125 : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) s'étendant de la position de base 8 à 27, et l'autre inverse (Ral126 : AAGGAGGTGATCCAAGCC), s'étendant de la position de base 1.541 à 1.525,

conçu à partir des zones conservées dans l'opéron rRNA d'Escherichia coli. [5], nous avons utilisé le séquenceur automatique "Automated 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie). Les résultats de la séquence ont été importés dans Bio Edit v5.0.9 et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstruite. Une recherche BLAST (blastn, non-redondant) avec la séquence complète, via GenBank [5,6], a permis d'identifier la souche étudiée par comparaison avec les souches les plus proches.

### II. 2 Milieux de culture

Les milieux de culture doivent contenir les nutriments nécessaires au développement et au métabolisme des micro-organismes choisis. Ils doivent ainsi contenir au moins une source azotée, une source carbonée, une source de phosphore, ainsi que des micro et macro-nutriments (sels minéraux dont métalliques), éventuellement des facteurs de croissance. Les milieux de culture peuvent être solides ou liquides, synthétiques ou complexes, riches ou pauvres.
Différents milieux sont préparés pour la culture des bactéries et pour la production du biosurfactant, leurs compositions sont indiquées en annexe [7, 8].

### II. 3 Production du biosurfactant

Notre travail est focalisé sur la production des biosurfactants en utilisant les bactéries citées. Le principe de la dégradation est de fournir aux bactéries tous les éléments nécessaires pour qu'elles puissent se développer en présence d'une substance huileuse comme seule source de carbone et donner un grand rendement en biosurfactants.

### II. 3. 1 Optimisation des paramètres opératoires pour la production de biosurfactan par la souche *Marinobacter* SF

#### II. 3. 1. 1 Sélection de la source de carbone et de sa concentration

Cette partie consiste à maximiser la quantité de biosurfactant produite en faisant varier deux paramètres : La source de carbone et sa concentration avec une concentration constante de la source d'azote ($NH_4Cl$ ; 0,02 g. $L^{-l}$). Les types de sources de carbone utilisés dans les bioprocédés influencent grandement les rendements, la qualité et la quantité des biosurfactants [9].
Quatre sources de carbone (1% v/v) ont été utilisées dans notre étude afin de sélectionner la source optimale pour une production maximale de biosurfactants : Huile végétale, huile d'olive,

gasoil et hexadécane (Merck, Darmstadt). Tous les substrats ont été stérilisés à l'aide d'un filtre de 0,22 µm. Après avoir optimisé la meilleure source de carbone, nous sommes passés à l'optimisation de sa concentration, allant de 0,5%, 1%, 2% et 3%. La réduction de la tension de surface a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre (TSD132389, Gibertini, Italie) et a également été utilisée avec l'indice d'émulsification comme outil de sélection de la source de carbone et de sa concentration pour une production optimale de biosurfactant [10].

### II. 3. 1. 2 Sélection de la source d'azote et de sa concentration

Après avoir choisi la meilleure source de carbone à une concentration optimale, les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. Les différentes sources d'azote (2% g. $L^{-1}$) sont ajoutées aux milieux de culture : $NH_4Cl$, $NaNO_3$, $NH_4NO_3$ et urée. Après avoir optimisé la meilleure source d'azote, nous sommes passés à l'optimisation de sa concentration en $g.L^{-1}$, allant de 1%, 2%, 3% et 4%.

### II. 3. 1. 3 Optimisation du rapport C/N

Pour la détermination du rapport carbone/azote, la concentration de la source optimale d'azote a été fixée et les concentrations de la source de carbone ont été variées afin d'obtenir des rapports C/N de 5, 10, 30, 40 et 50.

### II. 3. 2 Préparation de l'inoculum

Dans un environnement stérile, et à partir d'une culture sur gélose nutritive on prélève une surface de la souche (des différents isolats), au moyen d'un fil à boucle stérilisé et on l'introduit dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon nutritif (LB) préalablement autoclavé. Le Milieu minéral de production préalablement autoclavé additionnés de 2% d'huile d'olive pour les deux souches *M.* SdK644 et *KP* et le gasoil pour la souche *M.*SF comme seule source de carbone. Ce milieu est inoculé par 1% de la pré culture précédente et l'incubation s'effectue à 30 °C pour la *M.* SdK644 et *Kp*, et 45 °C pour la *M.* SF dans un incubateur à agitation à 150 tr/m pendant 3 jours.

### II. 3. 3 Tests de production des biosurfactants

### II. 3. 3. 1 Mesure de la croissance bactérienne

Un volume de culture est prélevé régulièrement chaque jours dans des tubes, le surnageant a été analysé par balayage dans la région à 600 nm pour déterminer la croissance bactérienne.

### II. 3. 3. 2 Déplacement de l'huile (Oil displacement)

Dans une boîte de Pétri d'un diamètre de 90 cm contenant 10 ml d'eau distillée, un volume de 20 µl de pétrole brut est étalé sur toute la surface de l'eau distillée. Ensuite, 10 µl du surnageant de culture est légèrement placé au centre de la couche de pétrole. Le diamètre (en cm) de la surface halo claire est mesuré après 30 secondes. Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante [11].

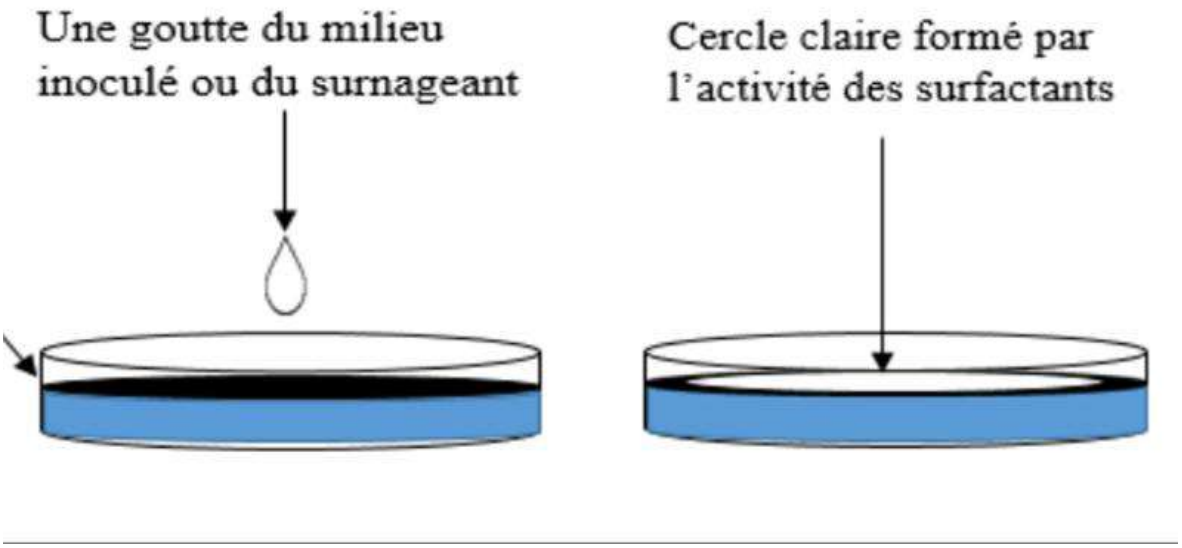



**Figure. 6** Test de déplacement d'huile

### II. 3. 3. 3 Activité d'émulsification

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brut) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture (de fermentation) avec 3 ml de pétrole brute dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 min. Puis après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion($E_{24}$) selon la relation ci-après. Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante. Puis le calcul de E24 est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion [12].

Le calcul du $E_{24}$ est effectué selon la relation suivante :

$$E_{24} = (he / ht) \times 100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

he : hauteur de l'émulsion.

ht : hauteur totale du mélange.

### II. 3. 3. 4 Détermination de la tension superficielle

La tension superficielle 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 méthode utilisée consiste à prélever un échantillon de culture toutes les 12 heures et ce pour une durée de 5 jours pour le suivi de la tension superficielle [13].

### II. 3. 4 Extraction du biosurfactant

Après avoir séparé la biomasse du milieux par centrifugation à 6000 tr/min , le liquide récupéré est précipité par l'acétone ,cette opération a été effectuée par le dosage de trois volumes d'acétone goutte à goutte sur un volume de surnageant déposé sous agitation avec l'utilisation de la glace à 4 °C, le mélange homogène (surnageant –acétone ) est mis dans le réfrigérateur pendant 24 h ,puis il est centrifugé à 200 tr/min. Le solide récupéré a été séché dans l'étuve à 37 °C après 48 h, la poudre obtenue par la suite c'est le biosurfactant.

## II. 4 Caractérisation du biosurfactant

### II. 4. 1 Détermination de la Concentration Micellaire Critique (CMC)

Les solutions tensioactives ont été préparées dans de l'eau ultra pure (EUP) à partir de la solution mère. Le pH est ajusté à 7 par ajout de NaOH 0,5 et/ou 0,1 mol. L-1, les solutions ont été filtrées sur membrane en fibre de verre GF/D Whatman de porosité 2,7 µm, puis sur membrane en nitrate de cellulose Whatman de porosité 0,45 µm pour éliminer d'éventuelles particules insolubles qui représentent moins de 0,5 %. Durant l'étape de filtration, seule une perte négligeable de biotensioactif a été notée.

Une solution mère à 1 g. $L^{-1}$ a été préparée, cette solution est conservée à 4 °C pendant au maximum 4 jours. Les solutions filles sont obtenues par dilutions successives et leur pH est ajusté à 7 juste avant utilisation, la détermination de la CMC est obtenue en traçant graphiquement la courbe représentant la tension de surface en fonction de la concentration en tensioactif. La courbe obtenue présente une pente décroissante jusqu'à la CMC puis devient constante par la suite.

### II. 4. 2 Pouvoir émulsifiant

Afin d'évaluer le pouvoir d'émulsifiant ($E_{24}$) des biosurfactants issus des souches productrices, une solution de biosurfactant (1 $g.L^{-1}$l) a été testée contre plusieurs substrats hydrophobes de différentes nature à savoir : l'hexane, l'huile d'olive, le gasoil, l'essence.

### II. 4. 3 Spectrophotométrie infrarouge IR

Les techniques de spectrophotométrie infrarouge sont utilisées pour la détermination des groupement fonctionnels permettant de proposer la structure, chaque liaison présente des vibrations caractéristiques de fréquence bien déterminée[14].

Les groupement moléculaire possèdent un certain nombre de modes de vibration caractéristiques qui sont déterminés par les masses des atomes constituant les forces interatomiques et la géométrie des arrangements, c'est-à-dire la structure.

Les vibrations modifient le moment électrique dipolaire, ce qui entraine l'absorption des ondes électromagnétiques dans la région 1 à 100 µm qui correspondent au domaine de la spectrographie infrarouge.

Le biosurfactant partiellement purifié a été analysé à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de marque Bruker-TENSOR 27. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés dans la région située entre 400 et 4000 $cm^{-1}$ et enregistrés par un logiciel OPUS. Une goutte de biosurfactant est déposée au centre d'une pastille de bromure de potassium.

### II. 5 Caractérisation des échantillons

Les pesticides utilisés dans notre étude sont des produits fournis par (la direction des forêts, et la DDA de Médéa), sont les plus utilisés en Algérie.

### II. 5. 1 (Métribuzine 70%) nom commercial metrixon

La métribuzine est un herbicide, appartenant à la famille des triazines, employé en prélevée et en post-levée pour lutter contre les mauvaises herbes qui parasitent diverses cultures agricoles.

La métribuzine ($C_8H_{14}N_4OS$) est une molécule aromatique, donc des hétérocycles à six chaînons comprenant trois atomes de carbone et trois atomes d'azote, qui possède un groupement amine, un groupement soufre, un groupement cétone et 1, 2, 4- triazine. Son nom chimique est : 4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-méthylthio-1,2,4-triazin-5-one [15].

La courbe d'étalonnage de la métribuzine est représentée sur la figure 7.

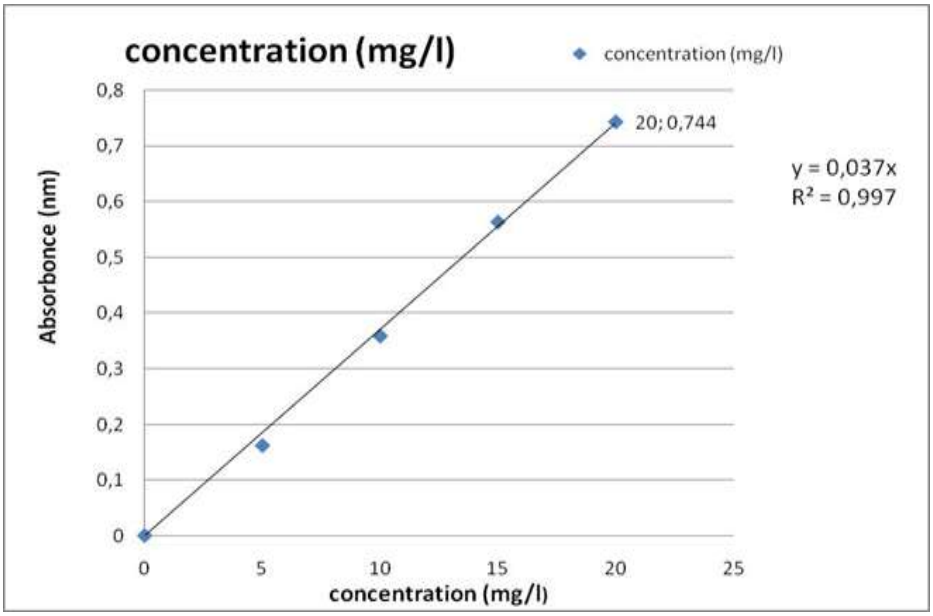



**Figure 7.** Courbe d'étalonnage de la métribuzine

### II. 5. 2 Acétamipride 20% SP (nom commerciale MOPISTOP)

Insecticide produit sous les noms commerciaux : Assail et CHIPCo par Aventis Crop Sciences. Cette famille d'insecticides : Néonicotinoïdes a été introduite au début des années 1990. Son nom chimique est N - [(6-chloro-3-pyridyl) méthyl] - N ' -cyano- N -méthyl-acétamidine [16]. Les Caractéristiques de l'Acétamipride sont mentionnées dans le tableau ci-dessous

**Tableau. 6** Caractéristiques de l'Acétamipride

| | |
|---|---|
| Nom | Acétamipride. |
| Masse molaire | 222.67 g/mol |
| Formule chimique | $C_{10}H_{11}CLN_4$ |
| Solubilité | 4.25 $g.L^{-1}$ |
| λ max | 244 nm |

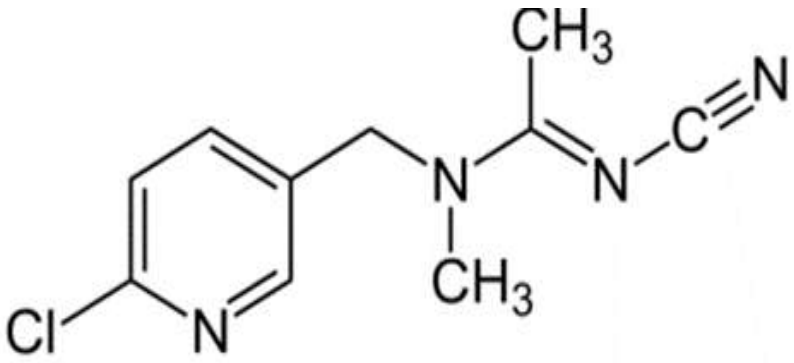



**Figure. 8a.** formule chimique de l'acétamipride

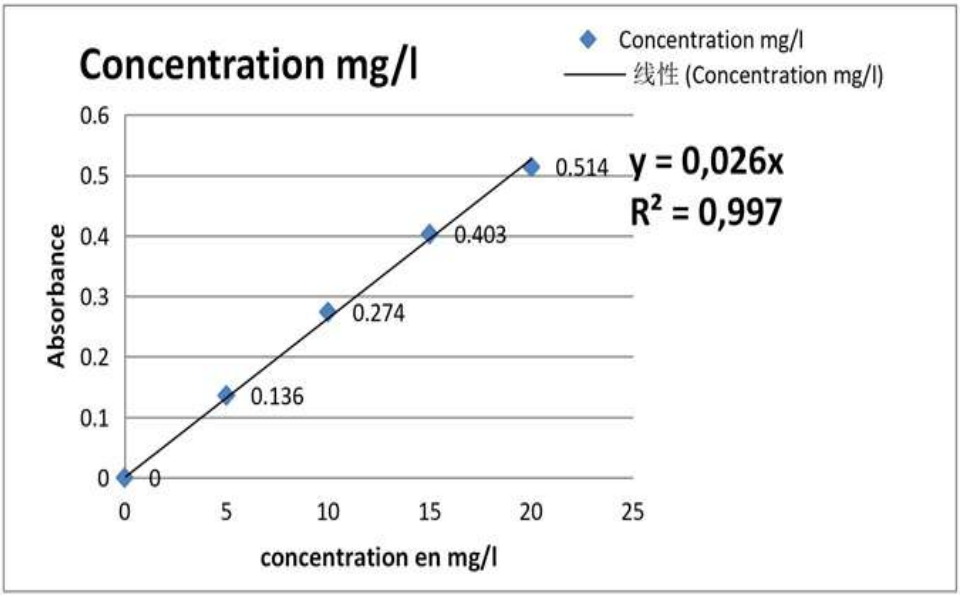



**Figure. 8b.** Courbe d'étalonnage de l'acétamipride

### II. 5. 3 Effluent industrielle : Rejet d'abattoir

L'échantillonnage a été effectué à la sortie de l'abattoir de Médéa, à 6 heures du matin. Les échantillons ont été prélevés dans des récipients en verre ou en polyéthylène, et conservés entre 2 °C et 4 °C avec une acidification à l'acide sulfurique jusqu'à pH inférieur à 2, sous réserve d'éviter toute contamination de l'échantillon.

## II. 6 Analyses physico-chimiques des échantillons

### II. 6. 1 Mesure de la température et du pH

La température a été mesurée in situ à l'aide d'un thermomètre (JULABO). Le pH a été mesuré par électrochimie à l'aide d'un pH-mètre (Istek Neo Met) comportant une électrode sélective qui sera en contact de la solution en question

### II. 6. 2 Conductivité électrique et salinité

La détermination de la conductivité électrique est une mesure indirecte de la salinité. La conductivité électrique a été mesurée à l'aide d'un conductimètre (CONSORT C831). L'unité de la conductivité électrique est le Siemens par mètre (S/m). La salinité est déterminée approximativement en multipliant la conductivité électrique par un facteur de correction qui dépend de la valeur de la conductivité. Pour une conductivité supérieure > 10000 µS, le facteur de correction est = 0,85.

### II. 6. 3 Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La DCO est déterminée par oxydation en milieu acide par l'excès de dichromate de potassium à la température de 148 °C des matières oxydables dans les conditions de l'essai en présence de sulfate d'argent comme catalyseur et de sulfate de mercure qui joue le rôle de complexant pour les éventuels chlorures ).La teneur est déterminée selon la norme ISO 606089 à l'aide d'un dispositif à six post (behr) équipé d'un module de commande (Behrotest TRS 300) [17].

### II. 6. 4 Demande Biologique en Oxygène ($DBO_5$)

La $DBO_5$ permet d'évaluer la fraction biodégradable de la charge polluante carbonée) [17]. Elle est mesurée dans une enceinte tempérée et ventilée à 20 °C (BSB-Controller Model 620T (WTW)), fonctionnant selon le principe barométrique qui repose sur une mesure de pression.

### II. 6. 5 Dosage des paramètres chimiques

Les éléments chimiques de l'effluent dosé sont les Nitrates, les Phosphates et l'Ammonium. La teneur est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre typique (spectrophotomètre DR /4000 V, 230 Vac| Hach USA) et de cellules en verre d'une capacité de 25 ml ; détection dans le domaine visible (300-1000) nm. L'analyse de l'élément ou du composé est effectuée après sa complexassions avec le réactif ajouté, qui développe une couleur. Le dosage du nitrate est effectué à 415 nm, celui de l'ammonium à 655 nm et celui des phosphates à 880 nm) [17].

### II. 6. 6 Dosage des matières en suspension

Les matières en suspension (MES), exprimées en milligrammes par litre, désignent les particules dont la taille est comprise entre 10 nm et 1 µm, déterminées par une filtration sous vide. Elle est déterminée par filtration à travers des fibres de verre à l'aide d'un appareil de filtration sous vide. La teneur en matières en suspension est donnée par la formule (2).

$$P = (b-a) \times 1000 / v \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(2)$$

Avec P : la teneur en matières en suspension en $mg.L^{-1}$, a et b : la masse du filtre avant et après filtration en mg. v : le volume de l'échantillon en ml [17].

### II.7 Etude de la biodégradation de l'effluent d'abattoir

Une quantité d'espèce bactérienne est mise dans le milieu LB et incubée dans un agitateur orbital à 30 °C et 150 tr/min pendant 24 h. 3% de ce milieu est introduit dans 500 ml de rejet, incubé sous agitation à 150 tr/min. Dans le but de quelques mesures et de différentes analyses, des prélèvements ont été fait chaque 24 h.

Plusieurs paramètres ont fait l'objet d'un suivi régulier à savoir : les matières en suspension (MES), la DCO : demande chimique en oxygène selon la méthode normalisée ISO 606089. La $DBO_5$ : par la méthode respiromètrique. Les éléments chimiques de l'effluent dosés sont : les Nitrates, les Phosphates et l'Ammonium. (ISO7150/1-1984, ISO6878 ) [17].



**Figure.9**.Incubation des échantillons

### II. 8 Traitement du rejet d'abattoir avec les biosurfactants produits

0.1g des biosurfactants a été dissoute dans 5 ml d'eau distillée ce mélange a été introduit dans 500 ml de rejet (abattoir), les échantillons ont été incubé à 30 et 45 °C et 150 tr/ min. Le prélèvement et l'analyse doivent se faire chaque 24 h pendant 7 jours.

### II. 9 Elimination des pesticides

### II. 9. 1 Etude préliminaire : Adsorption des pesticides sur charbon actif

L'adsorption sur charbon actif en poudre reste une technique de choix pour la réduction des teneurs en polluants organiques. Le charbon actif en poudre(CAP) présente une bonne capacité d'adsorption pour les pesticides due essentiellement à sa surface spécifique.
Ce travail a pour but de tester l'élimination de ces pesticides, en solutions synthétiques d'eau distillée par adsorption sur charbon actif en poudre. Nous avons étudié l'effet des paramètres réactionnels (cinétique d'adsorption, effet de la masse du charbon, teneur initiale en pesticides et influence du pH du milieu).
Dans notre travail on a utilisé le charbon actif commercialisé sous forme de poudre CAP. Le tableau 7 représente les caractéristiques du CAP utilisé.
Avant toute manipulation le charbon actif est rincé plusieurs fois à l'eau pure, puis maintenue dans un bain d'eau pendant 4 heures (minimum) pour enlever les fines particules et désorber .Le CAP est ensuite séché à l'étuve à 105 °C pendant une nuit et conservé dans un dessiccateur [18].

**Tableau. 7** Caractéristiques du charbon actif utilisé.

| **Propriétés** | **Charbon actif** |
|---|---|
| Masse volumique apparente | 940.50 kg/m3 |
| Surface spécifique | 674 m²/g |
| Masse volumique réel | 376,64 kg/m3 |
| Taille effective (TE) | 0.0092 mm |
| La porosité (η) | 23.37% |
| Conductivité | 760 µs/cm |

### II. 9. 2 Etude de la biodégradation des pesticides

Afin de déterminer la capacité de dégradation de ces pesticides, les isolats purifiés ont été introduits sur un milieu de culture (MM) additionné de l'un des pesticides testés comme seule source de carbone et d'énergie**.**

La capacité des souches à dégrader ces pesticides, se traduit par une bonne croissance sur le milieu. L'effet des facteurs physicochimiques : Le pH, la température et la concentration initiale du pesticide sur la capacité de dégradation des souches bactériennes a été évalué, en mesurant la densité optiqu**e** à 600 nm des cultures. Les essais de croissance bactérienne et de dégradation des pesticides ont été menés à des températures allant de 12 °C qui peut correspondre à la température d'une eau naturelle à traiter, et 45 °C. L'effet du pH a été testé pour la gamme suivante : 4,7 et 9.Alors que la concentration du pesticide a été examinée avec les concentrations de 2,20,50,100 mg. $L^{-1}$.

Les expériences ont été réalisées dans des flacons de 200 ml contenant 100 ml de milieu MM. Le pH est ajusté à 7. Après stérilisation du milieu, un inoculum de 1% d'une pré culture de la souche a été ajouté au milieu MM, de même que le pesticide à différentes concentrations. Les cultures sont incubées sous une agitation de 150 tr/min pendant 6 jours. Un volume de 5 ml est prélevé régulièrement pour la mesure de la DO, un balayage UV afin de suivre l'évolution des pesticides .Afin de confirmer la dégradation, une étude plus détaillée, sur la cinétique de dégradation du pesticide par cette souche a été évaluée par analyse spectrophotométries UV et par mesure de la DCO.

### II. 9. 3 Criblage des facteurs affectant la croissance

Pour évaluer l'effet des paramètres physicochimiques : concentration du pesticides, pH, volume de l'inoculum, et la température d'incubation, sur la dégradation de l'Acétamipride, et la croissance des deux souches (*kp*, *M*.SdK644*)*, et vue la pathogénie de la souche *Kp*, nous avons utilisé le plan d'expérience factoriel complet, ce dernier est un plan qui permet de repérer rapidement, dans un certain nombre (k) de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur la biodégradation de ce pesticide, ou la croissance de la souche. Le nombre de facteurs doit être inférieur au nombre d'essais [19].

L'analyse des données expérimentales a été explorée à l'aide du logiciel JMP qui est un logiciel de statistique élaboré par la société SAS Institute Inc. qui est particulièrement bien adapté pour la construction et l'analyse des plans d'expériences.

Pour notre matrice d'expérience on a choisi deux réponses :la première réponse est la croissance bactérienne qui a été évalué par mesure de la densité optique à 600 nm pour les deux souches étudiées, la deuxième réponse c'est le rendement d'élimination du pesticide étudié ,qui a été évalué par mesure de la DCO d'une solution de pesticide de concentration connue ,et la mesure après incubation et stérilisation sur filtre seringue ; le calcul du rendement est comme suit :

$$R\% = [(DCOE-DCOS)/DCOE].100 \quad (3)$$

**Tableau. 8**. Criblage des facteurs affectant la croissance

| N° essai | X1(temperature) | X2(pH) | X3(c1:pesticide) | X4(c2:inoculums) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 |
| 1 | -1 | -1 | +1 | +1 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 |

**Tableau.9.**Différents niveaux de chaque facteur**.**

| Niveau / Facteur | -1 | +1 |
|---|---|---|
| Température | 12°C | 30 °C |
| pH | 4 | 7 |
| C (pesticide) | 2 $mg.L^{-1}$ | 20 $mg.L^{-1}$ |
| C ((inoculum) | 1 % | 4 % |

## II. 10. Elimination des pesticides avec les biosurfactants produits

Les essais d'application des biosurfactants sur les pesticides ont été réalisés à des concentrations définis des pesticides, une solution concentré de biosurfactants a été ajouté de façon à avoir la CMC ,1/2* CMC et 1/4* CMC et 2*CMC dans 50 ml du milieu.
Ces échantillons ont été placés à 30 °C et 150 tr/min pendant trois jours.
Le suivi de la concentration des pesticides a été réalisé par balayage UV et par mesure de la DCO.

# Partie III

## Résultats et discussions

### III. 1 Caractérisation de la souche *Marinobacter* SF

### III. 1. 1 Détermination des conditions optimales et des paramètres de croissance de la souche *marinobacter* SF

D'après la figure 10 on observe qu'après 10 jours d'incubation, la souche SF se développe dans une gamme de pH comprise entre 6 et 10.5, avec un optimum de croissance à pH 7.4. De même, elle est capable de se développer dans une plage de température de 15 à 50 °C, avec un optimum à 45 °C, comme le montre la figure 10. Ainsi, la concentration de NaCl pour la croissance de la souche *M*.SF était optimale entre 0-30 g. $L^{-1}$ de NaCl. L'absence de croissance a été observée à une concentration de NaCl de 110 g. L-1 comme le montre la figure 10c.

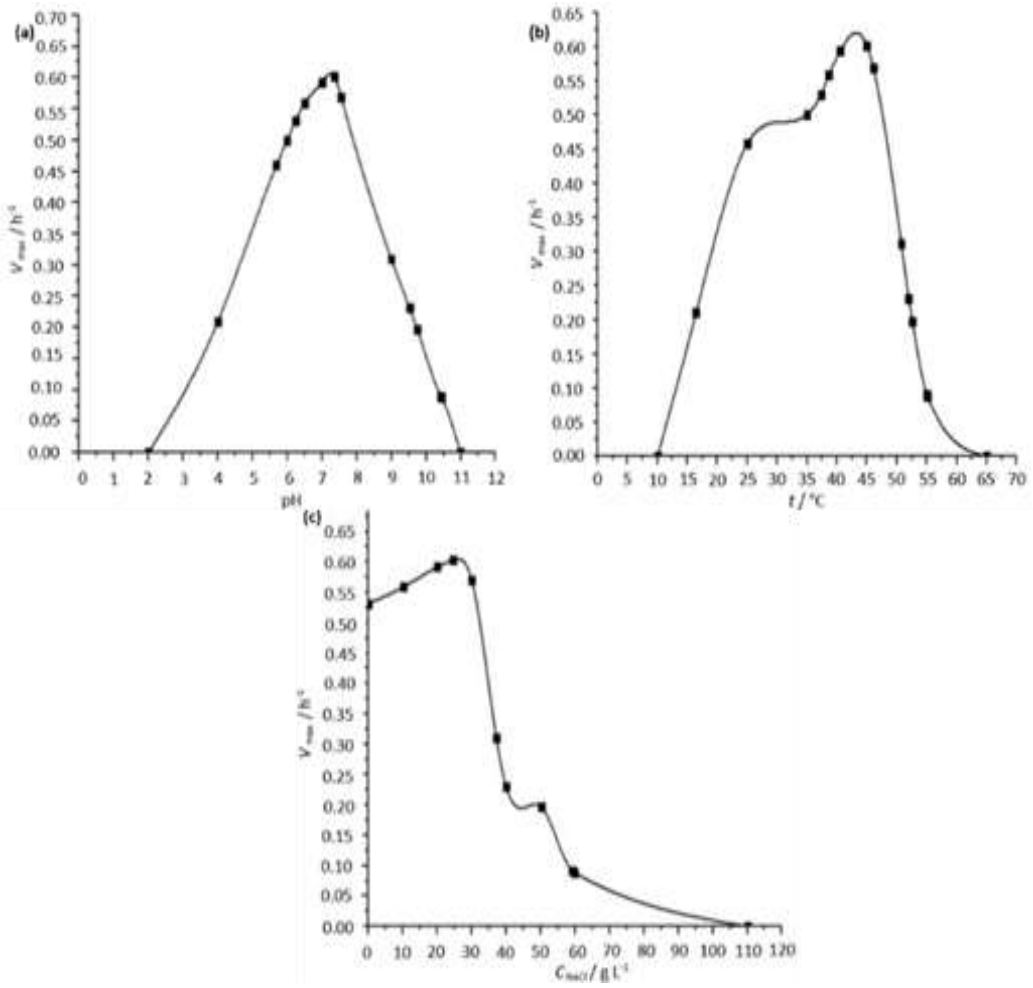



**Figure. 10.** Influence du pH (a), de la température (b) et de la concentration de NaCl (c) sur la croissance bactérienne

### III.1.2 Analyse phylogénétique

L'identification moléculaire de l'isolat producteur de biosurfactant a été réalisée en séquençant le gène de l'ARNr 16S et en comparant les séquences à la base de données de l'ARNr 16S du NCBI avec les séquences d'ARNr 16S de l'isolat et de la souche étroitement apparentée, un arbre phylogénétique enraciné a été construit (Fig. 11). L'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S nous a permis d'identifier la souche *SF* comme une espèce de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. La souche SF présente 99,76% de similarité en utilisant BLASTn avec le type de souche de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, ATCC 27132T (GenBank accession no. AB021372).

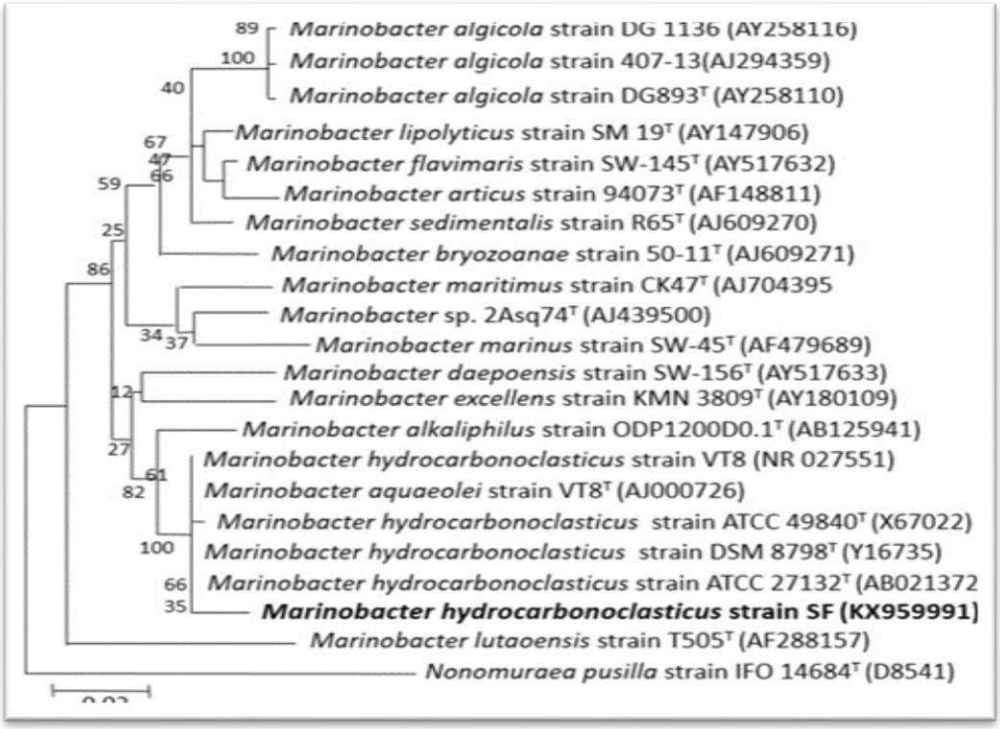



**Figure. 11**. Arbre phylogénétique basé sur 1500 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche *M*.SF, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre *Marinobacter*. Les pourcentages de Bootstrap sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès (Genbank) sont indiqués entre parenthèses.

### III. 1. 3 Affiliation phylogénétique de la souche *M*. SdK644

Un fragment d'environ 1500 pb du gène de l'ARNr 16S a été amplifié à partir de l'ADN génomique de l'isolat, cloné dans le vecteur pGEM-T Easy et séquencé sur les deux brins pour établir un support supplémentaire pour l'identification de la souche SdK644.

La séquence du gène de l'ARNr 16S (968pb) obtenue a été soumise à une série d'analyses de recherche par le programme GenBank BLAST ayant permis d'établir une forte similitude avec celles de plusieurs souches cultivables de *Marinobacter* sp. Les valeurs de confiance pour les branches des arbres phylogénétiques ont été déterminées en utilisant des analyses bootstrap basées sur 1000 réplications [20]. L'analyse phylogénétique indique que la souche SdK644 est plus étroitement associée aux membres du genre *Marinobacter* et plus spécifiquement à l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus* [21], avec une similarité de séquence de 97,5% (avec la souche ATCC 49840T) (figure 12). Ce seuil est suffisamment élevé (>97%) pour l'affilier à *M. hydrocarbonoclasticus*, selon l'étude de Stackebrandt et GoebeL(1994) [22], qui est largement utilisée dans la classification des bactéries [23].

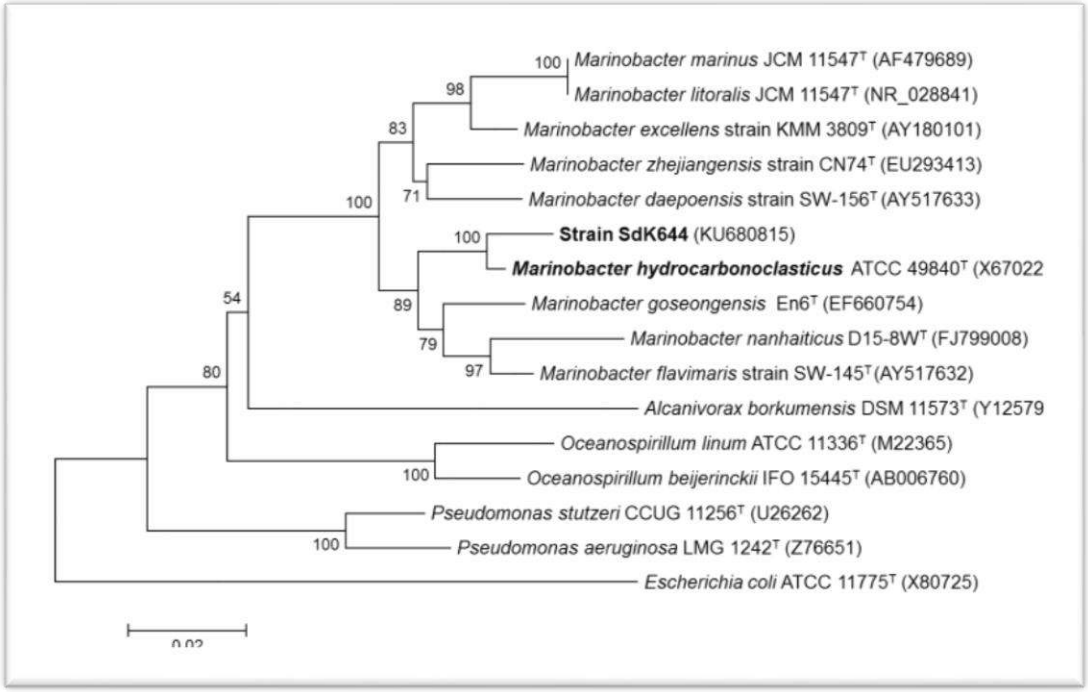



**Figure. 12** : Arbre phylogénétique de la souche *M*. Sdk644 [1]

### III. 2 Production de biosurfactants

L'objectif de cette partie est la production des biosurfactants à partir des trois souches bactériennes isolées et leurs caractérisations.

A notre connaissance, la souche bactérienne *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SF isolée d'un sol algérien contaminé par des hydrocarbures capable de produire des biosurfactants n'a pas été étudiée jusqu'à présent par d'autres chercheurs.

Pour la *M*. SF la stratégie adoptée est une optimisation par étapes, ainsi en faisant varier un seul facteur à la fois, la cinétique de la production de biosurfactant a été également établie. Cette dernière, a été suivie par une culture de l'espèce *Marinobacter carbonoclasticus* SF dans un milieu contenant du gasoil comme meilleure source de carbone et du $NH_4Cl$ comme source d'azote avec un rapport C/N égal à 5 optimal. Dès les premières heures d'incubation, la production du biosurfactant commence, prouvée par la diminution de la tension superficielle et cela revient à l'utilisation de la préculture qui donne un inoculum initial approprié et important dans des conditions de fermentation optimales favorisant la production, la phase de latence est courte. Après 72 heures de fermentation, la production du biosurfactant atteint son maximum (ST = 27,94 mN. $m^{-1}$) avec des émulsions stables ($E_{24}$ = 75%).

#### III. 2. 1 Evaluation de la production des biosurfactants

La production des biosurfactants par les souches isolées *M.* SdK644,*M*. SF, et *Kp* a été réalisée en utilisant le milieu de base (MM) . Les cultures bactériennes ont été incubées et suivies au cours du temps par mesure de la densité optique à 600 nm, pendant 3 jours. La mesure de la tension de surface (TS) et le test de déplacement d'huile, ont été effectués au cours de la croissance des souches.

#### III. 2. 1. 1 Croissance bactérienne

Selon les résultats représentés dans le tableau 10, la souche *Marinobacter* SdK644 présente la meilleure croissance bactérienne, avec une densité optique égale à 1.601 après trois jours d'incubation, en présence de l'huile d'olive comme source de carbone, suivie par la *Marinobacter* SF avec une densité optique de 0.628 après trois jours d'incubation à 45 °C en présence de gasoil , tandis que la souche *klebsiell*a a présenté la plus faible densité optique qui est égale à 0.428 après trois jours d'incubation à 30 °C en présence de l'huile d'olive.

Hentati et al. 2018 [24] ont étudié la production de biosurfactants par les souches FLU5, NAPH6, CO100 et PYR isolées des milieux marin ,ils ont trouvé une croissance bactérienne allant de 0.45 à 2.18 se diffère selon la source de carbone utilisée

**Tableau. 10.** évaluation de la croissance bactérienne

| Souches / DO | *M.* SF | *Kp* | *M.* SdK 644 |
|---|---|---|---|
| 1ère jour | 0.302 | 0.230 | 0.991 |
| 2ème jours | 0.525 | 0.365 | 1.402 |
| 3ème jours | 0.628 | 0.428 | 1.601 |

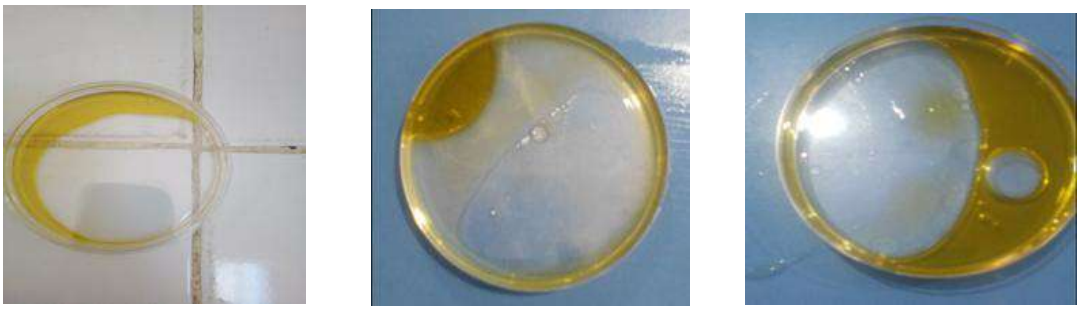
Cela signifie que la meilleure souche productrice du biosurfactant est la *Marinobacter* SdK644 suivie par la souche *M.* SF et en dernier c'est *la klebsiell*a.

### III. 2. 1. 2 Déplacement de l'huile (Oil displacement)

Le déplacement de l'huile est strictement lié à la présence de biosurfactants dans le surnageant des bactéries testées [25], le diamètre de déplacement varie selon la quantité de biosurfactants présente dans le surnageant de chaque échantillon. Toutes les souches testées ont montré un résultat positif pour le déplacement de l'huile mais à des diamètres différents.

Le test de déplacement d'huile est un test utilisé également pour montrer la sécrétion de biosurfactants par les souches étudiées [26]. Dans le cas de la souche *M.* SdK644 la formation d'un halo est remarquable pour les boites contenant l'huile d'olive (8,7 cm), l'essence (8,7 cm), Pour le reste des substrats (gasoil) le halo formé est compris entre 3,5 et 4,5 cm. Pour la souche *Kp,* le déplacement de la couche de pétrole entraîne la formation d'un halo de diamètre 6 cm dans le cas des cultures sur l'huile d'olive, Pour le gasoil le diamètre de la zone claire varie entre 2,3 et 3,2 cm . Concernant la souche *M.* SF nous remarquons la formation d'un halo suite au déplacement de la couche de pétrole de diamètre 6,7 cm dans le cas de l'huile d'olive que le diamètre d'halo varie entre 7 et 7.9 cm pour le gasoil.

.



*M*.Sdk644 *(*h olive) *M.* SF *(*gasoil*)* *Kp* (h olive)

**Figure. 13** Test du DDH pour les différentes souches

La réduction de la tension de surface ainsi que le déplacement de la couche de pétrole pourraient être expliqués par la synthèse, par les souches marines SdK644 et SF et la souche *Klebsiella pneumoniae* des agents tensioactifs ou des biosurfactants.

Les biosurfactants présentent les avantages de biodégradabilité, de faible degré de toxicité, et d'utilisation dans diverses applications. Cependant, leurs coûts élevés de production soulignent la nécessité d'optimiser le processus de production pour permettre une éventuelle application à l'échelle industrielle [27].

A la lumière des résultats obtenus, les souches *M*. SdK644, *M.* SF *et Kp*, ont montré leur capacité intéressante de produire des agents tensioactifs, en utilisant l'huile d'olive et le gasoil comme sources de carbone.

### III. 2. 1. 3 Activité d'émulsification

Les tensioactifs jouent un rôle très important dans la solubilisation des molécules hydrophobes en les piégeant dans la pseudo-phase hydrophobe formée par les micelles, permettant ainsi d'augmenter leur solubilité apparente[28].L'indice E24 permet une estimation quantitative du taux d'émulsification par les différents isolats. Les différents microorganismes isolés peuvent tous solubiliser l'huile et former une pseudo-phase hydrophobe mais les indices d'émulsion ($E_{24}$) varient d'une bactérie à une autre selon le taux de production de biosurfactants. Le biosurfactant produit par la souche *M*. SdK644 possède un bon pouvoir émulsifiant contre l'huile d'olive ($E_{24}$ = 75%), suivi par l'essence ($E_{24}$ = 64%), et un faible pouvoir émulsifiant vis-à-vis le gasoil ($E_{24}$= 19%) tandis que l'hexane n'a pas été émulsifié. Pour le biosurfactant produit par la souche *M*. SF, une bonne activité émulsifiante a été décrite

sur le gasoil et l'huile d'olive avec un E24 de 75 et 68% respectivement et un faible E24 qui est égale à 24 % contre l'essence. Pour le biosurfactant produits par la souche *Kp* il a présenté un E24 égale à 64 et 44 % avec l'huile d'olive et le gasoil respectivement et 23 % avec l'essence.

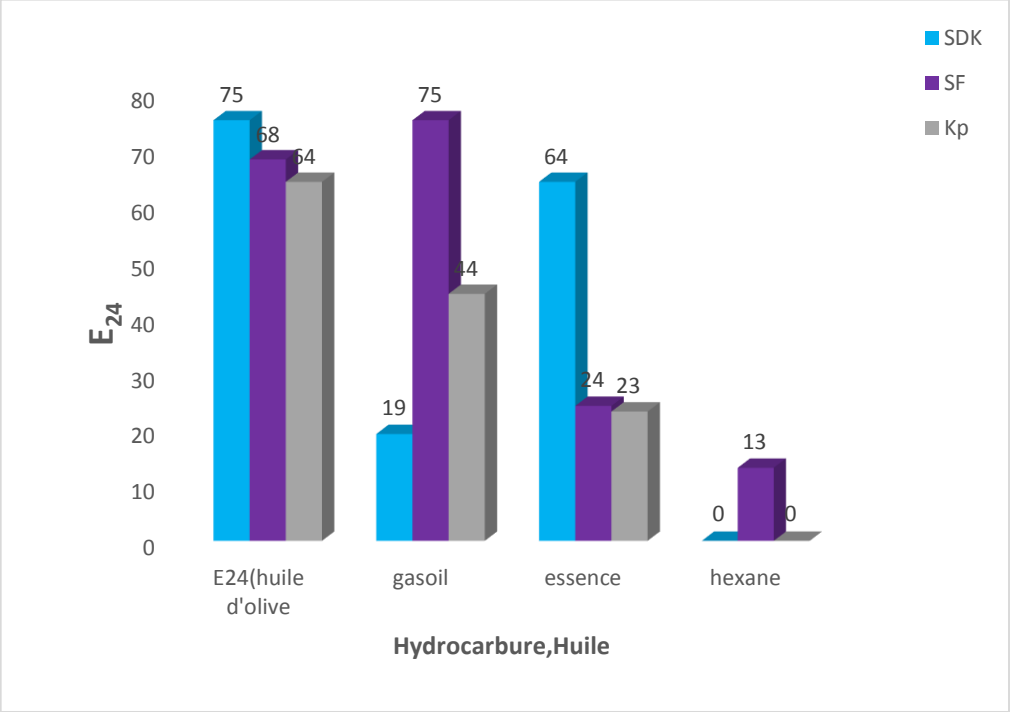



**Figure**. 14. Pouvoir émulsifiant des biosurfactants sur les hydrocarbures et les huiles.

En comparant avec des travaux antérieurs, le biosurfactant produit par la souche *Nocardiopsis sp.* B4 présente un meilleur pouvoir émulsifiant avec l'huile d'olive, l'indice d'émulsion était de 80% [29]. Mnif et al. en 2012 ont indiqué que la souche marine *Pseudomonas aeruginosa* C450R a une activité émulsifiante maximale vis-à-vis du pétrole, une bonne activité contre les huiles végétales (E24 de plus de 50%) [30]. Ferhat et al. en 2011 ont trouvé que l'indice d'émulsification des biosurfactants produits par les souches *Brevibacterium* 7G et *Ochrobactrum* 1C respectivement égale à 45 et 52,2 % avec l'huile de tournesol et 92,31 et 95,23 % avec l'huile moteur [2].

### III. 2. 2 Caractérisation des biosurfactants

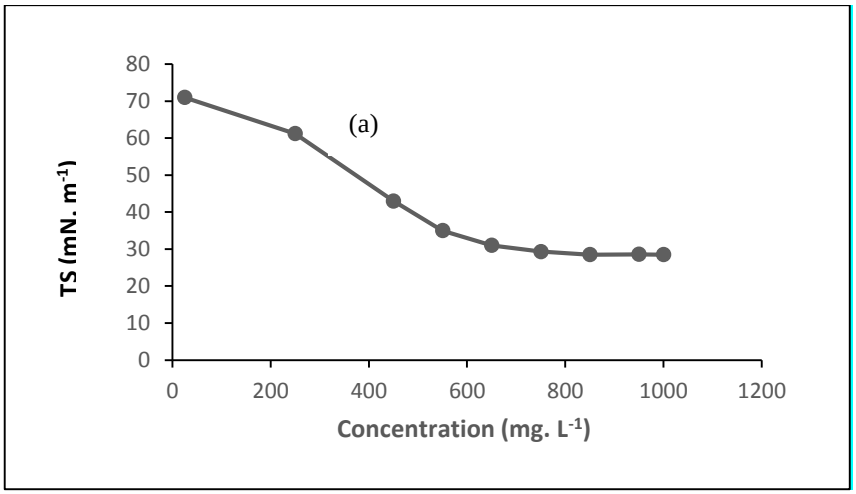
### III. 2. 2. 1 Détermination de la CMC

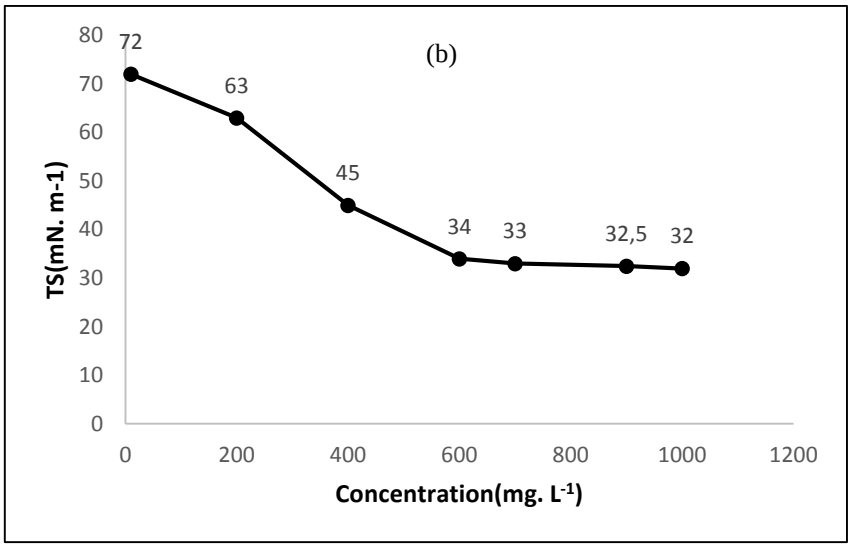
Les bactéries produisent des tensioactifs capables de réduire les tensions interfaciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide [31]. La tension superficielle des surnageant des différentes cultures a été mesurée en fonction de la concentration en biosurfactants excrétés dans le but de comparer les activités de surface de tous les isolats. Les différentes figures montrent le tracé de la tension de surface par rapport à la concentration en biosurfactant.

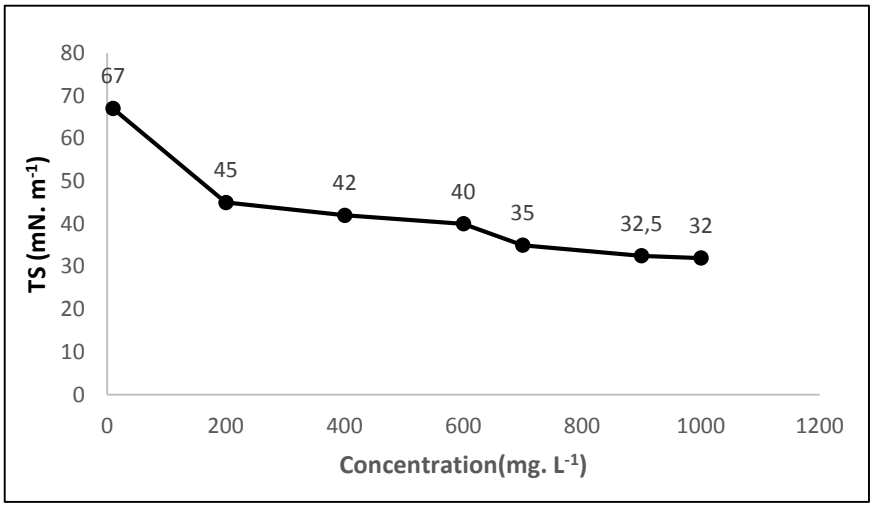
Comme le montre la figure 15, la tension de surface (TS) est inversement proportionnelle à la concentration en biosurfactant pour des valeurs inférieures à (a : 850 –b : 750-c : 900) mg. $L^{-1}$, au-delà, aucune diminution significative n'est observée. Cela, donne une valeur de CMC de 850 mg. $L^{-1}$ pour le biotensioactif SF, 750 mg. L-1pour le biosurfactant SDK644 et de 950 mg. $L^{-1}$ pour le biosurfactant produit par la souche *Kp* et une tension de surface de (a : 28, b : 32.5 et c : 32.5) $mN.m^{-1}$.

Ces valeurs sont inférieures aux CMC de certains tensioactifs chimiques tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) (CMC allant de 2307 à 2596 mg. $L^{-1}$ avec une TS de 35 mN/m) [32,33] et ceux obtenues par Ferhat et al. (2011) [2] qui ont trouvé une CMC relativement élevée (1500 mg. $L^{-1}$) et ceux de Gudiña et al. ou la CMC était (2500 mg. $L^{-1}$) [34].

En outre, il a été montré que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* W10 pourrait produire des rhamnolipides capables de diminuer la tension de surface à 32,3 mN. $M^{-1}$ avec une valeur de CMC de 400 mg. $L^{-1}$ [35]. En effet, les rhamnolipides produits par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 ont montré l'aptitude à réduire la tension de surface jusqu'à 27,4 mN. $m^{-1}$avec une valeur de CMC de 700 mg. $L^{-1}$ [36].




(c)

**Figure. 15**. Evolution de la TS en fonction de la concentration du biosurfactant (a : SF, b : kp, c : SdK644*)*

Les quantités des biosurfactants recueillis sont indiquées dans les tableaux ci-dessous

**Tableau. 11** .Quantités des biosurfactants produites

| **Microorganismes** | **Quantité** |
|---|---|
| *Marinobacter* SF | 0.901 g pour 300 ml de surnagent |
| *Marinobacter* SdK644 | 1.137 g pour 300 ml de surnagent |
| *Klebsiella pneumonia* | 1.095 g pour 300 ml de surnagent |

Il a été mentionné que les substrats hydrophobes, y compris les hydrocarbures et les huiles végétales, pouvaient induire la synthèse de surfactants biologiques [37]. La production des biosurfactants en utilisant les huiles de friture résiduelles, fait l'objet d'un intérêt considérable au cours de ces dernières années [38]. Dans ce contexte, (George et al. 2013) ont étudié le potentiel d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 à synthétiser 2,26 g. $L^{-1}$ des rhamnolipides, en utilisant l'huile de noix de coco usagée, comme substrat [39]. La production des glycolipides par la souche bactérienne 16 LM. USTHB de *Rhodococcus erythropolis*, en utilisant l'huile de friture résiduelle comme source de carbone, a été également, rapportée [40].

En outre, une concentration de biosurfactant de nature lipopeptidique de l'ordre de 2,1 g. $L^{-1}$, a été rapportée pour la souche 1E de *Staphylococcus* sp. cultivée sur un milieu LB contenant de l'huile d'olive [41], l'étude par Chebbi et al., 2018 [42] a montré la capacité de la souche SH6 de *Staphylococcus capitis,* à produire des lipopeptides, avec des quantités de l'ordre de 50 mg. $L^{-1}$ et 100 mg. $L^{-1}$, en utilisant des huiles de moteur usées et du pétrole brut, comme sources de carbone, respectivement.

### III. 2. 2. 2 Spectre infrarouge

Le biosurfactant partiellement purifié obtenu par précipitation avec de l'acétone à partir du surnageant de culture acellulaire de l'isolat après croissance dans un milieu à base de gasoil a été soumis à une analyse FTIR pour identifier les principaux groupes fonctionnels présents. Le

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

De cette étude structurale du biosurfactant (fig.16), nous avons obtenu une bande au-dessus de 3200 $cm^{-1}$ (large), indiquant la présence d'une liaison (-OH) (groupes hydroxyles libres du cycle rhamnose). Les absorptions autour de 2960 $cm^{-1}$ sont attribuées à l'étirement symétrique C-H des groupes $CH_2$ et $CH_3$ des chaînes aliphatiques sachant que toutes les classes de biosurfactants en contiennent. Les groupes ester carbonyle sont prédits par des vibrations à 1100 $cm^{-1}$.

La bande de valence du carbonyle a été trouvée à 1685 $cm^{-1}$, ce qui correspond aux vibrations de la liaison CO confirmant ce que Ron et Rosenberg (2001)ont montré que presque tous les biosurfactants ont un groupe ester ou acide carboxylique dans leurs structures confirment la présence de liaisons formées entre les atomes de carbone et les groupes hydroxyles dans les structures chimiques de la partie glycosidique) [43].

Le biosurfactant obtenu à partir de la souche bactérienne "*Marinobacter carbonoclasticus*" SF isolée d'un sol contaminé par des hydrocarbures est initialement un glycolipide.

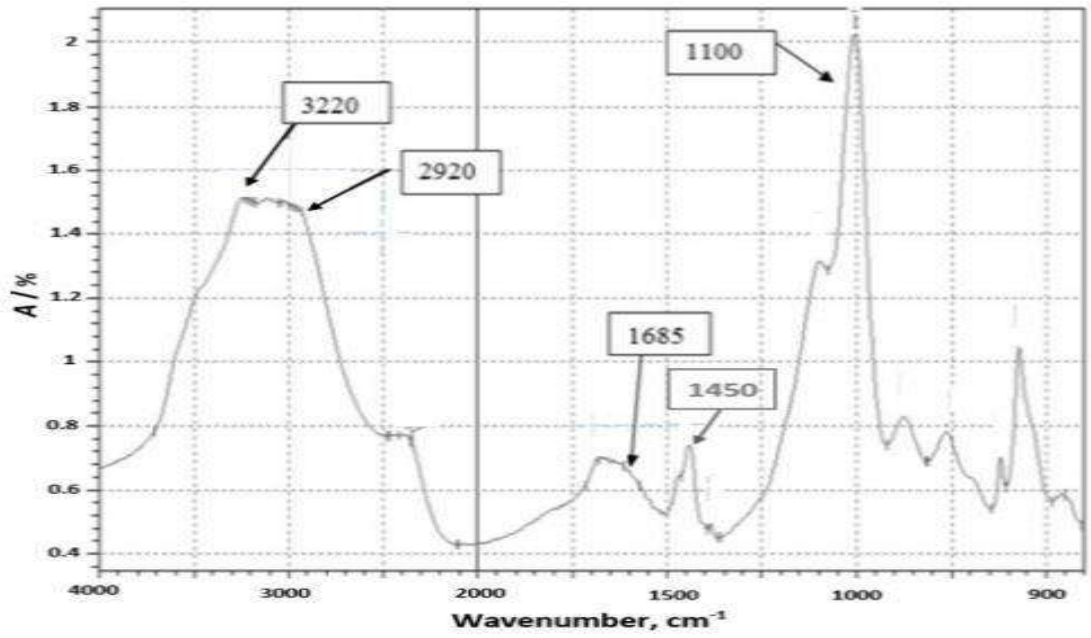



**Figure. 16 .a**-Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *M.*SF

L'analyse par FTIR du biosurfactant produit par la souche *M.*SdK644 a montré un profil relativement similaire des biosurfactants glycolipidiques, et ceci est dû à la présence des groupements fonctionnels suivants :

- Groupements alkyles ($–CH_2$, $–CH_3$) des chaines aliphatiques des acides

gras, du fait de l'apparition des bandes très intenses dans la région 3000–2800 cm-1 (vibrations d'élongation) et des pics pointés à 1460 et 1380 $cm^{-1}$ (vibrations de déformation) [44].

- Groupement carbonyle (C=O) des esters et acides carboxyliques, visualisés par les pics situés à 1750 et 1714 $cm^{-1}$ respectivement [45]. Ainsi, le pic observé à 1655 $cm^{-1}$ est dû aux vibrations d'élongation de l'ion carboxylate (COO–) [46].

Les pics affichés entre 1300 et 1000 $cm^{-1}$ (1236, 1164, 1119, 1101 et 1035 $cm^{-1}$) sont attribués aux vibrations d'élongation des liaisons C−O et C−O−C affirmant la présence d'hydrates de carbone dans la structure du biosurfactant (BS) SdK644 [47]. L'absence des pics à 3422, 3246 et 1552 cm-1 confirme l'inexistence des

groupements N-H dans la structure du BS SdK644 [48].

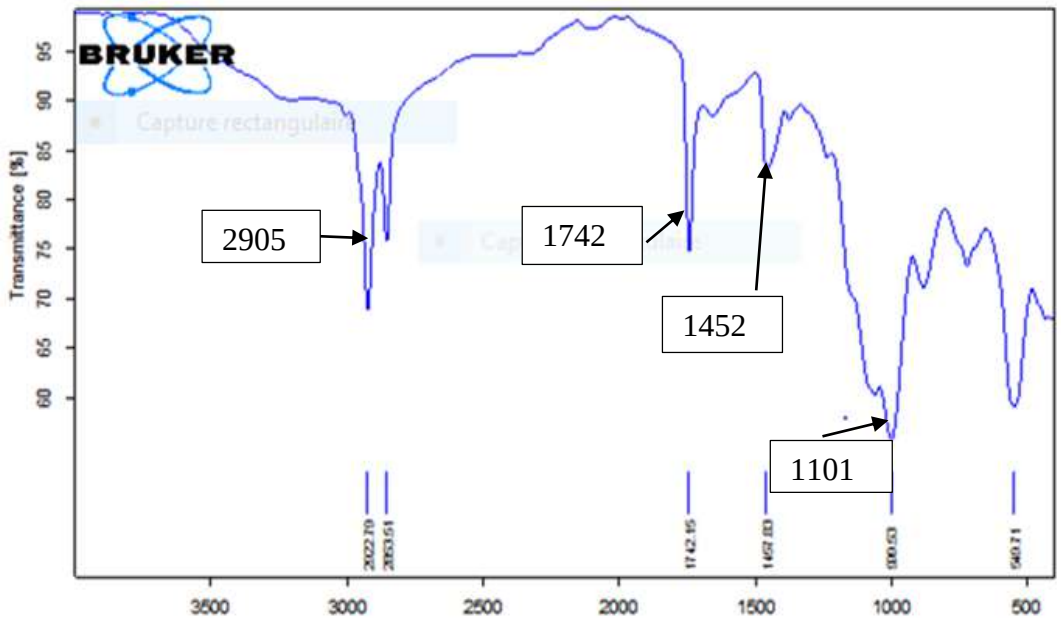



**Figure.16.b.** Spectre de IR du biosurfactant de la souche *M*.SdK644

Pour le résultat d'analyse par FTIR du biosurfactant produit par la souche *kp :*

La bande d'absorption de 880 $cm^{-1}$ sont dues à l'absorption des vibrations $RCH=CH_2$ et aux déformations de groupe =C-H. La bande de 1004 $cm^{-1}$ est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons C−O et C−O−C ,affirmant la présence d'hydrates de carbone dans la structure du biosurfactant *kp* [47].

La bande à 1441 $cm^{-1}$ est due l'absorption des vibrations C-O-H dans les acides carboxyliques .(à 1377-1461 $cm^{-1}$ ) montrent que le produit a une structure chimique identique à celle des glycolipides [49].

La bande à 1641 $cm^{-1}$ est dû aux vibrations d'élongation de l'ion carboxylate ($COO^{-}$) indique la présence de groupe peptidique .

La bande d'absorption de 2321 $Cm^{-1}$ sont celles de la vibration de valence C-H des chaines hydrocarbonées, sachant que toutes les classes de biosurfactants en contiennent. La bande d'absorption de 3054 $cm^{-1}$ résulte des vibrations d'élongation des liaisons de C-H dans alcènes en groupe $–C=C=CH_2$.

Les types de glycolipides produits dépendent de la souche bactérienne, de la source de carbone utilisée et le processus de production [49].

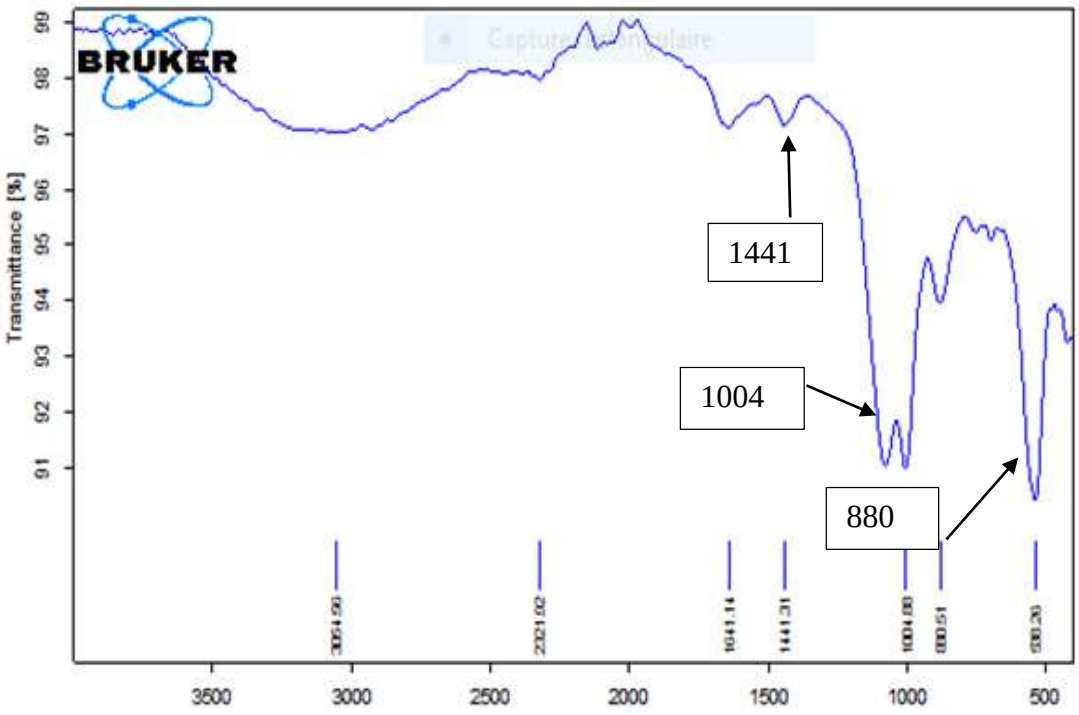



**Figure.16.c**.Spectre de IR du biosurfactant de la souche *Kp*

### III. 3 Application environnementale

### III. 3 .1 Caractérisation de l'échantillon

Les paramètres physicochimiques de l'échantillon ont été déterminés, avec un pH du milieu égal à 7.5 et une température de 11°C, Les valeurs limites de rejets sont mentionnées dans le tableau suivant

**Tableau. 12.** Paramètres physicochimique du rejet et leurs valeurs limites

| **Paramètres** | **DCO** | **$DBO_5$** | **MES ($mg.L^{-1}$)** |
|---|---|---|---|
| Valeurs limites [50] | 800 | 250 | 200 |
| Concentration($mg.L^{-1}$) | 1920 | 1700 | 12.5 |

En effet, le sang présent dans ce type d'effluent contient principalement des complexes protéiques (fibrogène, protéine de coagulation, anticorps, etc.) qui sont actifs à pH neutre. Le rejet de l'abattoir est caractérisé par une forte alcalinité, une forte demande chimique en oxygène, une forte teneur en produits volatiles, une forte teneur en ammonium et en phosphore [51].

### III. 3. 2 Traitement d'un rejet d'abattoir par la souche bactérienne *M*. SF

L'eau des abattoirs est riche en composés organiques biodégradables, tels que les graisses, les protéines, le sang, l'urine et les fèces, ce qui implique des valeurs élevées de $DBO_5$ et de DCO. Selon les résultats obtenus et montrés dans la figure 16, l'efficacité d'épuration a été de 80% (DCO) et 85% ($DBO_5$). La réduction de la DCO est considérablement remarquable dès le premier jour, ce qui explique le pouvoir épurateur de la *Marinobacter* SF utilisée, et nous avons pu obtenir un résultat satisfaisant : la valeur de la DCO en fin de traitement est conforme aux normes de rejet. De même, pour la $DBO_5$, étant donné la forte biodégradabilité de l'effluent à traiter.

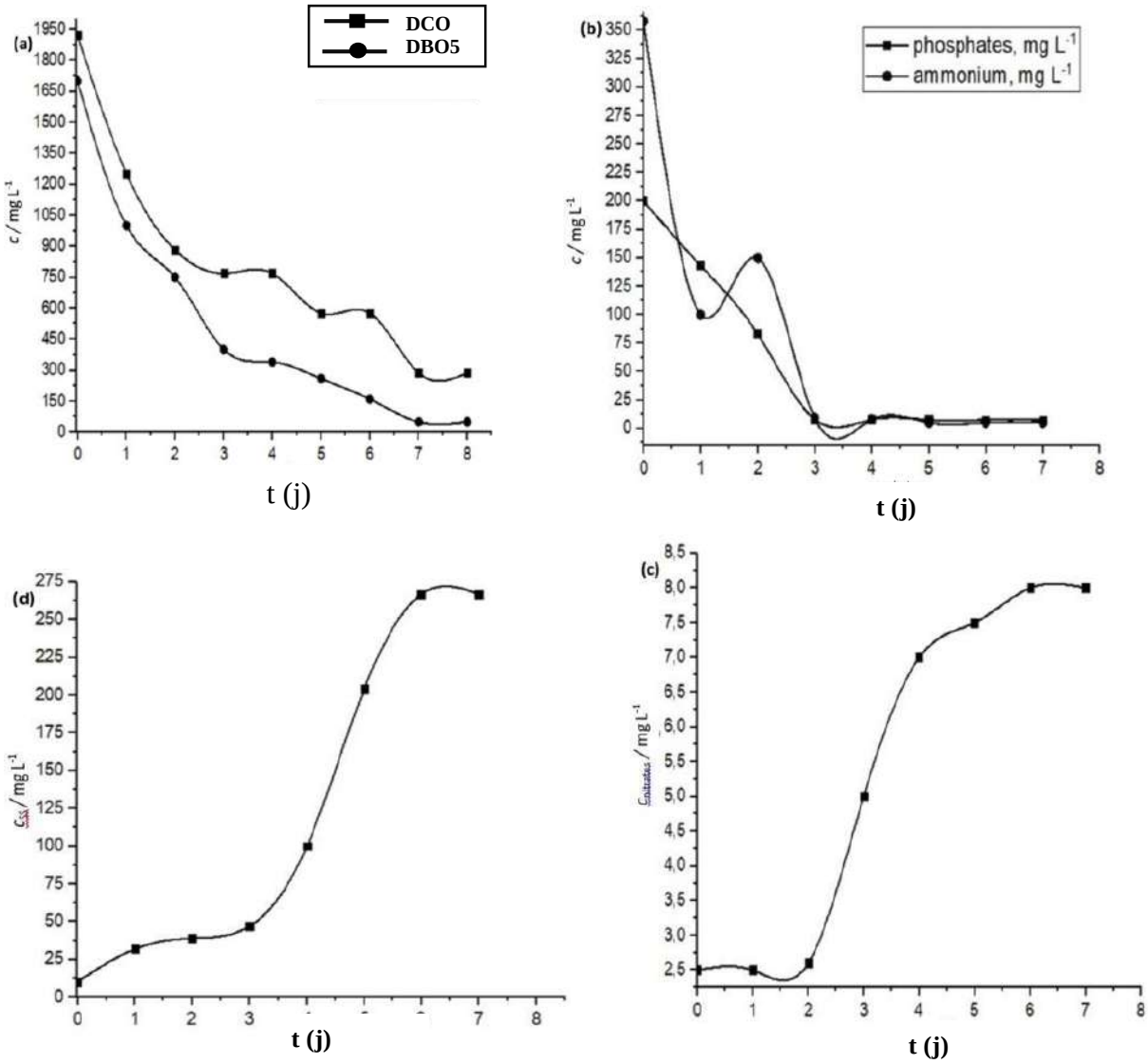



**Figure. 17.** Variation de : a) DCO, $DBO_5$, b) phosphates, ammonium, c) nitrates et d) matières en suspension ; après 120 heures de traitement avec la *Marinobacter SF* isolée.

Haselroth JK. et al. (2021) [52] ont obtenu un taux de traitement par *Aeromonas hydrophila* de la matière organique dans les eaux d'abattoir allant jusqu'à 51 % après 72 heures.

Krishman et valsa (2015) [53] ont traité les eaux de l'industrie laitière par un consortium (*Bacillus coagulans, Bacillus simplex, Trichococcus sp*) et ont constaté qu'après 9 jours le taux de traitement était de 88,50 %.

De même, la figure 17 montre que la quantité d'ammonium diminue alors que la quantité de nitrates augmente, ceci est dû à une nitrification des eaux usées et qui consiste en une oxydation

de l'azote ammoniacal en nitrites qui à leur tour s'oxydent pour se transformer en nitrates [54] La réduction des phosphates et de l'ammonium, avec la formation de nitrates (nitrification), reflète le bon pouvoir épurateur de la souche utilisée ainsi que l'environnement favorable à la biodégradation. La figure 17c montre que la matière en suspension augmente remarquablement après le deuxième jour.

Les valeurs de température des eaux usées enregistrées, sont inférieures à 30 °C, considérées comme la valeur limite pour un rejet direct dans le milieu récepteur, les valeurs de pH mesurées varient peu, et restent autour de 7,5 lorsque le pH est inférieur à 5 ou supérieur à 8,5 , la croissance des microorganismes est directement affectée ; la conductivité électrique reflète le degré de minéralisation globale, les valeurs mesurées varient entre 0,88 et 3,5 ,exprimées en ms. $cm^{-1}$, cette augmentation peut se traduire par la formation de nouvels ions lors de l'oxydation des matières organiques, et une variation plus ou moins importante de la minéralisation.

### III. 3. 3 Traitement d'un rejet abattoir par le biosurfactant produit par la souche *M.* SF

Le traitement des eaux de l'abattoir a été réalisé en utilisant un biosurfactant produit à partir de la souche bactérienne *Marinobacter carbonoclasticus* SF. Les bons résultats présentés dans la Figure 18 ont confirmé l'efficacité de l'utilisation du biosurfactant dans le domaine du traitement des eaux polluées.

Comme le montre la figure 18, l'efficacité de purification obtenue était de 82 et 96 % pour la DCO et la $DBO_5$ respectivement. Une diminution de la concentration de phosphates et d'ammonium, une augmentation des nitrates et une grande quantité de solides en suspension ont été observées.

L'étude menée par Al-Wahaib et al. [55] sur différents milieux pour produire des biosurfactants en utilisant des souches de *Marinobacter sp*. Ils ont constaté que les efficacités de biodégradation étaient de 90, 84, 76 et 72 % pour le pétrole brut, le diesel, le C32 et le C40, respectivement. Un excellent traitement des contaminants a été trouvé Ceci est dû à la faible valeur de la CMC et au bon pouvoir émulsifiant du biosurfactant obtenu.

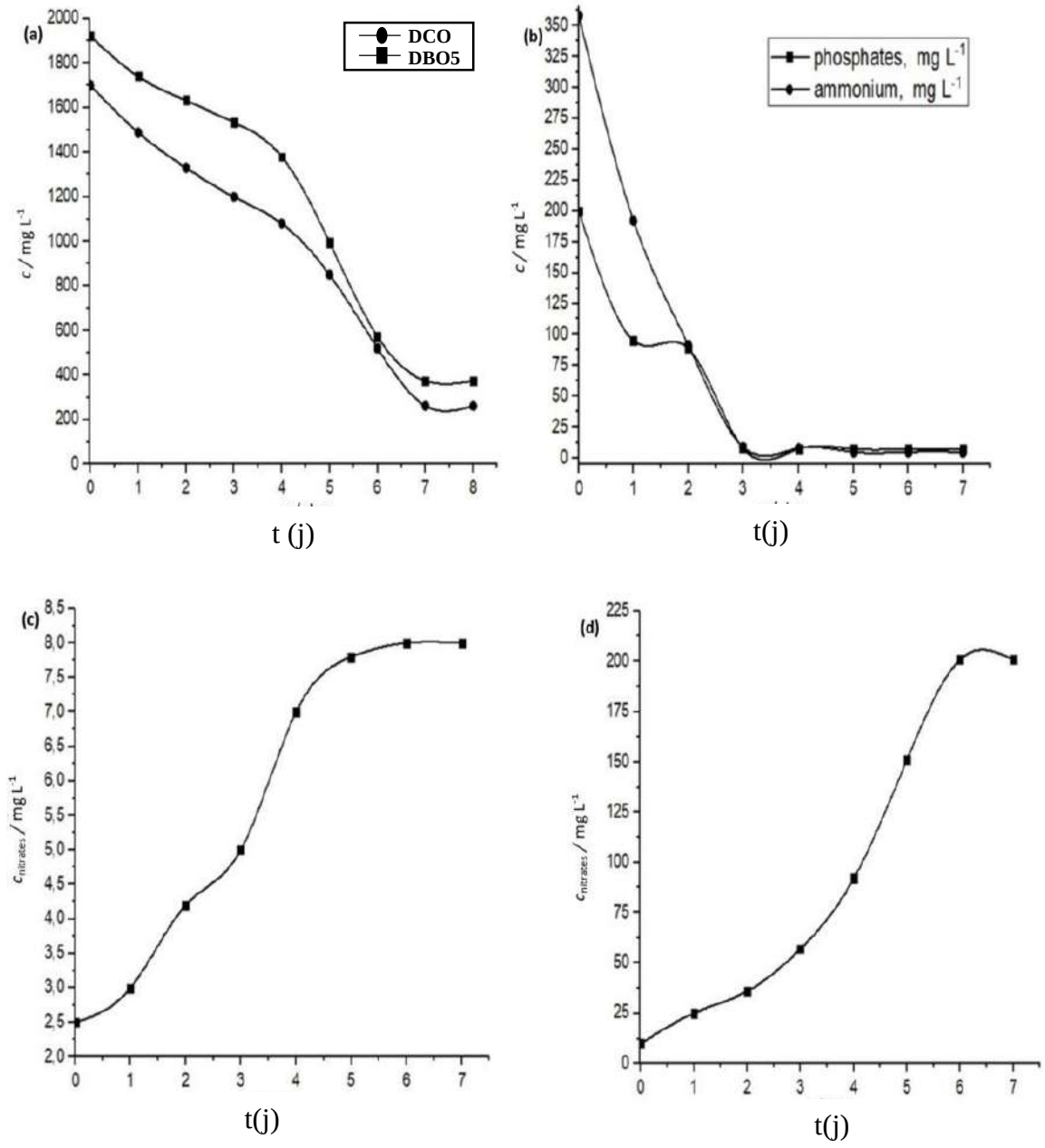



**Figure.18.** Variation de : a) DCO, $DBO_5$, b) phosphates, ammonium, c) nitrates et d) matières en suspension ; après 120 heures de traitement avec le biosurfactant produit par la souche *M*. SF

### III. 3. 4 Traitement d'un rejet abattoir par la souche bactérienne *M*. SdK644

Des résultats satisfaisants ont été obtenus en traitant l'eau polluée avec la souche bactérienne isolée *M*. SdK644.

La figure 19 montre la réduction de la DCO et de la DBO5 après 7 jours d'incubation, la DCO a été réduite de 1900 à 384 et la $DBO_5$ réduite de 1700 à 320 mg. $L^{-1}$ respectivement. L'efficacité de l'épuration était de 80% (DCO) et 81% ($DBO_5$), la réduction de la DCO est considérablement remarquable dès le premier jour, et la valeur de la DCO à la fin du traitement est conforme aux normes de rejets.

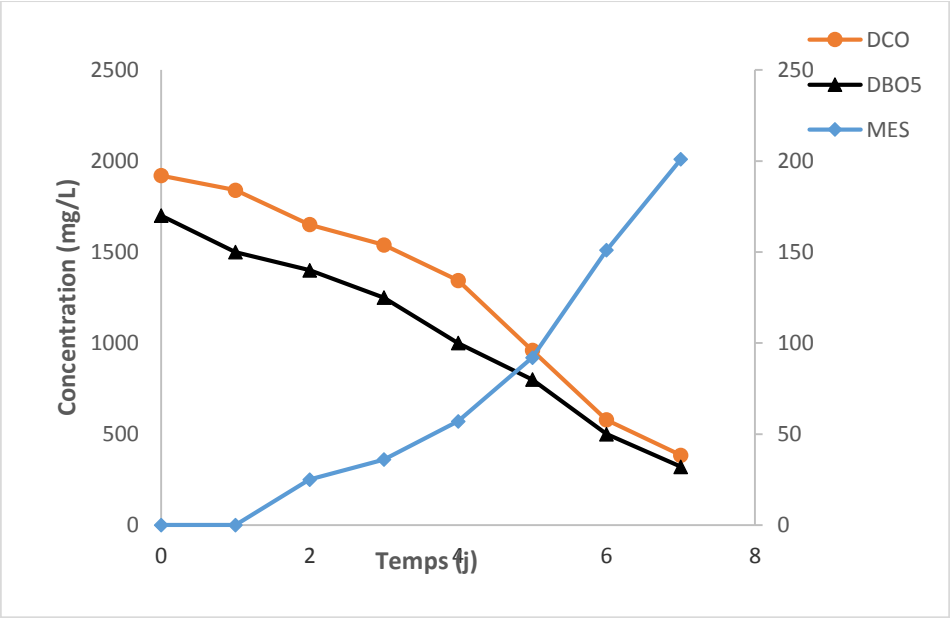



**Figure .19.a.** Variation de la DCO, $DBO_5$ et MES en fonction du temps

La valeur élevée de la $DBO_5$, pourrait être expliquée par l'abondance de la matière organique (débris de rumen), et par la concentration de cet effluent par le sang des rejets d'abattoir, ainsi que la valeur de la DCO. Ces eaux usées ont une charge organique élevée, et facilement biodégradable, donc le traitement biologique des eaux d'abattoir est approprié. Des résultats similaires ont été trouvés par Gnagne et Brissaud (2002) [56].

La matière en suspension augmente remarquablement après le deuxième jour ; ceci peut s'expliquer par la formation d'agrégats lors du traitement (concentration de la pollution sous forme de boue).

Nicoly et al. [57] ont étudié un système biologique anoxique-aérobie à deux étapes, l'élimination de la DCO et de l'azote ammoniacal total (TAN) se situant dans une fourchette de 83-97% et 83-99% respectivement.

La performance d'un système de traitement des eaux usées d'un abattoir combinant la digestion anaérobie et le photoélectron solaire-Fenton a été étudiée par Vidal et al ou l'étape biologique a atteint environ 91% de réduction de la DCO de 1494 mg/.$L^{-1}$ à 137 mg.$L^{-1}$ après 180 minutes [58].

Le mécanisme impliqué dans l'élimination de l'azote inorganique des eaux usées dépend des principales formes sous lesquelles l'azote est présent. Dans cette étude, la diminution de la concentration en azote est liée à la réduction de $NH_4^+$. La figure 19 montre que la réduction des phosphates et de l'ammonium avec la formation des nitrates est due à une nitrification des eaux usées qui consiste en une oxydation de l'azote ammoniacal en nitrites qui à leur tour s'oxydent pour se transformer en nitrates

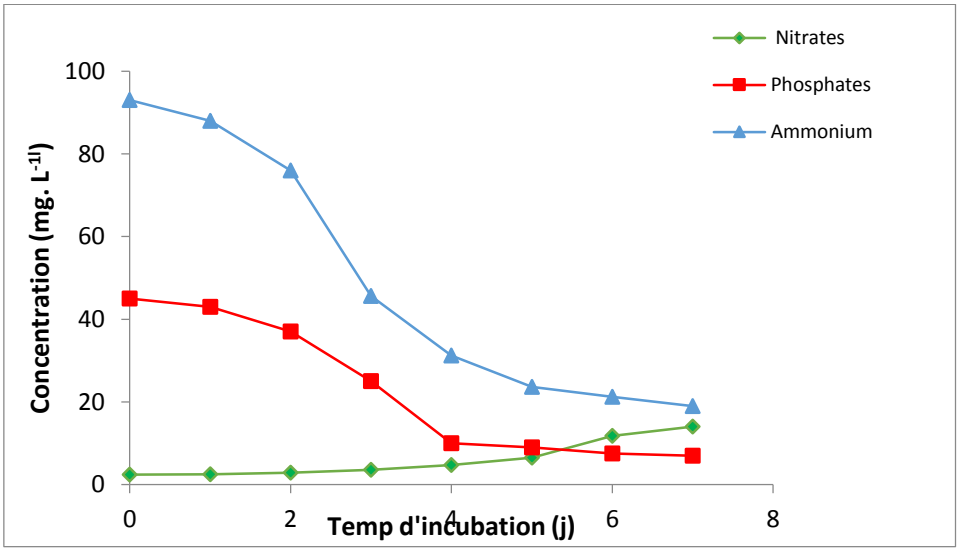



**Figure.19.b.** variation des paramètres chimiques

Hoang et al. [2021] [59] ont traité les eaux usées de traitement du poisson, en utilisant la bioaugmentation, par l'application de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* et ont trouvé que la *Marinobacter* a montré une réduction significative des concentrations de $NH_4^+$ avec des efficacités d'élimination de 80 %.

### III. 3. 5 Traitement du rejet d'abattoir avec le biosurfactant produit par la souche *M.* SdK644

Dissoudre 0.1 g du biosurfactant dans 5 ml d'eau distillée introduire dans 500 ml de rejet (abattoir), incuber à 30 °C et 150 tr/ min. Le prélèvement et l'analyse doivent se faire chaque 24 h pendant 7 jours. Les résultats sont illustrés dans la figure 20.

Les bons résultats présentés dans la Figure 20 ont confirmé l'efficacité de l'utilisation du biosurfactant dans le domaine du traitement des eaux polluées. L'efficacité d'épuration obtenue était de 82 et 96 % pour la DCO et la $DBO_5$ respectivement. Une diminution de la concentration en phosphates et en ammonium, une augmentation des nitrates et une grande quantité de solides en suspension ont été observées.

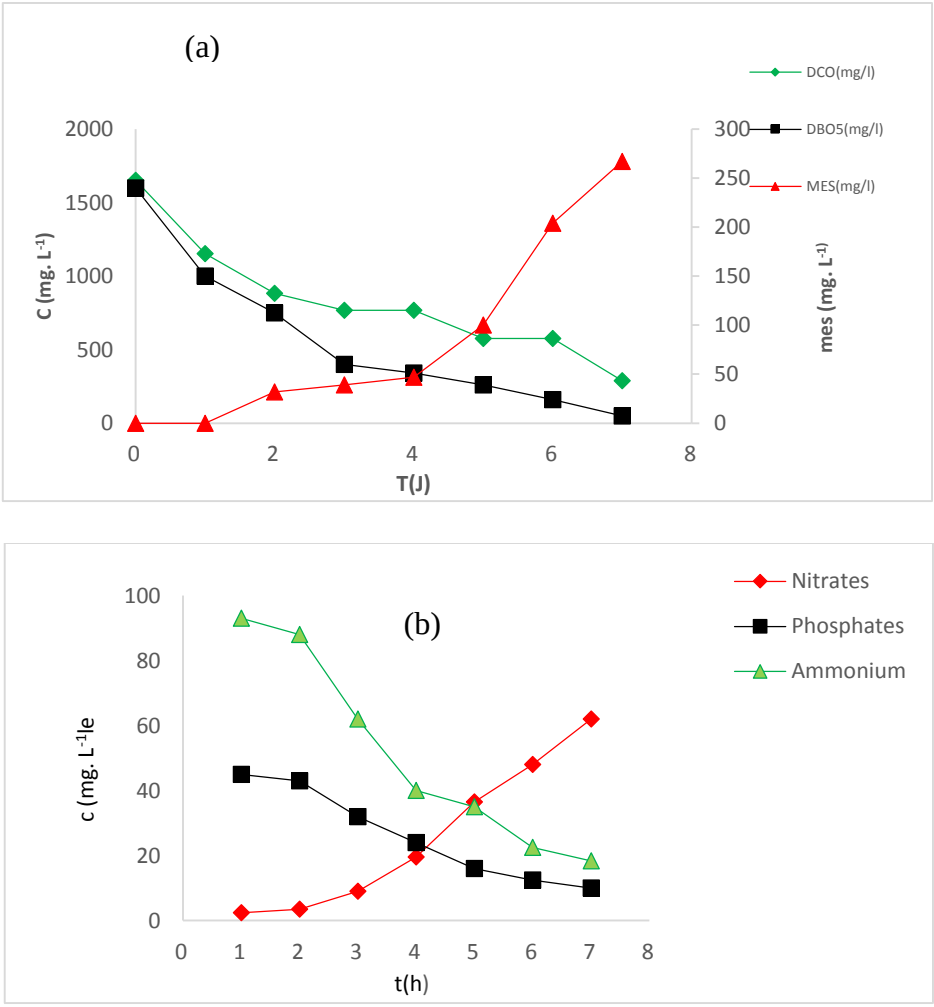



**Figure. 20**. Variation des paramètres chimiques (traitement avec le BS Sdk644

a: DCO, $DBO_5$, MES ,b : Nitrate, Phosphate et Ammonium)





**(a)** **(b)**

**Figure. 21. a)** échantillon brut, b) échantillon traité

### III. 4 Etude de l'adsorption des pesticides sur le charbon actif en poudre(CAP)

L'étude de l'adsorption d'un composé sur un adsorbant nous permet d'examiner l'influence de plusieurs paramètres physicochimiques sur sa rétention.

Le processus d'adsorption de la métribuzine et de l'acétamipride sur le charbon actif a été discuté en fonction des différents facteurs.

### III. 4. 1 Effet des différents paramètres sur l'adsorption

#### III. 4. 1. 1 Effet du temps de contact

L'adsorption est un procédé de transfert du polluant de la phase liquide vers la phase solide, le temps de contact entre les deux phases joue le rôle d'un facteur limitant. La détermination du temps correspondant à l'équilibre d'adsorption, a permis l'établissement des figures 22-a et 22-b.

Pour cela nous avons suivi les cinétiques d'adsorption de la métribuzine et de l'acétamipride à température ambiante de 20 °C, un volume de 1000 ml de solution contenant le polluant de concentration 20 $mg.L^{-1}$ est mis en contact au temps entre 1 et 6 heures, avec une quantité de 0.1 gramme d'adsorbant dans un bécher de 1 litre. Un agitateur permet d'assurer un bon contact des mélanges et une grande homogénéisation de la solution, cette étude a été réalisée à pH naturel de la solution.

La fixation des pesticides est souvent décrite comme un processus dépendant du temps de réaction. Les résultats de certains travaux concernant la cinétique de fixation vont du temps court (quelques minutes) à 6 heures [60] à plusieurs jours [61].

Les résultats obtenus (figure 22) montrent que le rendement d'élimination du métrixone augmente avec le temps d'agitation, et qu'il y'a apparition d'un palier correspondant à un maximum d'efficacité à partir de 5 heures d'agitation. En effet, la valeur maximale d'élimination du metrixone correspondant à ce temps est de 91%.

Pour le deuxième pesticide (le Mopistop), la courbe présente la même allure : augmentation rapide du taux d'élimination pendant la première heure et qui est plus lente jusqu'au temps d'équilibre (3 h) au-delà de ce temps la concentration résiduelle est presque stable. Nous pouvons distinguer deux étapes au cours de la cinétique d'adsorption de ces pesticides sur le charbon actif en poudre. Au cours de la première étape, une augmentation rapide, ceci s'explique par une fixation rapide des molécules de pesticides sur la surface du CAP, c'est l'étape de transfert de masse externe, la deuxième étape de la cinétique montre une augmentation plus lente du rendement d'élimination jusqu'au temps d'équilibre, L'étape lente de la cinétique montre l'existence du phénomène de diffusion[62].

(a) (b)

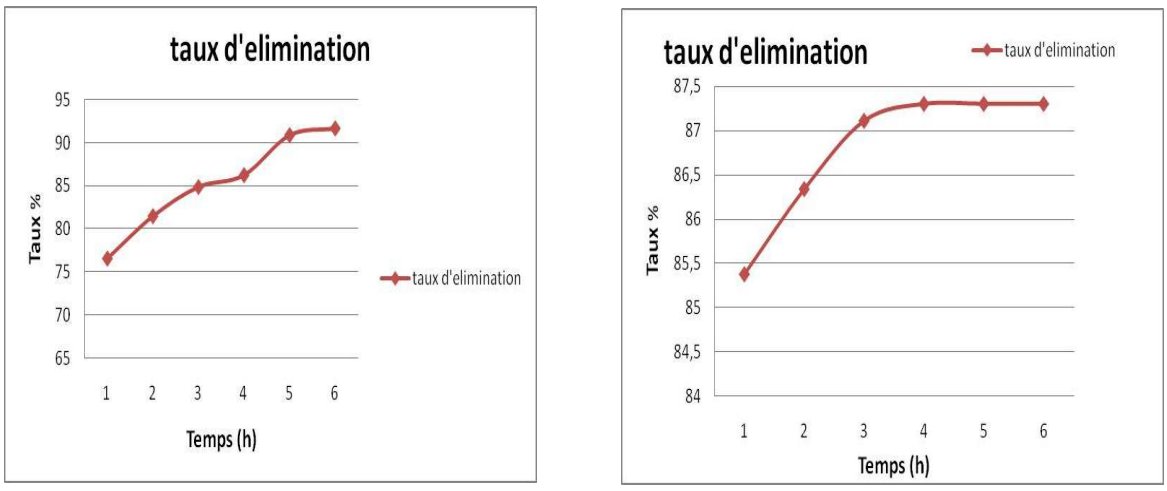



**Figure.22**. Evolution du rendement d'élimination en fonction du temps de Contact. (a-metrixone, b-mopistop)

### III. 4. 1. 2 Influence du pH

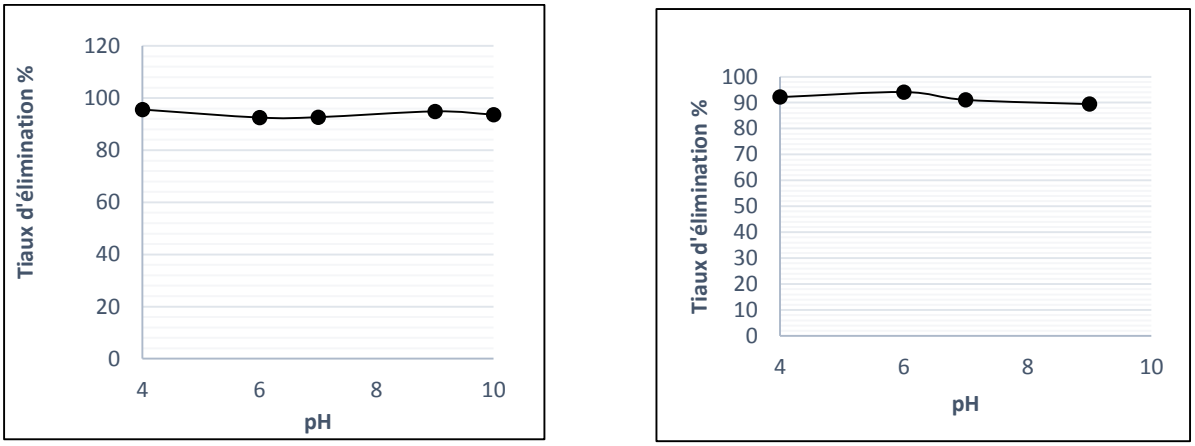
Le pH est l'un des paramètres qui influent sur la fixation des molécules sur les surfaces solides, car ce dernier contrôle l'apparition des charges sur la surface et sur les molécules fixées [63]. Nous

nous sommes alors proposé d'étudier son influence sur l'interaction herbicide-adsorbant. L'influence du pH initial des solutions de la métribuzine et de l'acétamipride sur l'adsorption a été étudiée dans l'intervalle de pH=4 à pH=10 dans des conditions identiques pour les deux pesticides (C0=20 mg. L-1, T=20 °C, m=0.1 g d'adsorbant. Les ajustements de pH ont été faits par ajout des solutions de HCl 0,1N ou de NaOH 0,1N. Les erlenmeyers contenant les échantillons mis sous agitation pendant 5 heures et 3 heures pour la metribuzine et l'acétamipride.

Les résultats présentés dans la figure 23 montrent que l'adsorption de la metribuzine et l'acétamipride sur CAP n'est pas influencée par la variation du pH. Et cela peut être expliqué du fait que la charge électrique négative (potentiel zêta= -20 mV environ à pH 5,5) de la surface des particules de CAP augmente avec les pH basiques (potentiel zêta= -35mV pour pH 11). Les molécules non ionisées ne verront pas leur adsorption modifiée [64].

Des résultats ont été obtenus par BETTAYEB et al. 2020 ont montré l'effet du pH sur l'adsorption de la métribuzine par la bentonite montre un maximum à pH acide, qui diminue entre (pH = 4-8) et s'annule à pH=12 (milieu basique).

BETTAYEB et al 2020 [65], ont montré que la métribuzine est stable à pH de la solution égale à 2 et 3 sont devenues instables si le pH augmente.



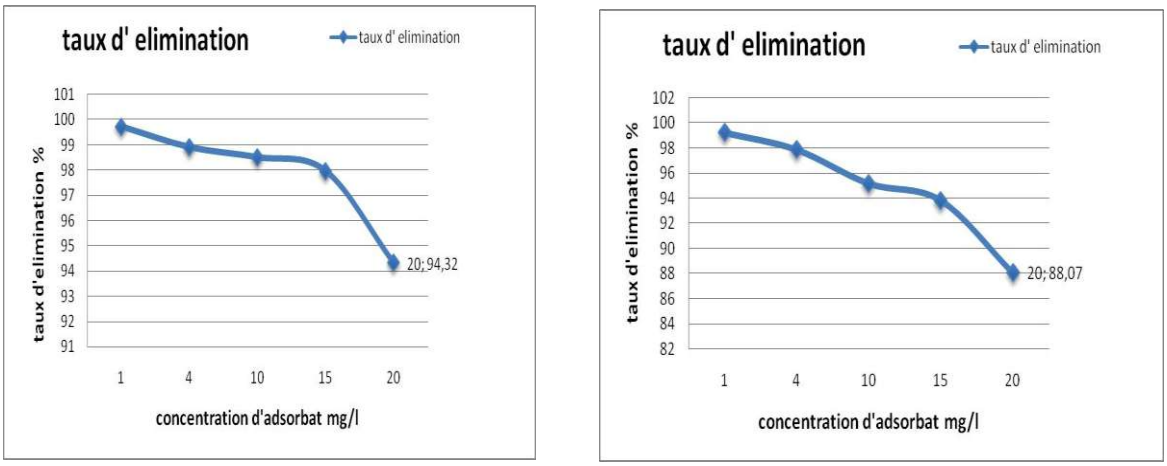

(a) (b)

**Figure. 23. Effet** du pH sur le taux d'élimination : a-métribuzine-acétamipride)

### III. 4. 1. 3 Effet de la teneur initiale en pesticides

L'effet de la concentration initiale de l'adsorbat sur l'adsorption a été effectué à des concentrations variant de 1 à 20 $mg.L^{-1}$ pour les deux pesticides. Tous les essais ont été faits par le même protocole expérimental précédent.

Nous avons fixé la masse introduite du charbon actif en poudre à 1 $g.L^{-1}$ et fait varier la concentration en pesticides de 1 à 20 $mg.L^{-1}$. Les résultats obtenus (figure 24) montrent que les meilleurs rendements d'élimination de ces pesticides sont obtenus pour des faibles concentrations. On remarque que pour les deux pesticides étudiés, les meilleurs taux d'éliminations sont obtenues lorsque les concentrations sont faibles, et d'après Brunet et al. (1996) [66] qui ont étudié l'élimination de l'atrazine par adsorption sur charbon actif en poudre, ont observé des taux d'abattement élevés lorsque la concentration en atrazine est faible il pourrait s'agir d'une saturation des sites d'adsorption du CAP.

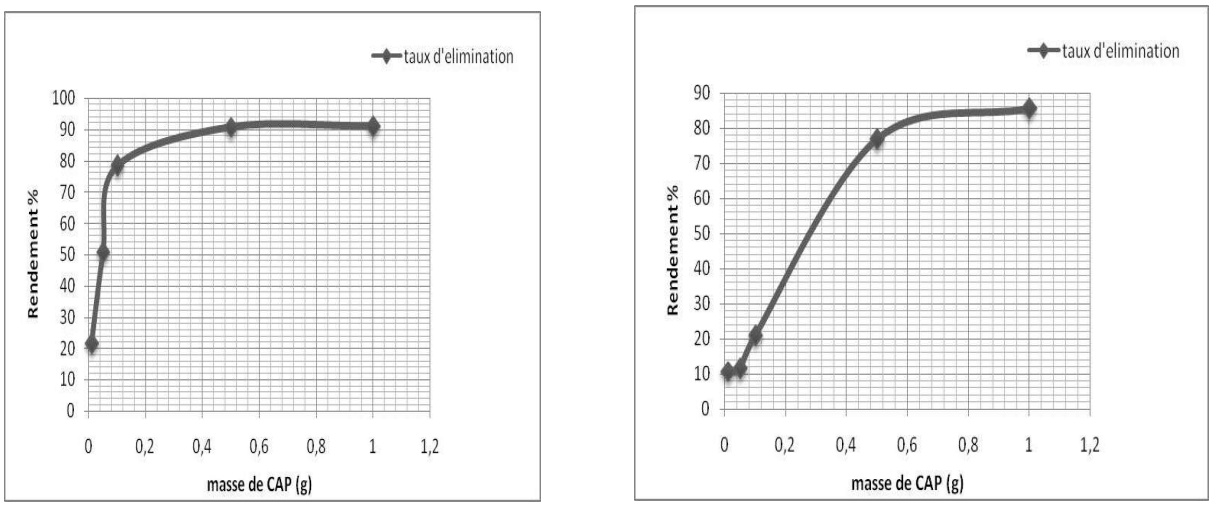



(a) (b)

**Figure. 24**. Effet de la concentration de l'adsorbat sur le taux d'élimination (a-métribuzine,b-acétamipride)

### III. 4. 1. 4 Effet de la masse du CAP

L'étude de l'influence de la masse du solide appliquée sur la capacité d'adsorption de métribuzine nous a conduits à faire varier la quantité initiale de l'adsorbant tout en conservant la concentration initiale du substrat en solution. Les résultats obtenus montrent que l'élimination de ces pesticides augmente avec la masse du charbon actif en poudre, cela est dû à l'accroissement du nombre de sites d'adsorption en augmentant la dose du CAP. Une dose élevée de CAP signifie la disponibilité d'une surface spécifique plus grande ou d'un nombre de sites d'adsorption plus important.




(a) (b)

**Figure. 25.** Effet de la masse de l'adsorbant sur le rendement d'élimination : a- métribuzine,b-acétamipride

### III. 4. 2 Modélisation de l'adsorption

Les équilibres d'adsorption sont d'une importance majeure dans la désignation du système d'adsorption, les deux plus importantes isothermes utilisées correspondent aux modèles de Langmuir et de Freundlich. Le tracé des isothermes d'adsorption a été effectué pour le metrixone après 5 heures avec une concentration initiale égale à 20 $mg.L^{-1}$ , avec une masse de CAP allant de 0.01 à 1 g , pour le mopistop après 3 heures avec une concentration initiale égale à 20 $mg.L^{-1}$ ,la masse du CAP allant de 0.1 à 1g à la température ambiante(20 °C) et sans ajustement du pH (pH initial de la solution).

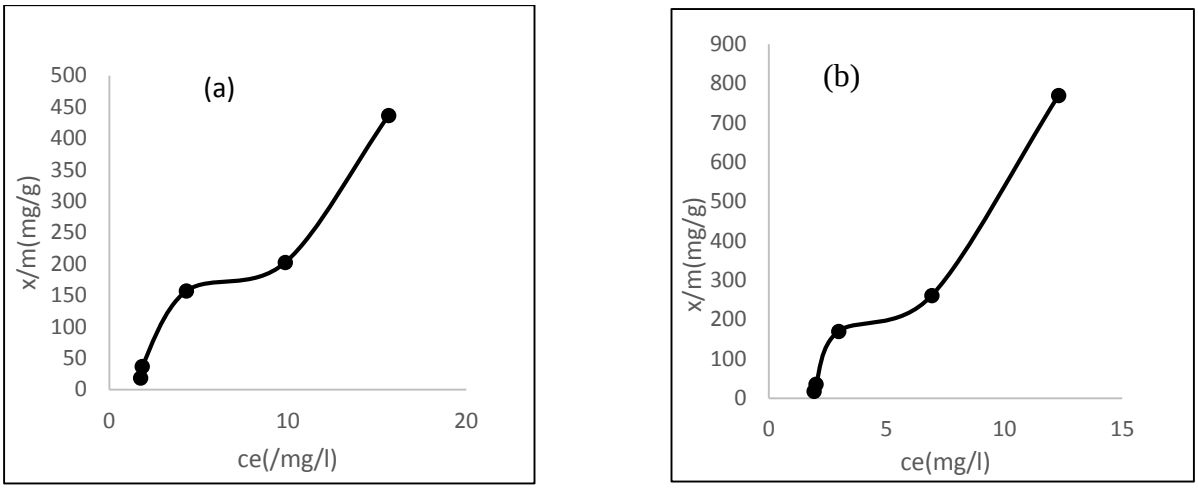
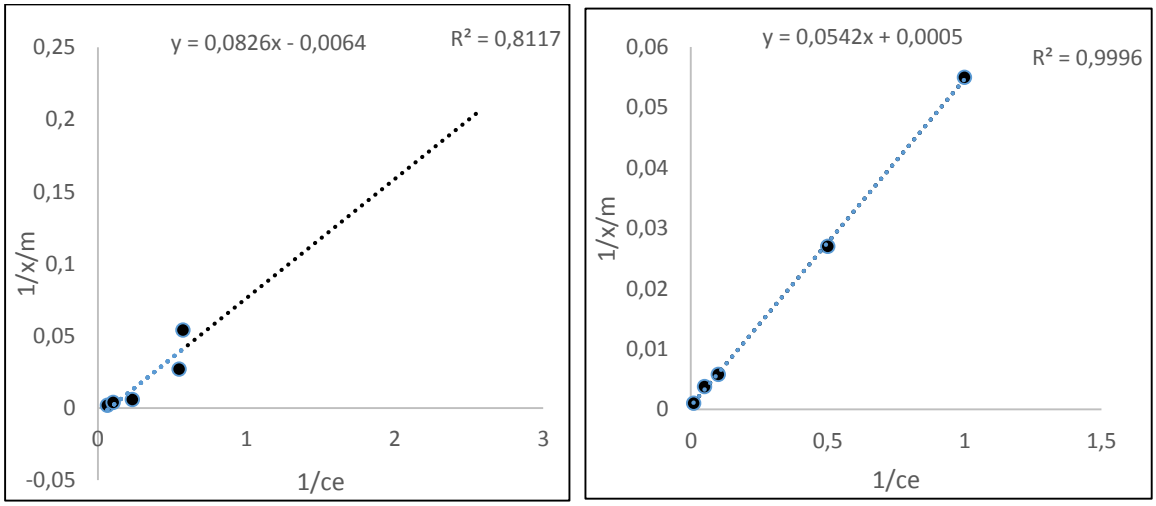



**Figure. 26** Isotherme d'adsorption : a-metrixone,b- mopistop sur CAP

### III. 4. 2. 1 Modélisation selon Langmuir

La modélisation selon Langmuir démontre que l'élimination du polluant se fait sur une surface homogène selon une adsorption en monocouche. La forme linéaire de l'équation de Langmuir est comme suit :

$1/q_e=1/q_m+1/(k_l*c_e*q_m)$ $qe=x/m$ [67]




**(a)** **(b)**

**Figure. 27.** Linéarisation du modèle de Langmuir appliquée à l'isotherme d'adsorption : a-métribuzine, b-acétamipride

Les valeurs des paramètres de Langmuir issus des pentes et des ordonnées à l'origine sont regroupés sur le tableau .13 cet isotherme obéit au modèle de Freundlich avec un Coefficient de corrélation satisfaisant par contre, le modèle de Langmuir n'est pas tout à fait l'isotherme qui traduirait le type d'adsorption du metrixone.

### III. 4. 2. 2 Modélisation selon Freundlich

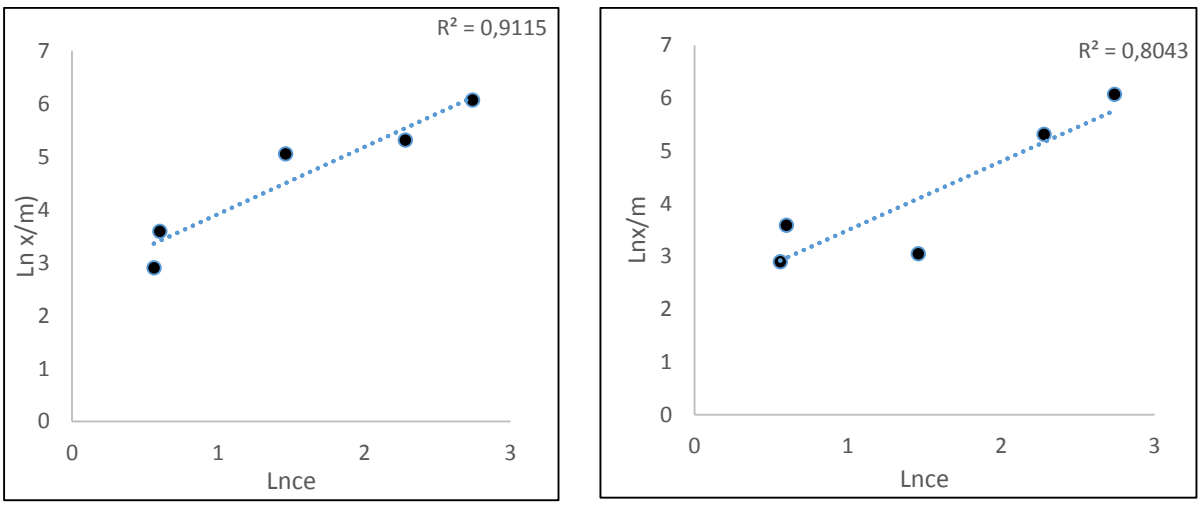
Les résultats expérimentaux ont été également modélisés par l'isotherme d'adsorption de Freundlich qui peut être décrits par la relation suivante :

$$\mathbf{X/m = K_f Ce^{1/n}}$$

qui est aussi décrite par sa forme linéaire :

$$\mathbf{Ln\ x/m = Ln\ k_f + 1/n\ Lnc_e}\ \mathbf{[68].}$$

Avec X/m : quantité adsorbée par unité de masse de pesticide, Ce : Concentration à l'équilibre dans la phase aqueuse et Kf, nf : constantes de Freundlich qui caractérisent l'isotherme d'adsorption. A partir des valeurs expérimentales de Ce et X/m nous avons calculé au moyen de la régression linéaire (figure 28) les valeurs de $K_f$ et de $n_f$ qui sont regroupés sur le tableau.13




**(a)** **(b)**

**Figure 28.** Linéarisation du modèle de Frendlich : a- métribuzine,b- acétamipride

**Tableau 13.** Paramètres des modèles de Langmuir et de Freundlich pour l'adsorption des pesticides sur CAP.

| | **Modèle de Freundlich** | | | **Modèle de Langmuir** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $K_f$ | 1/n | $R^2$ | kl (l/mg) | $q_m$(mg/g) | $R^2$ |
| Metrixone | 14.01 | 1.26 | 0.911 | 0.194 | -163.9 | 0.811 |
| Mopistop | 8.95 | 1.31 | 0.804 | 0.147 | 5.20 | 0.998 |

Nous observons pour le mopistop l'accord du modèle de Freundlich avec les données expérimentales, n'est pas satisfaisant suite aux valeurs faibles des coefficients de corrélation de ce modèle, tandis que les résultats expérimentaux coïncident parfaitement avec la forme linéaire du modèle Langmuir avec un coefficient de corrélation de 0.998.

A partir de ces résultats nous pouvons conclure que la rétention de la métribuzine et l'acétamipride par le support étudié suit l'isotherme d'adsorption de Langmuir (facteurs de corrélation plus proche de l'unité)

### III. 4. 3 Conclusion

L'étude expérimentale que nous avons menée a été consacrée à l'élimination, par adsorption sur le charbon actif en poudre, de deux pesticides : metrixone, mopistop en eau distillée et la détermination de l'effet des paramètres réactionnels sur la rétention de ces pesticides. De l'ensemble des résultats obtenus, on a pu conclure que :

* De bons rendements sont obtenus en utilisant une masse de CAP de 1 $g/L^{-1}$.

*L'équilibre d'adsorption est atteint au bout de : 5 heures d'agitation pour le metrixone et 3 heures pour le mopistop.

* La rétention de ces pesticides augmente avec l'augmentation de la masse du charbon actif en poudre introduite (1 $g.L^{-1}$)

*L'adsorption était maximale pour des teneurs faibles en pesticides (1$mg.L^{-1}$)

*L'adsorption de ces pesticides n'est pas influencée par la variation du pH.

*Les résultats obtenus ont été modélisés par deux modèles empiriques : Langmuir et Freundlich. Ces deux modèles constituent un outil largement sollicité pour l'élucidation du mécanisme d'adsorption et la quantification de l'affinité adsorbant/adsorbât.

### III. 5 Biodégradation de la metribuzine par *la Marinobacter* SDK644

### III. 5. 1 Effet de la concentration du pesticide sur la croissance bactérienne.

La figure 29 montre la variation de la densité optique de la souche *M*.Sdk644 à 600 nm en fonction du temps.

En utilisant la métribuzine comme seule source de carbone à différentes concentrations, la souche *M*. SdK644 a été cultivée à 30 °C et à pH 7 pendant 144 h.

La concentration optimale est de 20 mg. $L^{-1}$, pour une croissance maximale (D0 6oo = 0,408) après 96 h d'incubation, la même cinétique est observée pour la concentration de 50 $mg.L^{-1}$ mais à un degré moindre (D0 6oo = 0,35). Pour la concentration 100 $mg.L^{-1}$, il y a une croissance pendant les premières 48 heures suivi d'une phase stationnaire puis un déclin après 120 heures d'incubation. Alors que pour la concentration de 2 $mg.L^{-1}$, on observe une faible croissance et cela peut être expliqué par l'insuffisance de la source de carbone par rapport au nombre des cellules bactériennes.

Ces résultats indiquent que les concentrations élevées du pesticide inhibent la croissance de la souche *M.* SdK644. Le ralentissement de la croissance est dû soit à l'épuisement des substrats énergétiques et nutritifs présents dans le milieu MSM, soit à l'accumulation de produits de dégradation qui peuvent être toxiques pour cette souche.

Ces résultats sont en harmonie avec ceux de ESSA et al [69] qui ont trouvé que la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* diminuait à des concentrations élevées du pesticide organophosphoré diazinon, et que la vitesse de dégradation ralentissait.

Zhang et al [70] ont choisi une gamme de concentration de métribuzine de 5 à 100 $mg.L^{-1}$, ils ont trouvé que 20 $mg.L^{-1}$ était la concentration optimale de dégradation, ils ont trouvé que la souche *Bacillus* sp N1 est apte à dégrader la métribuzine à de faibles concentrations.

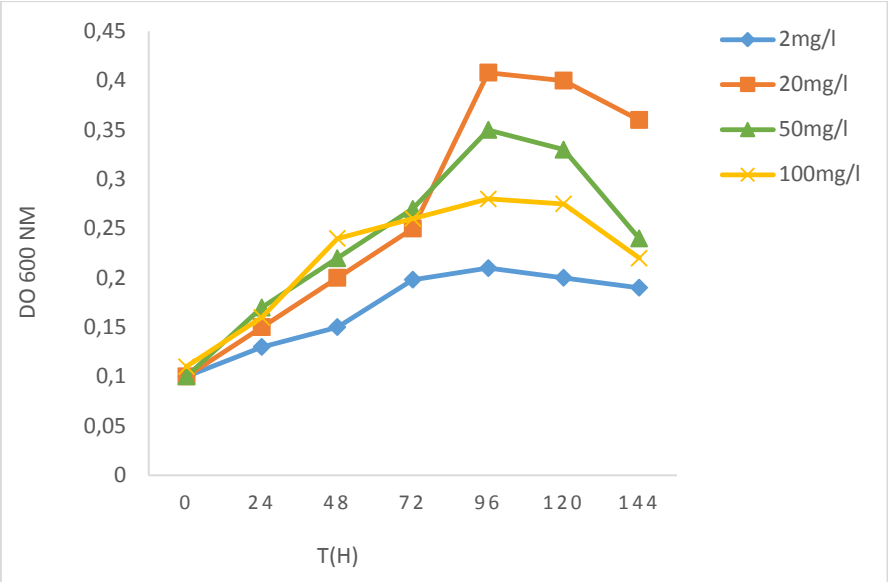



**Figure. 29.** Effet de la concentration du pesticide sur la croissance bactérienne.

### III. 5. 2 Effet du pH sur la croissance

Le pH optimal de croissance est déterminé par la mesure de la croissance pour des cultures réalisées sur un milieu MSM à 30 °C, avec une concentration de 20 $mg.L^{-1}$ de metribuzine et 1% d'inoculum. Les résultats de la figure 30 montrent que la croissance de la souche présente un grand développement à pH 7, alors que la croissance est plus faible à un pH égal à 9. Nous avons remarqué une inhibition de la croissance de cette bactérie à pH 4.

Ces résultats montrent que les bactéries s'adaptent aux milieux neutres, en comparant avec Zhang et al. [70] qui ont étudié la dégradation de la métribuzine par la souche *Bacillus* sp N1, le taux de dégradation de la métribuzine a diminué progressivement avec l'augmentation ou la diminution des valeurs de pH. De plus, les valeurs de pH peuvent affecter directement la croissance cellulaire et les activités métaboliques, affectant ainsi la capacité de dégradation [71].

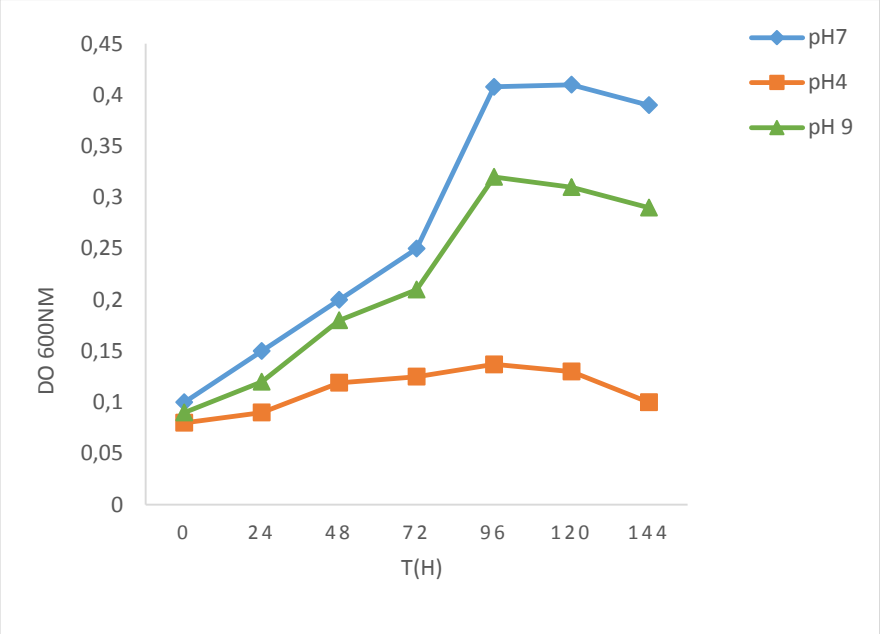



**Figure. 30**. Effet du pH sur la croissance bactérienne

### III. 5. 3 Effet de la température sur la croissance

La température de croissance optimale est déterminée en mesurant la croissance bactérienne pour des cultures réalisées sur milieu MSM à pH 7, en présence de 20 mg/l de métribuzine, et aux températures suivantes : 12, 20, 30 et 45 °C.

Les résultats obtenus et représentés sur la Figure.31 montrent que l'augmentation de la température a un effet positif sur la croissance bactérienne, cependant cette croissance est ralentie à basse température. Une diminution de la température s'accompagne généralement d'une baisse de la vitesse de biodégradation qui peut s'expliquer par une diminution de l'activité enzymatique. On note que la croissance de la *M*. SdK644 est meilleure à T = 30°C.

Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (WALWORTH et al, 2001) [72].

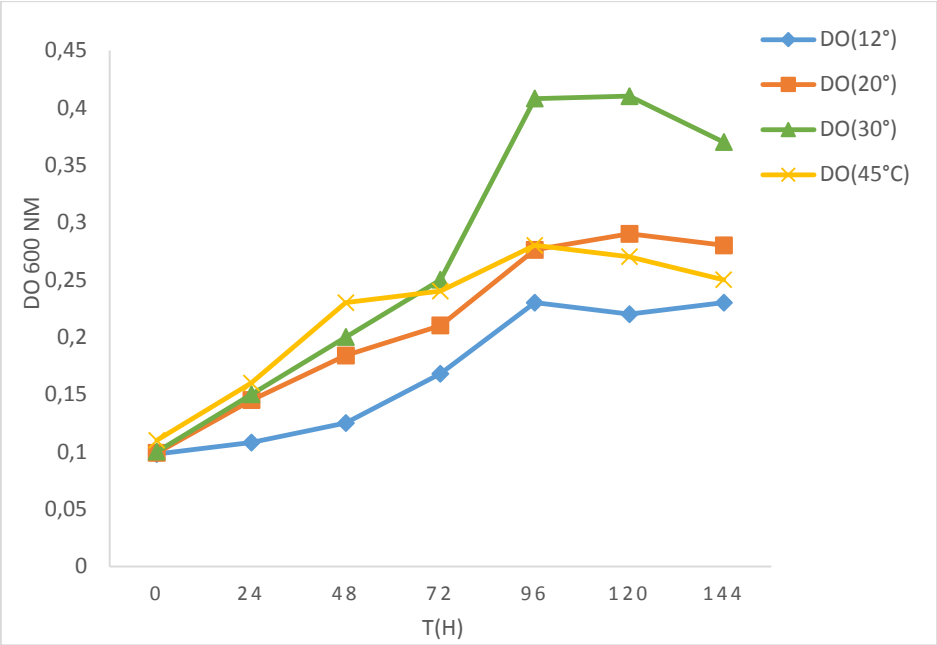



**Figure. 31.** Effet de la température sur la croissance

### III. 5. 4 Effet de la concentration de l'inoculum sur la croissance

La figure 32 montre la variation de l'absorbance à 600 nm en fonction du temps en utilisant la métribuzine comme seule source de carbone, la souche *M.* SdK644 a été inoculée avec différents volumes (1 %, 2 %,4 % et 8 % v/v) et cultivée à 30 °C et à pH 7,0 pendant 144 heures. Les résultats ont montré que la densité de cellules dans les milieux en présence de 20 mg.$L^{-1}$de métribuzine étant limitée (DO en fin de croissance autour de 0,4 avec une inoculation de 1% dans des conditions de croissance optimales.

Ces résultats montrent que le taux de dégradation diminue si l'inoculation est trop faible, diminuant ainsi la quantité initiale de bactéries sur le milieu. Les taux de dégradation ont également diminué quand l'inoculation est trop élevée car la nutrition insuffisante limitera la croissance normale des bactéries, il est nécessaire d'inoculer les solutions avec un plus grand volume (environ 4%), avec une concentration adéquate de métribuzine.

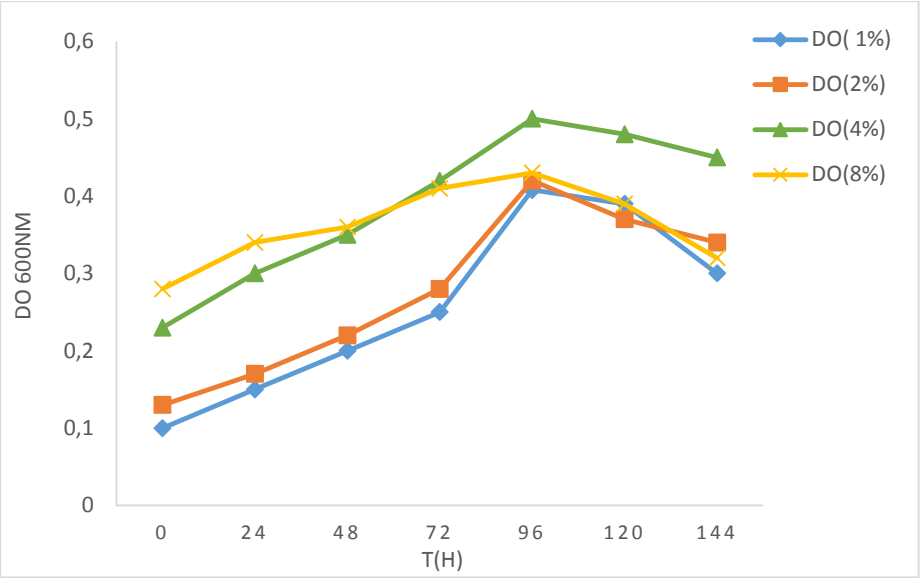



**Figure.32**.Effet de la concentration de l'inoculum sur la croissance

L'ensemble de ces tests a permis de définir les conditions optimales pour la croissance de la souche *M*. SDK644 : pH à 7, température à 30 °C, concentration initiale de métribuzine fixée à 20 mg.L$^{-1}$ avec une inoculation à 4 %.

### III. 5. 5 Dégradation de la métribuzine par la souche *M*. Sdk644

Afin d'évaluer la capacité de la souche *M*. Sdk644 à dégrader le pesticide utilisé, une solution de milieu de sel minéral a été préparée avec différentes concentrations de pesticide, le milieu a été inoculé avec 4% (v / v), pH = 7, et T = 30 °C.

La figure 33 montre la diminution de la quantité de métribuzine dans le milieu, et ceci est remarquable avec une concentration de 20 mg.L$^{-1}$.

La concentration de métribuzine a diminué de 20 mg.L$^{-1}$ à 6,75 mg/l et de 2 mg.L$^{-1}$à 0,26 mg.L$^{-1}$. Les taux d'élimination étaient de 88, 67.75, 45.6, 41.3 pour des concentrations en pesticides égales à 2, 20, 50, 100 mg.L$^{-1}$ respectivement.

Les résultats montrent que cette souche assimile bien la metribuzine à faibles concentrations

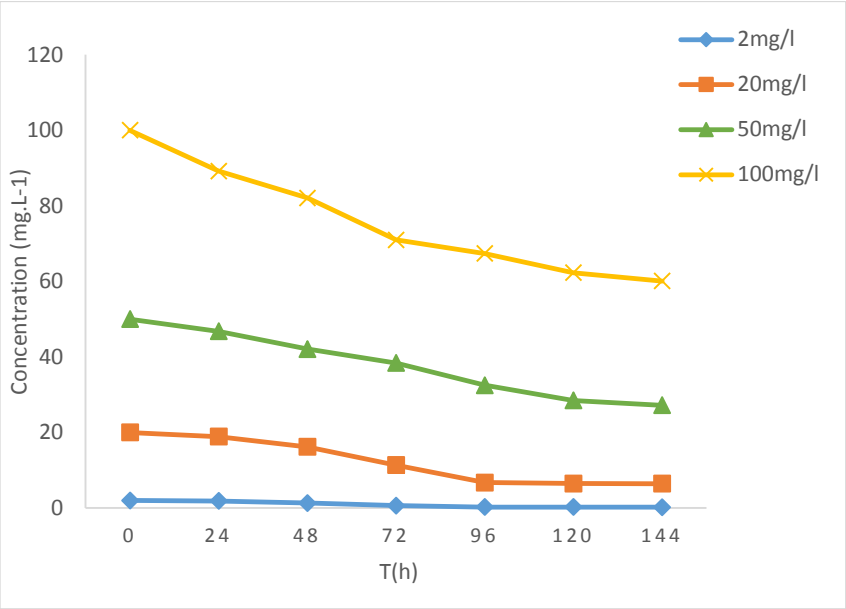



**Figure. 33.** Dégradation de la metribuzine au cours du temps

pH : 7, T : 30 °C

La dégradation de la métribuzine a également été suivie par la mesure de la DCO [73] les résultats sont présentés dans la Figure 34 où la réduction de la DCO est remarquable avec une efficacité de purification de la valeur de la DCO de 80%.

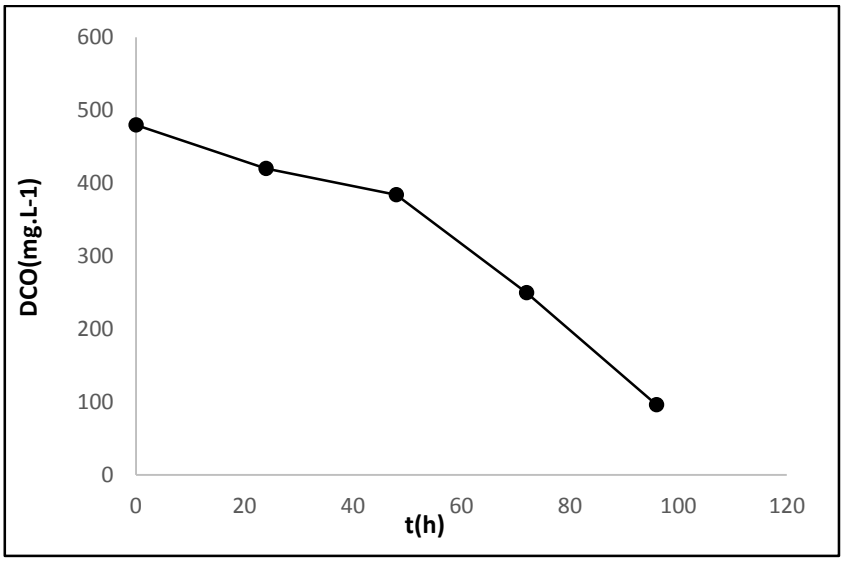



**Figure. 34.** Cinétique de variation de la DCO au cours du temps

### III. 6 Etude de l'influence des différents paramètres par le plan d'expérience

Pour notre matrice d'expérience on a choisi deux réponses :la première réponse est la croissance bactérienne qui a été évalué par mesure de la densité optique à 600 nm pour les deux souches étudiées, la deuxième réponse c'est le rendement d'élimination du pesticide étudié ,qui a été évalué par mesure de la DCO d'une solution de pesticide de concentration connue ,et la mesure après incubation et stérilisation sur filtre seringue ; le calcul du rendement est comme suit :

$$R\% = [(DCOE - DCOS)/DCOE].100$$

### III. 6. 1 Biodégradation de l'acétamipride avec la *Marinobacter* SdK644

Afin d'améliorer la biodégradation de l'acétamipride et la croissance de la souche *M.* SdK644, des expériences ont été conçues pour sélectionner les facteurs influants sur cette dégradation en utilisant le design expérimental complet. Le tableau 14 présente la conception du plan pour quatre variables de culture et leurs réponses correspondantes en termes de biodégradation du pesticide et/ou croissance de la souche .

**Tableau.14** Résultats expérimentaux de la biodégradation de l'acétamipride par souche bactérienne *M.* SdK644

| Essais | **X1(T°C)** | **X2(pH)** | **X3(C1:pesticide)** | **X4(C2:inoculum)** | DO | R% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0.029 | 62 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | 0.027 | 63 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | 0.02 | 60 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | 0.042 | 73 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | 0.046 | 75 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | 0.049 | 77 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | 0.046 | 75 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | 0.049 | 79 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | 0.053 | 82.5 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | 0.058 | 85 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | 0.054 | 83 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | 0.059 | 85 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | 0.07 | 90 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | 0.076 | 91 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | 0.79 | 92 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | 0.087 | 92 |

D'après la figure (35 a) le modèle a donné un $R^2$ = 0,97 proche de 1 et l'indicateur statistique (RMSE=0.0056) très faible, ce qui veut dire que notre modèle est très efficace.

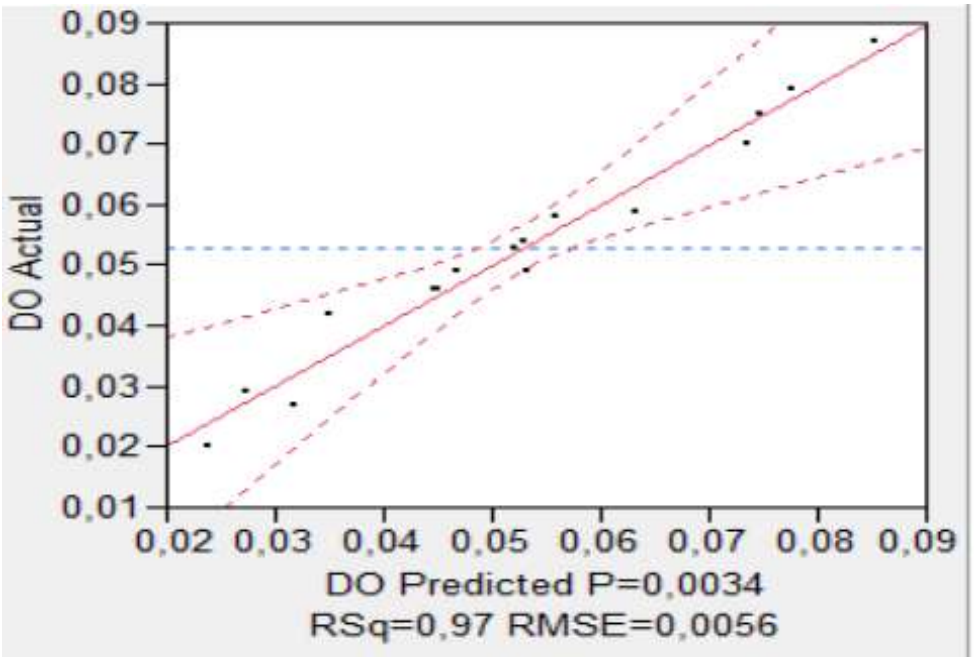



**Figure .35**a. L'écart entre la DO mesurée et la DO calculée

Et de même pour le rendement ou on a trouvé un $R^2$ égale à 0.98 et le RMSE égale à 2.5818 Ce qui veut dire que la modélisation est adéquate.

Lorsque l'effet du paramètre testé est positif, l'influence des variables est plus grande avec les niveaux élevés testés et si elle est négative, l'influence des variables est plus grande avec les niveaux bas. La croissance de la souche et donc la dégradation dans les différents ensembles variait de 0,02 à 0,087, rappelant l'importance de la sélection et de l'identification des facteurs importants.

Le graphique de Pareto a été tracé pour montrer l'effet de toutes les variables sur la dégradation de l'acétamipride par la première souche (*M*. SdK644).

.

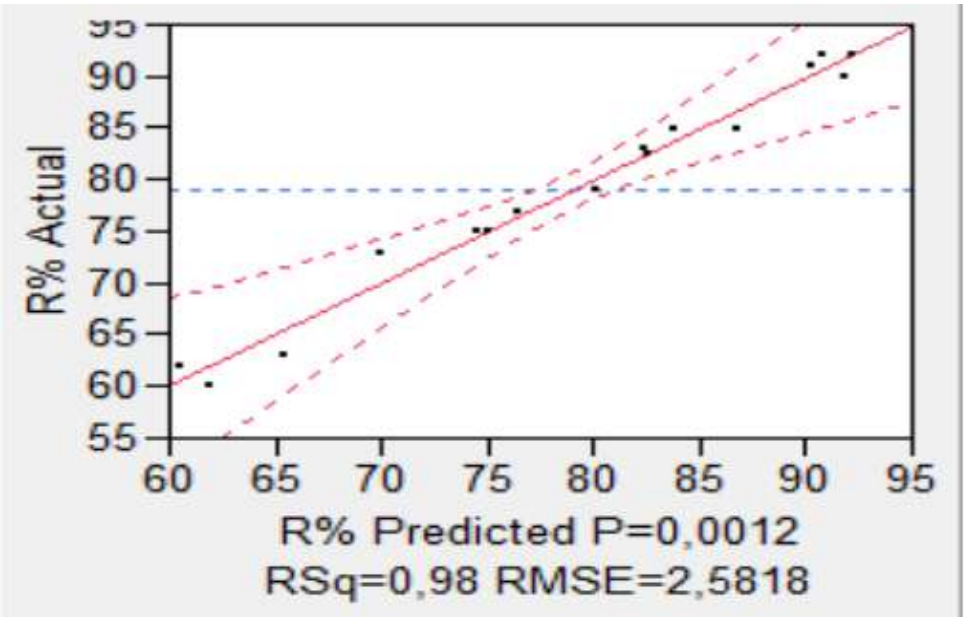



**Figure. 35 b.** l'écart entre le rendement mesuré et le rendement calculé

Comme il est clairement montré (figure 36 a) la concentration de l'inoculum et la concentration du pesticide avaient l'influence majeure sur la croissance de la souche, suivis par la température et le pH.

La concentration de l'inoculum est le principal facteur affectant la croissance de la souche bactérienne (*M*. SdK644) avec un coefficient de 0,0141875 ce qui veut dire que la biodégradation du pesticide nécessite une concentration élevé en population bactérienne. La concentration du pesticide et le facteur qui affectent la croissance de la souche *M*. SdK644 et donc la biodégradation de l'acétamipride avec un coefficient de 0,0099375. Ces résultats ont montré que les fortes concentrations en pesticide affectent la croissance de la souche et la dégradation de l'herbicide étudié, et que le pH et la température n'ont pas d'effet important sur la croissance/dégradation.

Vijayalakshmi et Usha (2012) [74] ont trouvé que la concentration du pesticide est un facteur limitant la biodégradation du chlorpyrifos par *Pseudomonas sp*.

| Term | Estimate | Std Error | t Ratio | Prob>\|t\| |
|---|---|---|---|---|
| C2 inoculum | 0,0141875 | 0,001405 | 10,10 | 0,0002* |
| C1 Pesticide | 0,0099375 | 0,001405 | 7,08 | 0,0009* |
| TC° | 0,0030625 | 0,001405 | 2,18 | 0,0811 |
| PH | 0,0018125 | 0,001405 | 1,29 | 0,2533 |
| TC°*PH | 0,0016875 | 0,001405 | 1,20 | 0,2834 |
| PH* C2 inoculum | 0,0010625 | 0,001405 | 0,76 | 0,4835 |
| C1 Pesticide* C2 inoculum | 0,0009375 | 0,001405 | 0,67 | 0,5340 |
| PH*C1 Pesticide | 0,0008125 | 0,001405 | 0,58 | 0,5880 |
| TC°*C1 Pesticide | -0,000687 | 0,001405 | -0,49 | 0,6452 |
| TC°* C2 inoculum | -0,000188 | 0,001405 | -0,13 | 0,8990 |

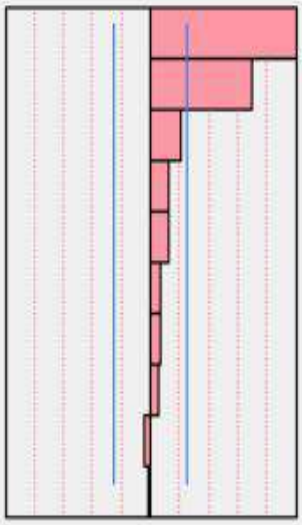


**Figure.36**.a : Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur la croissance.

De même pour le rendement ou on trouve que la concentration de l'inoculum et la concentration du pesticide sont les deux premiers paramètres influençant le rendement d'élimination du pesticide (Figure 36 b) suivis par la température.

La concentration de l'inoculum est le principal facteur affectant le rendement d'élimination avec un coefficient de 8.53125 ,la concentration du pesticide affectent le rendement d'élimination et donc la biodégradation de l'acétamipride avec un coefficient de 4.84375. Ces résultats ont montré que les fortes concentrations en pesticide affectent la croissance et la dégradation de l'herbicide étudié. Et que le pH et la température n'ont pas d'effet important sur la croissance/dégradation. Singh et al. (2003)[75] ont observé qu'à un pH compris entre 6,7 et 8,4 les souches de *Pseudomona* sp, maintiennent une capacité de dégradation du chlorpyrifos élevée. Liu et al. (2012)[76] ont montré que le pH optimum pour une meilleure dégradation du chlorpyrifos par *Bacillus cereus* était à pH 7.

| Term | Estimate | Std Error | t Ratio | Prob>\|t\| |
|---|---|---|---|---|
| C2 inoculum | 8,53125 | 0,645447 | 13,22 | <,0001* |
| C1 Pesticide | 4,84375 | 0,645447 | 7,50 | 0,0007* |
| TC° | 1,59375 | 0,645447 | 2,47 | 0,0566 |
| C1 Pesticide* C2 inoculum | -1,15625 | 0,645447 | -1,79 | 0,1332 |
| TC°* C2 inoculum | -0,90625 | 0,645447 | -1,40 | 0,2193 |
| PH | 0,84375 | 0,645447 | 1,31 | 0,2480 |
| TC°*PH | 0,78125 | 0,645447 | 1,21 | 0,2802 |
| TC°*C1 Pesticide | -0,71875 | 0,645447 | -1,11 | 0,3161 |
| PH* C2 inoculum | -0,40625 | 0,645447 | -0,63 | 0,5567 |
| PH*C1 Pesticide | -0,21875 | 0,645447 | -0,34 | 0,7484 |

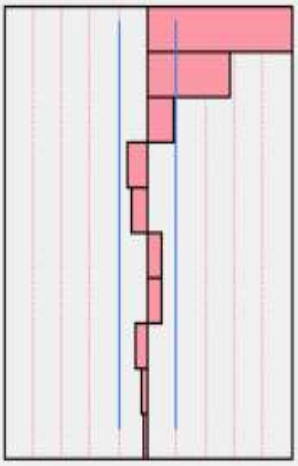


**Figure.36b :** Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur le rendement

Le diagramme qui étudie l'effet des paramètres (pH, concentration du pesticide, concentration de l'inoculum et la température) sur la croissance bactérienne(DO) et le rendement (R%).est représenté dans la figure 37.

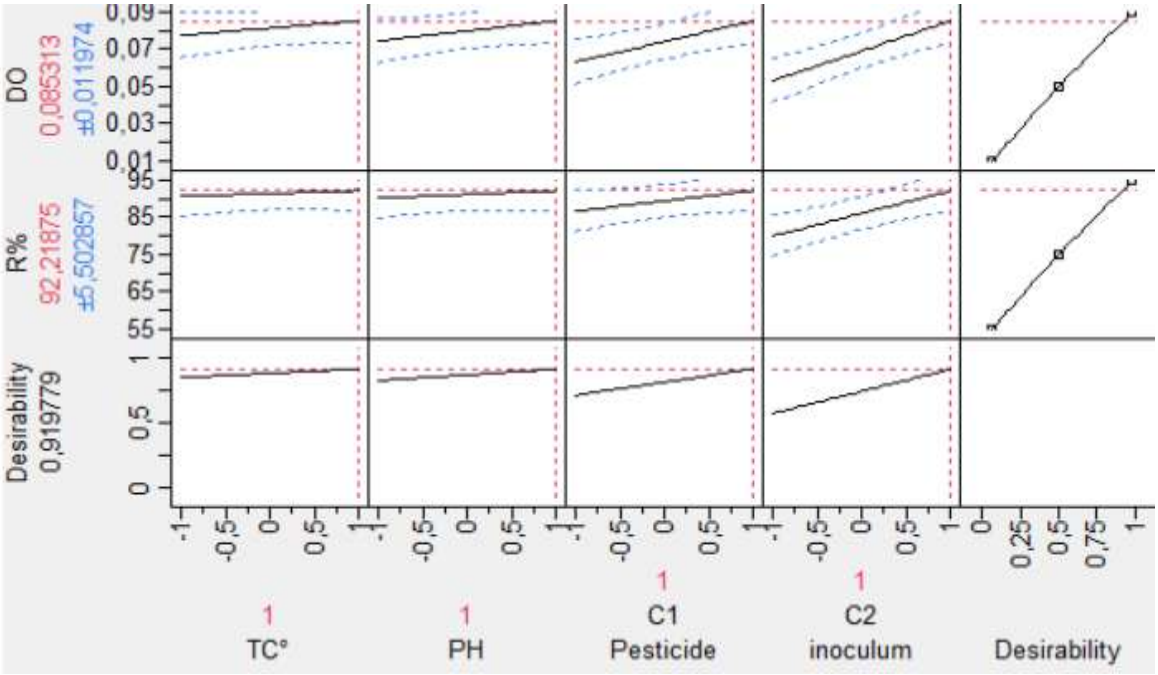



**Figure. 37** Effet des paramètres sur les deux réponses

A partir du diagramme (figure 37) on observe que le pH a un effet positif sur la croissance bactérienne. Car dans l'intervalle de pH [4 -7] il y a une augmentation de la DO de sorte qu'à pH = 4 sa valeur est de 0.074563 et à pH =7 sa valeur est de 0.085313. Dans l'intervalle de température [20 °C – 30 °C], on remarque que la croissance bactérienne densité optique a augmenté ou on a trouvé une densité optique égale à 0.077563 à 20 °C et 0.085313 à 30 °C. Pour la concentration initiale du pesticide égale à 20 $mg.L^{-1}$ on a enregistré une densité optique de valeur de 0.189271 et 0.279264 pour une concentration initiale 200 $mg.L^{-1}$

L'effet des paramètres (pH, C1, C2, T) sur le rendement (R%).

On observe que tous les paramètres (pH, température, concentration du pesticide et la concentration de l'inoculum) ont un effet positif sur le rendement, car chaque augmentation de chacun de ces paramètres entraine l'augmentation du rendement.

### III. 6. 2 Biodégradation de l'acétamipride par la *Klebsiella pneumonie ATCC25922*

**Tableau 15.** Résultats expérimentaux de la souche bactérienne *Kp*

| Essais | **X1(T°C)** | **X2(pH)** | **X3(C1:pesticide)** | **X4(C2:inoculum)** | DO | R% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0.125 | 64.5 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | 0.127 | 65.5 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | 0.129 | 66 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | 0.132 | 66 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | 0.11 | 53 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | 0.113 | 54 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | 0.235 | 89 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | 0.253 | 93 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | 0.125 | 63 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | 0.115 | 53.5 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | 0.145 | 67 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | 0.255 | 64.5 |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | 0.119 | 65.5 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | 0.126 | 65 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | 0.246 | 91 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | 0.3 | 95 |

D’après la (Figure 38) le modèle a donné un $R^2$ = 0.95 proche de 1 et l’indicateur statistique (RMSE=0.0248) très faible, ce qui veut dire notre modèle est très efficace

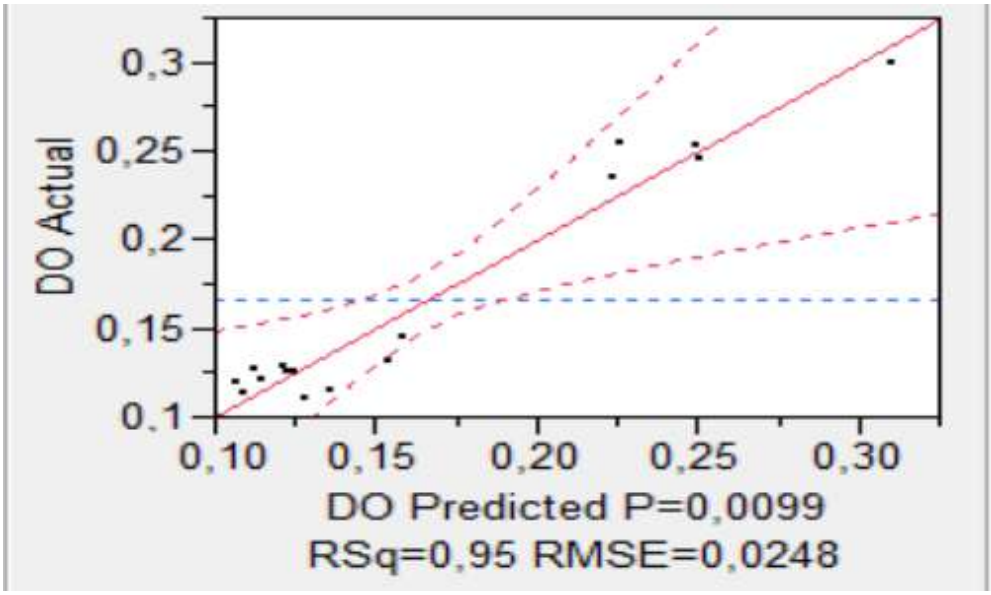



**Figure 38-a**. L**’écart entre la DO mesurée et la DO calculée.**

Le modèle a donné un $R^2$ = 0.88 proche de 1 et l’indicateur statistique (RMSE=9.2366) faible, ce qui veut dire notre modèle est efficace.

L’influence des variables était plus grande avec les niveaux bas. La croissance de la souche et donc la dégradation du pesticide dans les différents ensembles variait de 0,115 à 0,3, rappelant l’importance de la sélection et de l’identification des facteurs importants, le graphique de Pareto a été tracé pour montrer l’effet de toutes les variables sur la da la deuxième souche (*kp*).

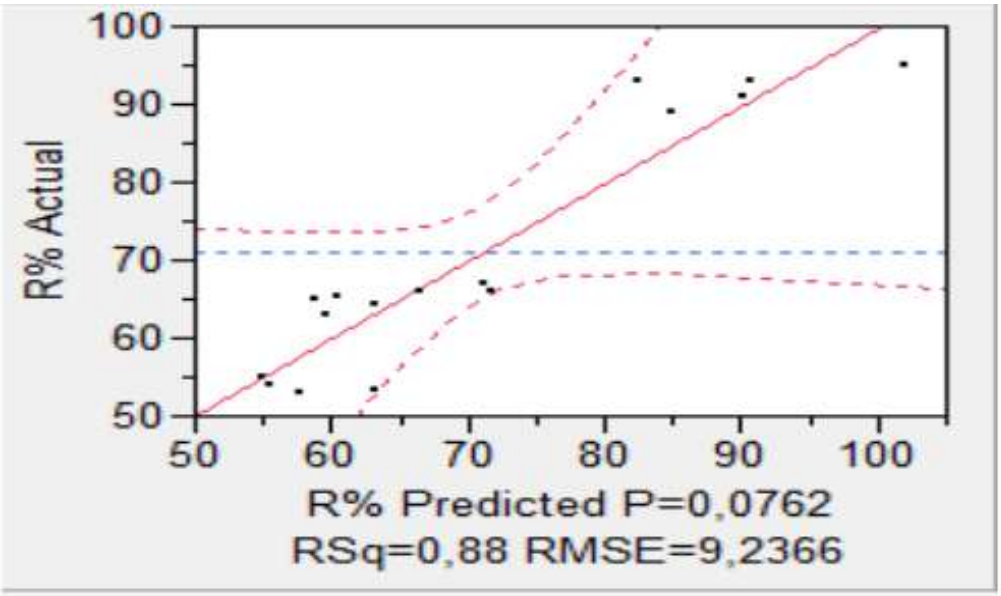



**Figure.38-b.** l'écart entre le rendement mesuré et le rendement calculé.

La (Figure 39 a) montre que le pH, l'intersection de pH avec la concentration de pesticide et la concentration du pesticide avaient l'influence majeure sur la croissance de la *klebsiella (kp)* suivis par la température.

Le pH est le principal facteur affectant la croissance de la souche bactérienne (*kp*) avec un coefficient de 0,0461875,l'intersection de pH avec la concentration du pesticide et le facteur qui affectent la croissance de la souche *kp* et donc la biodégradation de l'acétamipride avec un coefficient de 0.0245625.suivi par la concentration du pesticide avec un coefficient de 0.0220625. Ces résultats ont montré que les fortes concentrations en pesticide affectent la croissance et la dégradation, et que la température et la concentration de l'inoculum affectent moins la croissance/dégradation. .

| Term | Estimate | Std Error | t Ratio | Prob>\|t\| |
|---|---|---|---|---|
| PH | 0,0461875 | 0,006198 | 7,45 | 0,0007* |
| PH*C1 | 0,0245625 | 0,006198 | 3,96 | 0,0107* |
| C1 | 0,0220625 | 0,006198 | 3,56 | 0,0162* |
| C2 | 0,0126875 | 0,006198 | 2,05 | 0,0960 |
| PH*C2 | 0,0119375 | 0,006198 | 1,93 | 0,1120 |
| T C° | 0,0119375 | 0,006198 | 1,93 | 0,1120 |
| T C°*PH | 0,0111875 | 0,006198 | 1,81 | 0,1309 |
| T C°*C2 | 0,0086875 | 0,006198 | 1,40 | 0,2199 |
| C1*C2 | -0,002687 | 0,006198 | -0,43 | 0,6826 |
| T C°*C1 | -0,001687 | 0,006198 | -0,27 | 0,7963 |

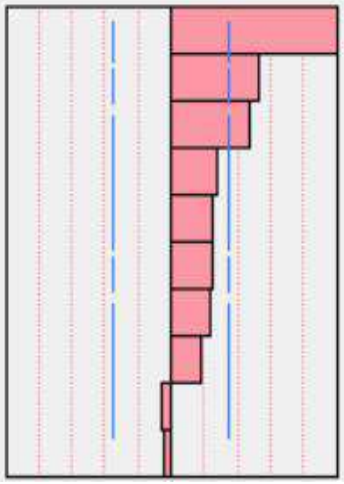


**Figure 39-a.** Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur la croissance

La (Figure 39-b) montre que le pH et l'intersection de pH avec la concentration du pesticide avaient l'influence majeure sur rendement suivis par la concentration du pesticide, la température et la concentration de l'inoculum

| Term | Estimate | Std Error | t Ratio | Prob>\|t\| |
|---|---|---|---|---|
| PH | 11,65625 | 2,309161 | 5,05 | 0,0039* |
| PH*C1 | 5,96875 | 2,309161 | 2,58 | 0,0491* |
| C1 | 3,53125 | 2,309161 | 1,53 | 0,1868 |
| T C° | 2,28125 | 2,309161 | 0,99 | 0,3686 |
| PH*C2 | 2,03125 | 2,309161 | 0,88 | 0,4193 |
| C2 | 1,96875 | 2,309161 | 0,85 | 0,4328 |
| T C°*PH | 1,96875 | 2,309161 | 0,85 | 0,4328 |
| T C°*C2 | 1,53125 | 2,309161 | 0,66 | 0,5366 |
| C1*C2 | 0,15625 | 2,309161 | 0,07 | 0,9487 |
| T C°*C1 | 0,09375 | 2,309161 | 0,04 | 0,9692 |

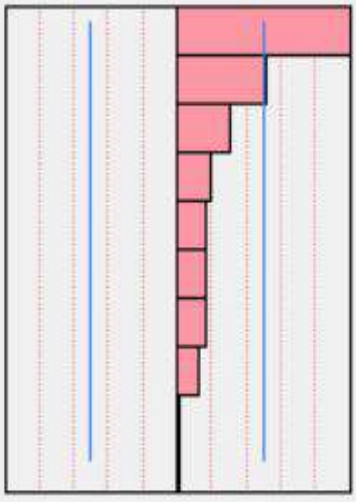


**Figure. 39b.** Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur le rendement.

Ces résultats ont montré que les forts pH et concentration en pesticide affectent la croissance et la dégradation de l'herbicide étudié, et que la température et la concentration de l'inoculum n'ont pas d'effet important sur la croissance/dégradation

Le plus grand rendement est atteint lorsque les trois facteurs sont à leur niveau haut.
A partir de diagramme (Figure 40) on observe que il y a un effet positif du pH sur la densité optique, le sens de variation du facteur 1 (la température) est le même pour les deux réponses. Donc, quand on améliore (détériore) l'une, on améliore (détériore) l'autre. On peut jouer pour améliorer la croissance, on obtiendra en même temps des rendements élevés.

On règle donc le facteur 1 au niveau haut (Figure 40). La croissance passe à 0.3 et celle du rendement à 95.Pour cette valeur du niveau du facteur 1, on s'aperçoit que le facteur 2 modifie le rendement. On remarque que, le facteur 3 agit de la même façon sur les deux réponses. Les changements de pente des facteurs sont dus aux interactions.

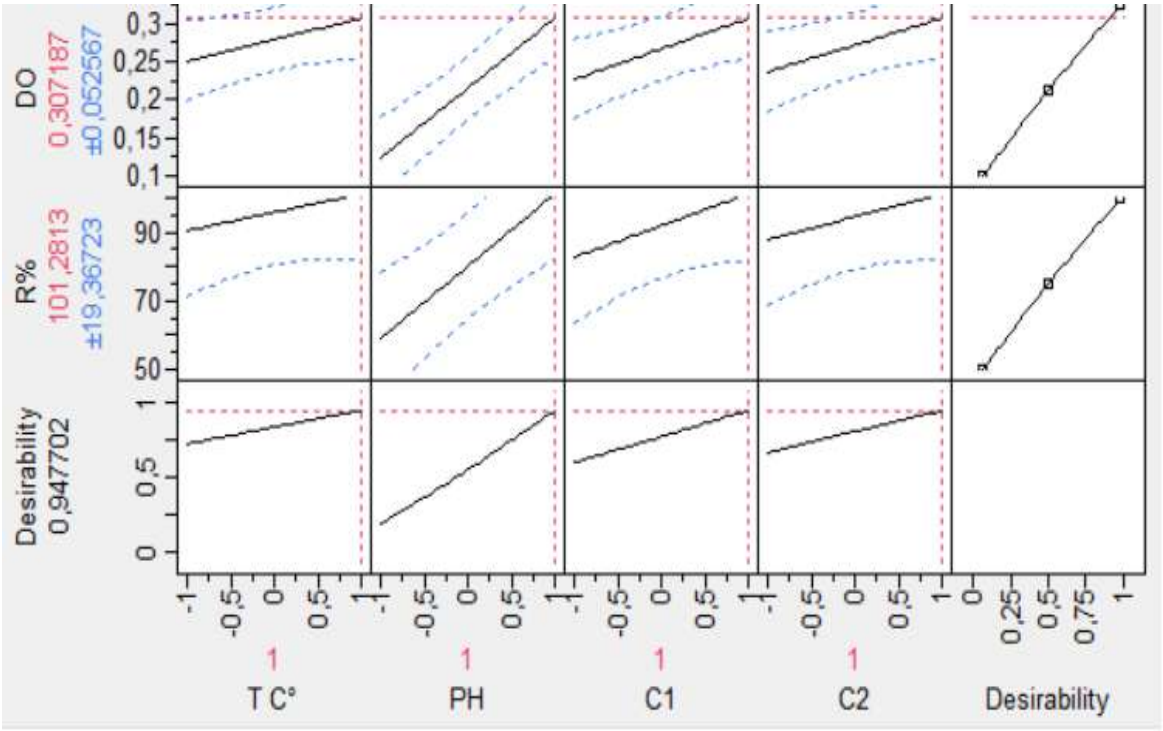



**Figure .40**.Effet des paramètres sur les deux réponses (souche *kp)*

### III. 7 Traitement des pesticides par les biosurfactants produits

La concentration des pesticides a été évaluée par spectrophotométrie UV et par mesure de la DCO pour pouvoir conclure s'il y a minéralisation ou non de la molécule de départ. Des solutions de biosurfactants (1/4* CMC, ½ *CMC, 1 *CMC et 2*CMC) contenant les pesticides étudiés à une concentration de 20 mg.$L^{-1}$ dans l'eau ont été préparé

Le Tableaux 16 montre respectivement les concentrations trouvées dans les solutions. La Figure 41 présente respectivement les concentrations des pesticides trouvées dans les solutions et la DCO en fonction de la concentration en biosurfactant.

Le procédé a donné lieu à une minéralisation de 85 % de la matière organique en terme de DCO dans le cas de l'acétamipride et 70 % dans le cas de la métribuzine , en ce qui concerne le traitement par le biosurfactant produit par la souche *Kp* a permis de minéraliser, en terme de DCO 70 % de l'insecticide acétamipride et 60 % de l'herbicide métribuzine et cela avec l'utilisation d'une concentration en biosurfactant égale à deux fois la CMC. Les biosurfactants deviennent efficaces lorsque leurs concentrations en solution dépassent leur CMC effectives.

**Tableau 16.** Traitement des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *M.* SdK644

| **Pesticides** | **Echan brut** | | **Ech+BS SdK644 (1/4CMC)** | | **Ech+BS SdK644 (1/2*CMC)** | | **E+BS SdK644 (1*CMC)** | | **E+BS SdK644 (2*CMC)** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **DCO (mg/l** | **C (mg/l)** | **DCO (mg/l** | **C (mg/l)** | **DCO (mg/l)** | **C (mg/l)** | **DCO (mg/l** | **C (mg/l)** | **DCO (mg/l** | **C (mg/l** |
| **Metrixone(P1)** | 326.4 | 20 | 297.6 | 18 | 268.8 | 16.4 | 192 | 11.7 | 96 | 5.88 |
| **Mopistop(P2)** | 960 | 20 | 547.2 | 11.5 | 518.4 | 10.6 | 384 | 8.2 | 144 | 7.2 |

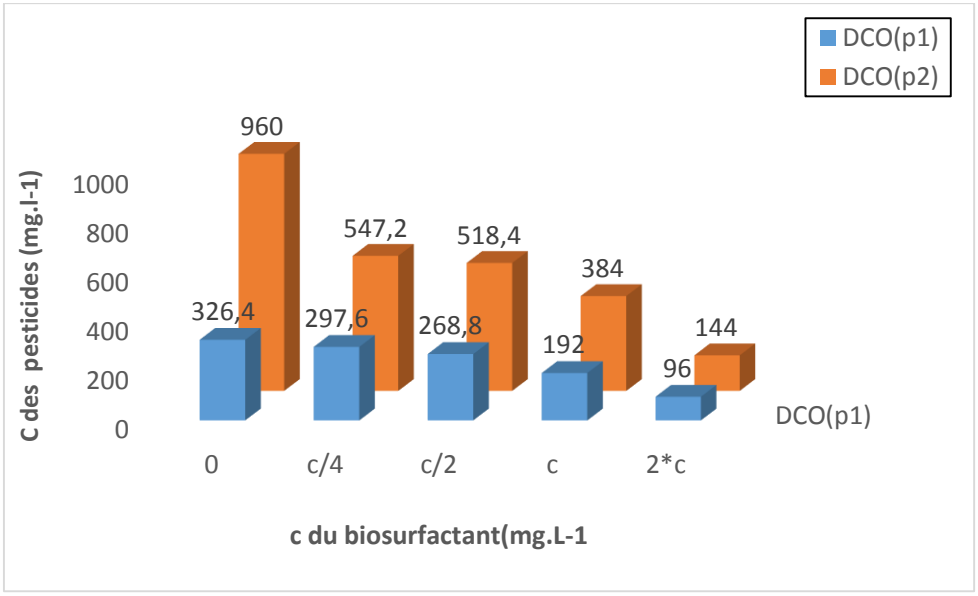



**Figure.41 a** Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *M.S*dK644 (Mesure de la DCO)

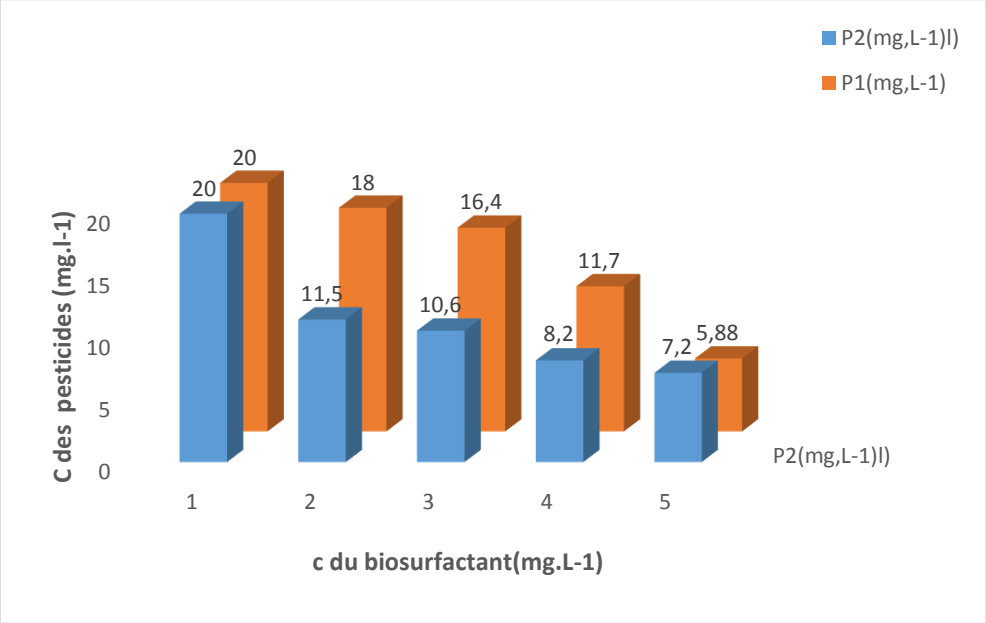



**Figure. 41. b** Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *M.*SdK644 (Mesure de la concentration des pesticides)

**Tableau 17.** Traitement des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *Kp*

| Pesticides | Echan brut | | Ech+BS SdK644 (1/4CMC) | | Ech+BS SdK644 (1/2*CMC) | | E+BS SdK644 (1*CMC) | | E+BS SdK644 (2*CMC) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | DCO (mg/l | C (mg/l) | DCO (mg/l | C (mg/l) | DCO (mg/l) | C (mg/l) | DCO (mg/l | C (mg/l) | DCO (mg/l | C (mg/l |
| **Metrixone(P1)** | 326.4 | 20 | 268 | 17.5 | 230 | 14.3 | 192 | 10.8 | 134 | 6.9 |
| **Mopistop(P2)** | 960 | 20 | 681.6 | 14.2 | 576 | 11.8 | 403.2 | 8.7 | 220 | 5.1 |

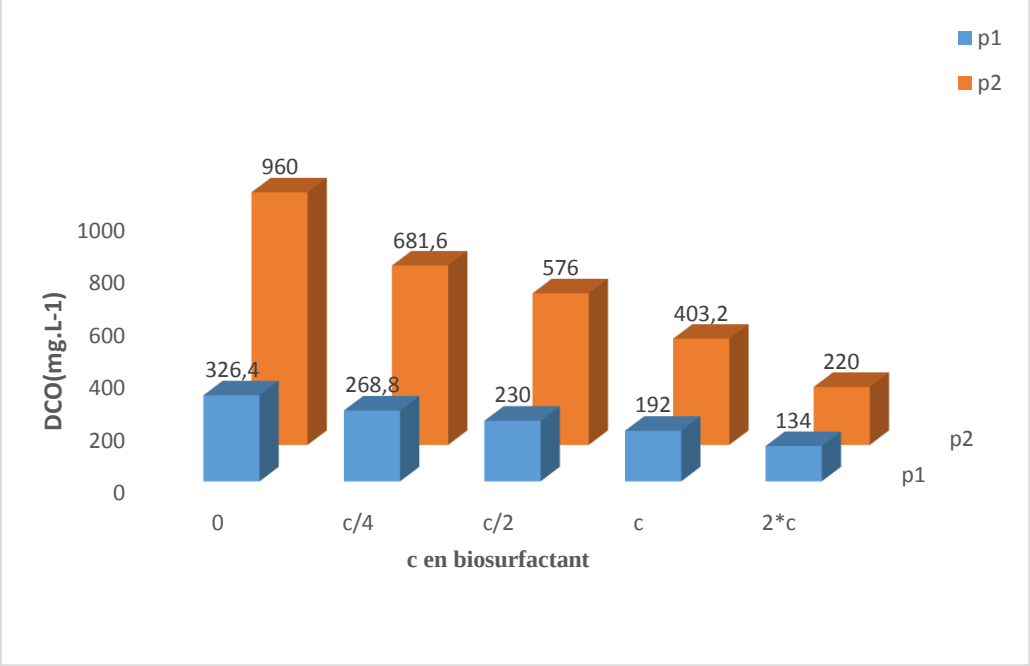



**Figure.42 a** Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *Kp*(Mesure de la DCO)

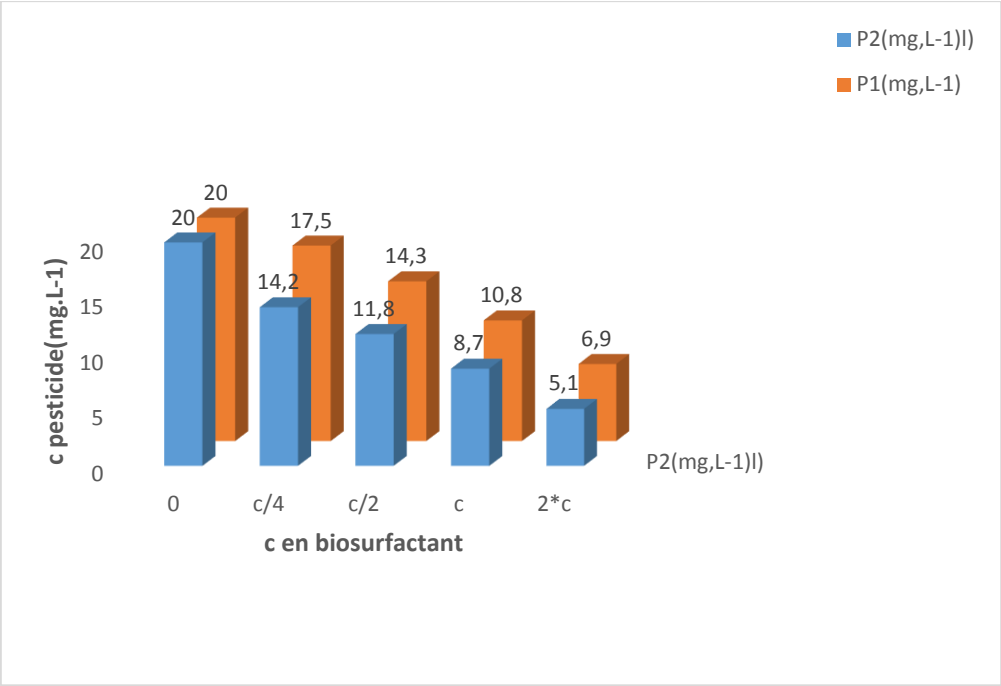



**Figure.42.b** .Dégradation des pesticides par le biosurfactant produit par la souche *Kp* (Mesure de la concentration des pesticides)

Les résultats de cette étude montrent que le procédés de traitement par le biosurfactant peut être appliqué à la décontamination d'effluents pollués par des pesticides.

Les biosurfactants, et les glycolipides en particulier, peuvent être utilises directement pour la récupération des métaux (Singh et Thomas 1987) [77]. Des études menées en laboratoire (Tan et al. 1994) [78] ont montré les capacités des rhamnose lipides produits par la souche *P. aeruginosa* ATCC 9027 à complexer de manière rapide et stable les ions cadmium.

# Conclusion générale et Perspectives

La première partie de cette thèse a été centrée sur l'isolement de bactéries du sol pollué et la production de biosurfactant par une des communautés isolées. Ainsi, leur capacité à produire des biosurfactants a été étudiée. Pour cela, les colonies ont été inoculées dans un milieu de culture spécifiquement sélectionné pour favoriser la production de biosurfactant. L'utilisation d'huile végétale et l'ajout d'azote, de phosphore, de potassium et de sodium comme nutriments a été décidée en ce sens. La production de biosurfactant par une des colonies inoculées dans ce milieu a été attestée, validant la composition de ce milieu comme permettant la production de biosurfactant.

La souche isolée *M*.SF se développe à pH égal à 7.4, à 45 °C et dans une gamme de concentration en NaCl comprise entre 0-30 g. $L^{-1}$. La caractérisation phénotypique et phylogénétique montre que la souche est membre du genre *Marinobacter hydrocarbonoclasticus.* En plus, la souche dégrade presque 80 % de la fraction polluante présente dans l'échantillon brut d'abattoir, au bout de 7 jours d'incubation. Aussi, la souche isolée *Marinobacter* SdK644 présente la meilleure croissance bactérienne, suivie par la *Marinobacter* SF et la souche *klebsiell*a.

L'efficacité de microorganismes ne provenant pas du lieu de la pollution a aussi été prouvée, ou les souches isolées des milieux marins ont dégradé les pesticides étudiés en les utilisant comme source de carbone.

Les *hydrocarbonoclastes*, très recherchés pour être appliqués en bioremédiation, sont considérés comme des candidats potentiels pour produire des agents tensioactifs, et de même pour le genre *Klebsiella pneumoniae.*

La deuxième partie a concerné l'étude des facteurs influençant la croissance des souches et la biodégradation des pesticides métribuzine et acétamipride à l'aide d'une matrice de criblage de Plan factoriel complet. En effet, on a trouvé que certains d'entre eux ayant un effet positif significatif.

Le suivie d' éventuelle production de biosurfactants par nos 3 souches sélectionnées *Marinobacter* SF, *Marinobacter* SdK644 et *la klebsiella pneumonia Kp ;* durant leur croissance sur différentes sources en réalisant la mesure de la tension de surface et le test de

déplacement d'huile. Le premier critère utilisé dans la littérature pour suivre la production de biosurfactants est la réduction de la tension de surface. Au cours de la croissance des 3 souches sur différentes sources de carbone, une diminution de la tension de surface (TS=28- 32 mN. $m^{-1}$) a été constatée à des concentrations micellaires critiques égales à 850, 750 et 950 mg. $L^{-1}$ des biosurfactants SF, SdK et *KP* consécutivement. Le test de déplacement d'huile montre aussi la formation des halos de diamètres importants (D= 7-8 cm) en présence de certains substrats.

Les résultats obtenus qui mettent en relief les propriétés tensioactives intéressantes des biosurfactants BS-SF, BS-SdK644 et BS-KP, pourraient encourager la possibilité de l'utilisation de ces produits biologiques dans divers applications. Dans ce contexte, des essais d'applications des biosurfactants étudiés ont été réalisés telle que la dépollution des eaux usées d'abattoir et la dégradation des pesticides utilisés.

L'efficacité d'épuration des eaux d'abattoir obtenue était de 95 % par le BS-SF et le BS-SdK et de 82 % par la souche SF et SdK productrices. Au vu de ces résultats pertinents, les souches *M.* SF, *M.*SdK644 *et KP* ainsi que leurs biosurfactants demeurent prometteurs et pourraient être utilisés avec succès dans divers applications biotechnologiques. Ils peuvent servir pour performer les stratégies de bioremédiation des eaux. De même, la dégradation des pesticides par les souches isolées SdK et *KP* et par leurs biosurfactants produit a été confirmé en obtenant un taux de dégradation de 80% et dans la gamme de 80- 85 % successivement à un pH neutre, à 30 °C, une concentration du pesticide (source de carbone) de 20 mg. $L^{-1}$ avec 4% d'inoculum.

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

-L'optimisation des paramètres de production du biosurfactant par l'essai d'autres substrats à faibles valeurs marchandes (huile de friture, huile de vidange,…etc.).

-L'étude des propriétés physicochimiques des biosurfactants produit, pour mieux connaitre leurs natures et leurs structures.

-La réalisation des analyses qualitatives des pesticides après la biodégradation pour connaitre les fractions biodégradées et remobilisées à l'aide de notre biosurfactant.

En fin, il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs afin d'obtenir de meilleur rendement et d'appliquer son efficacité dans la bioremédiation des eaux polluées sur site.

# Références


[1] Zenati. B, Chebbi. A, Badis. A, Eddouaouda. K,Boutoumi. H, El Hattab.M ,Hentati.D, Chelbi.M, Sayadi.S, Chamkha.M, Franzetti.A,. (2018).Anon-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.154, 100-107.

[2] Ferhat. S , S. Mnif, A. Badis, K. Eddouaouda, R. Alouaoui, A. Boucherit, N. Mhiri, N. Moulai-Mostefa, and S. 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.* 65:1182-1188.

[3] Corwin. D. L and K. Yemoto. (2017). Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. *Methods of Soil Analysis*. 2(1).

[4] Mnif. S, M. Chamkha and S. Sayadi. (2009). Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of Applied Microbiology* .107:785–794

[5] Kim. S.H, E.J. Lim, S.O. Lee, J.D. Lee and T.H. Lee. (2000).Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L417. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 31(3): 249-253.

[6] Jimoh. A and J. Lin. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability .*Ecotoxicology and Environmental Safety*. 184 : 109607.

[7] Widdel. F and N. Pfennig. (1981).Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of microbiology*. 129(5): p. 395-400.

[8] Abu-Ruwaida. A.S, Banat. I.M, Haditirto. S et Khamis. A.(1991).Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus bacterium*. *World J. Microbiol. Biotechnol*., V. 7(1): 53–61.

[9] Tuleva. B , N. Christova, B. Jordanov, B. Nikolova-Damyanova and P. Petrov.( 2005). Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Z. Naturforsch* (C). 60: 577–582.

[10] Ferhat. S, R. Alouaoui, A. Badis, and N. Moulai-Mostefa. ( 2017). Production and characterization of biosurfactant by free and immobilized cells from *Ochrobactrum*

*intermedium* isolated from the soil of southern Algeria with a view to environmental application. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31(4): 733–742.

[11] Morikawa .M, Daido. H, Takao .T, Murata .S, Imanaka T.(1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol*. 175: 6459–6466.

[12] Paraszkiewicz. K, Kanwal. A, Dlugonski .J. (2002). Emulsifier production by steroid transforming filamentous *fungus Curvularia lunata.* Growth and product characterization. *J Biotchnol*. 92: 287–294.

[13] Abu-Ruwaida .A. S, Bana .T, Haditirto. A, Salem .S and Kadri A.(1991). Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. *ActaBiotech*. 11(4): 315-24.

[14] Lotfabad. T.B, Shourianc. M, Roostaazada. R, Najafabadib. A.R, Adelzadeha. M.R. and Noghabic. K.A. (2009).An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran". Coll. Surf. B: Biointerf. 69(2):183-193.

[15] Arsenault. W.J, Ivany. J.A. (2001).Response of several potato cultivars to metribuzin and diquat, *Crop. Prot*. 20: 547–55.

[16] B. Zoumenou, M. P. Aïn, P. Agbohessi, I. Imorou toko and M-L. Scippo .(2015).Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin . *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 9(4): 2184-2199.

[17] Rodier. J, Legube. B, Merlet. N and al.Analysis of water, natural waters, wastewater and seawate, *9th edition Dunod, Paris*, 2009.

[18] J.Ayele, A.Mahi, M.Mazet. (1995).Etude de l'adsorption de l'atrazine sur le charbon actif en présence de tensioactifs, *Rev. Sci. Eau*, 8, 3, 355-370

[19) J. Goupy, Lee. Creighton : Introduction aux plans d'expériences 3ème édition DUNO .2005.

[20] Felsenstein. J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4): 783-791.

[21] Gauthier. J.P, H. Hammouri and S. Othman. (1992). A simple observer for nonlinear systems applications to bioreactors. *IEEE Transactions on automatic control.* 37(6): 875-880.

[22] Stackebrandt. E and B. Goebel.(1994).Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 44(4): 846-849

[23] Kim. M, Oh. H. S, Park. S. C, & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64(2): 346-351.

[24] Hentati. D, A. Chebbi , F. Hadrich, I. Frikha, F. Rabanal, S. Sayadi, A. Manresa and M. Chamkha.( 2018). Production and characterization of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. Ecotoxicology and Environmental Safety. 167: 441-449.

[25] Rodrigues. L, Banat. I.M, Teixeira. J, Oliveira. R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* .57(4): 609-618

[26] Sriram. M.I, Kalishwaralal. K, Deepak. V, Gracerosepat. R, Srisakthi. K, Gurunathan. S. (2011). Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 85(2): 174-181

[27] Banat. I.M, Satpute. S.K, Cameotra. S.S, Patil. R, Nyayanit. N.V. (2014b). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*.5: 697.

[28] Bai .G, Brusseau .M. L and Miller .R. M. (1997). Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. J. *Contam. Hydrol*. 25: 157-170.

[29] Khopade. A, Biao. R, Liu. X, Mahadik. K, Zhang. L, & Kokare, C. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*. 285: 198-204.

[30] Mnif. S. Microbiologie de certains gisements pétroliers tunisiens : Biodégradation des hydrocarbures, production de biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne moyennant la technique de la SSCPThèse de doctorat. Université de Sfax 2012, Tunisie. p. 169. [31]Banat. I.M, Makkar .R.S, Cameotra .S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 53: 495–508.

[32] Bahri. M.A, Hoebeke. M, Grammenos. A, Delanaye. L, Vandewalle. N, & Seret, A. (2006). Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance. Colloids and Surfaces. *Physicochemical and Engineering Aspects*. 290 (1-3): 206-212.

[33] Luna. J.M ,Rufino. R. D, Sarubbo. L. A, & Campos-Takaki, G. M. (2013). Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from

industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 102 : 202-209.

[34] Gudiña. E.J , Rocha.V, Teixeira J. A, & Rodrigues, L. R (2010).antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei* A20. *Letters in applied microbiology*. 50(4): 419-424.

[35] Chebbi. A, Elshikh. M, Haque. F, Ahmed. S, Dobbin. S, Marchant. R Banat.I.M. (2017a). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of basic microbiology.* 57(5): 364-375.

[36] Silva. S.N.R.L, Farias. C.B.B, Rufino. R.D, Luna. J.M, Sarubbo. L.A. (2010). Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 79(1): 174-183.

[37] Vijaya. B, Jayalakshmi. N.R, Manjunath. K. (2013). Enumeration of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil in and around Bangalore (India). *International Journal of Current Science*, 5: 86-94.

[38] Hasanizadeh. P, Moghimi. H, Hamedi. J. (2017). Biosurfactant production by *Mocur circinelloides* on waste frying oil and possible uses in crude oil remediation. *Water Science et Technology*, 6(7-8): 1706-1714.

[39] George. S, Jayachandran. K. (2013). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*,114(2):373-383.

[40] Sadouk. Z, Hacene. H, Tazerouti. A. (2008). Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a *Rhodococcus* Strain. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP*. 63(6): 747-753.

[41] Eddouaouda. K, Mnif. S, Badis. A, Younes. S.B, Cherif. S, Ferhat. S, Mhiri. N, Chamkha. M, Sayadi. S. (2012). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of basic microbiology*. 52(4): 408-418.

[42] Chebbi. A, Hentati. D, Cheffi. M, Bouabdallah. R, Choura. C, Sayadi. S, Chamkha. M. (2018). Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 93(5): 1401-1412.

[43] Ron. E, Rosenberg. E. (2001).Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol*. 3(4): 229-236.

[44]Thavasi. R, Subramanyam Nambaru.V. R. M, Jayalakshmi. S, Balasubramanian, T, & Banat, I. M. (2011). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. *Indian journal of microbiology*, 20 51(1): p. 30-36

[45] Pantazaki, A. A, Dimopoulou. M. I, Simou. O. M, & Pritsa, A. A . (2010). Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. *Appl Microbiol Biotechnol*. 88(4): 939-951.

[46] Patowary. R, Patowary. K, Kalita. M. C, & Deka, S. R. (2016). Utilization of paneer whey waste for cost-effective production of rhamnolipid biosurfactant. *Applied Biochemistry* and Biotechnology. 180(3): 383-399.

[47] Lee. D.W, Lee. H, Kwon.B ,Khim. J.S ,Yim.U.H, Kim.B.S , Kim.J.J (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution*. 241 : 254-264.

[48] Varjani. S.J. and V.N. Upasani. (2016). Carbon spectrum utilization by anindigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology*. 221: 510-516.

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

[50] Azubuike. C.C, Chikere. C.B, Okpokwasili. G.C. (2016).Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects.*World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 32(11): 180 (2016).

[51] Belghyti. D,Y. El Guamri, G. Ztit, L. Ouahidi, B. Joti, A. Harchrassi, H. Amghar, O. Bouchouata, K. El kharrim and H. Bounouira. (2009). Physico-chemical characterization of slaughterhouse wastewater in view of the implementation of adequate treatment: case of Kenitra in Morocco. *Afrique Science*. 05(2): 153 – 216.

[52] Haselroth. K. J, Wilke. P, Miotto Dalla Costa. I, Lustoza Rotta. V.M Fiorini Rosado. A, Hermes. E. (2021).Effectiveness of *Aeromonas hydrophila* for the removal of oil and grease from cattle slaughterhouse effluent, *Journal of Cleaner Production*., 287: 125533.

[53] Krishnan. N, Valsa. A.K. (2015).Biodegradation of lipid rich dairy effluent by bacterial consortium. *Journal of Environmental Science and Toxicology. Food Technol.* 9: 16-20.

[54] Uba. B. N. (1995). Microbiological characteristics of wastewaters from a nitrogen and phosphate-based fertilizer factory. *Bioresource Technology*.51:143-152.

[55] D. Al-Wahaib, D. Al-Bader, D. K. Al-Shaikh Abdou, M. Eliyas, S. S. Radwan. (2016). Consistent Occurrence of *Hydrocarbonoclastic Marinobacter* Strains in Various Cultures of *Picocyanobacteria* from the Arabian Gulf: Promising Associations for Biodegradation of Marine Oil Pollution. *J. Mol.Microbial Physiology*. 26 : 261

[56] Gnagne. T and F. Brissaud.( 2002).Etude des limites de l'épuration par infiltration sur sable des eaux usées fortement chargées en matières oxydables de l'abattoir de Ougadougou au Burkina Faso. *Sud Sciences & Technologies.* 34-41.

[57] Nicoly D. S, Maurício .C. M, Bassin. J.P, Dias Brito.Y, Mahler,C.F Dresch Webler. A. (2021).treatment of a slaughterhouse wastewater by anoxic-aerobic biological reactors followed by uv-c disinfection and microalgae bioremediation. *Water environment research*. 93: 409-420.

[58] Vidal. J, Huiliñir. C and Salazar. R. (2016).Removal of organic matter contained in slaughterhouse wastewater using a combination of anaerobic digestion and solar photoelectro-Fenton processes, *Electrochimica Acta* . 210:163–170.

[59] Hoang.T. H.A, Shahsavari. E, Bott. N. J, Ball. A.S. (2021).Bioaugmentation of seafood processing wastewater enhances the removal of inorganic nitrogen and chemical oxygen demand,*Aquaculture*., 542**:** 736818

[60] Bouhaouss. A, Bensaoud. A, El Azzouzi. M, Perrin-Ganier, C., & Schiavon, M. (2001).Etude par spectroscopie ultraviolet et infrarouge de l'adsorption des pesticides par les apatites, *Phys, Chem. News.*1 /115-118.

[61] S. BAUP. Elimination des pesticides sur lit de charbon actif en grain en présence de matière organique naturelle : Elaboration d'un protocole couplant expériences et calculs numériques afin de simuler les équilibres et les cinétiques compétitifs d'adsorption, Thèse de doctorat de l'université de Poitiers, 2014.

[62] B. Yaacoubi, A. Bacaui, C. Dahdi, J. Bennouna, M. Ayele. (2010). Activated Carbon Production from Moroccan Olive Wastes- Influence of Some Factors .J. *Enviro. Tech.*19:1203-1212.

[63] M.A.M. Salleh, D.K. Mahmoud, W.A. Karim, A. Idris. (2011). Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: a comprehensive review. *J. Desalin. Water*. 280, 1- 13.

[64] Gendrault .S. Etude d'un traitement combiné bio-physico-chimique pour la décontamination des eaux polluées en atrazine, Thèse de doctorat, INSA de Lyon, France, 2004.

[65] BETTAYEB.A. Adsorption d'un herbicide (Métribuzine) sur différents matériaux poreux. Thèse de doctorat en matériaux et environnement .Université Mustapha STAMBOULI de Mascara.2020

[66] Brunet. M.J, Gourmand. F, Picot. R. Elimination des micropolluants organiques dans les eaux sous terraines par filtration sur charbon actif. Comparaison de l'efficacité de différent charbon, 12 ème *journées Information Eaux JIE96, Conférence n° 11,1996.*

[67] I. Langmuir. (1918).The constitution and Fundamentals properties of solids and liquid. *Jam.Chem, Soc*.40:1361

[68] H. Frendlich. (1906). Uber die adsorption in losungen.Zeitschrift fur physikalische *Chemie(Leipzig*).57: 385-470 .

[69] A.M.M. Essa Amany, M. Reyad, T.E.E. Radwan and W.M. Ibrahim .(2016).Biodegradation of the Organophosphorus Insecticide Diazinon by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Agricultural Drainage Ditches.*Egypt. J. Bot*. 56(1): 353-370.

[70] Hao. Z, Yubin. Z, Zhiguang .H, Xian .W, Henan. G, Fengjie .S and Hongyu .P.(2013). Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain *Bacillus sp. N1.Journal of Environmental Science and Health* . 49(2): 79-86.

[71] Brajesh. K, Sing. H.A.W, Alun. J. (2003).Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. *Appl. Environ., Microbiol.* 11: 7035–7043.

[72] Walworth. J, Braddock. J, Woolard. C. (2001).Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils. *Cold Regions Science and Technology*. 32 (2): 85-91.

[73] Fdil. F, Aaron. J.J, Oturan. N, Chaouch. A and Oturan. M.A. (2003). Photochemical degradation of chlorophenoxyalcanoic herbicides in aqueous media. *Revue des Sciences de l'Eau* (*France*).16:123-146.

[74] Vijayalakshmi. P and Usha. M. S. (2012). Optimization of chlorpyrifos degradation by *Pseudomonas putida*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(5): 2532-2539.

[75] Singh. B. K, Walker. A, Morgan. J. A. W and Wright. D. J. (2003). Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9): 5198-5206.

[76] Liu. Z. Y, Chen. X, Shi. Y and Su. Z. C. (2012). Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Advanced Materials Research*. 356: 676-680.

[77] Singh. M, Thomas .M.(1987) Surface active agents from microbes - Applications and advantages. *J Surf Sci Tech* 3: 55-62.

[78] Tan. H, Champion. J.T, Artiola .J.F, Brusseau .M.L, Miller. R.M. (1994) Complexadon of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ Sci Technol* 28: 2402-2406

# ANNEXE I

## Composition de différents milieux de culture

Différents milieux ont été sont préparés pour la culture des bactéries et pour la production du biosurfactant, leurs compositions sont indiquées comme suit :

- Le bouillon nutritif LB1 (Luria bertani) composé comme suit : peptone : 10g/l, extrait de levure : 5 g/l, NaCl : 23 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 7,0 ± 0,2 avec une solution de la soude caustique (NaOH, 1 mol/l).
- Milieu Minimum(MM)1: La composition d'un litre de ce milieu est comme suit-en (g/l) : $CaCl_2$(0.05)–NaCl (23) $MgCl_2$(0.33)- $NH_4Cl$(0.4)- $K_2HPO_4$(0.3) - $KH_2PO_4$(0.3)- $MgCl_2$(0.33)
- le milieu est supplémenté de 1ml d'une solution des éléments traces métalliques (mg/l) : $FeCl_2$, $4H_2O$(1500)- $ZnCl_2$(70)- $MnCl_2$,6H2O (100) - $H3BO_3$(6) - $CoCl_2$ , $6H_2O$(190) - $NaMoO_4$,$2H_2O$ (36) et HCl à 35% (6.7ml) . Le pH du milieu est ajusté à 7,0 ± 0,2 avec une solution de soude caustique (NaOH, 1M)
- Le bouillon nutritif LB2 composé de Extrait de carne : 3 g/l, Peptone de gélatine : 5 g/l
- Milieu Minimum(MSM) : Contient en g/l : ($Na_2HPO_4$ (2.2) ; $MgSO_4$, $7H_2O$ ; NaCl (0.05) ; $CaCl_2$ (0.02) ; $KH_2PO_4$ (1.4) ; $FeSO_4$, $H_2O$ (0.01) additionné d'un millilitre de la solution oligoélément dont la composition est la suivante :en mg/l $ZnSO_4$, $7H_2O$ (525); $MnSO_4$, $5H_2O$ (200); $NiSO_4$, $6H_2O$ (27); $COCl_2$, $6H_2O$ (200); $H_3BO_3$ (15)

Le milieu MSM a été préparé, autoclavé, inoculé par la souche et incubé, selon les différentes conditions de chaque expérience. L'incubation a été réalisée à 30°C

# ANNEXE II

**Demande chimique en oxygène (DCO) : ISO 606089**

**Principe**

Dans des conditions définies, certaines matières contenues dans l'eau sont oxydées par un excès de dichromate de potassium, en milieu acide et en présence de sulfate d'argent et de sulfate de mercure .l'excès de dichromate de potassium est dosé par le sulfate de Fer et d'Ammonium

**Réactifs :**

**I -Dichromate de Potassium : ( $K_2Cr_2O_7$) :**

($K_2Cr_2O_7$) = 0.040 mol/l contenant du sel de mercure.

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

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

- La solution est stable pendant au moins **1 mois.**

**II- Acide sulfurique – sulfate d'argent :** (Acide sulfurique à préparé)

Ajouter **10 g** de sulfate d'argent ($Ag_2SO_4$) à **35 ml** d'eau.

Ajouter par portions **965 ml** d'acide sulfurique pour ($f$ =1.84 g/l), la dissolution est favorisée par agitation, laisser reposer **1 ou 2 jours**.

- **Témoin : Hydrogenophtalate de potassium :**

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

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

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

**III- Sulfate de Fer et d'Ammonium :** Solution titrée

**C« $(NH_4)_2$ Fe $(SO_4)_2$ 6 $H_2O$ » = 0.12 mol/l.**

Dissoudre **4.7 g** de sulfate de Fer et d'Ammonium dans l'eau .Ajouter **2 ml** d'acide sulfurique pour

($f$ =1.84 g/l) refroidir et diluer avec de l'eau à **100 ml**.

**III – 1. Acide sulfurique dilué C ($(H_2SO_4)$ = 4 mol/l :**

Ajouter à environ **250ml** d'eau, par portion et avec précaution **110 ml** d'acide sulfurique pour ($f$ =1.84 g/l), laisser refroidir et diluer à **500 ml.**

**III- 2. Ferroine : Solution d'indicateur :**

-Dissoudre **0.35 g** de sulfate de Fer ($Fe\ SO_4\ 7\ H_2\ O$), on 0.5 g de sulfate de Fer et d'Ammonium hexahydrate $(NH_4)_2\ Fe\ (SO_4)_2 6\ H_2\ O$ dans de l'eau.

-Ajouter **0.75 g** de phénanthroline **1.10** monohydratée $C_{12}H_8N_2\ H_2\ O$, et agiter jusqu'à dissoudre. Diluer à **50 ml.**

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

**III-3. Remarque**

La solution sulfate de Fer et d'Ammonium doit être étalonnée chaque jour de la manière suivante :

-Diluer **10 ml** de la solution dichromate de potassium à environ **100 ml** avec de l'acide sulfurique **(4 mol/l).**

-Titrer avec la solution de sulfate de Fer et d'Ammonium. En présence de **3 gouttes** de la solution d'indicateur ferroine. La concentration en quantité de matière C1 exprimé en mol par litre de la solution de sulfate de Fer et d'Ammonium est donnée par la formule :

$$10 \textbf{ x } \textbf{0.04 x 6 / V = 2.4/V}$$

**V** : est le volume, en millilitres, de solution de sulfate de Fer et d'Ammonium consommé

**Mode Opératoire :**

Transvaser 10 ml de l'échantillon pour analyse, diluer si nécessaire dans un tube à DCO mètre (Toujours le volume total est de 10 ml)

- Mettre 10 ml d'eau distillé dans un tube à DCO mètre (c'est le blanc) (effectuer 2 essais à blanc).

- Mettre 10 ml d'hydrogenophtalate de potassium dans un tube à DCO mètre (c'est le témoin).
- Ajouter pour chaque tube 5 ml de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) et quelques billes en verre
- (régulateur d'ébullition) et agiter soigneusement.
- Ajouter lentement 15 ml d'acide sulfurique – sulfate d'argent sous hotte.
- Mettre le DCO mettre en marche à une température 150 C° pendant 120 minutes.
- Une fois les 120 min entame, éteindre le DCO mètre et laisser les tubes refroidir.
- Diluer le contenu de chaque tube dans une éprouvette de 100 ml à environ 75 ml.
- Mettre 1 à 2 gouttes de l'indicateur Ferroine, et titrer avec la solution sulfate de Fer et d'Ammonium (Sel de Mohr)

**Expression des Résultats :**

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

$$\mathbf{8000 \times C\ (V_1 - V_2) / V_0}$$

Où

C : est la concentration en quantité de matière, ex primée en moles par litre, de la solution de sulfate de Fer et d'Ammonium, calculée selon III – 3

$V_0$ : est le volume en millilitres, de la prise d'essai avant dilution (s'il ya lieu).

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

$V_2$ : est le volume en millilitres, de la solution de sulfate de Fer et d'Ammonium utilise pour l'échantillon.

8000 : est la masse molaire en milligrammes par litre de ½ $O_2$.

**Demande biologique en oxygène ($DBO_5$) :**

**Principe :**

La demande biologique en oxygène après **5 jours** ($DBO_5$) d'un échantillon est définit comme étant la quantité d'oxygène consommé par les microorganismes aérobies dans des conditions bien définit telle que la température **20 C°**, l'obscurité, l'agitation après une durée de **5 jours.**

-On peut estimer la valeur de la DBO à partir de la valeur de la DCO.

$DBO_5$ estimée (mg/l) = **80%** X DCO

D'après la valeur de la DBO estimée en mg/l on peut se refaire à un tableau de Gamme, qui nous indique le volume à prendre de notre échantillon ainsi que la valeur du facteur.

| **DBO estimée mg/l** | **Prise d'essai Ml** | **Facteur** | **DBO estimée mg/l** | **Prise d'essai ml** | **Facteur** |
|---|---|---|---|---|---|
| **0-40** | 432 | 1 | 0-400 | 164 | 10 |
| **0-80** | 365 | 2 | 0-800 | 97 | 20 |
| **0-200** | 250 | 5 | 0-2000 | 43.5 | 50 |

**Manipulation :**

- Dès que le volume de la prise d'essai est connue, on l'introduit dans la bouteille du DBO mètre
- Introduire un barreau magnétique dedans.
- Placer la capsule qui va contenir 2 postilles de NaOH pour capter le CO2.
- Fermer avec l'oxitope et régler à zéro.
- Mettre une étiquette sur chaque bouteille contenant la date du prélèvement et d'analyse, ainsi que l'identification de l'échantillon.
- Mettre le DBO mètre en marche pendant 5 jours.

**Dosage De Nitrates ($NO_3^-$) : ISO 7890-3**

**Principe :**

Mesurage spectrométrique du composé jaune issu de la réaction des nitrates avec l'acide sulfosalicylique. (Formé par addition à l'échantillon de salicylate de sodium et d'acide sulfurique après traitement à l'alcali.

**Réactifs**

- Acide sulfurique $H_2\ SO_4$ = 1.84 g/ml.
- Acide acétique $CH_3$ COO H *f* = 1.05 g / ml.
- Alcali : Na OH *f* = 200 g/l

*f* ( $CH_2$ –N( $CH_2$ COOH ) $CH_2$ - COO Na ) $_2$ 2 $H_2O$ = 50 g/l.

❖ **Préparation de l'Alcali : NaOH *f* = 200 g/l**

***f* ( $CH_2$ –N( $CH_2$ COOH ) $CH_2$ - COO Na ) $_2$ 2 $H_2O$ = 50 g/l.**

- Dissoudre avec précaution **200 g** de postilles d'hydroxyde de sodium dans environ **800 ml** d'eau.

- Ajouter **50 g** de sel disodique de l'acide éthylène diamine tetraacetique ( $Na_2$ EDTA) dihydraté

(CH2 –N (CH2 COOH) $CH_2$ - COO Na) $_2$ 2 $H_2O$ et dissoudre

- Laisser refroidir à la Température ambiante et compléter à **1 litre** avec de l'eau.
- Conserver dans une bouteille en polyéthylène.
- Ce réactif est stable indéfiniment.

❖ **Azoture de sodium : C $NaN_3$ = 0.5 g/l**

- Dissoudre avec précaution **0.05 g** d'azoture de sodium dans environ **90 ml** d'eau puis compléter à **100 ml** avec de l'eau.

- Conserver dans une bouteille en verre.

- Ce réactif est stable indéfiniment.

❖ **Salicylate de sodium :** *f* HO –$C_6H_4$ – COONa = 10 g/l

- Dissoudre **1 g** de salicylate de sodium dans **100 ml** d'eau.
- Conserver dans une bouteille en verre ou en polyéthylène.
- Préparer cette solution chaque jour au moment de l'emploi.

❖ **Nitrate, solution mère $f_N$ = 1000 mg/l :**

- Dissoudre **7,215 g** de nitrate de potassium (KNO3).
  Préalablement séchée à **105 °C** pendant au moins **2 heures** dans environ **750 ml** d'eau.

- Transvaser dans une fiole jaugée de **1 litre** et compléter avec de l'eau.
- Conserver la solution dans une bouteille en verre pendant une durée ne dépassant pas **2 mois.**

❖ **Nitrate, solution étalon $f_N$ = 100 mg/l**

- Transvaser à la pipette **50 ml** de la solution mère à **1000 mg/l** dans une fiole jaugée de **500 ml**, et compléter au volume avec de l'eau.
- Conserver dans une bouteille en verre pendant une durée ne dépassant pas **1 mois.**

❖ **Nitrate, solution étalon $f_N$ = 1 mg/l**

Dans une fiole jaugée de **500ml**, ajouter à la pipette **5 ml** de la solution étalon à **100 mg/l**

- Complete au volume avec de l'eau
- Préparer la solution au moment de l'emploi.

**Appareillage :**

- Etuve
- Bain marie
- Spectrophotomètre

**Mode Opératoire :**

Prendre un volume maximal de **25 ml** de l'échantillon à analyser, (diluer si nécessaire) dans un bécher.

- Ajouter **0.5 ml** d'Azoture de sodium
- Ajouter **0.2 ml** d'Acide acétique.
- Evaporer à **75 – 88 C°**

Après séchage, refroidissement

- Ajouter **1 ml** salicylate de sodium.
- Evaporer à nouveau à **75 – 88 C°**. Séchage et refroidissement.
- Ajouter **1 ml** d'Acide sulfurique.
- Laisser reposer environ **10 min.**
- Ensuite, ajouter **10 ml** d'eau distillé
- Ajouter **10 ml** de la solution d'Alali.
- Transvaser le contenu du bécher dans une fiole jaugée de **25 ml** sans compléter.
- Placer la fiole dans le bain d'eau à **25 C°** pendant **10 min.**
- Retirer la fiole et compléter au volume avec de l'eau.
- Lire au spectrophotomètre à une longueur d'onde **λ= 415 nm**.

**La Gamme :**

| | Blanc | I | II | III | IV | V |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Solution étalon 1 mg/l** | 0 | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 4 ml | 5 ml |
| **Azoture de sodium** | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml |
| **Acide acétique** | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml |

- Evaporer à 75 – 88 C°
- Ajouter après séchage et refroidissement

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Salicylate de Na** | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

- Evaporer à 75 – 88 C°
- Ajouter après séchage et refroidissement.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Acide sulfurique $H_2SO_4$** | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

- Attendre 10 min et rajouter :

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Eau distillé** | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml |
| **Solution Alcali** | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml |

**Expression des Résultats :**

Le résultat est donnée directement en **mg/l en N-$NO_3$** pour la conservation en **$NO_3$** multiplier le résultat par **4.43.**

**Dosage des orthophosphates : ISO 6878 / 1 – 1986**

**Principe :**

- Réaction des ions ortophosphate avec une solution acide contenant des ions de molybdate et d'antimoine pour former un complexe d'antimonyl- phosphomolybdate.
- Réduction du complexe par l'acide ascorbique pour former un complexe de molybdène fortement coloré en bleu.

**Réactifs :**

❖ **Acide sulfurique**: C( $H_2$ $SO_4$) = 9 mol /l

Introduire 500 ml d'eau dans un bécher de 1 l. Ajouter avec précaution sous agitation continue, 500 ml d'acide sulfurique (*f* = 1.84 g/ml).

❖ **Acide sulfurique:** C ($H_2$ $SO_4$) = 4.5 mol/l.

Introduire **500 ml** d'eau dans un bécher de 1 l .Ajouter avec précaution sous agitation continue **500 ml** d'acide sulfurique 9 mol / l et bien mélanger.

❖ **Acide ascorbique** : 100 g/l

- Dissoudre **10 g** d'acide ascorbique (C6 $H_8$ $O_6$) dans **100 ml** d'eau.
- Conserver dans une bouteille en verre foncé au réfrigérateur.
- Stabilité = **2 semaines** et il peut être utilise tant qu'aucune coloration n'apparait.

❖ **Molybdate acide, solution I :**

- (a) Dissoudre **13 g** d'heptomolybdate d'ammonium tetrahydraté $(NH4)_6NO_7O_{24}4H_2O$ dans **100 ml** d'eau
- (b)Dissoudre **0.35 g** de tartrate de potassium et d'antimoine hemihydraté K ( sbO $C_4$ $H_4O_6$ ½ $H_2O$ dans **100ml** d'eau.
- Ajouter, tout en agitant la solution de molybdate (a) à **300 ml** de la solution d'acide sulfurique 9 mol / l.
- Ajouter la solution de tartrate (b) et bien mélanger
- Stabilité au moins **2 mois.**

❖ **Solution mère 50 mg/l**

- sécher quelques grammes de K $H_2PO_4$ jusqu'à masse constante à **105 C°.**
- Dissoudre **0.2197 g** de K $H_2PO_4$ dans **800 ml** $H_2O$.
- Ajouter **10 m**l $H_2SO_4$ 4.5 MOL/L et compléter avec de $H_2O$ jusqu'à **1000 ml.**

Conserver dans un flacon en verre au réfrigérateur, elle est stable au moins **1 semaine.**

❖ **Solution fille 2 mg/l**

- Ajouter à la pipette **4 ml** de la solution mère dans une fiole jaugée de **100 ml.**
- Compléter au volume avec de l'eau.
- Préparer cette solution le jour de l'emploi.

**Appareillage :**

- Spectrophotomètre.

**Mode Opératoire :**

- Le volume maximum de la prise d'essai est de **40 ml** (diluer si nécessaire), le dosage de concentration d'ortophosphate allant jusqu'à $f$ = 0.8 mg/l
- Ajouter **1 ml** d'acide ascorbique et agiter.
- Ensuite ajouter **2 ml** de molybdate acide, agiter.
- Compléter à **50 ml** avec de l'eau dans des fioles jaugées de **50 ml.**
- Laisser le temps de réaction **30 minutes.**
- L'Apparition d'une coloration bleu indique la présence des $PO_4^{-3}$ .Faire la lecture des échantillons à une **$\lambda$ = 880 nm.**

**La Gamme :**

| **Fioles** | **T** | **I** | **II** | **III** | **IV** | **V** | **VI** | **VII** | **VIII** | **IX** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Solution fille 20 mg/l** | 0 | 1 | 2 | 3 | 8 | 10 | 13 | 15 | 18 | 20 |
| **$H_2O$** | 40 | 39 | 38 | 37 | 32 | 30 | 27 | 25 | 22 | 20 |
| ***f* $PO_4$ mg/l** | 0 | 0.04 | 0.08 | 0.12 | 0.32 | 0.4 | 0.52 | 0.6 | 0.72 | 0.8 |
| **Acide ascorbique** | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| **Sol molybdate acide** | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |

**Expression des Résultats :**

Les résultats sont donné directement en **P-$PO_4^{-3}$**, pour les convertir en **$PO_4^{-3}$** multiplier le résultat par **3.06.**

**Détermination de l'azote ammoniacal ($NH^+_4$) : ISO 7150/1984**

**Principe :**

Mesurage spectrométrique du composé Bleu formé par réaction de l'ammonium avec les ions salicypochlorite en présence de nitroprussiate de sodium.

**Domaine d'application** :

Cette méthode est applicable aussi bien aux eaux potables, qu'aux eaux brutes, elle nécessité une dilution pour les eaux salées et colorées.

**Appareillages :**

UV visible spectrophotométrie.

Mesure l'absorbance dans la région UV sensible a **λ** =655 nm.

**Réactifs :**

- L'eau distillée
- Réactif coloré
- Dichloroisocynurate

**Mode opératoire :**

- Prendre 40ml d'eau à analyser.
- Ajouter 4ml de réactif coloré.
- Ajouter 4ml de sel dichlo-roisocynurate de sodium.
- Compléter jusqu'au 50ml d'eau distillé.
- Attendre une heure et demie (1h30).
- L'apparition de la couleur vert montre la présence des $NH_4^+$ dans l'échantillon.
- Effectuer la lecture à 665 nm.

**Expression des résultats :**

La valeur de la concentration en $NH^+_4$ s'exprime suit :

$NH_4^+$ =la valeur lue sur l'appareille x le facteur de dilution x 1.29 (mg /l).