

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



# Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER EN GENIE DES PROCEDES**

**Spécialité** : Procédés de Traitement des Effluents et Protection de  
l'Environnement

Contribution à l'étude de la toxicité de  
biosurfactants produits par une souche  
bactérienne hydrocarbonoclastes et des  
hydrocarbures pétroliers sur un organisme  
marin : Artémia

Présenté par :

M'KEMMECHE Imene

OUAD Noura

Encadreur :

Prof. BADIS Abdelmalek

Co-encadreur :

M. ZENATI Billal, CNRDPA

## REMERCIEMENTS

Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail.

Nous remercions spécialement notre encadreur **Prof. Badis A**, Professeur à l'Université Blida 1, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux patience qui ont donné vie à ce travail. Nous sommes très reconnaissants de tout ce qu'il nous a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel.

Nous remercions spécialement notre Co-encadreur **M.ZENATI B**, attaché de recherche au Centre National de Développement de la Pêche et de L'aquaculture (**CNRDPA**) pour l'aide compétence qu'il nous a apportée, pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes section de notre mémoire; merci profondément pour le temps consacré, nous le remercions vivement.

Nous remercions, vivement et profondément les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nous remercions tout particulièrement **Dr. MESBAIAH F**, Maître de recherche au CNRDPA pour nous avoir aidés dans la recherche bibliographique ainsi pour l'obtention d'accessoire très utile pour l'avancement de mémoire. Ou encore **M. BOUDJAMAA K** nous a aussi encouragés par de nombreuses discussions.

Nous remercions le directeur du CNRDPA **M. ANNANE R.** de nous ouvrir les portes de cet établissement et nous donner l'opportunité de vivre une expérience aussi enrichissante tous sur le plan humain que professionnel. Plus spécialement, nous remercions **M. CHIBANE N.**, Ingénieur en aquaculture pour l'aide technique qu'il nous a offert ainsi que **M. GUENACHI B.**, Chercheur en aquaculture pour l'approvisionnement des cystes d'Artémia. Que **Melle. BOUNAKOUSN.**, **Mme. BOUAREB F.**, **Melle CHIBET ED DISS C.**, **M. MEKNACHI A.**, et **Mme. KORD A.**, trouvent ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Un grand merci à nos professeurs du département **Génie des Procédés** de l'Université Blida 1 pour leur aide et leur encouragement.

D'autres personnes nous ont encouragés à finir ce travail par des gestes d'amitié dont nous sommes reconnaissants. A titre d'exemple, nous citerons **M. LEUTRACHE H**, **Mme. BELKACEMIL.**

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.

# DEDICACES

Aux êtres les plus précieux au monde, qui sont le secret de mon existence, qui m'a donnée leur amour, leur tendresse et soutien ; ce mémoire est le fruit de leur seule patience : Maman et Papa

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents ; mère et père vous êtes mon repère dans cette vie, sans votre présence je ne serais jamais arrivé la ; j'espère que je serai toujours à la hauteur de vos aspirations.*

*A mes très chères sœur ; Manal et sa famille et Mouchira*

*A mes chère frère ; Abd el Kader*

*A tous ma famille; tantes, oncle, cousins et cousine, que ce soient maternelles ou paternelles, surtout Ichrak*

*A mon binôme ; Noura et sa famille*

*A mes amis ; Asma et sa famille qui m'a donné le soutien et l'encouragement, Houda et Chahra, Hichem et Rahim*

*A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé les meilleurs moments de mes études*

*A toute la promotion PTEPE 2016*

*A toutes et tous que j'aime et qui m'aiment*

*M. kemmeche Imene*

## **DEDICACE**

*A Ma Chère Mère, les mots me manquent pour exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour mon bon heur et ma réussite. Pour ton grand amour, ta tendresse et tes longues prières qui m'on été la meilleure gage de réussite, je t'offre ce travail*

*A Mon très Cher Père, il est très difficile de choisir les termes adéquats pour t'exprimer mon amour et mon respect. Que Dieu te garde en bonne santé pour toute la famille. Mes chers parents je n'oublie jamais vos sacrifices. Ce travaille n'est que le fruit de votre soutien, de votre encouragement, de vos prières, de votre amour profond. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorde-le bonheur, la santé, longue vie et bonheur.*

***Ames chers frères Belkessam, Farid, Nour-adine, Toufik***

***A mes adorables sœurs Rokia, samya, Farida***

*Je vous exprime à travers ce travaille mes sentiments de fraternité et d'amour. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

***A mon cher grand père. Que Dieu te protège et te laisse pour nous.***

*A ma chère binôme Imene qui était toujours à mes cotés et n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Jamais des simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements ma très chère amie.*

*A tous mes amis surtout Samira, Safa, Dalel, Asma, Amdjad, Fadhila, Ahlem, Ibtisam , je considère comme sœurs. Je vous remercie de votre patience, vous m'avez aidé toujours à avancer, merci d'être toujours prés de moi, et Chahra, Ismail, Mbarak et Abderazak.*

***A tous ma famille, mes cousins et mes cousines surtout Hocine***

***A tous mes ami(e)s de la promotion.***

***A tous les personnes de city 04 que ce soit des étudiantes ou des agents et travailleurs merci de votre gentillesse pendant mon cursus universitaire.***

*Je termine sans oublier une personne quia joué un rôle important les dernier temps dans ma vie. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi jusqu'à maintenant, je te dis bonne chance dans ta vie qu'Allah t'accorde-le bonheur, la santé, la réussite, le succès, et l'amour.*

*Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études. J'espère  
que j'étais à la Hauteur de ce que vous attendez de MOI.*

*Noura Ouad*

## الملخص

في هذا العمل قمنا بدراسة سمية مفاعلات سطحية بيولوجية منتجة من طرف سلالة بكتيرية بحرية نفطية  
: رتيميا. السطحية البيولوجية في وسطين مختلفين: (Luria Bertani)  
مع زيت الفلي . النتائج المتحصل عليها خلال عملية  
البيولوجي تركيز 3.65 / بعد استخراجه بالأسيتات اثيل. دراسات التسمم الايكولوجي أجريت يرقات  
الثاني يميا فرونسيكانا. تحت لفظ التركيز المميت المتوسط 24  
التركيز المميت المتوسط (Sodium Dodécyl Sulfate) SDS  
بين 13.3 19.9 / يبين صحة الاختبارات. من جهة أخرى، أثبتت النتائج أن  
السطحي البيولوجي غير سامة (929.34) / 80633 /  
(. التركيز المميت المتوسط للنفط الخام الاليفاتي هي 30.59 /  
499.70 / 50.93 .

## الكلمات المفتاحية :

ا - بكتيريا البحرية - يميا فرونسيكانا - سمية .

## ABSTRACT

The toxicity assessment of biosurfactants produced by marine bacterial strain as well as petroleum products on a crustacean organism: *Artemia* was studied. The biosurfactants were produced in two different mediums with frying oil as inductive carbon source: a rich medium LB (Luria Bertani) and minimum medium MM. The results obtained for the production of biosurfactant give a concentration of 3.65 g/l after its extraction by the ethyl acetate. The ecotoxicological study has been conducted with nauplii of the second in star of *Artemia franciscana* specie. The results were expressed as the median lethal concentration after 24 hours of exposure (LC<sub>50</sub>-24 hr). The LC<sub>50</sub> of anionic surfactant SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) used as reference toxicant is ranged between 13.3 and 19.9 mg/l, indicates test validity. The biosurfactants produced in rich medium and minimum medium are considered to be non-toxic (LC<sub>50</sub> of 929.34 mg/l and LC<sub>50</sub>=8063.3 mg/l respectively). The LC<sub>50</sub> of crude oil, aliphatic fraction and the aromatic fraction are respectively 30.59 mg/l, 499.70 mg/l and 50.93. The three products are considered to be toxic for *Artemia* nauplii.

## Keywords:

Biosurfactant, marine bacterium, production, *Artemia franciscana*, ecotoxicity, bioassay, crude oil.

## **RESUME**

Dans le présent travail, nous avons étudié la toxicité des biosurfactants produits par une souche bactérienne marine ainsi que des produits pétroliers sur un organisme crustacé : Artémia. Les biosurfactants ont été produits dans deux milieux différents avec l'huile de friture comme source d'inductrice de carbone ; un milieu riche LB (Luria Bertani) et un milieu minimum MM. Les résultats obtenus pour la production du biosurfactant donnent une concentration de 3.65 g/l après son extraction par l'acétate d'éthyle. Les études d'écotoxicologie ont été menées sur des nauplius de deuxième stade d'une espèce d'*A. franciscana*. Le résultat est donné sous le terme de la concentration létale médiane CL50 après 24 heures d'exposition. La CL50 du surfactant anionique SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) utilisé comme toxique de référence est entre 13,3 et 19,9 mg/l, indique ainsi la validité des tests. Les biosurfactants produits sur milieu riche et minimum sont considérés comme étant non toxique (CL50 de 929, 34 mg/l et CL50=8063,3 mg/l respectivement). La CL50 du pétrole brut, la fraction aliphatique et la fraction aromatique sont respectivement 30,59 mg/l ; 499,70 mg/l et 50,93. Les trois produits sont considérés comme toxique.

### **Mots clé :**

Biosurfactant, bactérie marine, production, *Artémia Franciscana*, tests d'écotoxicités, pétrole brut.

## TABE DES MATAIRES

**REMERCIEMENTS**

**RESUME**

**LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

**LISTE DES ABREVIATIONS**

**INTRODUCTION GENERALE ..... 1**

## PARTIE THEORIQUE

### CHAPITRE 1:SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1.1 SURFACTANTS (TENSIOACTIFS) .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Définition. ....	3
1.1.2 Classification des surfactants .....	5
1.1.2.1 Classification basée sur la nature de la tête polaire (hydrophile) .....	5
1.1.2.2 Classification basée sur la nature de la chaîne hydrophobe.....	7
1.1.2.3 Les surfactants naturels.....	7
1.1.3 Propriétés des surfactants.....	8
1.1.3.1 Propriétés fondamentales .....	8
1.1.3.2 Propriétés pratiques.....	9
1.1.4 Domaines d'applications des surfactants .....	9
1.1.5 Origine et impact des surfactants dans le milieu marin .....	12
1.1.6 Toxicité des surfactants .....	13
<b>1.2 BIOSURFACTANTS.....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Définition .....	15
1.2.2 Classification des biosurfactants.....	15

1.2.2.1 Selon le poids moléculaire .....	16
1.2.2.2 Selon la nature biochimique .....	16
1.2.3 Microorganismes producteurs de biosurfactants .....	17
1.2.4 Production des biosurfactants .....	18
1.2.5 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance .....	19
1.2.6 Avantage des biosurfactants .....	19
<b>1.3 TESTS D'ECOTOXICITES .....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Généralité .....	20
1.3.1.1 Règles générales à respecter .....	20
1.3.1.2 paramètre d'évaluation .....	21
1.3.1.3 Type des tests.....	21
1.3.1.4 Méthodes de détermination de la DL <sub>50</sub> et la CL <sub>50</sub> .....	22
1.3.2 Organismes aquatiques testés .....	24
<b>1.4 ARTEMIA EN ECOTOXICITE.....</b>	<b>26</b>
1.4.1 Définition .....	26
1.4.2 Taxonomie .....	26
1.4.3 Biologie.....	27
1.4.3.1 Morphologie .....	27
1.4.3.2 Cycle de vie .....	28
1.4.4. Écologie et répartition .....	29
1.4.5. Sensibilité de l'artémia aux toxiques .....	30
1.4.6 Les avantage d'Artémia.....	30

---

PARTIE EXPERIMENTALE

---

CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES

<b>2.1 PRODUCTION DE BIOSURFACTANT .....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Origine de la souche bactérienne SdK644.....	31

2.1.2 Repiquage et conservation de la souche .....	32
2.1.3 Production du biosurfactant .....	33
2.1.4 Extraction et purification de biosurfactant.....	34
<b>2.2 TESTS DE TOXICITE SUR L'ARTEMIA .....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Elevage de l'artemia .....	35
2.2.2 Déroulement de l'essai .....	37
2.2.3 Matériels testés .....	37
2.2.4 visualisation microscopique de l'effet des toxiques sur la morphologie de l'artemia.....	.39
2.2.5Détermination de la CL50 et traitement statistique des resultats .....	39

### **CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>3.1 PRODUCTION DE BIOSURFACTANT .....</b>	<b>40</b>
3.1.1Production de biosurfactants dans les milieux MM et LB.....	40
3.1.2Extraction et purification partielle de biosurfactant .....	42
<b>3.2 ÉTUDE ECOTOXICOLOGIQUE SUR L'ARTEMIA .....</b>	<b>46</b>
3.2.1 Suivi de l'éclosion des cystes et développement des nauplius .....	46
3.2.2 Choix de nauplius .....	47
3.2.3 Étude de la toxicité .....	47
3.2.3.1 Qualité physico-chimique de l'eau de mer .....	47
3.2.3.2 Toxicité de surfactant chimique (SDS) sur l'Artémia et validité des essais.....	47
3.2.3.3 Toxicité de Tween 80 sur l'Artémia .....	49
3.2.3.4 Toxicité du biosurfactant HF644 produit dans le milieu riche .....	50
3.2.3.5 Toxicité du biosurfactants HF644 produit dans le milieu minimum .....	51
3.2.3.6 Toxicité du Surnageant LB .....	54
3.2.3.7 Toxicité du Surnageant MM .....	54
3.2.3.8 Toxicité de la culture fraiche .....	55

3.2.3.9 Toxicité de pétrole brut.....	57
3.2.3.10 Toxicité de la fraction aliphatique .....	58
3.2.3.11 Toxicité de la fraction aromatique .....	59
3.2.4 Effet des toxiques sur la morphologie de l' Artémia .....	60
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>63</b>

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **APPENDICES**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b>	Structure schématique d'un surfactant	3
<b>Figure 1.2</b>	Exemple de surfactant anionique : Dodécyl sulfate de sodium (SDS)	5
<b>Figure 1.3</b>	Exemple de surfactant cationique : Bromure de cetyl triméthyl ammonium (CTAB)	6
<b>Figure 1.4</b>	Exemple de surfactant non anionique : Polyoxyethylene(20) Sorbitanmonooleae (Tween 80).	6
<b>Figure 1.5</b>	Exemple de surfactants naturels à base de polyols	8
<b>Figure 1.6</b>	<i>A. franciscana</i> sous microscope	27
<b>Figure 1.7</b>	Cycle de vie de <i>A. franciscana</i>	28
<b>Figure 1.8</b>	Répartition d'Artémia dans le monde	29
<b>Figure 2.1</b>	Photos montrant l'échantillonnage d'un sédiment marin pollué par les hydrocarbures	31
<b>Figure 2.2</b>	Cystes de l'artémia prêts à utiliser	35
<b>Figure 2.3</b>	Montage d'éclosion et préparation des nauplius	36
<b>Figure 3.1</b>	Production de biosurfactant par la souche SdK644 dans le milieu MM	40
<b>Figure 3.2</b>	Production de biosurfactant par la souche SdK644 dans le milieu LB	41
<b>Figure 3.3</b>	Déplacment de pétrole suite à l'application des biosurfactants bruts HF644-MM et HF644-LB par rapport au témoin de l'eau distillée.	41
<b>Figure 3.4</b>	Précipitation acide de surnageant MM après une nuit de réfrigération à 4°C	42
<b>Figure 3.5</b>	Précipité récupéré	43
<b>Figure 3.6</b>	Déplacement de pétrole de surnageant de culture	43
<b>Figure 3.7</b>	Purification partielle du biosurfactant HF644	43
<b>Figure 3.8</b>	Étapes d'éclosion des cystes d'Artémia observées au grossissement GX10. (a) Cystes d'Artémia, (b) prés-nauplii (sades1),(c) prés-nauplii (stade2), (d) nauplii fraîchement éclos (stade1), (e)nauplii stade 2.	46
<b>Figure 3.9</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius d' <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de biosurfactant HF644-LB	51
<b>Figure 3.10</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de biosurfactant HF644-MM	52
<b>Figure 3.11</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de surnageant LB	54
<b>Figure 3.12</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de surnageant MM	55
<b>Figure 3.13</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de culture fraîche	56
<b>Figure 3.14</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de pétrole brut	57
<b>Figure 3.15</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de fraction aliphatique	58
<b>Figure 3.16</b>	Evaluation de la mortalité des nauplius de <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de fraction aromatique	59

**Figure 3.17** Visualisation microscopique de l'effet des toxiques sur la morphologie de l'artémia. (a)Témoin vivant, (a') Témoin mort, b) SDS mort (c)Tween 80 vivant, (d) HF644 vivant, (d') HF644mort.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b>	Types de surfactants selon leur structure	4
<b>Tableau 1.2</b>	Exemples d'applications des surfactants dans le secteur industriel	10
<b>Tableau 1.3</b>	Récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications	11
<b>Tableau 1.4</b>	Principaux types de surfactants biologiques	18
<b>Tableau 1.5</b>	Tests d'écotoxicité en l'eau marine	24
<b>Tableau 3.1</b>	Concentrations létales médianes du SDS sur l'Artémia	47
<b>Tableau 3.2</b>	Effet de tween80 sur l'Artémia	49
<b>Tableau 3.3</b>	Résultats comparatifs entre les essais réels et fictifs	53

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

<b>C</b>	Carbone
<b>N</b>	Azote
<b>APG</b>	Alkyl poly glucosides
<b>OE</b>	unité oxyde d'éthylène
<b>CMC</b>	Concentration micellaire critique
<b>LAS</b>	sulfonâtes d'alkyl benzène linéaire
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose létale médiane
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentration létale
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>MM</b>	Milieu minimum
<b>LB</b>	Milieu Luria Bertani
<b>DCM</b>	Diclorométhane
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>h</b>	heure
<b>v</b>	volume
<b>m</b>	masse
<b>DMSO</b>	diméthyle Sulfoxyde
<b>SDS</b>	Sodium Dodecylsulfate
<b>MM</b>	Milieu minimum
<b>t</b>	temps
<b>HF</b>	Huile de friture
<b>HF644</b>	Biosurfactant produit par la souche SdK644
<b>CI</b>	Concentration inhibitrice
<b>CMD</b>	concentration micellaire diluée
<b>CMD1</b>	concentration micellaire diluée mère (c.-à-d. 100 %)
<b>CMD10</b>	concentration mère à une dilution dix (10) fois
<b>CMD100</b>	concentration mère à une dilution cent (100) fois

## INTRODUCTION GENERALE

Les tensioactifs sont des composés organiques très utilisés dans de nombreuses industries (textiles, cuir, métallurgie, industrie pétrolière, industrie pétrochimie, etc.) et rentrent dans les produits de consommation courante tels que les détergents, les produits cosmétiques, les produits agroalimentaires, les produits pharmaceutiques. Ils sont ainsi utilisés dans le domaine environnemental, tel que la remédiation des sites contaminés par les hydrocarbures (essentiellement comme étant des dispersants et produits de lavages) [1].

La plupart des surfactants disponibles sur le marché sont d'origine chimique. Ils présentent un risque pour la santé humaine et l'environnement à cause de leur toxicité et leur faible degré de biodégradation [2]. De ce fait, les recherches scientifiques s'orientent vers des surfactants d'origine biologiques ou biosurfactants ; ces derniers possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou peu toxiques et sont également efficaces dans des conditions extrêmes (températures, pH et salinité) [3]. Ils sont produits essentiellement par les microorganismes (bactéries, champignons, levures).

La connaissance de la toxicité de n'importe quel produit avant sa mise en contact dans tel traitement de remédiation est nécessaire afin d'évaluer le risque sur l'écosystème en question. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des biosurfactants vis-à-vis des espèces représentatives des sites étudiés [4, 5, 6].

L'artémia est un organisme crustacé représentatif des espèces aquatique marine et l'un des organismes d'essai les plus précieuses disponibles pour des essais d'écotoxicité [7].

Bien qu'elle se trouve dans les milieux aquatiques hyper salins, son absence dans milieu marin est traduite par l'existence des prédateurs [8].

Notre travail s'intéresse à l'étude de la toxicité d'agents de remédiation des hydrocarbures en eau de mer sur l'Artémia ainsi que la toxicité de ses hydrocarbures. Les agents de remédiation testés sont le pétrole et ses fractions majoritaires.

La présente étude s'organise en trois chapitres. Le premier est une partie théorique où nous exposons les données relatives à la description des surfactants et des biosurfactants (classification, propriétés et avantages) et des notions générales sur les testes d'écotoxicités et particulières sur l'artémia. Dans le second chapitre, nous définissons la méthodologie adoptée pour la réalisation de différentes expérimentations.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus concernant :

- La production de biosurfactant synthétisé par la souche bactérienne.
- L'application du biosurfactant de notre souche bactérienne SdK644 dans les testes d'écotoxicité sur *A. franciscana*, ainsi que les surfactants chimiques (SDS, Tween 80), pétrole brute et ses fraction majoritaires.

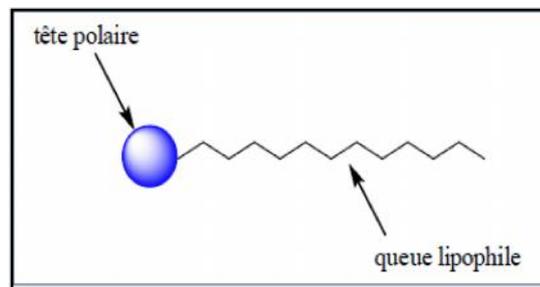
Enfin, une conclusion générale met en valeur l'ensemble des résultats obtenus.

# CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1 SURFACTANTS (TENSIOACTIFS)

### 1.1.1 Définition

Un surfactant ou agent de surface est un composé qui a tendance à s'agréger à l'interface, plutôt que dans le volume de la solution, lorsqu'il est mélangé à un solvant polaire ou apolaire. Cette propriété tient au fait que les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile et apolaire, l'autre hydrophile (miscible dans l'eau) et polaire (voir la figure 1.1) [9].



**Figure 1.1 : Structure schématique d'un surfactant.**

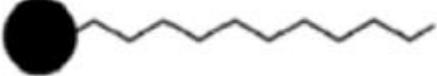
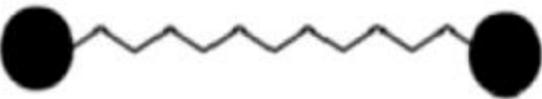
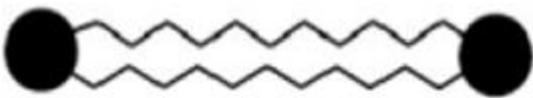
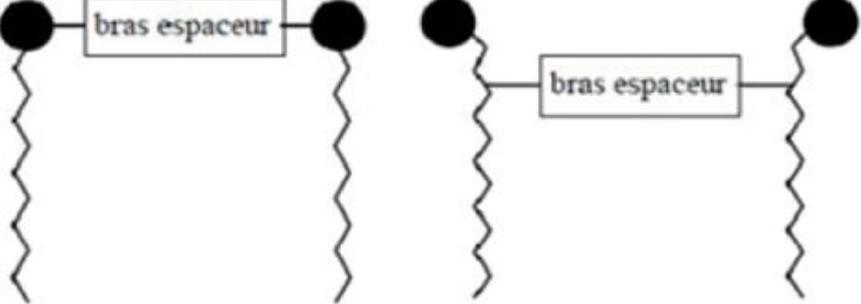
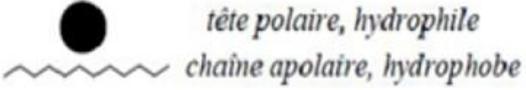
Leur structure particulière permet aux agents de surface de se concentrer :

- Aux interfaces liquides-liquides à cause de l'amphiphilie qui les caractérise. Chaque groupement se dirige vers le liquide pour lequel il a le plus d'affinité.
- Aux interfaces liquide-gaz et liquide-solide, le liquide repoussant vers l'extérieur les groupements qui ont une affinité opposée.

Dans la littérature, on rencontre diverses structures de tensioactifs, variant notamment selon la nature de la partie hydrophile qui peut être cationique, anionique, amphotère (zwitterionique), non ionique. La partie hydrophobe, quant elle, est le plus souvent sous forme d'une chaîne aliphatique de longueur variable, soit ramifiée ou non [10].

On peut diviser les surfactants en plusieurs catégories en fonction de leur structure (nombre et disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes au sein de la molécule). La structure la plus courante nommée surfactant monocaténaire est celle comportant une tête hydrophile et une chaîne hydrophobe. On rencontre des surfactants possédant plusieurs chaînes hydrophobes greffées sur la même tête hydrophile (surfactant bicaténaires et tricaténaires), mais aussi plusieurs têtes hydrophiles reliées à une ou plusieurs chaînes hydrophobes appelés surfactants bolaformes ou géminés (Tableau 1.1)[10].

**Tableau 1.1 : Types de surfactants selon leur structure.**

Structure du surfactant	Nom
	Monocaténaire
	Bicaténaire
	Tricaténaire
	Bolaforme simple
	Bolaforme double chaîne
	Géminés
	Légende

### 1.1.2 Classification des surfactants

Il existe différentes classifications possibles des surfactants (tensioactifs). Ils peuvent être classés en fonction :

- De la nature de leur tête polaire (cationique, anionique, amphotère (zwitterionique), non ionique (Tableau 1.2).
- de la longueur de la partie lipophile qui permet de classer les surfactants en agents mouillants (C8-C10), détergent (C12-C16), émulsionnants ou adoucissants (C18-C22).
- de leur origine, naturelle ou synthétique.

#### 1.1.2.1 Classifications basées sur la nature de la tête polaire (hydrophile)

- *Surfactants anioniques*

Les surfactants anioniques sont les premiers à avoir été synthétisés et les plus utilisés dans le monde. Ce sont des molécules qui donnent des anions organiques dans l'eau (un groupement acide déprotoné qui peut être carboxylate, sulfate, sulfonate...etc.) associés à des cations (généralement un métal alcalin). Ils constituent de très bons agents moussants et détergents [9].

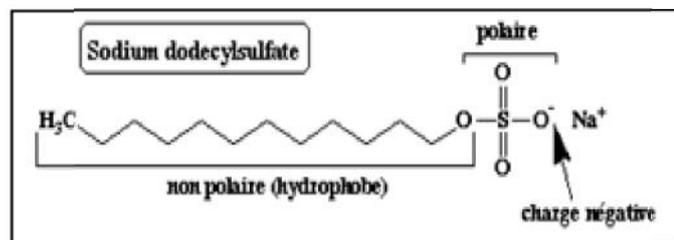
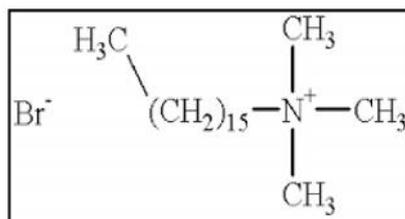


Figure 1.2 : Exemple de surfactant anionique : Dodécyl sulfate de sodium (SDS).

- *Surfactants cationiques*

Les surfactants cationiques portent une charge positive sur la partie polaire, le plus souvent un ammonium [9].



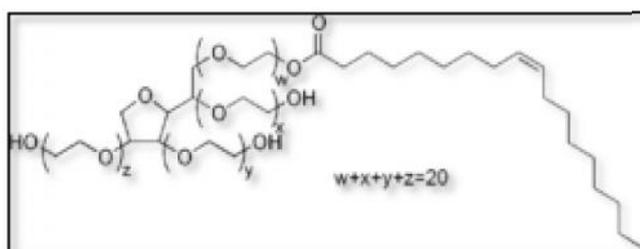
**Figure 1.3 : Exemple de surfactant cationique : Bromure de cetyl triméthyl ammonium (CTAB).**

- *Surfactants amphotères*

Les surfactants amphotères portent à la fois une charge positive et une charge négative, ce sont donc des molécules zwitterioniques. Ils sont analogues aux phospholipides naturels et constituent une famille de produits peu irritants et peu agressifs sur le plan biologique [9].

- *Surfactants non ioniques*

Les surfactants non ioniques ne donnent pas d'ions dans l'eau, leur solubilité est due à la présence de groupements polaires. Ces tensioactifs sont compatibles avec les trois autres groupes et de ce fait sont souvent utilisés avec d'autres produits amphiphiles dans des formulations à usages spécifiques. La partie hydrophobe est greffée à la tête hydrophile par des liaisons de type éther, ester, amide,...etc. La tête polaire est constituée soit par des ponts oxygène, soit par des groupements hydroxyles [9].



**Figure 1.4 : Exemple de surfactant non anionique :Polyoxyethylene (20) sorbitanmonooleate (Tween 80).**

Ces tensioactifs dits « non ioniques » présentent plusieurs avantages notamment : Un bon rapport coût/efficacité, une compatibilité avec toutes les autres classes de tensioactifs, de bonnes propriétés toxicologiques et biodégradabilité [9].

### **1.1.2.2 Classification basée sur la nature de la chaîne hydrophobe**

La partie hydrophobe d'un tensioactif est souvent constituée d'une chaîne hydrocarbonée, mais cette chaîne peut également être siliconée ou fluorocarbonée [9].

### **1.1.2.3 Les surfactants naturels**

Un surfactant naturel est issu de ressources naturelles (cette source peut être d'origine animale ou végétale). Les surfactants naturels doivent être obtenus par des procédés de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution. Pour les surfactants naturels aucun procédé de synthèse organique ne doit être réalisé. En réalité, il ya très peu de surfactant qui remplissent ces conditions. Les phospholipides, tels que les lécithines, obtenues à partir du soja ou du jaune d'œuf, sont les meilleurs exemples de tensioactif réellement naturel. Le facteur limitant la production de ces surfactants naturels est leur coût de production beaucoup plus élevé que celui des surfactants synthétiques aux propriétés équivalentes, car ces produits sont généralement présent en faible quantités et les procédés de séparation sont laborieux [11].

Généralement les termes de surfactant naturel ou bio-surfactant sont donc souvent utilisés dans un sens plus large. En effet, les surfactants synthétisés à partir de matière première naturel sont généralement qualifiés de naturels. Ainsi, un surfactant dont l'une de ses parties, hydrophobe ou hydrophile, est obtenue à partir d'une source naturelle est appelé surfactant naturel ou bio- surfactant [11].

Les principaux surfactants naturels commercialisés sont soit dérivés de polyols comme les alkyl polyglucosides (APG), les sucroesters et les alkyl glucamides (Figure 1.5), soit dérivés d'acide aminés. Les surfactants dérivés de polyols sont non ioniques, contrairement aux dérivés d'acides aminés [11].

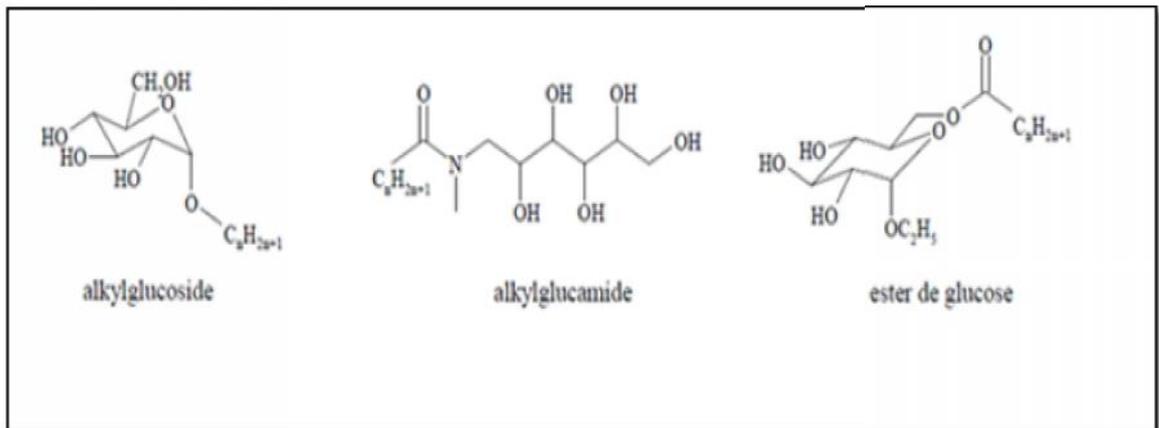


Figure 1.5 : Exemple de surfactants naturels à base de polyols.

### 1.1.3. Propriétés des surfactants

#### 1.1.3.1. Propriétés fondamentales

- *Propriétés superficielles*

Présents à faibles doses dans l'eau, les tensioactifs sont adsorbés positivement à l'interface eau/air et abaissent fortement la tension de surface.

- *Propriétés micellaires*

À faible concentration ( $<1\text{mg.L}^{-1}$ ), la solution est constituée de molécules tensioactives situées à l'interface eau-air formant une couche monomoléculaire continue. Une fois l'interface saturée, les nouvelles molécules ajoutées se regroupent au sein du liquide soit par leurs parties hydrophiles soit par leurs parties hydrophobes ; on assiste alors à la formation de micelles. La concentration minimale à partir de laquelle le surfactant s'autoassocie sous forme de micelles est appelée la concentration micellaire critique (CMC) [12]. La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif, elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaîne lipophile, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température.

On distingue différents types de micelles : les sphériques qui existent en solution diluée et les lamellaires qui sont présentes en solution concentrée. La présence de micelles a pour conséquence une augmentation importante de la solubilité et de la solubilisation [13,14].

### 1.1.3.2 Propriétés pratiques

- ***Mouillage***

Le pouvoir mouillant se définit par la faculté d'étalement du liquide sur un substrat donné et par son pouvoir de pénétration dans les pores du tissu.

- ***Moussage***

La mousse est un film dans lequel le tensioactif est adsorbé aux deux interfaces eau/air formant une double couche.

- ***Dispersion***

Les agents dispersants permettent de fixer les particules hydrophobes contenues dans une solution hydrophile, telle que de l'eau, ce qui permet de créer une dispersion, c'est-à-dire une solution aqueuse contenant des particules en suspension. Ces agents préviennent la floculation des particules, c'est-à-dire leur regroupement en plus grosses parties, qui pourraient alors facilement sédimenter dans le fond de la solution [15].

- ***Emulsion***

L'émulsion est définie comme étant une suspension de particules liquides au sein d'une autre phase liquide non miscible.

- ***Solubilisation***

Les tensioactifs ont la propriété de dissoudre les liquides organiques insolubles dans l'eau. Cette solubilisation résulte de l'enveloppement de ces derniers par les micelles suivant l'orientation préférentielle des tensioactifs.

### 1.1.4 Domaines d'applications des surfactants

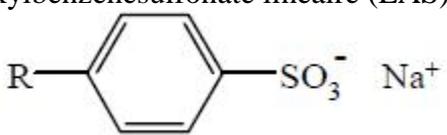
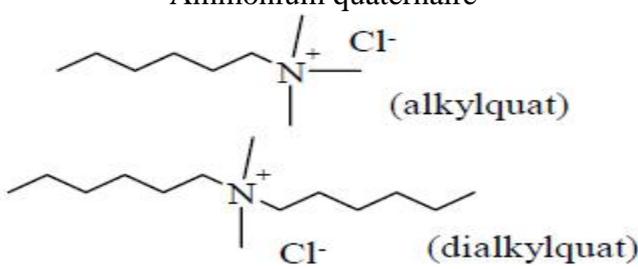
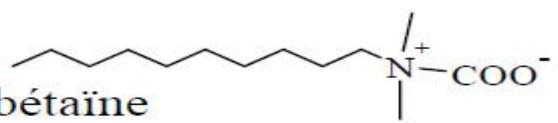
Les domaines d'applications des surfactants sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents ou cosmétiques, soit de produits auxiliaires dans les procédés de fabrication de l'industrie textile, des métaux, du cuir ou du pétrole. Trois grands secteurs d'activité se partagent le marché, à savoir les secteurs de la détergence, de la cosmétique et des usages industriels [16]. Le tableau 1.2 présente une liste non exhaustive de l'utilisation des surfactants dans le secteur industriel [16].

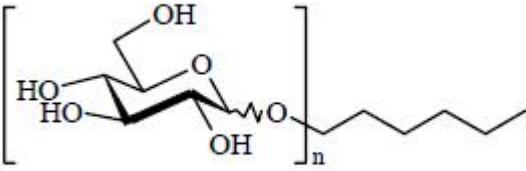
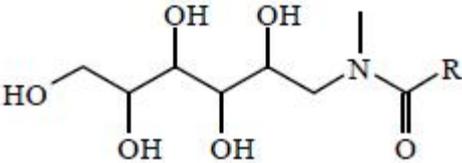
**Tableau 1.2 : Exemples d'applications des surfactants dans le secteur industriel.**

<b>Type d'activité</b>	<b>Mode d'utilisation des surfactants</b>
Cuir	Propriétés mouillantes et détergentes pour la préparation des peaux au tannage
Matières plastiques	Dispersion de PVC, caractère antistatique
Métallurgie	Nettoyage et dégraissage des métaux, inhibiteur des pigments
Peintures	Stabilisation des formulations, mouillage des pigments, ajoute un caractère hydrophobe aux peintures antirouille
Textile	Lubrification des fibres, lavage et teinture des fibres traitées
Phytosanitaire et engrais	Maintien du conditionnement sous forme de granulés empêche l'agglomération des substrats.

Ainsi, une classification de l'utilisation des surfactants selon la nature de la tête polaire est répertoriée dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3 : Récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications [16].**

Famille de surfactants	Principaux caractères	Utilisation
<b>Anionique</b>		
Savons $\text{RCOO}^- \text{Na}^+$  Alkylsulfate $\text{ROSO}^- \text{Na}^+$	Les plus courants  Peu onéreux  N'irritent pas la peau  Bonne	Détergent  Agent moussant (shampooing, dentifrice), humectant et détergent (liquide vaisselle)  Agent émulsifiant, dispersant et détergent
Alkylbenzènesulfonate linéaire (LAS)  	Biodégradabilité	Agent émulsifiant, dispersant et détergent
<b>Cationique</b>		
Ammonium quaternaire  	Charge positive qui leur permet de s'adsorber sur des substrats chargés négativement	Agent antistatique et adoucissant (produit de rinçage linge et cheveux)
<b>Amphotère</b>		
 alkylbétaine  alkylsulfobétaine dérivés d'acides aminés	Peu agressifs pour les tissus vivants  Compatibles avec toutes les autres classes de surfactants	Adoucissant pour textile et cheveux  Additif inhibiteur de corrosion
<b>Non ionique</b>		
Alcools éthoxylé  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$	Peu biodegradables	Détergent (6 à 10 OE [unité oxyde])

Alkyl phenols éthoxylé		d'éthylène]) dispersant, humectant et émulsifiant (liquide vaisselle et linge) (n>10 OE)
<p>Alkylpolyglucosides (APG)</p> 	Très faible toxicité Pas sensible au pH	C8-C10 : agent moussant dans l'agrochimie
<p>Alkylglucamides</p> 	Non irritant Bonne synergie avec les autre surfactants	Formulation pour shampooing et gel douche
Esters de glycérol Esters d'hexitols		Agent émulsifiant dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique etcosmétique

### 1.1.5 Origine et impact des surfactants dans le milieu marin

Malgré l'efficacité des liquides vaisselles, l'usage n'est pas sans conséquence sur l'environnement, notamment pour les liquides vaisselles qui ne sont pas écologiques et qui présentent des tensioactifs en grandes quantités.

Les tensioactifs, une pollution pire que les marrées noires ? Rejetés directement dans la mer avec les eaux usées ou par le biais des stations d'épurations, les détergents issus de la pétrochimie empoisonnent le plancton, la flore marine sans parler de la végétation côtière rongée par les embruns chargés en tensioactifs, cette molécule est responsable du

danger du produit. Son taux dans notre environnement à d'ailleurs atteint un seuil de toxicité insupportable au point de menacer les ressources en eau potable [17].

À la fin des années 1950 et au début des années 1960 les services d'hygiène ainsi que la population se rendent compte que la pollution engendrée par les détergents est apparue au grand jour car cela prend une importance incontestable, il faut réagir ! Il devient indiscutable dans les années 1970 que l'introduction et l'utilisation des tensioactifs au niveau des détergents provoque de graves dommages à l'environnement [17].

Les principaux dommages causés par les détergents sur le milieu marin manifestent par la mort des poissons, la pollution des eaux, l'eutrophisation des écosystèmes etc... Les détergents après leur utilisation, sont directement rejetés dans la mer avec les eaux usées ou encore via les rejets des stations d'épuration. Ces rejets provoquent l'empoisonnement du plancton qui est la principale nourriture de la plupart des organismes marins [17].

La pollution par les surfactants se persiste également par la destruction de la faune, de la flore et de la végétation côtière

Par ailleurs, quand les surfactants sont rejetés dans le milieu marin, la force ionique de l'eau de mer provoque une chute de leur concentration micellaire critique et par conséquent, leur solubilité diminue, provoquant ainsi leur accumulation dans les sédiments [18]. Ceci présente un danger pour les communautés benthiques qui sont les plus importantes dans la chaîne trophique [18,19].

### **1.1.6 Toxicité des surfactants**

De par leurs structures chimiques, les surfactants sont des molécules qui s'accumulent aux interfaces, elles vont donc naturellement se concentrer aux interfaces biologiques comme les poumons ou les branchies et ainsi, limiter les échanges respiratoires des organismes. De plus, leurs propriétés amphiphiles leur confèrent la capacité de se lier aux composants cellulaires comme les phospholipides des membranes mais aussi aux protéines et peptides. Il en résulte des modifications des fonctions notamment vis à vis des échanges cellulaires, en augmentant par exemple, l'absorption de molécules qui normalement ne traverse pas les membranes. Il ne faut pas négliger également le fait que le caractère amphiphile favorise la bioaccumulation [20].

Les surfactants anioniques qui représentent une énorme part du marché des détergents sont donc déversés en quantités astronomiques dans l'environnement. La majorité des tensioactifs anioniques qu'on retrouve dans les produits du commerce sont des

sulfonâtes d'alkyl benzène linéaire (LAS). On peut donc s'intéresser plus particulièrement à la toxicité de ce type de molécules. Les LAS sont considérés comme n'étant pas toxiques pour l'environnement. Cependant de nombreuses études montrent que les LAS ne sont pas si bénins pour l'environnement. La toxicité des tensioactifs est fonction de la concentration du produit et de sa durée de vie dans l'environnement. Dans le cas des tensioactifs anioniques, la CL50-24H (concentration létale médiane après 24 h) pour le poisson est 1,9 mg/L. La toxicité se manifeste de façon différente sur les groupes musculaires assurant la locomotion [21, 22, 23].

Suivant la concentration l'effet dose se traduit par un courbe à trois phases :

- La phase de sensibilité (0,1 à 0,4 mg/L)
- La phase d'intoxication chronique (0,4 mg/L à 1,6 mg/L)
- La phase d'intoxication aiguë où la dose mortelle varie de 10 à 12 mg/L

Des tests d'écotoxicité aiguë et chronique ont été réalisés sur différentes espèces animales ou végétales peuplant les milieux aquatiques ou littoraux. Des études sur la toxicité aiguë des LAS sur les algues ont montré que les effets étaient très spécifiques à chaque espèce et que les valeurs varient entre 0,1 et 100 mg/L [24,25].

Il est extrêmement important de vérifier la toxicité d'un produit sur les algues photosynthétiques qui sont à la base de la chaîne alimentaire.

Les diatomées comme *Navicula* ou encore d'autres algues comme *Microcystisaeruginosa* sont sensibles pour des concentrations de 1,4 et 5 mg/L respectivement [23]. *Gymnodinium breve*, est une algue marine, extrêmement sensible aux LAS puisqu'une concentration de 25 µg/L suffit à entraîner une détérioration de 100% en 24 heures [24]. Certains travaux ont également mis en évidence le fait que pour le même surfactant testé sur le même organisme, on pouvait observer des résultats 80 fois différents en fonction de la température de l'eau (de 17 à 28°C) [27].

Les crustacés, bien que réputés comme étant plus résistants aux LAS, s'avèrent également être sensibles à ce polluant. On observe par exemple la mort des larves de *Balanus balanoides* après 100 heures en présence de LAS à 1 ppm [27]. Cependant l'étude la plus marquante concerne *Penaeus monodon* [28], un crustacé élevé en Thaïlande, où les LAS sont les détergents synthétiques les plus utilisés. La diminution des populations de ce

crustacé a été observé à CL50 après 24 heures d'exposition aux LAS était de 0,06 ppm. Les poissons semblent être les organismes souffrant le plus de la pollution aux LAS, notamment à cause de leur propriété à accumuler les toxiques dans leur vésicule biliaire [29].

La propriété des surfactants à s'accumuler sur les surfaces et les interfaces engendre leur fixation sur les épithéliums des poissons, augmentant ainsi la sécrétion de mucus qui réduit les échanges gazeux et ioniques et affecte la fonction respiratoire ainsi que le métabolisme de l'urée [30]. Les valeurs de CL50 observées après 96 heures s'échelonnent entre 0,5 et 6,5 ppm pour les espèces testées [30].

## **1.2 BIOSURFACTANTS**

### **1.2.1 Définition**

Les biosurfactants (ou surfactants biologiques) sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par les microorganismes : des levures, bactéries et champignons. Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature du substrat et des conditions de la production [31,32]. Ils sont capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement.

### **1.2.2 Classification des biosurfactants**

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et origine microbienne. Généralement, le groupement hydrophile (soluble dans l'eau) est constitué par une variété de groupements fonctionnels d'acides aminés, protéines, peptides cycliques, acides carboxyliques, polysaccharides et (mono ou di) alcool gras ; et le groupement hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) est une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou insaturée (C<sub>8</sub> à C<sub>22</sub> : linéaire ou ramifié), un acide gras à longue chaîne, hydroxy-acide gras ou  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy-acide gras [33].

### 1.2.2.1 Selon le poids moléculaire

- *Faible poids moléculaire*

Ils sont très mobiles à l'interface et ils sont efficaces pour diminuer les tensions de surface et interfaciales. En conséquence, ils recouvrent rapidement l'interface huile-eau fraîchement créé pendant l'émulsification. Dans cette catégorie, nous avons principalement les monoglycérides, les lécithines et les lysolécithines, les glycolipides et les saponines, les alcools gras et les acides gras [34].

- *Haut poids moléculaire ou polymères*

Connus comme bioémulsifiants qui sont plus efficaces à stabiliser le complexe huile-eau sans une réduction importante de la tension de surface. Ils contiennent les groupes de protéines ou des lipopolysaccharides et des polysaccharides (hydrocolloïdes). La molécule de protéine peut s'interpénétrer dans la phase lipidique à des degrés divers. La liaison spécifique est essentiellement électrostatique : Les groupes de tête des surfactants se lient à des groupes de charge opposés sur la protéine. La saturation de la liaison de tensioactifs anioniques est indépendante du pH et semble être contrôlée par les interactions hydrophobes de coopération [34].

### 1.2.2.2 Selon la nature biochimique

Universellement, un biosurfactant typique est soit anionique ou non ionique, il se compose de tête hydrophile (principalement des acides aminés, peptide ou phosphate cyclique, hydrate de carbone mono, disaccharides ou polysaccharides) et une queue hydrophobe (essentiellement des acides gras insaturés, saturés, linéaires, ramifiés ou hydroxylés) [35, 36, 37,38]. Pour cela on distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [39].

- *Les glycolipides*

Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxy-aliphatiques [31]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.

- *Les lipopeptides*

Ils sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique.

- *Les phospholipides*

Ils sont formés de groupements alcool, phosphate et de chaîne lipidique. Healy et Bognolo indiquent qu'ils sont présents dans tous les microorganismes [39,40].

- *Les Lipopolysaccharides*

Ce sont des polymères constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ils constituent la classe des biosurfactants possédant la masse molaire la plus élevée.

- *Les acides gras et lipides neutres*

D'origine végétale, animale ou microbienne.

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés surfactantes importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [41, 36, 33].

### **1.2.3 Microorganismes producteurs de biosurfactants**

Une variété de microorganismes principalement bactéries, champignons et levures sont capables de produire des biosurfactants de diverse composition chimique (tableau I.4). Leur nature et la quantité produite dépendent du type de microorganisme produisant tel ou tel biosurfactant [32].

Les bactéries utilisées pour produire de biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des composés insolubles (hydrocarbures). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de sélectionner les souches productrices de biosurfactants et d'optimiser les paramètres abiotiques influençant la production (sources de carbone et d'azote, température, salinité, pH, ...).

**Tableau 1.4 : Principaux types de surfactants biologiques [33,34]**

Groupe	Biosurfactant	Microorganisme
Glycolipides	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus</i> sp., <i>Nocardiamycobacterium</i>
	Sophorolipides	<i>Candidabombicola</i> , <i>Candidaantartica</i>
Lipopeptides et lipoprotéines	Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>
	Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	Phospholipide	<i>Corynebacteriuminsidiosum</i>
Acides gras	Acides gras	<i>Corynebacteriumlepus</i>
Lipides neutres	Lipides neutres	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Lipopolysaccharides ou Polymériques	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Généralement, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de deux rhamnolipides [43]. Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées [3]. Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu.

#### **1.2.4 Production des biosurfactants**

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [44,45]. Une variété des matières premières et des substrats recyclés tels que les huiles végétales, des déchets d'huiles, des substances à base d'amidon, du lactosérum et des déchets de distillation sont communément employés comme substrats pour la culture des microorganismes. La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée. On obtient souvent un bon rendement avec un substrat insoluble. Le principal rôle physiologique du tensioactif est de

permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciales entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [46 ,47].

### **1.2.5 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance**

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 des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. [36] ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices.

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le biosurfactant par un mélange des solvants (chloroforme/méthanol) [48]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du biosurfactant. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

### **1.2.6 Avantage des biosurfactants**

L'application de biosurfactants est plus avantageuse par rapport aux surfactants chimiques du fait :

- D'une bonne stabilité thermique et chimique : pH (2-10), salinité (jusqu'à 30%) et de température (jusqu'à 100 °C) ;
- D'une biocompatibilité et la digestibilité : application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels ;
- D'excellentes caractéristiques écologiques : biodégradabilité et absence de toxicité ;
- D'un temps de stockage long ;

- D'éventuelle production à partir des déchets industriels (substrat effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon, ...) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production.

Les applications potentielles des biosurfactants sont : l'émulsification, la séparation de phases ou dé-émulsification, le mouillage, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité, antiadhésivité contre plusieurs microorganismes pathogènes. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, anti-tumeur et anti-mycoplasme. Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines en l'occurrence agricoles, cosmétiques, pharmaceutiques [49,50, 51] Récemment, les biosurfactants ont suscité beaucoup d'attention dans le domaine de nano biotechnologie [52].

## 1.3 TESTS D'ECOTOXICITES

### 1.3.1 Généralités

#### 1.3.1.1 Règles générales à respecter

D'après une publication de Calow [53], un bon test écotoxicologique doit respecter la règle des 5R (en anglais) :

- **Relevance** : ce qui signifie réalisme pertinence, représentativité. L'organisme vivant choisi pour le test doit être représentatif du milieu évalué : p. ex. un ver de terre représente bien les organismes du sol puisqu'il est très présent et très important dans la « vie de sol ».
- **Reliability** : est la fiabilité. Une méthode fiable peut être utilisée à n'importe quel moment.
- **Repeatability** : répétabilité. Lorsque le test est répété, il doit donner des résultats qui varient peu.
- **Reproducibility** : reproductibilité. Si différents laboratoire à travers le monde réalisent le test sur une même substance, ils doivent trouver des résultats voisins.
- **Robustness** : robustesse. Une méthode robuste est susceptible d'être utilisée par n'importe quel technicien moyennement entraînée ou formé.

### 1.3.1.2 Paramètres d'évaluation

- *Dose létale médiane DL50*

La  $DL_{50}$  est la dose unique déduite statistiquement, censée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée. La valeur de la  $DL_{50}$  est exprimée en masse de la substance étudiée rapportée à l'unité de masse corporelle des animaux soumis à l'expérimentation (mg/kg) [54].

- *Concentration létale médiane CL50*

La  $CL_{50}$  est la concentration d'une substance déduite statistiquement qui devrait provoquer au cours d'une exposition ou, après celle-ci, pendant une période définie, la mort de 50 % des animaux exposés pendant une durée déterminée. La valeur de la  $CL_{50}$  est exprimée en masse de substance étudiée rapportée à un volume standard d'air ( $mg.L^{-1}$ ) [54].

➤ *classification de  $DL_{50}$  /  $CL_{50}$*

Plus la  $DL_{50}$  est faible, plus le produit est jugé toxique. On retient habituellement la classification suivante [62] :

- Extrêmement toxique :  $DL_{50} < 5 \text{ mg/kg}$
- Très toxique :  $5 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 50 \text{ mg/kg}$
- Toxique :  $0,5 \text{ g/kg} < DL_{50} < 5 \text{ g/kg}$
- Peu toxique ou non toxique  $DL_{50} > 5 \text{ g/kg}$

Pour les composés absorbés par voie respiratoire, on peut déterminer de la même façon la concentration létal 50 ou  $CL_{50}$ .

### 1.3.1.3. Type des tests

- *Toxicité aigue*

La toxicité aiguë d'une substance chimique est l'ensemble des effets sur l'organisme provoqués par une exposition de courte durée à une dose (concentration) forte, généralement unique. Dans ce paragraphe, les principaux effets (lésionnels ou fonctionnels) sont décrits ainsi que les organes cibles et les valeurs de  $DL_{50}$  et  $CL_{50}$ . En effet, dans les études expérimentales chez l'animal, la toxicité aiguë se détermine par la

DL50 (par voie orale - voie cutanée) et la CL50 (par inhalation). En général elle n'est pas inférieure à une semaine [55].

- ***Toxicité chronique***

La toxicité chronique correspond aux effets d'une administration répétée à long terme et à faibles doses. Ces doses sont insuffisantes pour provoquer un effet immédiat, mais la répétition de leur absorption sur une longue période de temps à des effets délétères. Chez l'animal elle correspond à des expositions durant la quasi-totalité de la durée de vie [55].

#### **1.3.1.4 Méthodes de détermination de la DL<sub>50</sub> et la CL<sub>50</sub>**

- ***Méthode de Dragstedt et Lang***

Pour chaque dose de la substance, totaliser tous les morts déjà observés aux doses inférieures et tous les vivants encore observés aux doses supérieures. Elle permet de calculer le pourcentage de mortalité à chaque dose sur un plus grand nombre d'animaux que celui qui a réellement reçu cette dose. On fait ensuite la courbe représentant les pourcentages de mortalité en fonction de la dose. Si au voisinage de la DL50 la courbe est une droite on pourra déterminer ce point d'après l'équation de la courbe en utilisant la formule suivante [53] :

$$DL50 = \frac{[50(X2 - X1) + X1Y2 - Y1X2]}{Y2 - Y1}$$

X2 : dose supérieure encadrant la DL50

X1 : dose inférieure encadrant la DL50

Y1 : pourcentage de mortalité correspondant à X1

Y2 : pourcentage de mortalité correspondant à X2

- ***Méthode de Karber et Behrens***

On administre des doses croissantes de substance à des lots de souris de masses uniformes. La dose administrée est exprimée en mg/kg ou ml/kg de masse corporelle. La différence entre les doses voisines doit être constante. Pour chaque lot, on note le pourcentage de mortalité dans l'heure qui suit ou au bout du temps imparti. La DL50 est obtenue par la formule [57] :

$$DL50 = DL100 - \frac{S(a, b)}{n}$$

DL100 : plus petite dose tuant tous les animaux

a = moyenne de la somme des morts à deux doses consécutives

b = différence entre deux doses successives

n = nombre d'animaux utilisés par lot

- *Analyse de probit*

En 1952, un professeur de statistiques à l'Université d'Edimbourg par le nom de David Finney a pris l'idée Bliss et a écrit un livre intitulé Analyse Probit (Finney 1952). Aujourd'hui, l'analyse de probit est toujours la méthode statistique préférée dans des rapports de compréhension de dose-réponse [58].

Application :

- D'expériences binomiales de réponse dans une variété de champs.
- L'analyse de Probit est généralement employée en toxicologie pour déterminer la toxicité relative des produits chimiques à la matière organique.
- L'analyse de Probit agit en tant que transformation de sigmoïde à linéaire et puis court une régression sur le rapport.
- Une fois qu'une régression est courue, le chercheur peut employer le rendement de l'analyse de probit pour comparer la quantité de produit chimique priée pour créer la même réponse dans chacun des divers produits chimiques. Il y a beaucoup de points finaux employés pour comparer les toxicités différentes des produits chimiques, mais le **CL<sub>50</sub>** (liquides) ou **DL<sub>50</sub>** (solides) sont les résultats le plus largement répandus des expériences modernes de dose-réponse.

Avant la marche à suivre pour estimer **CL<sub>50</sub>**, il doit voir si la mortalité normale est prévue.

Quand la mortalité normale est prévue, les taux de mortalité devraient être corrigés en utilisant la formule de l'abbé. Il est donné près mortalité corrigée,

$$P^* = \frac{P-C}{1-C}$$

Là où,

p = proportion de mortalité pour une dose donnée,

c = proportion de mortalité pour une mortalité normale de dose (nul).

En cours d'estimer le DL<sub>50</sub>, nous employons les probits empiriques, les probits prévus et les probits fonctionnants.

- Les probits empiriques sont lus directement des tables.
- En utilisant la relation entre la notation-dose et les probits empiriques, les probits prévus sont obtenus.

Employer les probits et la mortalité prévus évalue les probits fonctionnants sont déterminés.

### 1.3.2 Organisme aquatiques testés

Le tableau 1.5 récapitule les organismes le plus généralement utilisées pour évaluer la toxicité en l'eau marine. Les organismes d'essais incluent les poissons, les invertébrés, les algues, et les micro-organismes. Certains de ces systèmes, par exemple animaux et larves de poisson, sont difficiles à manipuler et ils ne fournissent pas une réponse rapide. En outre, l'utilisation de certaines de ces organismes peut être moralement répréhensible. D'autres systèmes, tels que les cellules mammifères sont cher et les résultats ne sont pas toujours conformés [59,60].

**Tableau 1.5 : Tests d'écotoxicité en l'eau marine [61].**

Groupes biologiques et espèce	Paramètres testés et durée
<b>BACTERIES</b>	
Vibrio fisheri, anciennement photobacterium photophorum, du système microtox	Inhibition de la bioluminescence, durant 15 minutes
<b>ALGUES</b>	
Champia parvula	Létalité et inhibition sublétales de l'augmentation du nombre de bourgeons de cystocarpes durant 9 jours
Dunaliella sp., Thalassiosira	Variés
<b>INVERTEBRES</b>	
Palaemonetes vulgaris (crevette bouquet)	Létalité, durant 30 jours
Artemia salina (microcrustacé)	Létalité durant 48 heures
Autres microcrustacés : Acartia tonsa (copépode) Mysidopsis bahia (mysidacé) et	Variés

autre	
Strongylocentrotus purpuratus (oursin pourpre) ou Dendraster excentricus (oursin plat), Arbacia punctulata (oursin bleu)	Inhibition sublétales de la fertilisation, durant 40 minutes ou moins
Mytilus edulis (moule), Crassostrea sp. (huitre), Mercenaria mercenaria, (palourde), Pecten sp. (pétoncle)	Létalité, durant 28 jours
Autre invertébré : Brachionus plicatilis (rotifère)	Létalité, durant 24 heures
Menidia beryllina (capucette)	Létalité et inhibition sublétales de la croissance des larves, durant 4 ou 7 jours  Létalité d'embryons, durant 28 jours  Létalité de juvéniles, durant 28 jours
Menidia menidia (capucette de l'Atlantique)	Létalité de larves, durant 4 jours  Létalité d'embryons, durant 28 jours
Gasterosteus aculeatus (épine de mer à trois épines)	Létalité de juvéniles, durant 4 jours  Létalité de juvéniles, durant 28 jours
Cyprinodon variegatus (méné à tête-de-mouton)	Létalité et inhibition sublétales de la croissance des larves, durant 4 ou 7 jours  Létalité d'embryons, durant 28 jours  Létalité de juvéniles, durant 28 jours
Atherinops affinis (capucette barrée)	Létalité et inhibition sublétales de la croissance des larves, durant 4 ou 7 jours  Létalité d'embryons, durant 35 jours  Létalité de juvéniles, durant 28 jours
Oncorhynchus mykiss (truite-arc-en-ciel acclimatée à l'eau de	Létalité de juvéniles, durant 28 jours

mer)	
Oncorhynchusgorbuscha (saumon rose acclimaté à l'eau de mer	Létalité, durant 28 jours
Autre poissons : Fundulus sp. (tondule), Leuresthestenuis (grunion) et autres	Variés

## 1.4 ARTEMIA EN ECOTOXICITE

### 1.4.1 Définition

Connu sous le nom de petite crevette des marais salants (*brine shrimp* en anglais), l'Artémia est un petit crustacé phyllopode, aquatique d'une taille qui ne dépasse pas 15 mm. Ce crustacé est eurytherme (0-30 °C), ses tolérances à la salinité et à la température sont très élevées. L'artémia un organisme filtreur non sélectif de phytoplancton, de bactéries, de levures. Il existe de nombreuses souches (espèce) du genre Artémia. Son origine et en relation avec son milieu de vie [62].

### 1.4.2 Taxonomie

Le genre artémia est un complexe d'espèces et sous-espèces qui se ressemblent, définies par le critère de l'isolement reproductif. Les premiers taxonomistes attribuent des noms d'espèces aux populations avec les morphologies différentes, recueillies à différentes températures et salinités. Plus tard, la profusion de noms a été abandonnée et toutes les espèces d'artémia été appelées *Artemia salina* Linnaeus 1758. Certains auteurs continuent cette pratique aujourd'hui. En règle générale, des noms différents sont attribués aux populations reproductivement isolées ou des groupes de populations [63] :

- *A. salina* Linnaeus1758:Lymington, Angleterre (aujourd'hui disparu), région méditerranéenne;
- *A. tunisiana* Bowen and Sterling 1978 synonyme de *A. salina*;
- *A. parthenogenetica*Barigozzi 1974, Bowen and Sterling 1978: Europe, Afrique ; Asie, Australie;

- *A. urmiana* Gunther 1900: Iran;
- *A. sinica* Yaneng 1989: Asie central et de l'Est ;
- *A. persimilis* Piccinelli and Prosdocimi 1968 : Argentine ;
- Sous espèces de *A. de franciscana*: Amériques, Caraïbes et les îles du Pacifique, y compris les populations reproductivement isolées dans la nature comme *A. (franciscana) franciscana* Kellogg 1906 et *A. (franciscana) monica* Verrill 1869 (Mono Lake, Californie) ;
- *Artemia* sp. Pilla and Beardmore 1994: Kazakhstan.

L'affiliation taxonomique de l'espèce *A. Franciscana* est présentée ci-dessous :

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous-embr	Crustacea
Classe	Branchiopoda
Sous-classe	Sarsostca
Ordre	Anostraca
Sous-ordre	Artemiina
Famille	Artémiidae
Genre	Artémia
Espèce	Artémia franciscana



**Figure 1.6:** *A .franciscana* [64].

### 1.4.3 Biologie

#### 1.4.3.1 Morphologie

L'artémia est un crustacé aquatique nageant constamment, de forme allongée, dépourvue de carapace. Il est pourvu de onze (11) paires d'appendices thoraciques qui ont une fonction motrice, respiratoire et qui permettent la filtration de la nourriture et son acheminement vers les deux mandibules.

L'adulte de l'Artémia est une petite crustacée de 8 à 10 mm de longueur. Leur corps est composé de la tête, du thorax, et de l'abdomen [65].

Chez les mâles adultes, ils sont très grands et modifié pour former un organe étreignant de tenir la femelle pendant la copulation tandis que la seconde antennes de femelles sont plus petites. Les femelles possèdent une poche conique appelé le sac couvain

ou ovisac qui peuvent stocker des œufs ou des nauplii, mais les mâles portent une paire de tubulaire, pénis rétractiles ; juste derrière la dernière paire de phyllopodes [62].

#### 1.4.3.2 Cycles de vie

L'Artémia vit dans les milieux hyper halins, inaccessibles aux prédateurs aquatiques. En effet, les Anostracés sont dépourvus de structures morphologiques de défense [66].

Le mode de reproduction constitue un critère de classification chez l'artémia, cette dernière existe en milieu naturel sous deux populations :

- **Population bisexuelle** : Reproduction se fait en présence du male (mode sexué).
- **Population parthénogénétique** : Reproduction se fait à partir d'un ovule non fécondé (mode asexué), la femelle donnera des générations filles [67,68].

Dans les deux cas on obtient, soit des nauplii (ovoviviparité) [69,70], soit des cystes (oviparité) [71].

L'adulte peut produire 300 nauplii ou cystes chaque 04 jours, le nauplii passe au stade adulte en 8 jours.

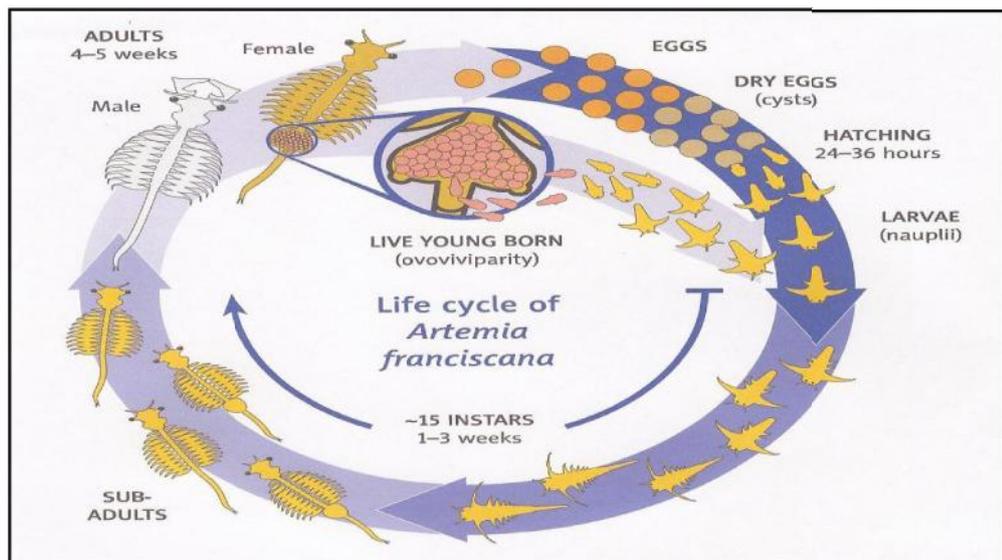


Figure 1.7 : Cycle de vie *A.franciscana* [72].

#### 1.4.4 Écologie et répartition

Les populations d'artémia se trouvent dans environ 500 lacs de sel naturel et des marais salins artificiel dispersés dans les zones climatiques tropicales, subtropicales et tempérées le long des côtes, ainsi que l'intérieur des continents (figure 1.8). La répartition de l'artémia est discontinue : des biotopes pas très salins sont peuplés d'artémia. Bien que les artémia se développent très bien dans l'eau de mer naturelle, ils ne peuvent pas migrer d'un biotope salin à un autre via les mers, car ils dépendent de leurs adaptations physiologiques à salinité élevée pour éviter la prédation et de la concurrence avec d'autres filtreurs. Ses adaptations physiologiques à salinité élevée fournissent une défense écologique très efficace contre la prédation du fait de :

- un système osmorégulateur très efficace ;
- la capacité à synthétiser des pigments respiratoires très efficaces pour faire face aux faibles niveaux d'O<sub>2</sub> aux fortes salinités ;
- la capacité de produire des cystes dormants lorsque les conditions environnementales mettent en danger la survie de l'espèce.

D'où, l'artémia se trouve uniquement à des salinités où ses prédateurs ne peuvent pas survivre (>70 g/l). En raison du stress physiologique extrême de la toxicité de l'eau, l'artémia meurt à des salinités proches de NaCl de saturation, à savoir 250 g/l et plus.

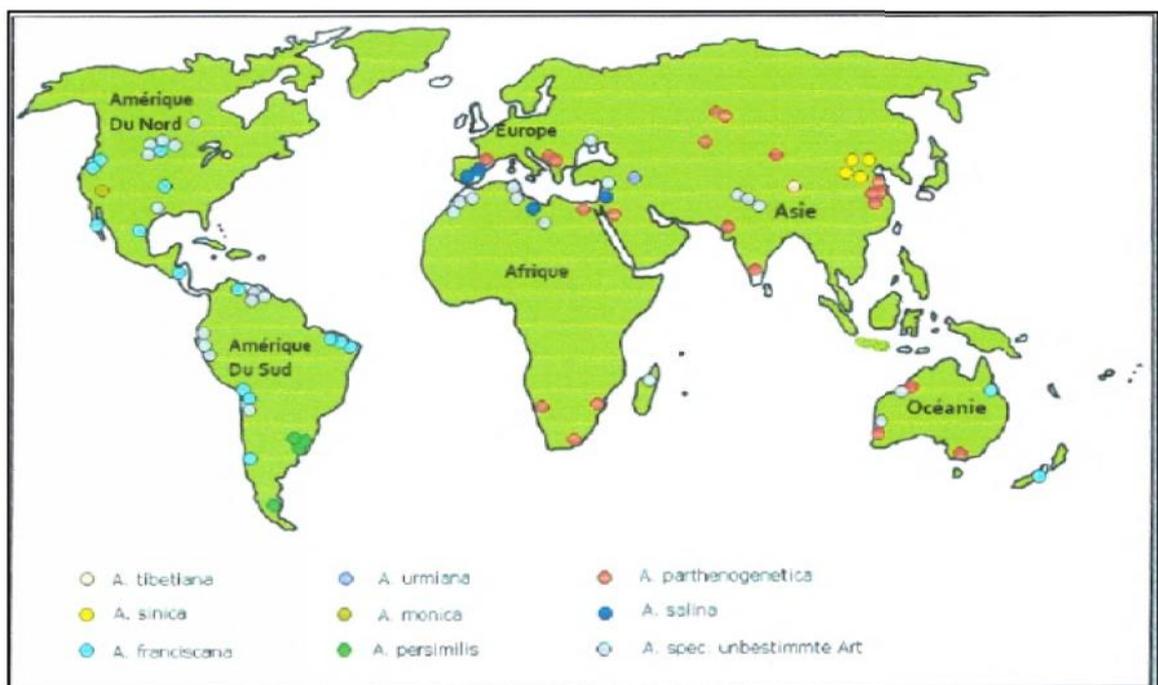


Figure 1.8 : Répartition d'Artémia dans le monde [73].

### **1.4.5 Sensibilité de l'artémia aux toxiques**

Les tests de toxicité se dérouleront sur les formes précoces de l'artémia. En effet, c'est le deuxième et le troisième stade, quelque fois le premier stade que s'intéressent les écotoxicologues, du fait de la grande sensibilité de l'artémia aux poisons et les produits testés durant ces stades.

Sorgeloos *et al.* [74] ont constaté une grande résistance aux produits chimiques des artémia du premier stade par rapport aux deuxièmes et au troisième stade. La différence évidente dans les doses mortelles entre le premier stade contre le deuxième et troisième stade larvaire est probablement due au fait que dans le nauplii fraîchement éclos, l'épithélium de la région digestive n'est pas en contact avec le milieu externe, considérant qu'elle est bien exposée dès que les animaux mueront dans le deuxième stade.

### **1.4.6 Les avantages d'Artémia**

Les avantages d'Artémia dans les essais d'écotoxicité en laboratoire peuvent être récapitulés comme suit:

- Ne nécessite pas de l'entretien pendant toute l'année des cultures courantes, avec tout on élimine complètement des difficultés biologiques et techniques et les répercussions économiques considérables.
- Les cystes sont commercialement et aisément disponibles de sorte que les essais puissent être effectués dans le monde entier avec le même matériel original et sans n'importe quel problème de provision ; d'ailleurs, la quantité de cystes exigés par essai est très petite de sorte que le prix du matériel biologique soit négligeable.
- Un grand nombre d'organisme d'essai exactement du même âge et état physiologique peuvent être facilement obtenues pour commencer les essais.

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODE

Ce travail de mémoire s'inscrit dans un contexte global qui s'intéresse à la bioremédiation du pétrole dans l'eau de mer. À cet effet et afin de justifier l'introduction des microorganismes hydrocarbonoclastes, en l'occurrence la bactérie marine SdK644 et son biosurfactant, des séries d'expériences sur la toxicité de ces agents ainsi que le pétrole sont avérées nécessaires. L'organisme test choisi comme « représentatif » de la toxicité sur la vie aquatique marine est le crustacé : Artémia.

Les expériences de production de biosurfactant ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie et de biochimie, dans le département de chimie industrielle de l'université de Blida -1-, tandis que les tests d'écotoxicité sur l'artémia ont été menés dans l'atelier physicochimique et l'atelier microbiologique du Centre National de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA).

### 2.1 PRODUCTION DE BIOSURFACTANT

#### 2.1.1 Origine de la souche bactérienne SdK644

La souche bactérienne (codée SdK644), utilisée dans cette étude est une souche mésophile isolée antérieurement à partir d'un sédiment portuaire contaminé par les hydrocarbures (Figure 2.1).

Selon BILAL ZENATI cette souche bactérienne a la capacité de produire un biomolécule de type d'un biosurfactant.



*Figure 2.1 : Photos montrant l'échantillonnage d'un sédiment marin pollué par les Hydrocarbures.*

### **2.1.2. Repiquage et conservation de la souche**

Pour maintenir la souche bactérienne dans les bonnes conditions et prévenir tout problème de contamination, un repiquage périodique est fait en boîtes, en tubes inclinés et en films de glycérol.

- ***En boîte***

La souche est repiquée chaque quinze jours dans des boîtes de pétri contenant un milieu de culture solide Luria Bertani (LB) dont la composition et sa préparation est la suivante (g/l l'eau distillé) : 23 NaCl, 10 peptone et 5 extrait de levure. De l'agar est additionné au milieu (15 g/l) pour gélifier le milieu. Le pH du milieu est ajusté à 7 avec une solution de 1 mol/l NaOH. L'agar étant pratiquement insoluble dans le milieu à température ambiante, le mélange est donc chauffé à une température plus de 50 °C pour que le milieu devienne homogène. Le milieu est ensuite réparti en flacons de 250 ml de capacité et autoclavé à 120 °C pendant 20 min. Nous attendons le refroidissement du milieu après autoclavage (une température de moins de 50 °C), nous faisons alors la distribution du milieu dans les boîtes de pétri (Photos en l'appendice (A)). Après gélification du milieu (plus de 2 h), une petite quantité de la souche SdK644 (portée de l'anse) est repiquée en stries dans les boîtes colées. Les semences bactériennes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 48 h. Après développement des colonies, les boîtes sont conservées au froid (+ 4°C).

- ***En tubes inclinés***

Nous avons fait les mêmes étapes précédentes avec un milieu LB sur dosé en agar (22 g/l) afin d'obtenir des surfaces inclinées en tubes bien gélifiées (l'appendice (A)).

- ***En film protecteur de glycérol***

Dans ce cas la conservation se fait en milieu liquide plutôt que solide. Une anse de colonies de la souche SdK644 est mise dans des tubes à essais contenant d'environ 10 ml de LB liquide (stérile). Les cultures sont incubées à 30 °C et une vitesse de 150 tr/min pendant une nuit. Une portion de 70 % du trouble bactérien développé (Absorbance d'environ 1 à 600 nm) est mélangé avec une autre portion de 30 % de glycérol stérile (sur filtres seringues stériles de 0,45 µm) dans des tubes Ependoff (photos en l'appendice (A)). Le mélange est vortexé à vitesse maximale pendant 2 min pour que le glycérol puisse recouvrir les cellules et les protéger de l'éclatement lors de son maintien à une température de - 20°C pendant une longue durée (6 mois et plus).

### 3.1.3 Production du biosurfactant

- *Préparation de la préculture*

La préculture de la souche bactérienne est préparée dans le même milieu LB liquide cité auparavant.

- *Milieux de production*

La production de biosurfactant est faite dans deux milieux différents ; un milieu minéral de base (MMB) et un milieu riche (LB).

- ❖ *Milieu minéral de base (MMB)*

Sa composition est la suivante (g/l d'eau distillée) : 23 NaCl; 0,3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,33 MgCl<sub>2</sub>; 0,05 CaCl<sub>2</sub>; 0,1 extrait de levure et 1 ml d'une solution d'éléments traces métalliques contenant (g/l d'eau distillée) : 6,7 ml HCl à 35 % ; 1500 mg FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 190 mg CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 100 mg MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 70 mg ZnCl<sub>2</sub>, 6 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 36 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 24 mg NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O et 2 mg CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O. Le pH est ajusté à 5 par une solution de 1 mol/l HCl. Le milieu est distribué dans un erlenmeyer de 5 litres avec un volume opérationnel de 2 litres et stérilisé à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min.

- ❖ *Milieu riche (LB)*

De la même façon, nous allons essayer de produire le biosurfactant à partir du milieu LB liquide.

- ❖ *Inoculum :*

Les milieux (LB et MB) sont inoculés à raison de 2 % par une préculture d'une nuit de la souche SdK644 cultivée dans un milieu Luria Bertani (LB) modifié.

- ❖ *Source de Carbone*

Nous allons utiliser huile de friture (usagée) comme une source de carbone inductrice de biosurfactant. Elles ajoutées aux milieux à raison de 2% (m/v) après sa stérilisation à 120 °C pendant 20 min ou par filtration sur filtre à seringue stérile de 0,45 µm.

- ❖ *Incubation*

La production de biosurfactant a été réalisée à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 3 jours.

## 2.1.4 Extraction et purification de biosurfactant

- *Élimination de la biomasse*

Après trois jours d'incubation et lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le milieu (cela est vérifié par le test de déplacement de pétrole selon le protocole cité par Benali [75]), le volume entier de la culture est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de 3900 tr/min pendant 30 min suivie par filtration sur papier filtre ordinaire. Eventuellement, la couche huileuse résiduelle a été éliminée par une pipette pasteur à partir des tubes capillaires (15 ml de volume).

- *Méthodes d'extraction*

Le surnageant de culture (qui contient le biosurfactant) est partiellement purifié selon les protocoles suivants :

- *Précipitation acide*

Le surnageant est acidifié à un pH de 2 au moyen d'une solution de HCl (6 mol/l). La précipitation du biosurfactant est favorisée par refroidissement du surnageant à + 4 °C pendant une nuit. Le précipité ainsi obtenu est récupéré par centrifugation à 3900 tr/min pendant 30 min [16].

- *Précipitation par NaCl*

Nous allons remarquer qu'il reste une activité de biosurfactant dans le surnageant après la récupération du précipité de l'étape précédente. Nous avons donc tenté de précipiter le biosurfactant par ajout d'une solution saturée de NaCl. Après une nuit à froid, les éprouvettes des solutions sont vérifiées de la présence du biosurfactant. Dans le cas d'un résultat positif, le précipité est récupéré par centrifugation.

- *Extraction par solvants*

La troisième méthode consiste à extraire tout le volume du surnageant par des solvants de différentes polarités. D'après la littérature, trois solvants ont été utilisés par succès pour extraire les biosurfactants (bien qu'il existe d'autres solvants) ; l'acétate d'éthyle, un mélange de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v) et le Dichlorométhane. Le surnageant de culture est extrait par ces trois solvants deux fois à volumes égales dans des ampoules à décanté. La phase organique combinée (de la première et la deuxième extraction) est

déshydratée de l'eau par ajout de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre. Elle ensuite évaporée à 40 °C dans évaporateur à vide (Rotavap) et le biosurfactant issue de chaque extraction est pesé.

## 2.2. TESTS DE TOXICITE SUR L'ARTEMIA

### 2.2.1. Élevage de l'artémia

- *Origine de l'artémia*

L'artémia utilisée dans notre étude est disponibles au niveau de la division de recherche Aquaculture du CNRDPA. Il s'agit de cystes déshydratés (lyophilisés) conditionnés en boîte par « INVE Aquaculture Nutrition, USA » (figure 2.2).



**Figure 2.2 : Cystes de l'artémia prêts à utiliser.**

- *Préparation de l'eau de dilution*

L'artémia est un crustacé marin vit dans des conditions de salinités, oxygène, températures et pH bien contrôlées afin de réussir son maintien.

L'eau de dilution utilisée est soit une eau de mer artificielle dont la composition est (g/l d'eau distillée) : 32 NaCl ; 14  $\text{MgSO}_4$  et 0,2  $\text{NaHCO}_3$ . Cette eau a été remplacée (pour son déficit en oligo-éléments indispensables à la croissance de l'artémia) par une eau de mer naturelle d'un endroit non pollué. Cette eau est aérée pendant 24 h afin de remonter le taux d'oxygène jusqu'à une valeur minimale de 90 % de saturation selon **Vanhaecke et al. [76]**. Ainsi, le pH de l'eau doit ajuster – si nécessaire – à  $8 \pm 0,5$  selon les mêmes auteurs.

Les caractéristiques de notre eau de mer est la suivante :

- ✓ Salinité : 37 ‰ (ou g/Kg) ;
- ✓  $\text{O}_2$  : 101,2% de saturation ;
- ✓ pH : 7,8.

Avant que l'eau soit employée elle devrait de préférence être pré filtrée sur un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité pour éliminer les déchets, les bactéries et les microalgues.

- ***Eclosion et préparation des nauplius***

Une quantité de 100mg de cystes d'artémia a été introduire dans une ampoule à décanté contenant 100 ml de l'eau de mer (l'eau de dilution).Les cystes d'artémia sont maintenus en suspension et oxygénation à l'aide d'une aération douce fournie par un moteur d'air. De même, le montage est illuminé par des lampes latérales (Figure 2.3)



**Figure2.3 : Montage d'éclosion et préparation des nauplius**

**Selon Vanhaecke et al. [76]** Les conditions optimales d'incubation des cystes sont les suivantes :

- ✓ Température : 25°C ;
- ✓ Intensité lumineuse minimale : 500 Lux ;
- ✓ Durée d'incubation : 18h jusqu'à 24h.

Après ce temps d'incubation, l'aération est arrêtée et les cystes sont laissés décantés pendant pas plus de 15min, ce qui pour but de faire séparer les œufs non éclos des nauplius du premier stade et des cystes vides (flottés à la surface de l'eau). Cette séparation est d'autant améliorée en exposant les nauplius à la lumière (à l'aide d'une torche) dans la zone intermédiaire de l'ampoule. Les cystes non éclos sont alors siphonnés par le robinet du bas et les nauplius sont récupérés dans un tamis de moins de 150  $\mu\text{m}$  de maille où ils subissent un rinçage avec de l'eau de mer fraîche. Cette opération a pour but d'éliminer les métabolites d'éclosion et le glycérol produit. Les nauplius sont récupérés dans un bac

contenant une eau de mer fraîche. Après un court temps (environ 2 à 5 min) nous observons que les nauplius se concentrent aux coins du bac. Un nombre suffisant est alors transféré dans une autre ampoule contenant 200 ml d'eau de mer fraîche et incubés pendant exactement 24 h dans les mêmes conditions cités en haut. Durant ce temps, les nauplius du stade I sont transférés en stade II et certains en stade III.

### **2.2.2. Déroulement de l'essai**

Les tests d'écotoxicologie sur l'artémia se feront, bien entendu avec des nauplius du deuxième stade. Les différentes étapes de l'essai sont résumées comme suit :

- ✓ Préparation des solutions du toxique (matériel testés). Dans le cas où nous ne connaissons pas la toxicité du produit, un test préliminaire avec des concentrations décimales (ou pourcentages décimaux) est de préférence procédé, afin de déterminer la gamme de concentration dans laquelle est située la CL 50 (p. ex : 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ... mg/l, etc.)
- ✓ Distribuer un volume de 5 ml de chaque solution sur boîtes de pétri d'un diamètre de 60 mm et compléter avec 5 ml de l'eau de mer dans laquelle 10 individus d'artémia sont prises (à l'aide d'une pipette pasteur).
- ✓ Trois replicats pour chaque concentration de solution testée ainsi que du témoin approprié sont préparés.
- ✓ Mettre les boîtes dans un incubateur à 25°C à l'obscurité pendant 24h.
- ✓ Après 24h d'incubation compter le nombre de mort et le nombre total dans chaque boîte et mesurer le taux d'oxygène dans la dilution minimale qui tue 100 % des individus. Ce taux ne doit pas être inférieur à 2 mg/l pour que le test soit considéré valide.

### **2.2.3. Matériel testé**

- ***Toxique de référence***

Le toxique de référence est le surfactant chimique Lauryl sulfate de sodium(SDS). Il sert comme un contrôle positif pour la validité de l'essai. Les concentrations testées (préconisé par Vanhaecke et al. [76]) sont les suivantes (mg/l) : 10 ; 13,5 ; 18 ; 24 et 32. La CL 50 du SDS doit se situer entre 13,3 et 19,9 mg/l pour que le test soit valide.

- ***Surfactant Tween 80***

Un test préliminaire avec une solution mère de 20 g/l est réalisé pour le surfactant Tween 80. Les dilutions décimales préparées sont : 1, 10, 100, 1000 et 10000 mg/l.

- ***Biosurfactant et surnageant de culture***

- ❖ ***Biosurfactant***

Les concentrations de biosurfactants sont déterminées en se basant sur sa propriété micellaire. La CMC du HF644 synthétisé dans le MMB est 780 mg/l [77] La CMC du HF644 issu du milieu riche (LB) n'a pas été déterminée. Néanmoins et vu que le produit est synthétisé avec la souche bactérienne, avec la même source de carbone, nous s'attendons que les propriétés micellaires des deux produits ne se diffèrent pas beaucoup. La gamme de concentration choisie s'étale des concentrations inférieures à la CMC, égales à la CMC et supérieure à la CMC.

- ❖ ***Surnageant de culture***

Les surnageant de culture (issu des milieux LB et MB) considérés comme étant le biosurfactant brut est étudiés dans la gamme de concentration suivante : 0,1% ; 0,5% ; 1%, 2% ; 3% ; 4% ; 5% ; 10% et 50 %.

- ❖ ***Culture de la souche SdK644***

La toxicité de la souche bactérienne sur l'artémia a été déterminée à partir d'une préculture dans le milieu LB. Les concentrations testés sont: 0,5% ; 1% ; 2% ; 3% ; 4% ; et 5%. À chaque concentration un témoin de milieu LB stérile est préparé dans les mêmes conditions.

- ***Pétrole brut et ses fractions majoritaires***

- ❖ ***Pétrole brut***

Les tests sur l'artémia étant réalisés avec des solutions aqueuses, le pétrole est cependant très peu soluble dans l'eau. Pour résoudre ce problème nous avons utilisé un solvant polaire organique, aprotique (qui a la propriété de solubiliser les composés polaire et apolaire). De plus, il est connu de sa faible toxicité. D'après nos essais, le maximum de solubilité du pétrole dans ce solvant est 0,4 % (v/v). Du coup, une série de dilution du pétrole dans 25 ml de DMSO a été préparée pour couvrir les concentrations (v/v) de :

0,006 % ; 0,016 % ; 0,1 % ; 0,2 % ; 0,3 % et 0,4%. À partir de ces dilutions nous avons prélevé 2 ml chacune et compléter à 10 ml avec de l'eau de mer (soit 20 % des solutions dans le DMSO) pour obtenir les concentrations suivantes : 3 ; 7 ; 43 ; 85 ; 128 et 171 mg/l. Un témoin en triplicatas avec 20 % DMSO est préparé en parallèle pour noter la mortalité dû à l'effet du DMSO seul.

#### ❖ *Fractions majoritaires du pétrole*

Le pétrole est composé principalement d'une fraction aliphatique et une fraction aromatique dont le pourcentage vari selon l'origine du brut. Nous avons testé chaque fraction séparément.

##### ✓ *Aliphatique*

À partir d'une solution mère de la fraction aliphatique (préparée dans le DMSO) nous avons prélevé 30 ; 160 ; 320 ; 950 ; 1590 et 2000 µl de chaque solution. Un témoin pour chaque dilution est préparé en parallèle (avec le même volume du DMSO seul).

##### ✓ *Aromatique*

Les mêmes dilutions ont préparées avec la fraction aromatique. Toutefois, la concentration de cette solution mère est très faible, ce qui ne pas nous permet des concentrations assez élevées.

#### **2.2.4. Visualisation microscopique de l'effet des toxiques sur la morphologie de l'artémia**

Les nauplius de l'artémia sont observés au microscope optique assisté par ordinateur pour voir les changements morphologiques survenus sur l'artémia après exposition de 24 h avec le toxique. Les individus morts ont été comparés avec ceux du témoin (vivants) pour en déduire les différences. Une goutte contenant l'individu mort est observé directement avec un grossissement de 100 fois (une taille d'environ 600 µm pour un nauplius de stade II). Les individus vivants sont anesthésié une solution de 5 % (v/v) de chloroforme avant d'être puisse observer sous microscope.

#### **2.2.5 Détermination de la CL50 et traitement statistique des résultats**

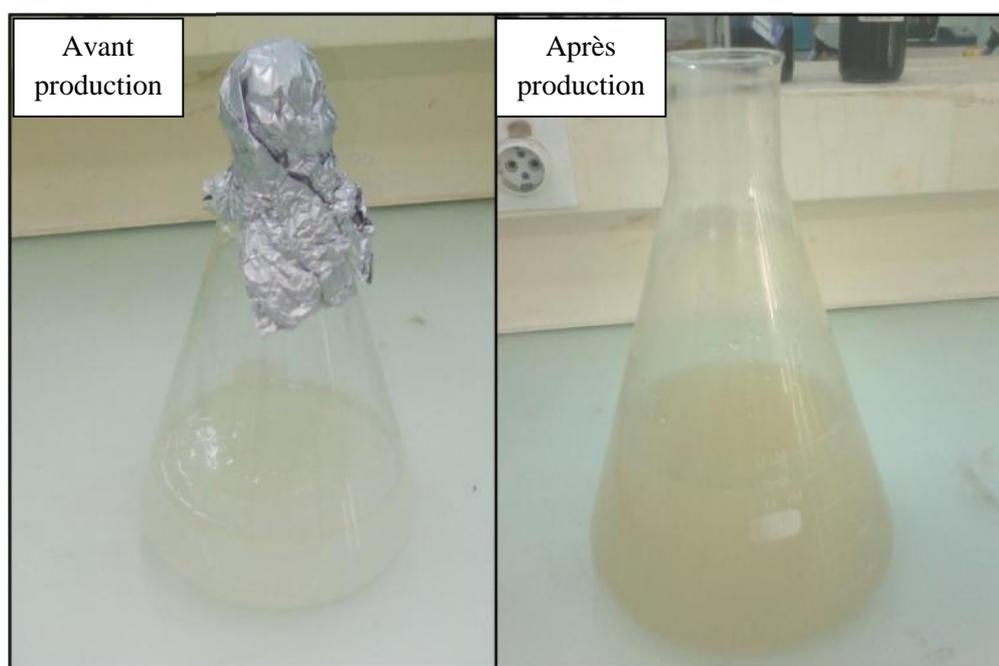
La CL<sub>50</sub> et son intervalle de confiance à 95 % est déterminé par un logiciel XLSTAT avec qui utilise la méthode des probits.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

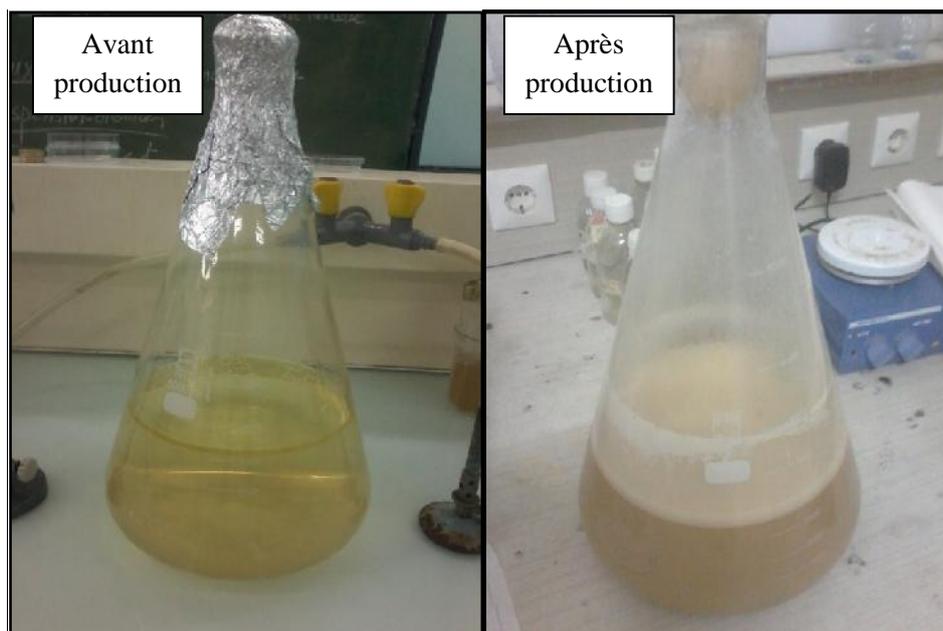
### 3.1 PRODUCTION DE BIOSURFACTANT

#### 3.1.1 Extraction et purification émulsion

Après trois jours d'incubation dans les conditions optimales, La production de biosurfactant par la souche SdK644 a été étudiée sur deux milieux (MM et LB). Nous avons remarqué une formation de l'émulsion qui indique la production de biosurfactant (figure 3.1 et figure 3.2).



**Figure 3.1 : La production de biosurfactant par la souche SdK644 dans le milieu MM**



**Figure 3.2 : La production de biosurfactant par la souche SdK644 dans le milieu LB**

Ce changement visuel, témoin de la production de biosurfactant a été confirmé avec un test de déplacement de pétrole comme le montre la figure 3.3.



**Figure 3.3: Déplacement de pétrole suite à l'application du biosurfactant brut (MM , LB) et témoin eau distillée .**

Les résultats de ce test montre que le surnageant HF644 possède une grande activité de surface avec un diamètre de 7cm. Il a permis de chasser le pétrole jusqu'aux bords de la boîte de pétri suite à la réduction des tensions interfaciales entre celui-ci et l'eau distillée.

### 3.1.2 Extraction et purification partielle de biosurfactant

Nous allons utiliser deux méthodes d'extraction :

✓ *Précipitation acide*

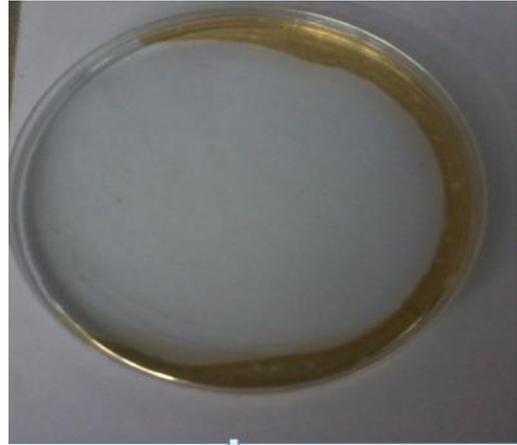


**Figure 3.4 : Précipitation acide de surnageant MM après une nuit de réfrigération à 4°C**

Après une nuit de réfrigération à 4°C le précipité est récupéré par centrifugation comme le montre la figure 3.5. Nous avons testé l'activité de surnageant par déplacement de pétrole (figure 3.6) et le résultat obtenu montre qu'il reste une activité de surface dans le surnageant. Dans ces conditions, la précipitation n'a pas été lieu. Pour cela nous avons utilisé une autre méthode pour extraire et purifier le biosurfactant c'est l'extraction par solvant pour améliorer le rendement de biosurfactant.



**Figure 3.5 : Précipité récupéré**



**Figure 3.6 : Déplacement de pétrole**

**de surnageant après la récupération de précipité**

✓ *Extraction par solvant*

Le filtrat correspondant au biosurfactant brut est extrait deux fois par trois solvants (v/v) par l'acétate d'éthyle, (v/v) par Dichlorométhane (DCM) et par (2V/V) Chloroforme méthanol. Nous allons obtenu avec l'acétate d'éthyle de un rendement de 3.65g/l contre un rendement de 0.39g/l avec Chloroforme méthanol et 0 g/l avec Dichlorométhane. L'acétate d'éthyle est considéré le meilleur solvant pour extraire le biosurfactant.

Le solvant (l'acétate d'éthyle) est ensuite évaporé à l'aide d'un rotavapeur à une température de 40 °C.

Le produit obtenu est un liquide visqueux d'une couleur jaune ressemblant à l'aspect du miel.



**Figure 3.7 : Purification partielle du biosurfactant HF644**

Après extraction et purification partielle du biosurfactant HF644 à l'aide de l'acétate d'éthyle, nous avons obtenu un liquide visqueux d'une couleur jaune similaire à l'aspect du miel. Le rendement total d'extraction (après la première et la deuxième extraction) est de 3.65 g/L. biosurfactant par litre de MMB additionné de 2% d'huile de friture comme seule source de carbone.

Toutes les études portant sur la production des biosurfactants montrent, après la sélection de microorganisme producteur, l'importance du choix de la source du carbone, que ce soit un hydrocarbure, un glucide, une huile, etc. Cette source joue un rôle déterminant dans le taux de production ainsi que sur la nature du biosurfactant synthétisé

Plusieurs travaux ont sélectionné une variété de sources de carbone pour une meilleure production de biosurfactant, le gasoil et le pétrole [78], l'hexadécane [79,80], l'huile de tournesol résiduelle de friture [81], l'huile d'olive [82], le pétrole et l'huile d'olive [83]. Ils montrent que les huiles végétales présente une bonne production de biosurfactant qui se traduit par la réduction de la tension de surface avec un grand diamètre de déplacement de pétrole (8 cm) [82]. L'huile végétale peut être également utilisée comme une source de carbone à cause de la faible tension de surface.

Santos *et al* (2010) [84] ont indiqué que l'utilisation des huiles végétales comme seule source de carbone ont un grand potentiel comme substrat dans la production de biosurfactant par les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le rendement de production obtenu avec notre souche bactérienne Sdk644 sur la HF (3.65 g/l) est très acceptable par rapport aux rendements obtenus cités dans la littérature. En effet, Haba *et al* (2000) [85] avec un rendement moindre de 2,9 g/l en présence de l'huile de friture. Abouseoud *et al* (2008) [80] ont trouvé un rendement similaire (2 g/l) avec l'huile d'olive comme source de carbone. Ainsi, Edouaouda *et al* (2012) [80] ont trouvé un rendement de 2,1 g/l de biosurfactant avec l'huile d'olive comme source inductrice de carbone (1 % v/v) dans un milieu riche LB.

Ferhat *et al* (2011) [75] ont trouvé un rendement de production de 2,0 g/l pour une souche *Brevibacterium* sp. 7G et 2,5 g/l pour une souche *Ochrobactrum* sp. 1C en utilisant l'hexadécane à 2 % (v/v) comme source de carbone. Wadekar *et al* (2012) [86] ont obtenu un rendement de 2,8 g/l avec l'huile de friture à 5 % (m/v) et une souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 cultivée dans un milieu minéral de base. Zhu *et al* (2007) [87]

ont trouvé un rendement de 12,47 g/l d'un rhamnolipide produit par une souche *Pseudomonas aeruginosa* zju.uIM. Dans les mêmes conditions, le rendement de production a augmenté à 20 g/l en utilisant un bioréacteur de 50 litres. De Lima et al (2009) [88] ont obtenu un rendement de 3,3 g/l avec l'huile de friture de soja à une concentration de 22 g/l et une souche de *Pseudomonas aeruginosa* PACL cultivé dans un bioréacteur de 10 litre.

De Gusmão et al (2010) [89] ont pu achever à un rendement de 7,0 g/l avec une souche de levure *Candida glabrata* UCP1002 cultivée avec 5 % (m/v) de graisses végétales utilisées

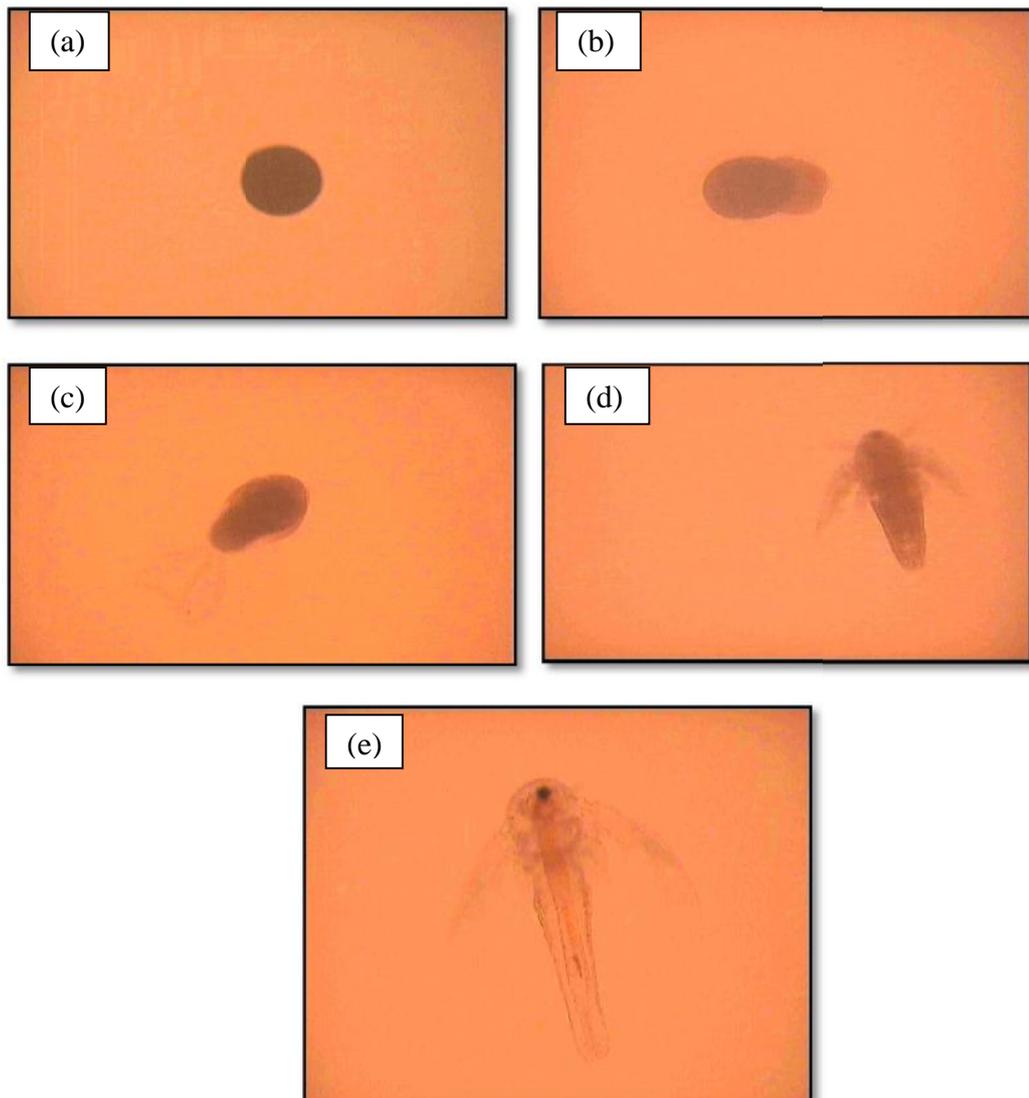
Thavasi et al (2011) [90] ont évalué la production de biosurfactant avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de la HMU et un cake de l'huile d'arachide. Ils ont achevé à un rendement plus élevé avec la deuxième source (6,45 g/l) qu'avec la HMU (4,37 g/l). Noparat et al (2014) [91] ont pu abouti à un rendement de biosurfactant de 4,52 g/l avec le cake de l'huile d'arachide.

Dans leurs travaux, WU et al (2008) [92] ont pu produire par *Pseudomonas aeruginosa* 3,70g/l et 2,63g/l de biosurfactant en utilisant l'huile d'olive et l'huile soja comme source de carbone respectivement. Par ailleurs, COSTA et al (2006), RAHMAN et al (2002) [93,94], signalent la production de 2,9 g/l de biosurfactant en présence de l'huile de carthame et de l'huile de friture respectivement par la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

## 3.2 ÉTUDE ECOTOXICOLOGIQUE SUR L'ARTEMIA

### 3.2.1 Suivi de l'éclosion des cystes et développement des nauplius

Les étapes qui précèdent l'obtention des nauplius stade II ont été suivies par une observation microscopique avec un microscope photonique avant et après 24 h de l'éclosion. Différentes formes morphologiques ont été prises ; cystes non éclos, juste à l'éclosion et après éclosion et développement jusqu'au stade II (figure 3.8).



**Figure 3.8 : Étapes d'éclosion des cystes d'Artémia observées au grossissement GX10. (a) Cystes d'Artémia, (b) prés-nauplii (stade1), (c) prés-nauplii (stade2), (d) nauplii fraîchement éclos (stade1), (e) nauplii stade 2.**

### 3.3.2 Choix des nauplius

Comme il a été montré par Sergeloos *et al* [74], les nauplius des deuxièmes stades sont les plus sensibles à l'effet des toxiques. Pour cela, tous les tests présentés dans cette partie ont été réalisés avec des nauplius du deuxième stade.

### 3.2.3 ÉTUDE DE LA TOXICITE

#### 3.2.3.1 Qualité physico-chimique de l'eau de mer

La qualité de l'eau de dilution joue un rôle très important dans les essais écotoxicologique sur l'artémia, une eau de mer faible en oligo-éléments nécessaire à la croissance de l'artémia donnera des mauvais résultats. Cela a été le cas avec une eau de mer artificielle qui ne contient que l'ion bicarbonate, le magnésium et le sodium. Le rendement d'éclosion était très faible. Cette eau a été remplacée avec une eau de mer naturelle d'un même endroit, non polluée et dans les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ PH=8,23 ;
- ✓ Salinité=35,8 g/Kg ;
- ✓ Conductivité = 54,4 mS/cm ;
- ✓ Oxygène dissous = 101,3 % ;

Cette eau a été utilisée dans tous les essais de toxicité, les valeurs trouvées ici (après aération de l'eau pendant 24 h) sont conformes aux exigences sur la qualité des eaux de dilutions proposées par Vanhaecke *et al.* 1981 [76].

#### 3.2.3.2 Toxicité de surfactant chimique (SDS) sur l'Artémia et validité des essais

Le surfactant SDS a été utilisé comme toxique de référence, sa toxicité sur l'artémia est bien connu, quel que soit son origine. Le tableau 3.1 montre les résultats des quatre (04) tests de vérification avec ce surfactant.

**Tableau 3.1 : Les concentrations létales de SDS sur l'Artémia.**

Test	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
CL <sub>50</sub> (mg/l) et intervalle de confiance à 95 %	27,2 (22,58-28,07)	19,45 (17,42-23,26)	15,87 (15,98-22,66)	16,21 (15,25-19,84)

Selon Vanhaecke et al 1981 [76], le test de toxicité sur l'artémia est considéré valide si la CL50-24 heure du SDS est située entre 13,3 et 19,9 mg/l et la mortalité dans l'essai témoin ne devrait pas dépasser 10 %.

La détermination de la CL50-24h a été obtenue à l'aide d'un logiciel XLSTAT qui permettra de donner la relation qui existe entre la concentration et la mortalité selon le modèle des probits. Ainsi, le logiciel permettra de calculer les bornes inférieures et supérieures (C.-à-d., intervalle de confiance) de l'oscillation de la CL50 à 95 %, ce qui vaut dire une marge d'erreur maximale (ou plutôt un risque de 5 %).

Dans le premier essai nous avons trouvé une CL50 supérieure à 19,9mg/l, la mortalité dans le témoin était de même supérieure à 10 % (10,83 %). Ce résultat est obtenu dans les premières expériences que nous avons réalisées. C'était une étape de familiarisation avec les manipulations de l'artémia. Les expériences ont été faites avec une eau de mer artificielle pauvre en oligo-éléments, ce qui peut être entraînée une mortalité assez élevée dans l'essai témoin. La CL50 trouvée avec le SDS dans ce test dépasse le seuil admissible, donc le SDS est apparu moins toxique de l'habitude. Il se pourrait que ces valeurs sont le résultat d'une mauvaise manipulation des artémia où des nauplius du premier et du deuxième stade se trouvent associés dans les biotes de pétri incubées. Avec le temps, nous avons acquis une expérience qui nous permettra de distinguer les nauplius des deux stades avant de les ensemercer dans les boîtes de pétri. Ainsi, les conditions opératoires de l'éclosion et de transfert des nauplius ont été nettement améliorées. Un test de toxicité sur le biosurfactant HF644 du milieu LB a été déroulé en même temps avec le premier test sur la toxicité du SDS. L'essai est donc été refait une deuxième fois pour obtenir des résultats fiables. Pour le reste, nous avons trouvé des valeurs dans la limite consignée (c.-à-d. une CL50 entre 13,3 et 19,9 mg/l).

Selon Viala [95] des valeurs de la CL50 inférieures à 50 mg/l approuve que le produit soit toxique. Le SDS est toxique à la vie aquatique marine.

La toxicité aiguë du SDS est élevée, et l'accord entre les résultats obtenus avec différentes espèces a été également vérifié (LC50 obtenus n'ont pas considérablement différées de d'une espèce à une autre). Encore, la sensibilité était plus haute quand l'artémia a été employé comme organisme test [96].

Une étude détaillée au sujet des effets des détergents sur l'environnement a été faite par Cserhàti *et al.* [97] quelles sont ces effets, détaillés. Le SDS a été référencé parmi les composés les plus toxiques, même aux concentrations de 50ppm [96].

Sur la base des essais de toxicité aux organismes aquatiques ont conclu que tous les agents tensio-actifs anioniques étaient nocif (CL50 entre 10 et 100 mg/l)

Liwerska-Bizukojc *et al* [98] Ont testé la toxicité de SDS sur *Artémia salina* et les résultats obtenus ont été analysés par la méthode de probit. La CL50 était 41,04 mg/l (35,9-49,6 mg/l).

### 3.2.3.3 Toxicité de tween 80 sur l'Artémia

Un autre surfactant, très utilisé en microbiologie et biotechnologie a été testé pour sa toxicité ; le Tween 80, un surfactant non ionique utilisé comme agent émulsifiant. Nous avons préparé des concentrations décimales à partir d'une solution mère de 20 g/l. Contrairement au SDS, le tween 80 est très soluble dans l'eau. Les résultats de toxicité de tween 80 sur l'Artémia sont présentés sur le tableau 3.2.

**Tableau 3.2 : Effet de tween80 sur l'Artémia.**

<i>Concentrations (mg/L)</i>	<i>Artémia testés</i>	<i>Artémia mortes</i>
1	10	0
10	9	0
100	11	0
1000	11	1
10000	11	1

Les résultats du test préliminaire montre que le tween 80 est non toxique sur l'*A. franciscana*. La mortalité la plus grande n'a pas atteinte 10 % (limite de validation du test sur le témoin). Afin de confirmer ce résultat, un essai en triplicat a été procédé avec la concentration la plus élevée (10000 mg/l). Les résultats ont donné un taux de mortalité de  $10 \pm 9,8$  %. Le non toxicité de tween 80 est donc confirmé.

Le tween80 est largement utilisé dans le domaine pharmaceutique du fait de son caractère non toxique. Les préparations pharmaceutiques sont en général des formulations complexes qui ont pour but de donner à chaque substance active la présentation médicamenteuse la mieux adaptée pour obtenir l'effet thérapeutique désiré. Il ne suffit pas

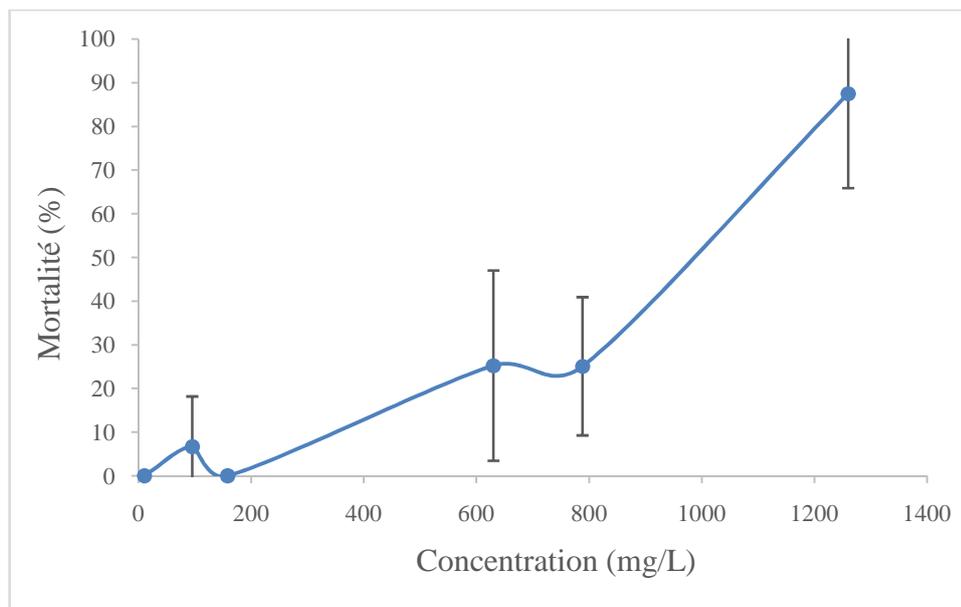
d'administrer un certain nombre de prises unitaires parfaitement dosées, il faut de plus que la forme pharmaceutique envisagée libère les principes actifs pour les mettre à la disposition de l'organisme dans des délais prédéterminés. Les propriétés physiques, chimiques et thérapeutiques des principes actifs conditionnent des facteurs qui entrent en jeu dans la mise au point d'un médicament. Nous illustrons par une formule l'utilisation de tween80 : **Suspension Antispasmodique** :

<i>Khelline</i>	<b>0,5 g</b>
<i>Carboxyméthylcellulose</i>	0,6 g
<i>Tween 80</i>	0,4g
<i>Eau distillée isotonisée q.s.p.</i>	100 ml

La Khelline est un principe actif antispasmodique d'origine végétale solide, il est insoluble dans la phase externe aqueuse. L'agent dispersant est un dérivé du sorbitol (le tween 80) et l'agent stabilisant est la Carboxyméthylcellulose [99].

#### **3.2.3.4 Toxicité du biosurfactant HF644 produit dans le milieu riche**

Les résultats de toxicité de biosurfactant HF644-LB sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.9 :



**Figure 3.9 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de biosurfactant HF644-LB**

Les résultats expérimentaux montrent que la mortalité varie proportionnellement avec la concentration du biosurfactant pour des valeurs au-delà de 150 mg/l, pour des valeurs inférieures la concentration ne provoque pas d'effet sur la mortalité (une mortalité inférieure à 10 %).

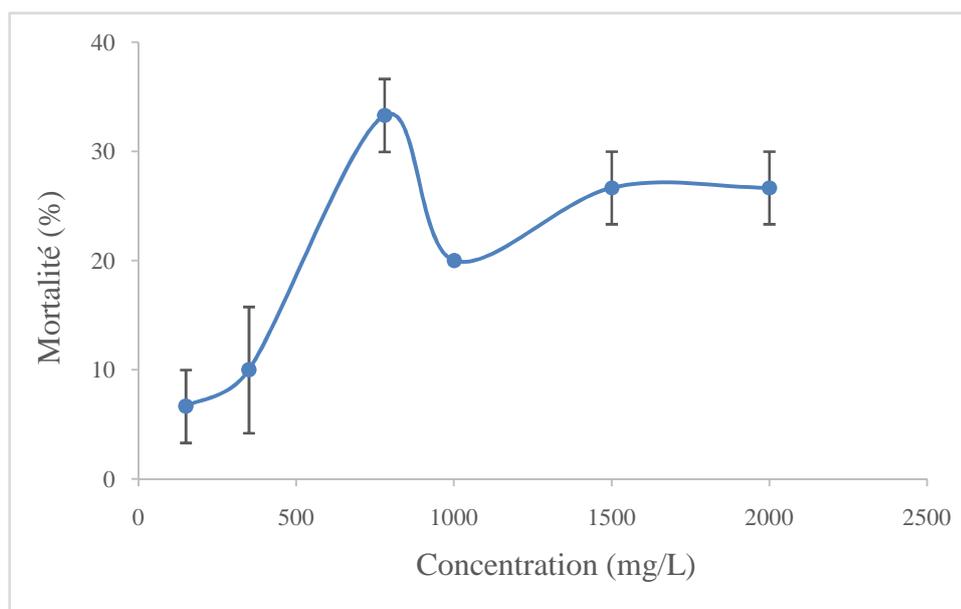
La CL50 du biosurfactant HF644 produit dans le milieu riche LB et son intervalle de confiance a été déterminé par le modèle des probites par le logiciel XLSTAT.

CL50 = 929,34 mg/l (794,59-1109 mg/l).

D'après Meyer et *al* [100], une substance bioactive est considérée comme non toxique si sa concentration dépasse 500 mg/l. Le biosurfactant HF644-LB est donc un produit non toxique.

### 3.2.3.5 Toxicité du biosurfactant HF644 produit dans le milieu minimum

Les résultats de toxicité de biosurfactant de MM sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.10 :



**Figure 3.10 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de biosurfactant HF644-MM**

Les résultats expérimentaux montrent que la mortalité évolue positivement avec la concentration du biosurfactant jusqu'à une valeur de 780 mg/l, au-delà, la mortalité oscille dans un intervalle entre 20 et 30 %. La mortalité semble être in affectée avec les changements de la concentration dans ce domaine.

La CL50 du biosurfactant HF644 produit dans le milieu riche MM et son intervalle de confiance a été déterminé par le modèle des probits par le logiciel XLSTAT.

$$CL50 = 8063,3 \text{ mg/l} (2761,6-8877700,09 \text{ mg/l}).$$

Le logiciel, donnera une CL50 très loin par rapport aux mortalités trouvées pour des concentrations testées allant jusqu'à 2000 mg/l. Le plus étonnant dans ces données établies est les limites inférieures, mais surtout supérieure (8877700,09 mg/L, c.-à-d. de l'ordre de  $10^7$  mg/l) de l'intervalle de confiance, on admettant un risque de 5 %. Cela signifie que le logiciel a failli à déterminer la marge d'erreur supérieure vue que les résultats prennent une allure presque constante plutôt que croissante à partir de la concentration 780 mg/l. Nous avons essayé de réorganiser les données de tel façon que nous obtiendrons une allure croissante des résultats pour voir ce que ça donne. Les résultats (comparatifs) sont portés dans le tableau 3.3

**Tableau 3.3 : les résultats comparatifs entre les essais réels et fictifs.**

<b>Essai</b>	<b>Réel</b>	<b>Fictif</b>
Mortalité (%)	6,7 ; 10 ; 33,3 ; 20 ; 26,7 ; 26,7	6,7 ; 10 ; 20 ; 26,7 ; 26,7 ; 33,3
CL50 et IC (mg/l)	8063,3 (2761,6-8877700,09)	5479,4 (2424,3-154373,2)

Nous observons qu'avec cette allure ascendante de la mortalité, la CL50 a diminué à plus de 2500 mg/l et sont borne supérieure de l'intervalle de confiance est environ 100 fois moins par rapport au cas réel. L'hétérogénéité des données de la mortalité à causer tant d'erreur. Nous pouvons expliquer cette hétérogénéité par les propriétés micellaires du biosurfactant HF644-MM. La concentration de 780 mg/l correspond en fait à la valeur de la CMC du produit [4]. La CMC est la concentration à partir de laquelle une augmentation de la concentration ne provoque pas une diminution notable de la tension de surface. C'est la valeur critique conduisait à la formation des micelles. Nous avons remarqué que dans l'intervalle entre la CMC et 2000 mg/l, la tension de surface augmente légèrement [101]. Ceci prouve que les propriétés tensio-actives du HF644 sont presque constantes, ce qui se répercute sur la toxicité du produit.

De França *et al.* [4] Ont trouvé une CL50 de 500 mg/l pour un biosurfactant dont la CMC est 25 mg/l.

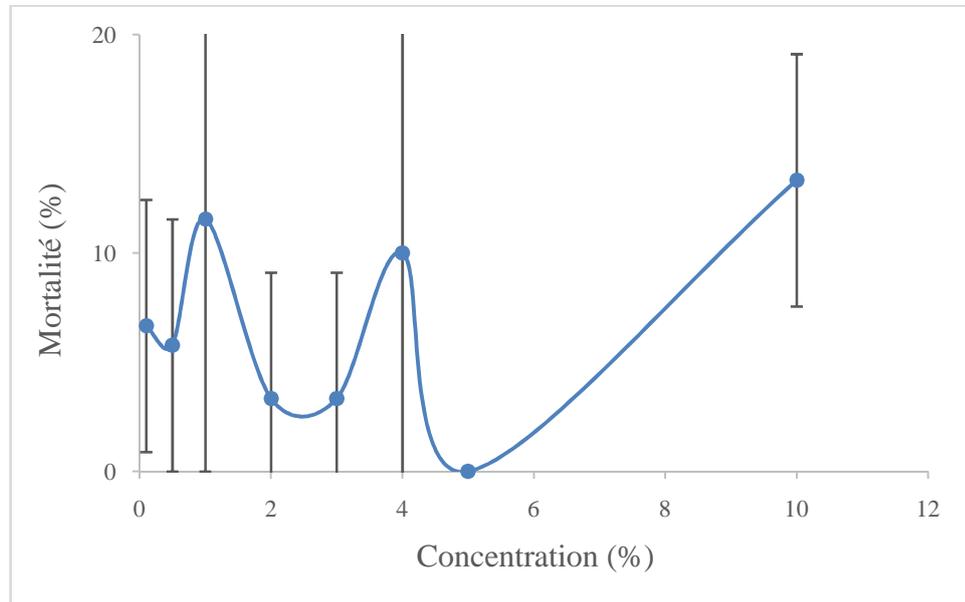
**Brasileiro *et al*** [5] ont trouvé que le biosurfactant produit par *Candida. Guilliermondii* n'a montré aucune toxicité contre le micro-crustacée *Artémia salina* indépendamment aux concentrations utilisées (1/2 la CMC et la CMC). Dans les études, les essais de toxicité montrés que le biosurfactant causé létalité de 100 et 50 % une fois examiné aux concentrations élevées de 700 et 525 mg/l, respectivement [5].

**Souza et al en 2013**[6] ont trouvé que les valeurs CL50 aux concentrations biosurfactant de 200 et 400 mg/l n'étaient pas dues calculer au bas pourcentage de la mortalité (moins de 50%). Quatre-vingts pour cent des Artémias sont demeurés vivants à une concentration de 200 mg/l et 70% est resté vivant à une concentration de 400 mg/l. Ces résultats démontrent des faibles degrés de toxicité du biosurfactant produit par *Candida sphaerica* examiné.

**Diniz Rufino et al (2014)** [102] ont étudié la toxicité d'un biosurfactant produit par *Candida lipolytica* sur *Artémia Salina* avec ces concentrations 150 mg/l, 300 mg/l et 600 mg/l. Les résultats indiquent une faible toxicité du biosurfactant de *C.lipolytica* UCP0988.

### 3.2.3.6 Toxicité du surnageant LB

Les résultats de toxicité du surnageant de milieu LB sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.11 :

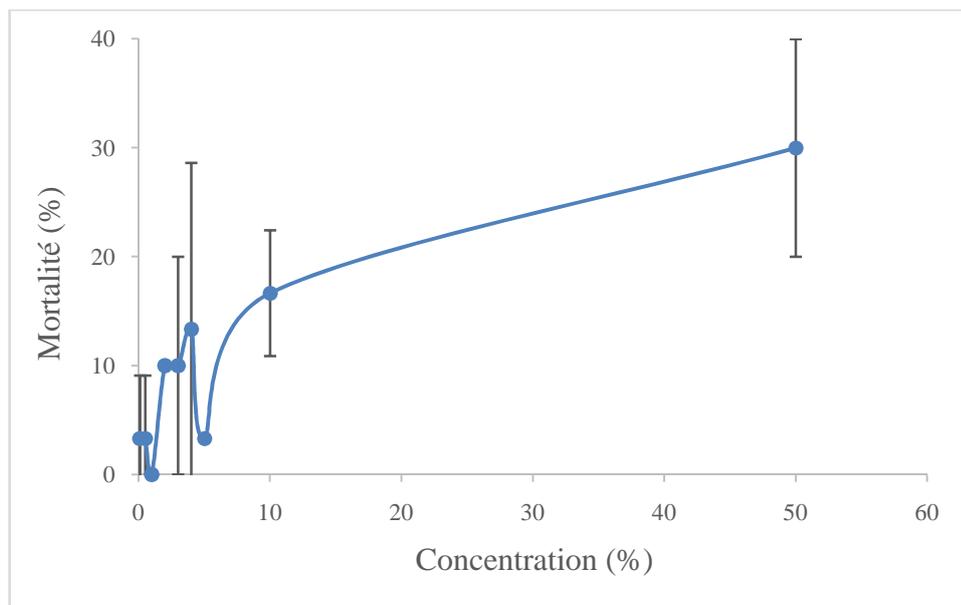


**Figure 3.11 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de surnageant LB.**

Les résultats présentés sur cette figure montrent que le surnageant du milieu LB est pratiquement non toxique. Nous avons enregistré une mortalité de 13 % à une concentration maximale de biosurfactant brut à 10 %. À cette concentration, l'activité tensioactive du surnageant (le biosurfactant brut) est relativement faible, les individus de *A. franciscana* sont donc exposés à des faibles concentrations du biomolécule. Ce qui pour résultat, une faible mortalité entraine.

### 3.2.3.7 Toxicité du surnageant MM

Les résultats de toxicité du surnageant du milieu minimum sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.12 :



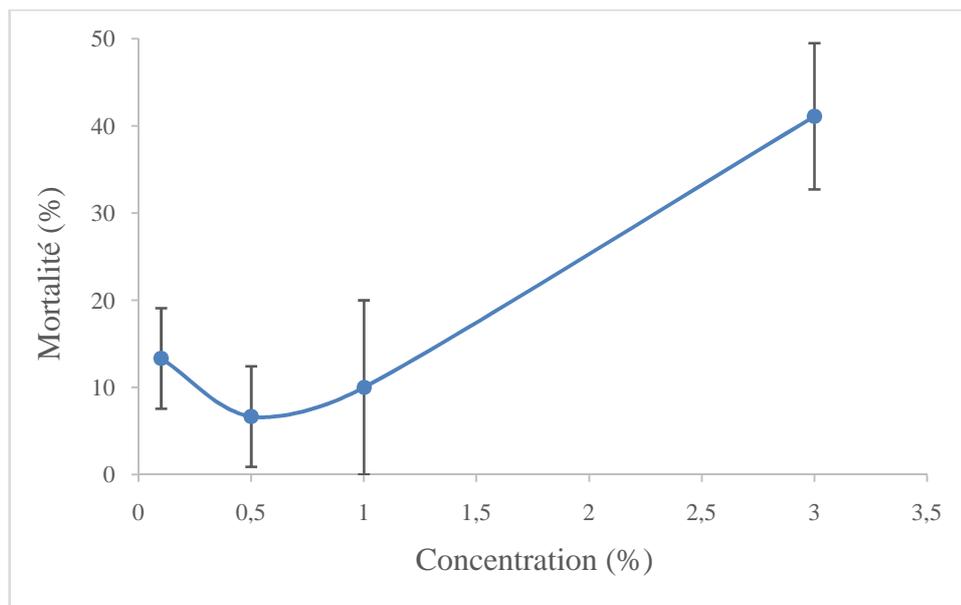
**Figure 3.12 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de surnageant MM**

Les résultats expérimentaux montrent que la mortalité est in affectée par l'effet de la concentration jusqu'à une valeur de 10 % (mortalité correspondante de 16 %). De 10 à 50 % de concentration en biosurfactant, la mortalité est presque doublée, mais reste inférieure à limite médiane. La portée des résultats dans le modèle probit ainsi montre que la variable réponse (mortalité) est indépendante de la concentration.

Le biosurfactant brut (surnageant de culture) du milieu minimum est pratiquement non toxique vis-à-vis le crustacé *A. franciscana*. Une des propriétés importantes des biosurfactants est la CMD (concentration micellaire diluée). Trois dilutions typiques sont généralement pris en compte dans l'étude de cette propriété ; CMD1, CMD10 et CMD100 qui correspond respectivement : à la concentration mère du surnageant (c.-à-d. 100 %), à une dilution dix (10) fois et à une dilution cent (100) fois. La toxicité de la CMD10 et CMD100 sont toutes les deux inférieures à 20 %, la toxicité du CMD1 est non envisageable à cause de la procédure d'ensemencement qui exige une dilution minimale de deux fois.

### 3.2.3.8 Toxicité de culture fraîche

Les résultats de toxicité de la culture fraîche sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.13 :



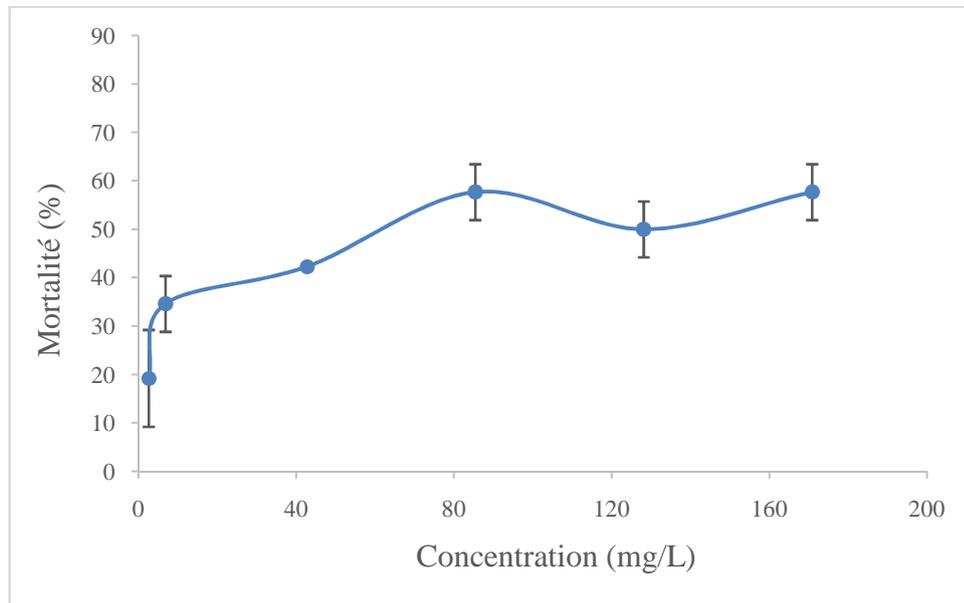
**Figure 3.15 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de culture fraîche**

Les données recueillies de la toxicité de la culture fraîche (proprement dit la toxicité de la bactérie sur l'artémia) révèle que jusqu'à un inoculum de 1 % la mortalité est insignifiante. Au-delà, l'effet toxique de la préculture remonte pour atteindre une valeur de plus de 40 % pour un inoculum de 3 %. La CL50 de culture fraîche et son intervalle de confiance déterminée par le logiciel XLSTAT est de 3,77 % (2,33-54,43%). Les résultats obtenus montrent que la préculture de la souche SdK644 est toxique à certaine concentration (i.e. 3,77 %). Toutefois, un inoculum de 1 % ne provoque pas un effet toxique sur l'artémia. Des expériences précédentes sur la dégradation du pétrole par cette souche bactérienne dans un environnement salin ont montré qu'avec cet inoculum la croissance bactérienne est maintenue.

Nous signalons enfin que ce type d'expérience devrait se faire avec des extraits lyophilisés de la souche bactérienne et c'est les dilutions de cet extrait qui seront utilisés en écotoxicologie sur l'artémia. Ceci sort de notre capacité vue les faibles rendements obtenu lors de la récupération de la biomasse microbienne.

### 3.2.3.9 Toxicité de pétrole brut

Les résultats de toxicité de pétrole brut sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.14 :



**Figure 3.14 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de pétrole brut**

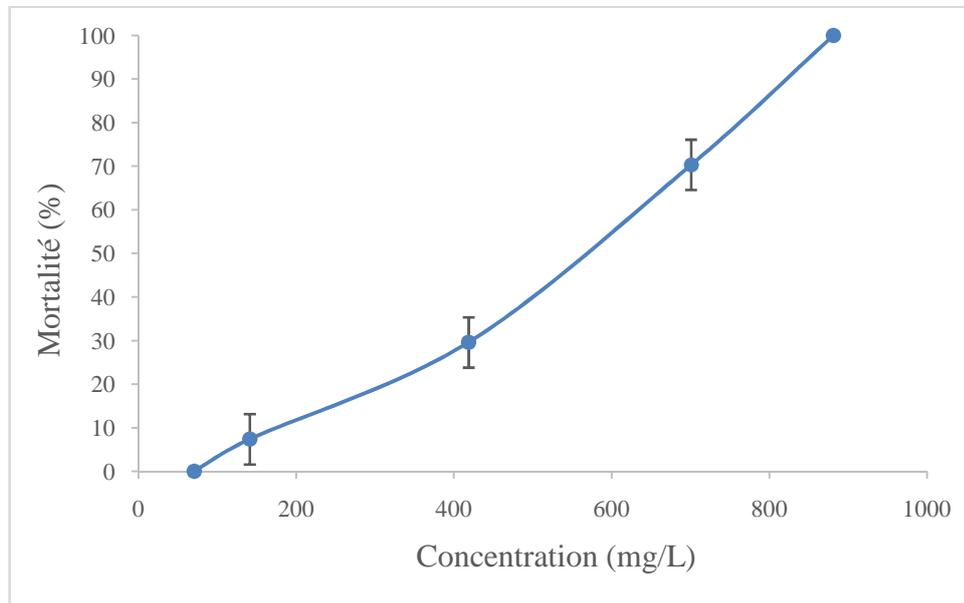
Les résultats expérimentaux montrent que le pétrole brut est relativement toxique sur l'artémia. La faible concentration ( $C = 3 \text{ mg/l}$ ) à causer une mortalité de 20 %, le seuil de toxicité est de 85 mg/l, au-delà, aucun changement significatif sur la mortalité n'est observé. La CL50 est fixée à 30,59 mg/l avec une limite inférieure de 5,61 mg/l et limite supérieure de 95,19 mg/l.

Le pétrole brut est un mélange de multitude de composés aliphatique, aromatique, polaire et asphaltique. Sa toxicité dépende de l'abondance et la toxicité de des fractions qui les composent. Ainsi, la solubilité de chaque fraction dans le DMSO est un facteur déterminant de la toxicité du pétrole. Il est difficile donc de comprendre l'effet toxique du pétrole sans connaître la toxicité de chaque fraction, où les fractions majoritaires au minimum.

Nous avons pu obtenir les deux fractions majoritaires du pétrole, à savoir aliphatique et aromatique. Le paragraphe suivant traite la toxicité de chaque fraction à part.

### 3.2.3.10 Toxicités de la fraction aliphatique

Les résultats de toxicité de la fraction aliphatique sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.15 :

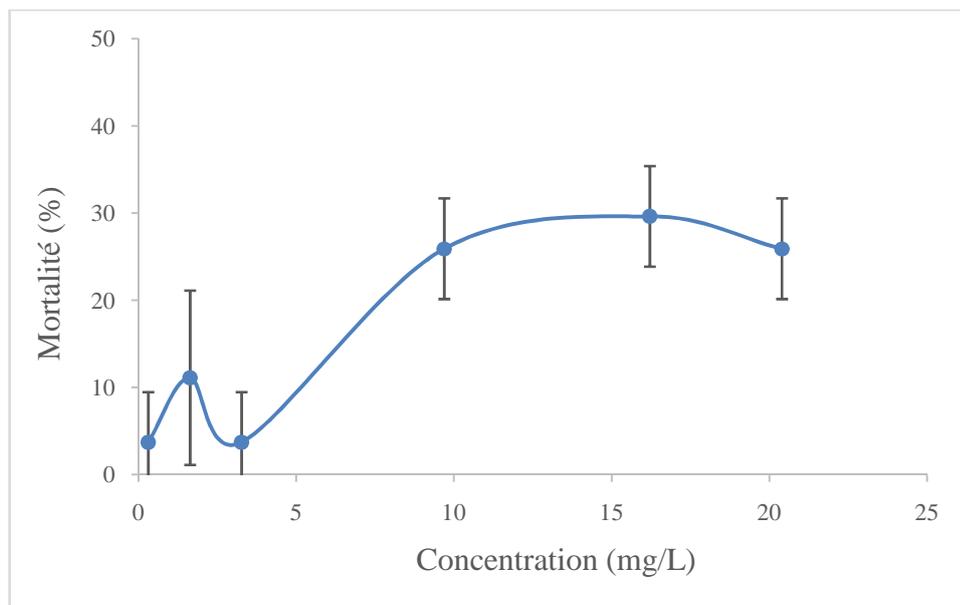


**Figure 3.15 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de fraction aliphatique.**

Les résultats expérimentaux montrent que la mortalité varie proportionnellement avec la concentration jusqu'à obtenir une mortalité totale des nauplius de *A. franciscana*. Nous avons remarqué que la fraction aliphatique est soluble dans le DMSO (la solution mère est préparée avec une concentration d'environ 13000 mg/l) contrairement au pétrole ; moins soluble dans ce solvant. Ainsi, nous remarquons que cette fraction est moins toxique par rapport au pétrole. À titre d'exemple, avec 141 mg/l de la fraction aliphatique nous obtenue une mortalité moins de 10 %, ce qui été dans les environs de 55 % (plus que la CL50) avec des concentrations équivalentes. La CL50 est loin supérieure à celle du pétrole (499,6995 mg/L, avec un IC de 399,72-569,35 mg/l). L'échantillon du pétrole obtenu est composé d'environ 75 % de la fraction aliphatique qui se présente peu toxique. La toxicité du pétrole est donc résulter des autres fractions de ce brut.

### 3.2.3.11 Toxicité de la fraction aromatique

Les résultats de toxicité de la fraction aromatique sur l'Artémia sont présentés sur la figure 3.16 :



**Figure 3.16 : Evaluation de la mortalité des nauplius de *A. franciscana* en fonction de la concentration de fraction aromatique**

D'après ces résultats nous observons qu'un effet significatif de la concentration est apparu à une concentration de 7 mg/l (une mortalité de 26 %), ce joint la courbe de toxicité de pétrole. Des concentrations plus élevés n'ont pas influencés beaucoup sur la mortalité. La CL50 de la fraction aromatique est de 50,93 mg/l, son intervalle de confiance n'a pas pu prédit par le logiciel du fait de l'hétérogénéité des résultats. Nous signalons que la fraction aromatique est très peu soluble dans le DMSO. Ceci ne permet pas d'étudier des concentrations dont la mortalité dépasse la létalité médiane.

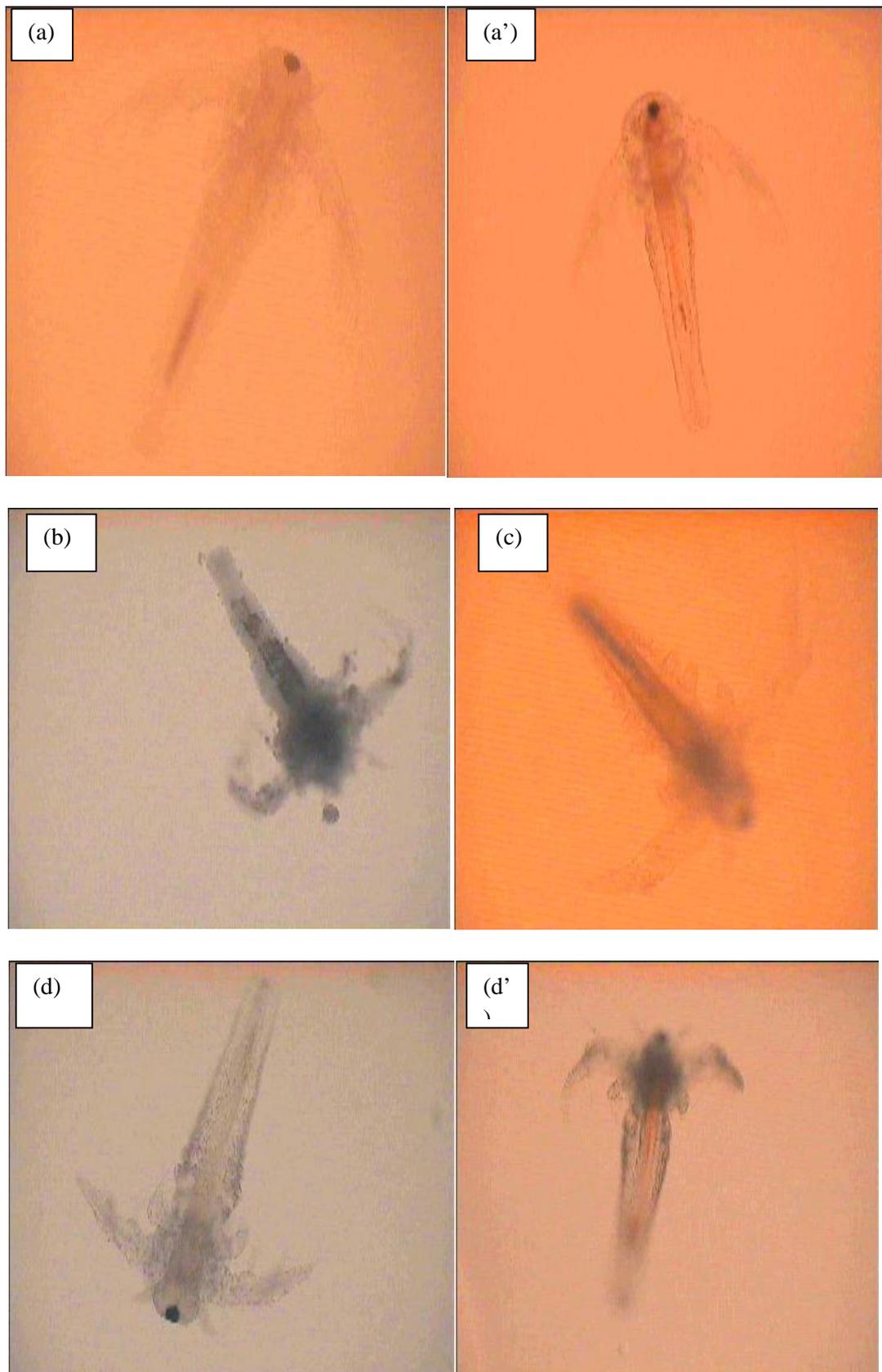
Nous signalons aussi que la fraction polaire est tout de même insoluble dans le DMSO. L'étude de la toxicité des deux fractions majoritaires nous permettra de dire qu'un part important de la toxicité du pétrole est dû à la fraction aromatique et que la fraction est faiblement toxique. Mais si on retient la classification de Viala [95] suivante, les trois produits sont toxiques :

- Extrêmement toxique  $CL_{50} < 5 \text{ mg/l}$
- Très toxique  $5 \text{ mg/l} < CL_{50} < 50 \text{ mg/l}$
- Toxique  $0.5 \text{ g/l} < CL_{50} < 5 \text{ g/l}$
- Peu toxique ou non toxique  $CL_{50} > 5 \text{ g/l}$

### **3.2.4 Effets des toxiques sur la morphologie de l'Artemia**

Les changements morphologiques des individus de l'*A. franciscana* suite à l'exposition aux différents niveaux de concentrations des trois surfactants (SDS, Tween 80 et HF644) ont été visualisés sous microscope photonique à un grossissement de 100 fois. Pour que la comparaison soit logique et précise, nous exposons ici les prises photos des individus morts après 24 h d'exposition aux trois surfactants par rapport au témoin qui n'a pas subi une intoxication.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.17.



**Figure 3.17 :** Visualisation microscopique de l'effet des toxiques sur la morphologie de l'artémia. (a)Témoin vivant, (a') Témoin mort, (b) SDS mort, (c)Tween 80 vivant, (d) HF644 vivant, (d') HF644 mort.

Les photos de la figure 3.17 montrent que la morphologie de l'Artémia change suite à l'introduction des différents surfactants comme suit :

- Témoin : il n'y a pas un changement morphologique de l'artémia (peut être que l'individu mort est pris ça fait pas long temps).
- SDS : dégradation de l'Artémia et apparition d'un pigment noir sur le corps.
- HF644 : dégradation de l'Artémia (sa morphologie a changé un peu).
- Tween 80 : Individus vivant

À partir de ces résultats nous pouvons dire qu'il y'a un changement spécifique sur la morphologie de l'Artémia, avec une ampleur accentuée selon le degré de toxicité de chaque surfactant.

## CONCLUSION GENERALE

Le présent travail a pour objectif d'étudier la toxicité des biosurfactants produits par une souche bactérienne marine ainsi que des produits pétroliers sur un organisme crustacé représentatif des espèces aquatiques marine : *Artémia*.

Au départ, les biosurfactants ont été produits, extraits et partiellement purifiés afin d'obtenir le produit désiré. Les biosurfactants ont été produits dans deux milieux différents avec l'huile de friture comme source d'inductrice de carbone ; un milieu riche LB et un milieu minimum MM. Trois méthodes d'extraction ont été employées : la précipitation acide, la précipitation avec le sel (chlorure de sodium) et l'extraction par solvants. La dernière méthode est avérée plus efficace dans l'extraction des biosurfactants. Trois solvants de différentes polarités ont été utilisés : le Dichlorométhane, un mélange de chloroforme/méthanol et l'acétate d'éthyle. Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'acétate d'éthyle (une concentration en biosurfactant de 3,65 g/l).

Les études d'écotoxicologie ont été menées sur des nauplius de deuxième stade d'une espèce d'*Artémia franciscana*. Le résultat est donné sous le terme de la concentration létale médiane CL50 après 24 heures d'incubation à l'obscurité. Un logiciel, XSTAT nous permet de déterminer cet indice en se basant sur modèle de probabilité de type probit pour établir la relation entre la concentration et la létalité. La validité de l'essai est arrêtée par une mortalité pas plus de 10 % dans les témoins et une CL50 d'un surfactant anionique (sodium Lauryl sulfate SDS) utilisé comme toxique de référence entre 13,3 et 19,9 mg/l. Les deux conditions ont été vérifiées pour l'ensemble des tests réalisés.

Le biosurfactant issu du milieu LB a provoqué une létalité médiane de 929,34 mg/l (794,59 - 1109 mg/L). Le produit est considéré donc comme non toxique. Avec le biosurfactant produit dans le milieu minimum la toxicité a été moins à celle du milieu LB. Nous avons obtenu une CL50 de 8063,3 mg/l (2761,6-8877700,09 mg/l). La létalité CL50 obtenue est au-dessus de la CMC du produit ce qui justifié son introduction comme dispersant dans la remédiation des produits pétroliers dans des environnements marins.

Les biosurfactants bruts ont été ainsi testés de leur toxicité sur les individus de l'artémia. La CMD10 et la CMD100 des deux surnageants de culture ont résulté d'une mortalité moins de 20 %.

À titre comparative, la toxicité d'un surfactant non ionique (Tween 80) très utilisé dans le domaine pharmaceutique en particulier a été étudiée. Le tween 80 n'a montré aucune toxicité vis-à-vis l'artémia même à des concentrations élevées (10 g/l).

L'étude de la toxicité de la souche bactérienne a donné une létalité médiane de 3,8 %. Toutefois, un inoculum de 1 % (qui suffit à la croissance sur pétrole) cause une mortalité insignifiante de *A. franciscana*.

Le travail a été complété par étude de la toxicité du pétrole et ces fractions majoritaires sur la mortalité de l'artémia. La CL50 du pétrole brut, la fraction aliphatique et la fraction aromatique sont respectivement 30,59 mg/l ; 499,70 mg/l et 50,93. Les trois produits sont considérés comme toxique.

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

- Utilisation d'autres indicateurs de la pollution marine comme les moules, les bactéries fluorescentes ou les micro-algues marines.
- Une étude plus détaillée sur la toxicité de pétrole et ses fractions ainsi que la fraction soluble du pétrole sur l'artémia.
- Une étude plus précise de la toxicité de la souche bactérienne avec des extraits lyophilisés.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) EDDOUAOUA. K. (2012). « Etude du potentiel biodégradatif de souches isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminé par du pétrole : Criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant ». Thèse de Doctorat, Université Blida 1, p210.
- 2) VIPULANANDAN. C and REN. X.(2000). «Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant», Journal of Environmental Engineering, Vol.126, n° 7, p 629 - 634.
- 3) BANAT. I.M, MAKKAR. R.S and CAMEOTRA S.S.(2000). « Potential commercial applications of microbial surfactants. » Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol.53, p495-508.
- 4) DE FRANÇA. I.W.L, LIMA. A.P, LEMOS. J.A.M, LEMOS. C.G.F, MELO. V.M.M, DE SANT'ANA. H.B, GONCALVES. L.R.B (2015). « production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of soils ». Ceara.Catalysis Today Vol.255, p10-15.
- 5) BRASILEIRO. P.P, MEIRA. H.M, DE LUNA. J.M, RUFINO. R.D, DOS SANTOS. V.A & SARUBBO. L.A. (2016). « Oil Bioremoval Prototype Controlled by Arduino Utilizing the Biosurfactant Produced by Candida Guilliermondii». CHEMICAL ENGINEERING, Vol.49.
- 6) BEZERRA DE SOUZA SOBRINHO. H, DE LUNA. J.M, RUFINO. R.D, FIGUEIREDO PORTO. A.L, & SARUBBO. L.A. (2013). « Assessment of toxicity of a biosurfactant from Candida sphaerica UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor». Electronic Journal of Biotechnology, Vol.16,n°4, p4-4.
- 7) [www.jove.com/video/3790/-long-terme-des-essais-de-toxicite-itale-avec-le-crustac-artemia?language=French](http://www.jove.com/video/3790/-long-terme-des-essais-de-toxicite-itale-avec-le-crustac-artemia?language=French) les crustacés (artémia) toxicité.

- 8) VINKEN. M, PAPELEU. P,SNYKRES. S, DE ROP. E, HENKENS. T, CHIPMAN. J.K,...&VANHAECKE,T.(2016).Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. Critilcal reviews in toxicology, Vol.36, n°4, p299-318.
- 9) MAYOT. E. (2007). «Monobactames Et Triazoles Fluorocarbones Amphiphiles : Vers Des Systemes Catanioniques A Proprietes Multiples». Thèse De Doctorat, Université Henri Poincaré.
- 10) MAMERI. Y. (2010). , Mémoire de magister, l'universite mentouri-constantine , ALGERE
- 11) RONDEL.C. (2009), Thèse de doctorat,l'universile de toulouse , France.
- 12) LARPENT.C. © Technique de l'Ingénieur Doc .K 342.
- 13) LECLERC. E. (1977) « Les détergents et la pollution des eaux ». Eyrolles, Paris.
- 14) NARKIS. N, BEN DAVID. B. (1985). Water Res, Vol.19, n° 7, p 815.
- 15) RUBIO. S, LACAZE-MASMONTEIL. T, BOURBON. J, DUCROC. R.( janvier 1995). « Les surfactants dans le tube digestif », Archives de pédiatrie, vol. 2, n° 1, p79-84).
- 16) NETO . V.(2007). Thèse de doctorat, l'universite de limoges ,France .
- 17) <https://sites.google.com/site/boulfradachraf/impact-environnemental>.
- 18) QUIROBA. J.M, SALES. D et GOMEZ-PARRA. A. (1989). Water Res, Vol.23, n°7, p 801.
- 19) SIGOILLOT. J.C et GUYEN. N. (1987). Cand journal of microbiology, Vol.3, n°10, p 929.

- 20) CHATERBACHE. A. (2007). « Etude et synthèse de composés tensioactifs à base de souches Naturelles et obtention de détergents industriels Biodegradables ». These de Magister, Université Mentouri Constantine. p13.
- 21) CABRIDENC. R et LUNDAL. P. (1976). TSM l'eau Vol.5, p219.
- 22) MARTINEZ. J, VIVES-REGGO. R, SANCHEZ. L.J. (1989). water Res, Vol.23, n° 5, p 569.
- 23) KIMERLE. R.A, SWISHER. R.D. (1989). Water Res, Vol.23, n° 7, p 801.
- 24) KIMERLE. R.A. (1989). « Aquatic and terrestrial ecotoxicology of linear alkylbenzene sulfonate ». Tenside Surfactants Deterg., Vol.26, p 169-175.
- 25) YAMANE . A.N, OKADA. M, SUDO. R. (1982). « The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents ». Water Res., Vol.18, p1101-1105
- 26) LEWIS. M.A, HAMM. B.G. (1986). « Environmental modification of the photosynthetic response of lake plankton to surfactants and significance to a laboratory-field comparison ». Water Res., Vol.20,p1575-1582.
- 27) THOUMELIN. G. (1995). « Les tensioactifs dans les eaux douces et marines – Analyse, comportement, écotoxicologie ». Repères Océan éditions IFREMER, n°9.
- 28) SWEDMARK. M, BRAATEN. B, EMANUELSSON. E, GRANMO. A. (1971). « Biological effects of surface active agents on marine animals ». Marine Biology Vol.9, p183-201
- 29) HWANG. D.F, CHEN. M.Y, YOSHIDA T, JENG. S.S. (1993). « Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on the tiger prawn, *Penaeus monodon* ».

- 30) THOUMELIN.G. (1995). « Les tensioactifs dans les eaux douces et marines – Analyse, comportement, écotoxicologie ». Repères Océan éditions IFREMER, n°9.
- 31) SOBRINHO. H.B, LUNA. J.M, RUFINO. R.D, PORTO. A.L.F, SARUBBO. L.A. (2013) «Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications». In Recent Developments in Biotechnology, 1st ed.; Studium Press LLC: Houston, TX, USA,; Vol.11, p1–29.
- 32) BANAT. I.M, FRANZETTI. A, GANDOLFI. I, BESTETTI. G, MARTINOTTI. M.G, FRACCHIA. L, SMYTH. T.J, MARCHANT. R. (2010), «Microbial biosurfactants production, applications». Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.87, p427–444.
- 33) KAPADIA. S.G, YAGNIK. B.N. (2013). «Current trend and potential for microbial biosurfactants». Asian J. Exp. Biol. Sci. Vol.4, p1–8.
- 34) ROSENBERG. E and RON. E.Z. (1999). «High- and low-molecular-mass microbial surfactants», Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 52, P2154 – 162.
- 35) BANAT. I.M, MAKKAR. S.R, CAMEOTRA. SS. (2000) «Potential commercial applications of microbial surfactants». Appl Microbiol Biotechnol Vol.53 p495–508.
- 36) DESAI. J.D, BANAT. I.M. (1997). «Microbial production of surfactants and their commercial potential». Microbiol Mol Biol Rev Vol.61, p47–64.
- 37) SMYTH. T.J.P, PERFUMO. A, MARCHANT. R, BANAT. I.M.(2010a) « Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg P3705–3723.
- 38) SMYTH. T.J.P, PERFUMO. A, MCCLEAN. S, MARCHANT. S, BANAT. I.M. (2010B) «Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight

biosurfactants. In: Timmis KN (ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p3689–3704.

- 39) HEALY. M.G, DEVINE. C.M ET MURPHY. R. (1996). «Microbial production of biosurfactants». Resources, Conservation and Recycling, Vol.18, p41-57.
- 40) BOGNOLO. G. (1999). « Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons Colloids and Surfaces ».Vol.152, p41-52.
- 41) FALATKO. D.F and NOVAK. J.T. (1992). « Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons». Water Environ. Res. Vol.64, p163-169.
- 42) SAHARAN. B.S, SAHU. R.K and SHARMA. D. (2012). «A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives». Genetic Engineering and Biotechnology Journal, Vol. 2011: GEBJ-29, p14.
- 43) VANDYKE. 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., Vol 39, p 1071-1078.
- 44) BOGNOLO. G. (1999). «Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons,Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects», Vol.152, n°1-2, p 41-52.
- 45) MULLIGAN. C.N, YOUNG. R.N, ET GIBBS. B.F. (2001). «Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil» a review, Engineering Geology, Vol.60, p 371-380.
- 46) FIECHTER. A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application, Tibtech, Vol.10, p3-12.

- 47) MATA-SANDOVAL. J.C, KARNS. J. et TORRENTS. A (2000), «Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides», *Environ. Sci.Technol.*, Vol.34, n°23, p 4923-4930.
- 48) PARRA. J.L, GUINEA. J, MANRESA. M. A, ROBERT. M, MERCADÉ. M.E, COMELLESAND. F, BOSCH. M.P. (1989). «Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants». *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol 66, p 141–145.
- 49) HIRATA. Y. S, RYU. .M, ODA. .Y, IGARASHI. K, NAGATSUKA. A, FURATA. T and SUGIURA. M. (2009). «Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low foaming surfactants». *J. Biosci. Bioeng.* Vol.108, p 142-146.
- 50) VELIKONJA. J and KOSARIC. N. (1993). «Biosurfactant in food application", In N. Kosaric (Ed), New York: Marcel Dekkar. *Biosurfactant: Production, properties and applications*». p 419 - 449.
- 51) ASCI. Y, NURBAS. .M and ACIKEL. Y.S. (2010). « Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metals ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant». *J. Environ. Manage*, Vol.91, p 724-731.
- 52) JOSHI. S, YADAV. S, NERURKAR. A.J. and DESAI. J. *Microbiol.Biotechnol.*(2007).Vol. 17 p 313. M.O. Ilori, S.A. Adebusoye, A.C. Ojo, *World J. Microbiol. Biotechnol.* (2008). p 24.
- 53) <http://www.ecotoxocologie.fr/labo.php>.
- 54) JOCE. (1980). Directive 80/1335/CEE du 22/12/1980. « Official Journal of the European Communities ».

- 55) RUCKEBUSCH. Y. (1981). « Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales, 2e Edit. Maloine S. A. Paris ».
- 56) DRAGSTEDT. A. et LANG B. (1957). « Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament ». Annales pharmaceutiques Françaises, Vol.11.
- 57) KARBER. C. et BEHRENS. B. (1935). « Wie sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am Zweckmässigsten Anzuordnen? ». Arch. Exp. Path. Pharm., Vol.177, p 379- 388.
- 58) PRAMOD H.D.PGS13AGR6088, power point presentation.
- 59) SU. L, JIA. W, HOU. C, LEI. Y. (2011). «Microbial biosensors :a review.Biosens. Bioelectron ». Vol.26 , p1788-1799.
- 60) TOTHILL. IE, TURNER. A.P.F. 1996b. « Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment.TrAc Trends Anal.Chem». Vol.15, p 178-188.
- 61) RAYMOND.V, Coillie en collaboration avec Lise Parent. 2011. « ECOTOXICOLOGIE GENERALE ET APPLIQUEE». Télé –université. Université de Québec à Montréal. Québec (Québec). P 334-335.
- 62) FERRA. C. (2008). Aquaculture, vuibert, France . p 364-371.
- 63) VAN STAPPEN. G. (1996). «Introduction, biology and ecology of Artemia ». Manual on the production and use of live food for aquaculture, Vol. 361, p 79-106.
- 64) KOLLOGG. V.L.1906. (description originale). A New Artemia and its Life conditions.science.Vol.24, n°619, p 594-596.
- 65) FOX. R. 2006. An Internet laboratory manual for courses in Invertebrate Zoology; Invertebrate Anatomy OnLine. Artemia franciscana Brine Shrimp, Lander University.

- 66) DEFAYE. D, RABET. N , & THIERY. A. (1998). «Atlas et bibliographie des crustacés branchiopodes (anostraca, notostraca, spinicaudata) ».MNHN, PARIS. p 62.
- 67) SORGELOOS. P. (1980). «The use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture». In: Persoone. G, Sorgeloos. P, Roels. O, Jaspers. E. (Edts.), the Brine shrimp *Artemia*. Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium. , vol. 3 p 25 - 45.
- 68) VOS. J and ROSA N. (1980). « Manual on *Artemia* production in salt ponds in the Philippines». FAO Corporate Document Repository Project Reports (not in series), submitted by Fisheries and Aquaculture Department.
- 69) MORRIS. J.E and AFZELIUS. B.A. (1967). «The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development». J. Ultrastr. Res.Vol. 20, p 244-259.
- 70) Anderson. E, LOCHHEAD. J.H, LOCHHEAD. M.S and HUEBNER. E. (1970). «The origin and structure of the tertiary envelop in the thick-shelled eggs of the brine shrimp *Artemia*». J. Ultrastruct. Res. Vol.32,p 497-525.
- 71) CLEGG. J. S. and CONTE. F. 1980. « A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. In The brine shrimp, *Artemia*». (Edts. Persoone G, Sorgeloos P, Roels. O. and Jaspers. E ). Wetteren, Belgium: Universa Press. Vol. 2, p.11 -54.
- 72) MADDEN D. 2009. « The life cycle of *Artemia franciscana*».
- 73) LAVENS. P & SORGELOOS. p. (2000). « The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture». Aquaculture, Vol.181, n°3, p 397-403.
- 74) SORGELOOS. P, REMICHE-VAN. D.W. C , and PERSOONE. G.1978. «The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests—a critical analysis». Ecotoxicology and environmental safety.vol.2, n° 3-4, p 249-255.

- 75) BENALI. K. 2014. « optimisation de la production du biosurfactant par des souches bactériennes isolées à partir d'un sédiment marin portuaire contaminé par des hydrocarbures pétroliers ». Mémoire de master 2, université de Blida 1.
- 76) VANHAECKE. P, PERSOONE. G, CLAUS. C , & SORGELOOS. P. (1981). «Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. Ecotoxicology and environmental safety ».Vol. 5 ,n°3, p 382-387.
- 77) BLANCHET. P. 1897. Le Djebel Demmer. In: Annales de Géographie. Armand Colin, p 239-254.
- 78) ILORI. O.M, AMOBI. C.J and ODOCHA. A.C. (2005). « Factors affecting the production of oil degrading *Aeromonas* sp. Isolated from a typical environment», *Chemosphere*, Vol. 61, n°7, p 985 - 992.
- 79) FERHAT. S, MNIF. S, BADIS. A, EDDOUAOUDA. K, ALOUAOUIC. R, BOUCHERIT. A, MHIRI. N, MOULAI-MOSTEF.A. N, and SAYADI. S. (2011). «Screening and Preliminary Characterization of Biosurfactants Produced by *Ochrobactrum* Sp. 1c and *Brevibacterium* Sp. 7g Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soils». *International Biodeterioration & Biodegradation* , Vol.65,p 1182-1188.
- 80) ABOUSEOUD. M, MAACHI. R, AMRANE. A, BOUDERGUA. S and NABI. I. (2008). «Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Biosurfactant by *Pseudomonas Fluorescens*». *Desalination* Vol. 223, p143-151.
- 81) 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*. Vol.63, p 747-753.
- 82) EDDOUAOUDA. K, MNIF. S, BEN YOUNES. S, BADIS. A, CHERIF. S, FERHAT. S, MHIRI. N, CHAMKHA. M and SAYADI. S. (2012). «Characterization of a Novel Biosurfactant Produced by *Staphylococcus* Sp. Strain

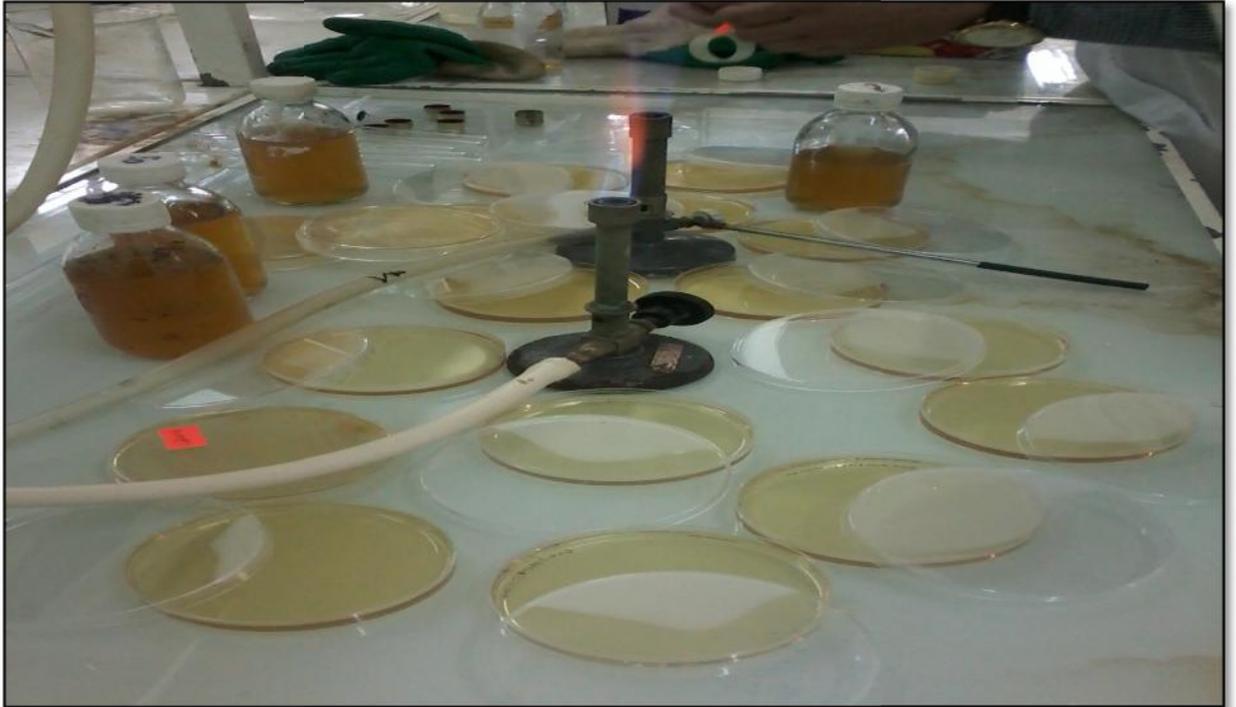
le with Potential Application on Bioremediation of Hydrocarbons Contaminated Sites». *Journal of Basic Microbiology* Vol.51, p1-11.

- 83) RAHMANI M. (2013). «Production de biosurfactant par une souche bactérienne thermophile isolée IA, localement en vue d'une application en agroalimentaire». Mémoire de Maser, université Blida 1.
- 84) SANTOS. S. C. D, FERNANDEZ. L. G, ROSSI-ALVA. J. C, ET ROQUE. M. R. A. (2010). «Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains». *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9, n°35, p 5704-5711.
- 85) HABA. E. et al.(2000). «Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils». *J. Appl. Microbiol.* Vol. 88, p 379–387.
- 86) WADEKAR. S.D, KALE. S.B, LALI. A.M, BHOWMICK. D.N, AND PRATAP. A.P. (2012) «Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source», *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Vol.42, p 249–266.
- 87) ZHU. Y, GAN. J.J, ZHANG. G.L, YAO. B, ZHU. W.J, AND MENG. Q. (2007). «Reuse of Waste Frying Oil for Production of Rhamnolipids Using *Pseudomonas Aeruginosa* Zju.U1m». *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 8, n°.7, p1514-1520.
- 88) De Lima C. J. B & Ribeiro. E. J & Sérvulo. E. F. C & Resende. M. M & Cardoso. V. L. (2009). « Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* Grown in Residual Soybean Oil», *Appl Biochem Biotechnol*, Vol 152, p 156–168.
- 89) De Gusmão. C. A. B, Rufino. R. D, Sarubbo. L. A. (2010). «Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant», *World J Microbiol Biotechnol*, Vol. 26, p 1683–1692.

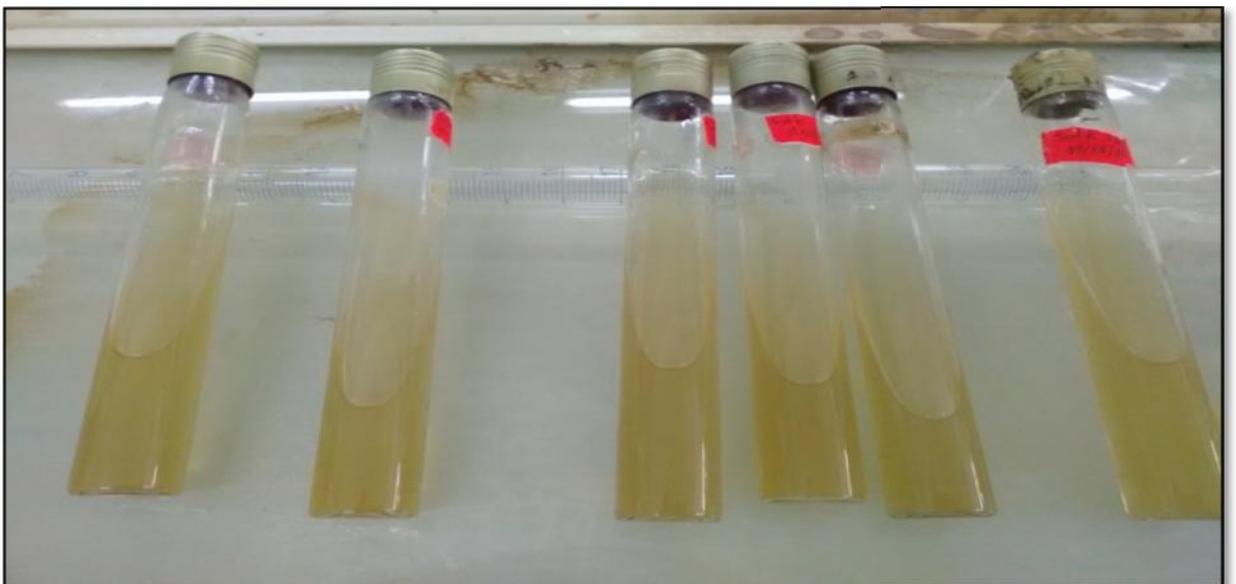
- 90) Thavasi. R, Nambaru. V. R. M. S, Jayalakshmi. S, Balasubramanian. T and Banat. I. M. (Jan–Mar 2011) «Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources». *Indian Journal of Microbiological Methods* Vol. 51, n°. 1 p 30–36.
- 91) NOPARAT. P, MANEERAT. S, SAIMMAI. A. «Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum* ».
- 92) WU. J. Y, YEH. K. L, LU. W. B, LIN. C. L, & CHANG. J. S. (2008). «Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site». *Bioresource Technology*, Vol. 99, n° 5, p1157-1164.
- 93) COSTA. S. G, NITSCHKE. M, HADDAD. R, EBERLIN. M. N, & CONTIERO J. (2006). «Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils». *Process Biochemistry*, Vol. 41, n° 2, P 483-488.
- 94) ANDRIOF. J, WADDOCK. S , & RAHMAN. S.S (EDS). (2002). «Unfolding stakeholder thinking: theory, responsibility and engagement». Greenleaf Publishing.
- 95) VIALA. A. 1998. «Eléments de toxicologic Tec & Doc Lavoisier», Paris, P 1-521.
- 96) NUNES. B, CARVALHO. F , & GUILHERMINO. L. (2005). «Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 61, n° 3, P 413-419.
- 97) CSERHÁ. T, FORGACS. E, & OROS. G. (2002). «Biological activity and environmental impact of anionic surfactants». *Environment international*, Vol. 28, n°5, P 337-348.

- 98) LIWARSKA-BIZUKOJC. E, MIKSCH. K, MALACHOWSKA-JUTSZ. A, & KALKA. J. (2005). «Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants». *Chemosphere*, Vol. 58 , n° 9, P 1249-1253.
- 99) MATILDE. M. (1991); «Applications Pharmaceutiques et Cosmétiques des Surfactifs ». Cahier firp N°F372-A Module d'enseignement en phénomènes interfacail en France Universidade de los Andes,Venezuela P 20.
- 100) MEYER. L.B, FERRIGNI. N.R, PUTNAM. J.E, & JACOBSEN. D.E, NECHOLS. D.E and MCLAUGHLIN. J.L (1982). «Brine Shrimp : A Convenient General Bioessay for Active Plant Constituents». *Journal of Medicinal Plant research purdue university*.Vol.45, P 31-34.
- 101) HELLAL. N. (2015). « Caractérisation de deux biosurfactants Synthétisés par une souche bactérienne halotolérante SdK644 » ; Thèse de Master, Université Blida 1. p 39.
- 102) DINIZ RUFINO. R, Moura de Luna. J, de Campos Takaki. G. M., & Asfora Sarubbo. L. (2014). «Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988». *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 17, n° 1, P 6-6.

**APPENDICE A**  
**CONSERVATION DE LA COUCHE SdK644**



*Distribution du milieu LB solide dans les boites pétri.*



Distribution du milieu LB solide dans les tubes inclinés.



*Conservation de la souche en film protecteur glycérol.*



La souche SdK644 après 48h d'incubation.

## APPENDICE B

### DEROULEMENT DES ESSAIS



Aération de l'eau de mer.



Préparation et distribution des concentrations des toxiques et prélèvement de l'Artémia.



Incubation des boites de pétri contenant les individus stade 2 de l'Artémia.

## APPENDICE C

### LES ETAPES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION PARTIELLE DE BIOSURFACTANTS



Les étapes d'extraction.



Evaporation de solvant.

**APPENDICE D**  
**LES EQUIPEMENTS UTILISES**

Étuve (memmert)
Autoclave (AESCULAP ),
PH mètre (inolab)
Agitateur Magnétique-plaque chauffante(Stuart)
Balance (KERN ALS 220-4N)
Bec Bunsen
Bain Marie(memmert)
Shaker Wise Cube (Fuzzy Control System )
Incubateur (memmert)
Centrifugeuse (SIGMA 2-6E )
Rotavap (LABOROTA 4001 )
Multi paramètres (salinité ,conductivité, o2)
Hotte (erlab),
Microscope optique équipé(Motic),
Loupe binoculaire,
Pompe à vide (SartoriusStedim)
Réfrigérateur (condor)
Aquarium
Thermostat
Diffuseur d'oxygène



Thermostat



Aquarium

## APPENDICE E

### VERRERIE ET CONSOMMABLES UTILISES

Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000ml, 5000ml,
Fiole Jaugée de 50ml, 100ml, 1000ml,
Eprouvette graduées de 10ml, 20ml, 15ml, 25ml, 50m,100ml, 250ml, 500ml,
Bécher de 80ml, 100m, 250m, 500m, 1000ml, 2000ml,
Boites de Pétri en plastique (D=80mm, D=60mm),
Boites de pétri en verre (D=50mm, D=80mm),
Pipettes Pasteur,
Anse de platine,
Tubes à essai de 20ml,
Seringues ,
Micro seringue,
Micropipettes (200 $\mu$ L ,1000 $\mu$ L )
Ampoule à décanter de 250ml,500ml, 1000ml,
Ballon de 250ml,500ml,1000m,2000ml,
Barreau magnétique,
Coton cardé,
Papier Aluminium,
Papier Film,
Papier Filtre de Wattman 47 mm de diamètre,
Papier Filtre ordinaire,
Portoirs Métalliques ou en plastiques,
Spatules,
Flacons en verre de200ml,
Entonnoirs

