

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 d'un
bioémulsifiant produit par *Marinobacter
hydrocarbonoclasticus* Sdk644 sur *Artemia
franciscana***

Présenté par :

M^{elle}. BELHOUT Abir

M^{elle}. BELAID Hadjira

Encadreur :

Prof. BADIS Abdelmalek

Co-encadreur :

M. ZENATI Billal, CNRDPA

Année universitaire 2016/2017

ملخص

الهدف من هذا العمل هو المساهمة لدراسة سمية مستحلب حيوي منتج من سلالة بحرية محللة للفحوم الهيدروجينية *Marinobacte rhydrocarbonoclasticus* Sdk644 على نوع من القشريات البحرية الصغيرة " *Artemia franciscana*"، وكذا دراسة سمية بعض المنتجات البترولية على هذا النوع من الأرتيميا.

أفضل النتائج المتحصل عليها في إنتاج المستحلب الحيوي لوحظت عند الشروط التالية: الغليسرول (2% حجم/ حجم) كمصدر الكربون ونترات الصوديوم كمصدر للنتروجين ونسبة C / N تقدر ب 6.3، كلوريد الصوديوم كعنصر محث للإنتاج. تحصلنا على عائد جيد مع وسط غني LB مقارنة مع وسط فقير MSM (13.5 غ/ل و 1.5 غ/ل على التوالي). ثم الحصول على أقصى قدر من الانتاج في وقت أقصر في الوسط LB (16 سا) مقارنة بالوسط MSM (40 سا) . استخراج المستحلب الحيوي مع خليط الكلوروفورم والميثانول أعطى عائد أفضل (4.7 غ/ل) واستحلاب جيد (E24 ب 60%). أشارت الدراسة أن طاف المستحلب الحيوي بنسبة 50 % لا يعتبر سام على حيوانات الأرتيميا (نسبة وفيات لم تتجاوز 5%). بيد أن السمية البيولوجية على هذا المنتج تتطلب المزيد من الدراسة بسبب مشاكل تتعلق ببقاء المنتج ومدى ذوبانه في الماء. في الأخير، تقييم سمية بعض المنتجات النفطية عن طريق التركيز الوسطي المميت (LC50) أعطى التراكيز التالية: الفينول 43.32 ملغ/ل والبترول 106.8 ملغ/ل. وعليه تصنف كل من المنتجات السابقة بأنها سامة. أما بالنسبة للنفتالين، قدرنا عن طريق التجارب أن اختبار السمية باستعمال الأرتيميا غير مناسب لهذا المركب بسبب فقد تركيزه السريع لما يتميز به من خاصية التطاير.

كلمات مفتاحية:

Marinobacter hydrocarbonoclasticus، مستحلب حيوي، إنتاج، سمية، أرتيميا فرانسيسكانا ، منتجات بترولية.

Abstract

The toxicity assessment of a bioemulsifier produced by a marine hydrocarbonoclastic bacteria, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus Sdk644* strain as well as petroleum products on a crustacean organism: *Artemia* was studied. Firstly, the main factors, which affect the bioemulsifier production, have been chosen. It was found that glycerol (2%, v/v) is the best carbon source, sodium nitrate as a nitrogen source and a C/N ratio of 6.3. Sodium chloride appeared as an important parameter in bioemulsifier production. In addition, the maximum yield production was observed in a rich medium LB instead of poor medium MSM (a concentration of 13.55 g/l in LB compared to 1.52 g/l in MSM). Maximum production was obtained in a short time with LB medium (16 h) than with MSM medium (40 h). Bioemulsifier extraction carried out with Chloroform/Methanol gave a high yield (4.74 g/l) and good emulsification (E24 of 60%). Furthermore, the toxicity assessment of the bioemulsifier (culture supernatant) at a concentration of 50% shows that this is not toxic (a mortality of 5%). The bioassays require further investigation due to purity product problems. Thus, the toxicity of some petroleum products was evaluated. LC50 of phenol is 45.32 mg/l and that of crude oil is 106.8 mg/l. Both products are classified as toxic. It has been estimated that the bioassay of *Artemia* on naphthalene is inadequate because of its volatility.

Key words: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bioemulsifier, production, Toxicity, *Artemia franciscana*, petroleum hydrocarbons.

Résumé

L'objectif de ce présent travail est la contribution à l'étude de la toxicité d'un bioémulsifiant produit par une souche bactérienne hydrocarbonoclaste marine « *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Sdk644 », ainsi que des produits pétroliers sur le microcrustacé *Artemia franciscana*.

Les résultats concernant les meilleures conditions de production sont : Le glycérol (2 %, v/v) comme source de carbone, le nitrate de sodium comme source d'azote avec un rapport C/N de 6,3, le chlorure de sodium comme élément précurseur de la production. Un bon rendement avec un milieu riche LB comparativement avec le milieu pauvre MSM (13,55 g/l et 1,52 g/l, respectivement). La production maximale a été obtenue à un temps plus réduit dans le milieu LB (16 h) par rapport au milieu MSM (40 h). Par la suite, l'extraction de bioémulsifiant avec le mélange Chloroforme/Méthanol a donné un meilleur rendement (4,74 g/l) et une bonne émulsification (E24 de 60%). Par ailleurs, l'étude de la toxicité du bioémulsifiant (surnageant de culture) à une concentration de 50 % montre que celui-ci n'est pas toxique (une mortalité de 5 %). Les bioessais de toxicité sur ce produit nécessitent une étude supplémentaire du fait de problème de pureté. Ainsi, la toxicité de quelques produits pétroliers a été évaluée. La CL50 du phénol est de 45,32 mg/l et celui du pétrole est de 106,8 mg/l. Les deux produits sont classés comme toxiques. Il est été estimé que le bioessai d'*Artemia* sur le naphthalène est non adéquat à cause de sa volatilité.

Mots clés : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bioémulsifiant, production, Toxicité, *Artemia franciscana*, hydrocarbures pétroliers.

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.

Et surtout ma chère maitresse : Mme Jawida Bensalem

A mes très chères sœurs ; Zineb et Merale Fatiha

A mon oncle et mon frère : Othmane et Ismail

A mes amis ; Yasmina ,Assia ,Abir, Et ses familles qui m'a donné le soutien et l'encouragement.

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

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

UX_TW [TW]eT

WXWXVT VX

T NÜxá âÇx zÜtÇwx NÜ|Çx }Ët| ÆÉvta|ÉÇ wx w|Üx âÇ ÁÉà wx ÜxvÉÇÇt|áatÇvx ö Át y|xÜá° xà
Át NÜxÁ|cÜx °vÉÄx t vxàx ä|x tÁcÜx? Áxá NtÜxÇää Üá| Áx NÉääxÇà áÉà)ÉáÜá wxätÇä? NÉáÜ Ü°tÄáÜ
Áxá Éu|xvájá xà Áxá ÜÉáxá

] x w°w|x vx äütät|Ä

T ÁÉÇ NcÜx Äx Ät|ä|x T UXWX_[T` \W UX_[bhg

CtNt ÁÉÇ ááN°Ü|xáÜ xáxÁNÄx xà ÁÉÇ xÇáx|zÇtÇä zÜúvx ö áÉá vÉÇáx|Ä? }Ët| tÜÜ|á° ö vx Ç|äxtá
xà }x NtÜatzx vxá ÁÉÁxÇää wx }É|x xà wx áÉääÇ|Ü täxv Áxá tÁ|á ? Áxá y|cÜxá xà ááÜáÉää ÁtÁtÇ?
ÁÉÇ áxáÄ áÉá{t|á ÉáÜx täxv ÇÉää xà tááá| wÉÉáÜx atááyt|Üx ö áÉáÜx y|Äx Át Á°v{tÇáx u|xÇ á±Üá i Éáá
°á° áÉà)ÉáÜá wtÇá Äx v, áÜ?] x Çx áÉá ÉáÜxÜt| }tÁt|á ÁÉÇ {°ÜÉá



T ááá|

T Át v{cÜx ÁtÁtÇ Át yÉÜx WtÁÁx

aT\` T fX` ` TaT

T Áxá y|cÜxá ÁÉÇ zÜtÇw y|cÜx gT ^\bX_W\ax X xà ÁÉÇ NÜxá y|cÜx
\fft` A

T Át v{cÜx á, áÜ eTbhi T

T ÁÉÇ u|Ç` Áx [TW]\eT xà át ytÁ|Äx ááÜáÉää at ÁcÜx xà át á, áÜ ÉáÜx át vÉN|Çx
çtäÁ|Çx

T áÉáá Áxá xÇáx|zÇtÇää wx Ä°atuÄááxÁxÇà NÜ|Át|Üx xà ááxÁx T ÜÁtÄtá
~tw|~ t` °w°t M` Üá [T fffT a BENLAKHAL ,BABA3LI ,MOLAI ,BEN
HADA ET SHIK ELTOUAMI Atááá| wx Äçvxx mtutÇt t UÄwt M` Ü RAHMOUN xà
ÁtwtÁx HASSINAA

T Áxá vÉÄçzâxá áfÉáÁ|t xà] tã|wt

TU\e UX_[bhg

Remerciements

Tout d'abord nous remercions Allah (Dieu) de nous avoir donné les efforts pour arriver à ce stade du succès et de nous orienter vers la lumière de la science et du savoir.

Nous remercions spécialement notre Promoteur Monsieur **BADIS A**, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et sa patience à ce travail et nous sommes très reconnaissantes de tout ce qu'il nous a apporté au niveau personnel et scientifique.

Avec beaucoup de respect, nous remercions notre Co-promoteur M. **ZENATI B**, attaché de recherche au Centre National de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (**CNRDPA**), pour la qualité de son encadrement, sa confiance, et ses conseils qui ont été pour nous une aide inestimable ; merci profondément pour le temps consacré.

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

Nous tenons à remercier vivement Dr. **Eddouaouda K**, pour sa contribution dans l'amélioration de la qualité du document.

Nous remercions également Mme **Kord A**, attaché de recherche au CNRDPA pour son soutien technique et moral, elle était toujours près de nous. Melle **Mesbaiah F/Z** maître de recherche au CNRDPA, quelle trouve ici le témoignage de nos vives salutations.

Nous tenons à exprimer nos remerciements au personnel de CNRDPA d'avoir accepté de nous accueillir, spécialement **Mr. Annane R. le directeur**, le staff des ateliers physico-chimiques : Mme **Djida F/Z**, Mme **Bounakous N.**, Mme **Benchama Y.** Mr. **Hazem S/D** ainsi que les membres de l'atelier microbiologique, Mme **Chegrani A.**, Mme **Rebhi A.** Melle. **Hedemi A.**
Nous remercions également Mme **Djellal K** du CNRDPA.

Nous remercions Melle **Itchar R.** et Mme **Chibat Eddbes C.** de la division aquaculture de nous avoir doté de la souche de *Daphnia magna* et Mr **Geunachi B.** de nous a approvisionné des cystes d'artemia.

Nous remercions Mr **Meknachi A** attaché de recherche au CNRDPA pour leur soutien technique et moral.

Nous remercions également l'ingénieur du laboratoire biochimique et microbiologique dans notre département de génie des procédés Mme **Lounaoussi N.**, ainsi que Mr **Rachid** pour son soutien technique. Nos remerciements s'adressent aussi au Dr. **Djellab**, Maître de conférences à notre département de Génies des procédés .

Un remerciement spécial au Dr. **Boutoumi H** pour l'aide qu'il nous a apportée tant sur le plan moral que technique.

Nous souhaitons également remercier le Prof. **El Hattab M.** et son équipe du laboratoire de recherche LCSN-BioM, surtout Mme **Lyrrate**, de nous avoir autorisé à réaliser des mesures de la tension de surface et d'utiliser le rotavap.

Un remerciement spécial à notre chef d'option et chef de département Dr. **Cheknane O.** nous remercions tous les enseignants de notre département de chimie industrielle.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des symboles

Liste des Glossaires

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANT 3

1.1.1 Introduction 3

1.1.2 Classification des Biosurfactants 3

1.1.3 Comparaison entre biosurfactants/bioémulsifiant 4

1.1.4 Composition des bioémulsifiants 5

1.1.5 Mode d'action de bioémulsifiant 6

1.1.6 Détection de bioémulsifiants 6

1.1.7 Paramètres influençant la production de bioémulsifiants 7

1.1.7.1 Source de carbone 7

1.1.7.2 Source d'azote 7

1.1.7.3 pH 7

1.1.7.4 Sels minéraux 7

1.1.7.5 Ions métalliques 8

1.1.7.6 Effet de l'agitation 8

1.1.8. Microorganismes marins producteurs de bioémulsifiants 8

1.1.8.1 Microorganismes marins hydrocarbonoclastes 9

1.1.9. Application des bioémulsifiants 10

1.2. ECOTOXICOLOGIE 11

1.2.1 Définition 11

1.2.2 Types de toxicité	12
1.2.2.1 Toxicité aiguë	12
1.2.2.2 Toxicité subaiguë	12
1.2.2.3 Toxicité à long terme	12
1.2.3. Evaluation de la toxicité d'un polluant	12
1.2.3.1 Tests d'écotoxicité	12
1.2.3.2. Les bioessais de toxicité.....	12
1.2.3.3. Les bioindicateurs écologiques de toxicité	13
1.2.4. Les microcrustacés zooplancton en Ecotoxicologie.....	13
1.2.4.1 <i>Daphnia magna</i>	13
1.2.4.2 Avantage d'utilisation	14
1.2.4.3 Biologie	14
1.2.4.3.1 Classification.....	15
1.2.4.3.2 Morphologie.....	15
1.2.4.3.3 Cycle de vie	16
1.2.4.3.4 Milieu de vie.....	17
1.2.4.2 ARTEMIA	17
1.2.4.2.1 Artemia en écotoxicologie.....	17
1.2.4.2.2 Avantages des bioessais.....	18
1.2.4.2.3 <i>Artemia franciscana</i>	18
1.2.4.2.3.1 Classification.....	18
1.2.4.2.3.2 Morphologie.....	19
1.2.4.2.3.3 Cycle de vie	20
1.2.5. Méthodes de Détermination LC50 et DC50.....	20
1.2.5.1. Probit et Logit.....	20
1.2.5.2. Méthode de la moyenne mobile.....	22
1.2.5.3. Méthode Spearman-Karber	22
1.2.5.4. Méthode binomiale	23

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIEL	25
2.1.1 L'origine de la souche bactérienne.	25

2.1.2 Milieux de culture utilisés.....	25
2.1.2 Appareillages.....	26
2.2 Méthodes de production.....	27
2.2.1 REPIQUAGE ET CONSERVATION DE LA SOUCHE	27
2.2.1.1 Repiquage en boîte (courte période)	27
2.2.1.2 Repiquage en tubes incliné (longue période)	28
2.3. PRODUCTION DE BIOÉMULSIFIANT	28
2.3.1 Préparation de la préculture (l'inoculum).....	28
2.3.2 Milieux de production.....	28
2.3.2.1 Milieu des sels minéraux(MSM)	28
2.3.2.2 Milieu riche (LB)	29
2.3.3. Influence de la source de carbone, d'azote, du rapport C/N et de la composition du milieu	29
2.3.3.1 Source de carbone	29
2.3.3.2 Source d'azote.....	29
2.3.3.3 Rapport C/N.....	29
2.3.3.4 Effet de la salinité	30
2.3.3.5 L'effet de la nature du milieu.....	30
2.3.3.6 Cinétique de production	30
2.4. EVALUATION DE LA PRODUCTION DU BIOÉMULSIFIANT	30
2.4.1 Indice d'émulsification (E24)	30
2.4.2 Test de déplacement de pétrole (Ddp).....	31
2.4.3 Tension de surface (TS)	31
2.5. EXTRACTION DE BIOÉMULSIFIANT.....	32
2.5.1 Élimination de la biomasse	32
2.5.2 Méthodes d'extraction	32
2.5.2.1 Précipitation par l'éthanol.....	32
2.5.2.2 Extraction par solvants.....	33

2.6. Tests de toxicité sur l'Artemia.....	34
2.6.1 Principe	34
2.6.2 Matériel biologique.....	34
2.6.2.1 Origine et maintien des cysts.....	34
2.6.3 Méthodes opératoires.....	36
2.6.3.1 Préparation de l'eau de dilution	36
2.6.2.3 Eclosion des cystes.....	36
2.6.3 Préparation des toxiques	37
2.6.3.1 Toxique de référence.....	37
2.6.3.2 Bioemulsifiant BioE644.....	37
2.6.3.3 Phénol.....	38
2.6.3.4 Naphtalène	38
2.6.3.5 Pétrole brut	38
2.6.4 Déroulement de l'essai de toxicité.....	39
2.6.5 Détermination de la CL50 et traitement statistique des résultats.....	40
2.7 Tests de toxicité sur la daphnie	41
2.7.1 Préparation de l'eau de dilution	41
2.7.2 Mode opératoire	42

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 PRODUCTION DE BIOEMULSIFIANT	43
3.1.1. Effet de la source de carbone, d'azote, du rapport C/N et de la salinité.....	43
3.1.1.1 Influence de la source de carbone.....	43
3.1.1.2. Influence de la source d'azote	45
3.1.1.3. Influence du rapport C/N	46
3.1.1.4. L'effet de la salinité	47
3.1.2. Influence du milieu de production	49
3.1.3. Cinétique de production	50
3.2. EXTRACTION DE BIOEMULSIFIANT.....	51
3.3 Tests de toxicité sur l'Artemia	52

3.3.1 Suivi de l'éclosion des cysts et développement des nauplius	52
3.3.2 Choix des nauplius	53
3. 4 Etude de la toxicité du bioémulsifiant	53
3.5 Etude de la toxicité des hydrocarbures pétroliers.....	54
3.5.1 Toxicité de phénol.....	54
3.5.2 Toxicité du naphthalène.....	57
3.5.3 Toxicité du pétrole brut	59
3.6 Toxicité du SDS	60
3.7. Toxicité sur la daphnia	63
CONCLUSION.....	64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

List des Tableaux

Tableau 1.1: Propriétés physico-chimiques et physiologiques des bioémulsifiants	10
Tableau 2.1: composition des milieux LB et MSM	25
Tableau 2.2: produits chimique utilisées	26
Tableau 2.3: Appareillages utilisées	26
Tableau 2.4 : produits chimique utilisée	35
Tableau 2.5: produit toxique utilisée	35
Tableau 3.1 : Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « l'influence du rapport C/N »	47
Tableau 3.2 : Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « l'influence du milieu de production »	50
Tableau 3.3 : Efficacité des différents solvants utilisés pour l'extraction de Bioémulsifiant	52
Tableau 3.4 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du phénol).	56
Tableau 3.5 : Test de reproductibilité de la CL50 des bioessais d' <i>A. franciscana</i> sur le phénol.	57
Tableau 3.6 : Effet de la concentration effective du naphthalène sur la mortalité de <i>A. Franciscan</i>	58
Tableau 3.7 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du pétrole).	60
Tableau 3.8: Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du SDS).	62
Tableau 3.9 : Test de reproductibilité des bioessais d' <i>A. franciscana</i> sur le SDSE valuation Toxique de BioE (SDK 644)	62

Liste des Figures

Figure 1.1 : Structure d'un tensioactif	3
Figure 1.2 : Schématisation de l'organisation des tensioactifs	4
Figure 1.3 : Femelle de <i>Daphnia magna</i>	15
Figure 1.4 : Organisation générale d'un cladocère, vue latérale	15
Figure 1.5 : Cycle de vie de la daphnie	16
Figure 1.6 : Nauplius d' <i>Artemia</i>	18
Figure 1.7 : le cycle de vie d' <i>artémia franciscana</i>	20
Figure 1.8 : Démonstration graphique des transformations en Logit et probit	21
Figure 2.1 : Mesure de l'indice d'émulsification	31
Figure 2.2 : Cysts de l' <i>artémia</i> prêts à utiliser	34
Figure 2.3 : Dispositif d'éclosion des cysts d' <i>A. franciscana</i>	37
Figure 3.1 : Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne, l'activité de surface et l'activité émulsifiante	44
Figure 3.2 : Influence de la source d'azote sur la croissance bactérienne, l'activité de surface (Ddp en cm) et l'activité émulsifiante dans le milieu de production MSM	45
Figure 3.3 : Influence du rapport C/N sur l'activité de surface et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM	46
Figure 3.4 : Influence de la salinité sur la croissance bactérienne et l'activité émulsifiante dans le milieu de production MSM	48
Figure 3.5 : Influence de la nature du milieu (riche ou minimum) sur l'activité de surface et l'activité émulsifiante	49
Figure 3.6 : Cinétique de croissance et de production de bioémulsifiant	50
Figure 3.7 : A : Cysts prêts d'éclosion, B : naupilus de deuxième stade C : nauplius de troisième stade	53

Figure 3.8 : Evaluation de la toxicité du phénol vis-à-vis <i>A. franciscana</i> avec des concentrations décimales	54
Figure 3.9 : Influence de la concentration du phénol sur la mortalité corrigée d' <i>A. franciscana</i>	55
Figure 3.10 : <i>Régression</i> logistique de la mortalité en fonction de la concentration du phénol	55
Figure 3.11 : Courbe d'étalonnage du naphtalène dans le milieu ACR	58
Figure 3.12 : Influence de la concentration du pétrole brut sur la mortalité corrigée de <i>A. franciscana</i>	59
Figure 3.13 : Régression logistique de la mortalité en fonction de la concentration du pétrole	59
Figure 3.14 : Influence de la concentration du SDS sur la mortalité corrigée d' <i>A. franciscana</i>	61
Figure 3.15 : Régression logistique de la mortalité en fonction de la concentration du SDS	61

Liste des Tableaux

Tableau 1.1 : Propriétés physico-chimiques et physiologiques des bioémulsifiants	10
---	----

Tableau 3.1: Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « l'influence du rapport C/N »	45
Tableau 3.2 : Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « l'influence du milieu de production »	48
Tableau 3.3 : Efficacité des différents solvants utilisés pour l'extraction du bioémulsifiant	50
Tableau 3.4 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du phénol)	55
Tableau 3.5 : Test de reproductibilité de la CL50 des bioessais d' <i>A. franciscana</i> sur le phénol	56
Tableau 3.6 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du pétrole)	58
Tableau 3.7 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du SDS)	60
Tableau 3.9 : Test de reproductibilité des bioessais d' <i>A. franciscana</i> sur le SDS	61

Liste des abréviations

C : carbone ;

N : azote ;

CMC : concentration micellaire critique ;

E24 (%) : indice d'émulsification ;

HCB : bactérie hydrocarbonoclaste ;

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ;

DO : Densité optique ;

S. K : Spearman-karber (methode d'analyse LC50et DL50) ;

Ddp (cm) : déplacement de pétrole ;

h : heure ;

t : temps ;

m : masse ;

DL₅₀ : Dose létale médiane ;

CL₅₀ : Concentration létale ;

IC : Intervalle de confiance ;

LB : Milieu Luria Bertani ;

v : volume ;

DMSO : diméthyle Sulfoxyde ;

SDS : Sodium Dodecyl sulfate ;

MSM : Milieu des sels minéraux ;

TS (mN/m) : tension de surface ;

ACR : milieu Artemia Center Reference.

Introduction

Les océans représentent une vaste source exhaustive de produits naturels dans le monde, hébergeant un groupes de flore et de faune les plus divers. Les microorganismes marins ont développé des capacités métaboliques et physiologiques uniques pour prospérer les habitats extrêmes et produisent de nouveaux métabolites qui ne sont pas souvent présents dans des microbes d'origine terrestre. Donc, ce riche habitat marin offre une magnifique opportunité pour découvrir de nouveaux composés comme les antibiotiques, les enzymes, les vitamines, les médicaments, les bio-tensioactifs et d'autres valeurs précieuses de composés d'importance commerciale [1].

Les bio-tensioactifs ou biosurfactants sont des agents actifs en surface et constituent un groupe de molécules de structures diversifiées, synthétisées par des microorganismes (essentiellement des bactéries et des levures). La plupart des surfactants disponibles dans le marché sont d'origine chimique. Un intérêt particulier croissant est porté par les scientifiques sur les surfactants d'origine microbienne à cause de leurs applications potentielles en matière de protection de l'environnement, de leur faible toxicité, haute biodégradabilité et leur haut pouvoir émulsifiant et moussant [2].

Les biosurfactants se subdivisent en deux groupes majeurs : les biosurfactants, de faibles poids moléculaires et les composés de haut poids moléculaire appelés les Bioémulsifiants. La structure chimique de ces derniers renferme des polysaccharides, des protéines, des lipopolysaccharides, lipoprotéines ou un mélange de ces polymères.

Contrairement aux biosurfactants, les bioémulsifiants ne provoquent pas une réduction importante des tensions de surface et interfaciales mais ils conduisent à la formation d'émulsions stables. Les applications potentielles des bioémulsifiants incluent la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, la récupération assistée du pétrole (*enhanced oil recovery EOR*), la formation d'émulsions stables huile dans l'eau en industrie alimentaire et dans les industries cosmétiques [3].

Quoique les biosurfactants/bioémulsifiants soient présumés être moins toxiques que leurs homologues chimiques, des tests sur leur toxicité s'avèrent nécessaires avant leur mise sur le marché dans les divers domaines d'application. De plus, très peu de données relatives sur la toxicité de biosurfactants (ou encore les bioémulsifiants !) dans l'environnement ont été publiés [4]. Les microcrustacés tels que la *Daphnia* et l'*Artemia* sont parmi les organismes les plus utilisés dans l'évaluation de la toxicité de ces produits [5].

Dans ce contexte, un bioémulsifiant produit par une souche bactérienne marine hydrocarbonoclaste a été évaluée pour sa toxicité sur le microcrustacé marin *Artemia franciscana* et celui de l'eau douce *Daphnia magna*. Les tests ont été élargis avec *Artemia franciscana* pour l'étude de la toxicité d'autres produits hydrocarbonés ou dérivés de pétrole (pétrole, phénol et naphthalène) du fait de la facilité relative dans l'élevage de ce dernier par rapport à la daphnie.

Le mémoire est scindé en trois chapitres : un premier chapitre passe une revue les bioémulsifiants et les notions sur l'écotoxicologie. Un deuxième chapitre est dédié au détail de la méthodologie et des protocoles suivis pour la réalisation des différentes expérimentations et bioessais et un troisième chapitre qui traite les résultats obtenus et les discute. Enfin, une conclusion générale pointe sur le fruit de ce travail.

1.1. BIOSURFACTANTS/BIOEMULSIFIANTS

1.1.1 Introduction

Les surfactants (ou agents de surface actifs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire (soluble dans l'eau) et d'une partie hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) (figure 1.1). 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 [6, 7]. Les surfactants peuvent répondre à un grand éventail d'applications industrielle et environnementale.

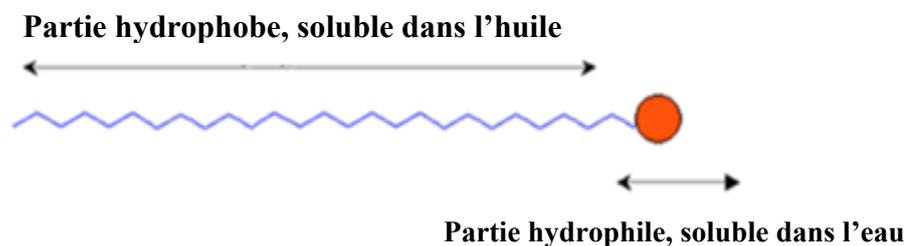


Figure 1.1 : Structure d'un tensioactif.

En comparaison à leurs homologues chimiquement, les biosurfactants ont de nombreux avantages : ils sont moins toxiques, biodégradables. Ils ont de meilleures propriétés moussantes et une sélectivité plus élevée. Ils sont également actifs aux conditions extrêmes (température, pH et salinité), et peuvent être produits à partir des déchets industriels et de sous-produits. Cette dernière caractéristique a un double aspect : aspect économique par réduction leur coût de production et aspect environnemental permettant l'utilisation des déchets (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon, mélasse, effluent de la farine de manioc, etc.) comme substrats en diminuant leur effet polluant [8].

1.1.2 Classification des Biosurfactants

Contrairement aux tensioactifs chimiquement synthétisés qui sont généralement classés sur la base du type de groupe polaire présent (cationique, anionique, non ionique et amphotères), les biosurfactants sont classés par leur composition chimique, leur poids moléculaire, leurs propriétés physico-chimiques, leur mode d'action et leur origine microbienne.

Selon la nature biochimique (composition chimique) du biosurfactant, on distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres [9].

Sur la base du poids moléculaire, ils sont divisés en biosurfactants de faible masse moléculaire, y compris les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides et les biosurfactants à masse moléculaire élevée, appelés bioémulsifiants, contenant des polysaccharides, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biopolymères.

Les biosurfactants à faible masse moléculaire sont efficaces pour abaisser les tensions superficielles et interfaciales, alors que les biosurfactants de masse moléculaire élevée sont plus efficaces pour stabiliser les émulsions huile-dans-eau [10].

A la surface d'un liquide, les tensioactifs s'organisent de telle sorte que la tête hydrophile soit au contact de l'eau et la chaîne hydrophobe orientée vers l'extérieur (figure 2).

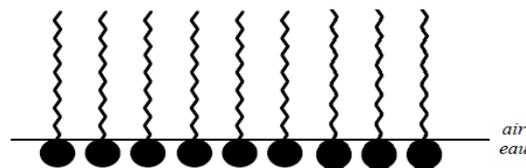


Figure1.2 : Schématisation de l'organisation des tensioactifs.

1.1.3 Comparaison entre biosurfactants/bioémulsifiant

La composition chimique des biosurfactants et des bioémulsifiants est différente et cela peut contribuer à leurs rôles spécifiques dans la nature et les applications biotechnologiques. Les biosurfactants sont généralement des produits microbiens de faible poids moléculaire composés de sucres, d'acides aminés, d'acides gras et de groupes fonctionnels tels que les acides carboxyliques. Ces molécules sont de nature amphiphilique et cette propriété leur permet de se dissoudre dans les solvants polaires et non polaires [11, 12, 13, 14]. Les biosurfactants sont connus pour leur excellente activité de surface qui consiste à abaisser la surface et la tension interfaciale entre différentes phases (liquide-air, liquide-liquide et liquide-solide) ; possédant une faible concentration critique de micelle (CMC) et une formation d'émulsions stables. Ils peuvent agir comme agents mouillants, moussants et

solubilisants dans différents procédés industriels. Les biosurfactants peuvent améliorer la dispersion efficace et la biodisponibilité des polluants hydrophobes. Ils ont la capacité de mobiliser des molécules hydrophobes liées sur des substrats solides. Les biosurfactants produits de manière associée à la croissance confèrent une hydrophobicité accrue de la surface cellulaire sur l'organisme producteur. L'hydrophobicité de la surface cellulaire est essentielle pour un accès facile et absorption de substrats hydrophobes par des cellules microbiennes [11, 12]. Ces biomolécules sont donc des agents appropriés pour différentes technologies industrielle et environnementale.

Les bioémulsifiants sont plus élevés en poids moléculaire que les biosurfactants car ils sont des mélanges complexes d'hétéropolysaccharides, de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de protéines [12, 15]. Ces molécules peuvent efficacement émulsionner deux liquides non miscibles (eau/hydrocarbures). Cependant, ils sont moins efficaces pour la réduction de la tension de surface. Ils sont également impliqués dans la solubilisation de substrats peu solubles. Les bioémulsifiants sont capables de stabiliser les émulsions, cette propriété a augmenté leur utilité dans les industries des produits cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques et pétroliers. Les études ont montré que l'efficacité de l'activité émulsionnante des bioémulsifiants dépend de leur composition chimique [16].

Selon Willumsen et Karlson (1997) [17], les biomolécules de surface actives sont classées en surfactant et émulsifiants : les surfactants jouent le rôle de réduction de la tension superficielle, les émulsifiants sont impliqués dans la formation et la stabilisation des émulsions. Cependant, certaines biomolécules possèdent des propriétés tensioactives et émulsionnantes qui contribuent à leurs fonctions uniques et à de larges utilisations industrielles.

1.1.4 Composition des bioémulsifiants

L'existence de polysaccharides, d'acides gras et de protéines dans la composition des bioémulsifiants leur confère un meilleur potentiel émulsifiant et une capacité à stabiliser les émulsions. Il est également important de noter que certains bioémulsifiants efficaces ne comprennent que des polysaccharides et des protéines. L'émulsan est un bioémulsifiant lipopolysaccharide avec un poids moléculaire de 1000 kDa produit par *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. Sous forme pure, l'émulsan montre une activité émulsionnante à de faibles concentrations (0,01-0,001%).

Par conséquent, il augmente la biodisponibilité de substrats peu solubles. [18, 19]. La souche *Planococcus maitriensis* Anita marine produit de bioémulsifiant dont la composition chimique est : glucides (12,06%), protéines (24,44%), acide uronique (11%) et sulfate (3,03%) [20]. Amaral et al. (2006) [21] ont isolé une souche de levure, *Yarrowia lipolytica*. Le bioémulsifiant produit est de nature de glycolipopeptidique : 15% de protéines, 35%, d'acide palmitique, 21% d'acide stéarique, 9% d'acide laurique et 7% d'acide oléique (6,9%).

1.5. Mode d'action des bioémulsifiants

Kaplan *et al* [22] ont également expliqué le mécanisme de l'activité émulsionnante par le mélange protéine-polysaccharide. Les protéines (partie hydrophobe) attachent aux hydrocarbures, tandis que les polysaccharides liés aux protéines produisent une émulsion huile-dans-eau stable. Il a été également démontré que la teneur en protéines de bioémulsifiant joue un rôle important dans l'activité d'émulsification [23].

1.6. Détection de bioémulsifiants

La détection des tensioactifs biologiques est souvent basée sur la mesure de la tension superficielle. D'autres méthodes sont également utilisées : le déplacement d'huile (Ddp), l'activité hémolytique, l'utilisation de l'indice d'émulsification E24, l'activité d'émulsification et l'adhésion des bactéries aux hydrocarbures (BATH) également connu sous le nom d'hydrophobicité de la surface cellulaire [24, 25, 26].

Selon Satpute *et al.* (2008) [27], ces méthodes sont insuffisantes pour l'identification et la différenciation entre les bioémulsifiants et les biosurfactants. Ceci est dû au fait que les bioémulsifiants sont mieux connus pour l'émulsification sans réduction significative de la tension de surface.

Expérimentalement, il a été démontré qu'il n'y a pas une corrélation entre la tension de surface et l'indice d'émulsification.

L'indice d'émulsification E24 et l'activité d'émulsification sont des tests nécessaires pour mesurer la capacité d'émulsification de toute molécule de surface active avec différents hydrocarbures. En utilisant l'indice d'émulsification E24, Souza *et al*(2012) [28] ont identifié six isolats producteurs des émulsifiants montrant une efficacité permet d'émulsifier les

différents hydrocarbures (plus de 50% contre le diesel, le décane, le kérosène et l'huile moteur) sans réduction significative de la tension de surface.

Le potentiel émulsifiant des composés tensioactifs issus de différentes levures ne présentant aucune réduction de la tension superficielle a été évalué à l'aide du test de l'indice d'émulsification. Monteiro *et al* (2010), Perfumo *et al* (2009), Sar *et al* (1983) [16, 11, 23] ont identifié un bioémulsifiant puissant produit par *Yarrowia lipolytica* qui présentait des valeurs élevées d'émulsification avec les hydrocarbures, sans réduction de la tension superficielle.

1.7 Paramètres influençant la production des bioémulsifiants

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

1.7.1 Source de carbone

Généralement, la source de carbone est divisée en trois catégories à savoir : les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales. En effet, le type, la qualité et la quantité de biosurfactant sont influencés par la nature du substrat. Les composés solubles (glucose, saccharose et glycérol) peuvent être utilisés comme source de carbone pour la production de biosurfactants [29].

1.7.2 Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse de biosurfactant. L'azote peut être apporté sous différentes formes (les sels d'ammonium, nitrates, l'urée, ...) selon les bactéries productrices [30, 31]. L'optimisation du rapport C/N est indispensable afin d'obtenir un bon rendement de production.

1.7.3 pH

Le métabolisme cellulaire est sensible au pH qui affecte les réactions chimiques des cellules vivantes. Généralement, les milieux acido-basiques sont défavorables pour la production de bioémulsifiants.

1.7.4 Sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitée en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [32] .

1.7.5 Ions métalliques

Les ions métalliques jouent un rôle très important dans la production de certains biosurfactants car ils forment des cofacteurs importants de nombreuses enzymes.

1.7.6 Effet de l'agitation

L'agitation est considérée comme paramètre important pour la croissance cellulaire. Elle influe sur l'efficacité du transfert de masse de l'oxygène et des composants du milieu. En augmentant le taux d'agitation de 100 à 250 tr/min, la production maximale de Rhamnolipides était à 200 tr/min et la biomasse microbienne a également été améliorée deux fois. Ce qui indique que l'élévation du niveau de l'oxygène dissous semble avoir un effet positif sur la croissance cellulaire et la production de Rhamnolipide [33].

1.8 Microorganismes marins producteurs de bioémulsifiants

Le milieu marin ou les zones côtières en général sont une source potentielle des microorganismes qui sont bien connus pour leurs propriétés bioactives variées, qui comprennent la production de métabolites secondaires, des enzymes hautement thermostables et des composés bioactifs. Un grand nombre de microorganismes producteurs de bioémulsifiants ont été isolés : *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhodotorula glutinis*, *Antarctobacter sp.*, *Halomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Halomonas eurithalina*, *Pseudomonas putida*, *Planococcus matriensis*, etc. La souche *Planococcus matriensis* Anita marine produit de bioémulsifiant dont la composition chimique est : glucides (12,06%), protéines (24,44%), acide uronique (11%) et sulfate (3,03%). Il forme des émulsions stables avec le xylène et les huiles de paraffine et silicone. La valeur de la tension de surface était de 46.07 mN/m. Kumar *et al* (2007) Amaral *et al* (2006) [20, 21] ont isolé une souche de levure, *Yarrowia lipolytica*. Le bioémulsifiant produit est de nature de glycolipopeptidique : 15% de protéines, 35%, d'acide palmitique, 21% d'acide stéarique, 9% d'acide laurique et 7% d'acide oléique (6,9%). Son poids moléculaire était d'environ 20 kDa avec une valeur de CMC de 0,5 g/L.

La plupart des études antérieures se sont appuyées sur les applications environnementales des biosurfactants (émulsifiants/dispersants). Récemment, la tendance a changé et les recherches ont commencé à se concentrer sur d'autres applications : antimicrobiens, la élimination du biofilm, la synthèse des nanoparticules, etc.

1.8.1 Microorganisme marine hydrocarbonoclasticus

Une communauté bactérienne très diversifiée sera plus à même de faire face à une perturbation du milieu et reviendra plus rapidement à son état d'origine qu'une communauté moins diversifiée. Cela prend tout son sens dans le cas d'une pollution pétrolière. En effet, parmi les bactéries marines, cela fait tout juste un siècle que des bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme seule source d'énergie et de carbone ont été isolées pour la première fois, ce sont les bactéries hydrocarbonoclastes (HCB pour hydrocarbonoclastic bacteria) [34].

La plupart des bactéries hydrocarbonoclastes appartiennent aux protéobactéries. On peut noter quelques genres majoritaires parmi les 79 récemment répertoriés : *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Thalassolituus*, *Oleispira* et *Vibrio*. De nombreuses études ont montré qu'elles étaient ubiquistes et présentes en faible quantité même dans les environnements dépourvus de contamination [34].

Naturellement, leurs effectifs sont accrus dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole (Atlas 1981 ; Floodgate 1995). Mais chacun de ces genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes. Par exemple il a été clairement établi que le genre *Alcanivorax* est prépondérant dans la dégradation des alcanes alors que le genre *Cycloclasticus* est associé à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) n'excédant pas trois cycles benzéniques. La biodégradation totale d'un pétrole n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures. Si les bactéries dégradant les composés les plus simples (comme les alcanes linéaires à courte chaîne) sont abondantes dans l'environnement, celles qui possèdent les machineries enzymatiques pour dégrader les composés les plus complexes (comme par exemple les composés aromatiques de plus de quatre cycles) sont beaucoup moins répandues [34].

Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué. La diversité des espèces bactériennes est un facteur décisif dans la réponse des communautés bactériennes à ce type de variation environnementale. Son étude est primordiale pour la compréhension du phénomène d'élimination naturelle des polluants pétroliers [34].

1.9 Application des bioémulsifiants

Générale, les bioémulsifiants ont été associés à un certain nombre d'applications potentielles, y compris : l'assainissement de l'eau polluée et du sol, la récupération améliorée du pétrole et le nettoyage des navires et des machines contaminés par l'huile ; enlèvement de métaux lourds [11, 35, 31] ; formation d'émulsions stables dans les industries alimentaires et cosmétiques [36], et les activités thérapeutiques (agents antibactériens, antifongiques, pesticides et herbicides) [37]. Les propriétés physico-chimiques des bioémulsifiants sont présentées dans le tableau 1.1

Tableau 1.1 : Propriétés physico-chimiques et physiologiques des bioémulsifiants [38].

Type	Microorganisme producteur	Propriétés physicochimique	Rôle physiologique
Emulsan RAG-1	<i>Acinetobactère sp.ATCC 31012</i>	Lipopolysaccharides (acide gras insaturé)	- Augmentation de la biodisponibilité des substrats peu solubles - Fixation des métaux lourds toxiques
Emulsan BD4	<i>Acinetobactère calcoaceticus</i> BD4	Complexe de polysaccharies et protéines	Stabilisateur :émulsion huile dans l'eau

alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	Alanine :polysaccharides et protéines	Emulsification et solubilisation
Mannoprotei ns	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Polysaccharide protéines et	Formation des émulsions stables
Bioémulsifia nt de type acide uronique	<i>Halomonas eurihalina</i> <i>Klebsiella sp.</i>	Polysaccharides -proteinss -acide uronique	Emulsification et détoxification des hydrocarbours

1.2. ECOTOXICITE

1.2.1 Définition

C'est la science qui étudie l'impact des toxiques sur les écosystèmes, soit l'étude des effets toxiques des substances sur les organismes vivants, la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Plusieurs auteurs ont proposé des définitions différentes pour ce terme. Truhaut (1977) la définit : branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par les substances naturelles ou les polluants d'origine synthétique sur les constituants des écosystèmes. Butler (1984) précisa : c'est l'étude des effets des polluants dispersés dans l'environnement sur cet environnement et les éléments vivants qui en font partie [39].

Toutefois, comme l'écotoxicologie s'appuie aussi sur la chimie, la physiologie, la biochimie, la biologie moléculaire, etc. Forbes et Forbes (1997) et Fent (2003) [39] proposent plutôt la définition suivante : « *domaine d'étude qui intègre les effets écologiques et toxiques des polluants chimiques sur la population, les communautés et les écosystèmes ainsi que leur devenir (transfert, transformation, dégradation) dans l'environnement* » Cette discipline implique donc différentes techniques d'investigation toutes interdépendantes les unes des autres soient[39]:

- Suivi des contaminants dans l'environnement : analyses chimiques, utilisation d'espèces bioindicatrices de contamination et/ou de biomarqueurs d'exposition.
- Devenir des contaminants dans l'écosystème récepteur (milieux abiotiques et biologiques) et leurs transferts et transformations physico-chimiques et/ou biochimiques entre les différents compartiments et les conséquences sur leur potentiel toxique.
- Prévision des effets des polluants sur les écosystèmes, du niveau moléculaire jusqu'à la biosphère, basés sur des bioessais de toxicité d'échelle variable

1.2.2 Types de toxicité

1.2.2.1 Toxicité aiguë : provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai suivant l'absorption d'une dose importante d'une substance toxique.

1.2.2.2 Toxicité subaiguë : Ne provoque pas la mort de la totalité de la population exposée à une substance toxique.

1.2.2.3 Toxicité à long terme (chronique) : c'est la forme la plus commune : exposition permanente à une substance toxique à de très faibles concentrations.

1.2.3. Evaluation de la toxicité d'un polluant

1.2.3.1 Tests d'écotoxicité

Les tests d'écotoxicité ont pour objet d'évaluer le degré de sensibilité (ou de résistance) à une substance donnée chez diverses espèces animales ou végétales et d'étudier les principaux effets létaux ou sublétaux. Aussi, l'évaluation se base sur diverses formes de toxicité doit être effectuée dans des conditions expérimentales bien standardisées et porte sur la population et non pas sur l'individu. Trois précautions doivent être prises dans tout essai écotoxicologique [40] :

- Echantillon aussi homogène que possible de l'espèce testée : sexe, âge, poids.
- Uniformiser les techniques d'exposition.
- Traiter les résultats des expériences avec une méthode statistique appropriée.
- Dose Létale DL50, Concentration effective qui immobilise 50 % de la population CE50, etc.

1.2.3.2 Bioessais de toxicité

Les bioessais de toxicité employés pour l'eau et les sédiments contaminés peuvent être utilisés comme outils pour l'évaluation des risques et des impacts associés aux techniques de restauration. Les bioessais de toxicité avec les sédiments contaminés emploient généralement des batteries d'essais de toxicité aiguë (léthalité ; courte durée) et chronique ou

sub-létal (croissance, reproduction ; plus longue durée) sur des organismes de différents niveaux trophiques [39].

Les espèces tests utilisées ont une sensibilité différente, notamment en raison des mécanismes d'action des contaminants [39].

Les critères d'effets sont multiples afin de couvrir plusieurs niveaux d'effets : survie, croissance, reproduction, autres paramètres biologiques tels l'activité enzymatique, etc. Ces tests sont menés dans des conditions contrôlées de lumière, température, milieu de culture ou support d'élevage. L'accent est mis sur la standardisation et la reproductibilité des mesures réalisées, de manière à obtenir une information fiable sur le phénomène de toxicité [39].

1.2.3.4. Bioindicateurs écologiques de la toxicité

L'utilisation de bioindicateurs écologiques de toxicité repose sur le principe de sélection des organismes aquatiques résistants aux pollutions au détriment des organismes sensibles. En effet, à l'échelle d'un peuplement, les individus ou les espèces les plus faibles vont disparaître sous la pression du polluant (mort ou fuite), laissant la possibilité aux espèces résistantes de se développer davantage [41].

1.2.4. Microcrustacés zooplancton en Ecotoxicologie

1.2.4.1 *Daphnia magna*

Les daphnies ont été largement utilisées en écotoxicologie et *Daphnia magna* est l'un des trois modèles biologiques les plus utilisés, avec les algues et les poissons, dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxiques des substances chimiques .

C'est ainsi que les données expérimentales relatives aux daphnies représentent 8% de l'ensemble des données expérimentales aquatiques trouvées dans les bases de données .De nombreux auteurs ont utilisé la daphnie comme modèle biologique et la première publication date, à notre connaissance, du début du XXème siècle. Ce sont ensuite les travaux de qui publie un article intitulé « sur l'utilisation à des fins expérimentales de *D. magna* Straus comme animal de laboratoire pour mieux comprendre les conditions de vie dans l'eau ». Ensuite, Anderson *et al*, (1948) [42] étudièrent l'écotoxicité de diverses substances présentes dans les effluents industriels sur *D. magna*, avant que cet organisme ne fasse l'objet de normes (aux USA et en France) ou de lignes directrices (LD). Le nombre de publications qui traitent des effets écotoxiques aigus et chroniques sur la daphnie est très élevé [42].

La daphnie est utilisée pour l'évaluation de l'impact potentiel des produits chimiques sur l'environnement aquatique. Seule ou au sein de batteries. Elle permet aussi d'évaluer l'écotoxicité potentielle d'effluents au laboratoire ou *in situ*, de lixiviats de divers déchets et d'eaux de pluies . En outre, la daphnie permet d'établir des critères de qualité des eaux ou des normes de qualité environnementale [42].

1.2.4.2 Avantage d'utilisation

- Manipulation, conservation, et élevage faciles à réaliser au laboratoire suite à sa taille relativement petite ,Visible à l'œil nu, aussi facilement à élever, Cycle de vie court, d'une population uniforme grâce à la parthénogenèse .ce qui permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations [42].
- Sensibilité à une large gamme de produits chimiques et des effluents de raffinerie de pétrole. La mortalité, définie comme la fin des contractions intestinales et du battement cardiaque, est un des effets de l'agent toxique [42].

1.2.4.3 Biologie

Le terme cladocère à fait l'objet d'un débat entre taxonomistes en ce qui concerne l'utilisation ou non du terme cladocère. Calman (1909) [42]. a proposé la division de la sous-classe des branchiopodes en 4 ordres à savoir : Anostracés, Notostracés, Conchostracés et Cladocères. Selon Fryer (1987 a,b) [42]. ce terme utilisé comme unité taxonomique, devrait être rejeté vu qu'il ne correspond à aucun groupe monophylgénétique et qu'il était juste retenu par commodité pour une description générale de ces organismes[42].

En revanche, d'autres travaux plus récents tels que ceux de Forro *et al*, (2008) ; Kotov et Taylor (2010), Van Damme et Eggermont (2011) [42] conservent le terme cladocère dans la taxonomie des crustacés .

1.2.4.3.1. Classification

La classification de la daphnie est [42] :

Embranchement : Arthropodes

Classe : Crustacés

Sous-classe : Branchiopodes

Super-ordre : Anomopodes

Ordre : Cladocères

Famille : Daphniidae

Genre : *Daphnia*

Espèce : *Daphnia magna*



Figure 1.3 : Femelle de *Daphnia magna*.

1.2.4.3.2 Morphologie

La taille de la daphnie adulte varie entre 3 et 5 mm et est subdivisée en deux parties : la tête et le corps. La tête distinguée par deux antennes et les yeux et le corps est recouvert par une carapace transparente qui se renouvelle à chaque mue marquée (Green, 1963). Cette carapace se prolonge par une épine caudale dont la taille est variable en fonction de plusieurs contraintes environnementales. En effet, la morphologie des daphnies peut changer périodiquement au cours des cycles saisonniers et affecter en particulier la forme de la tête et de la carapace, figure 1.4. La durée de vie moyenne d'une daphnie est généralement de 40 jours à 25°C et de 56 jours à 20°C [42].

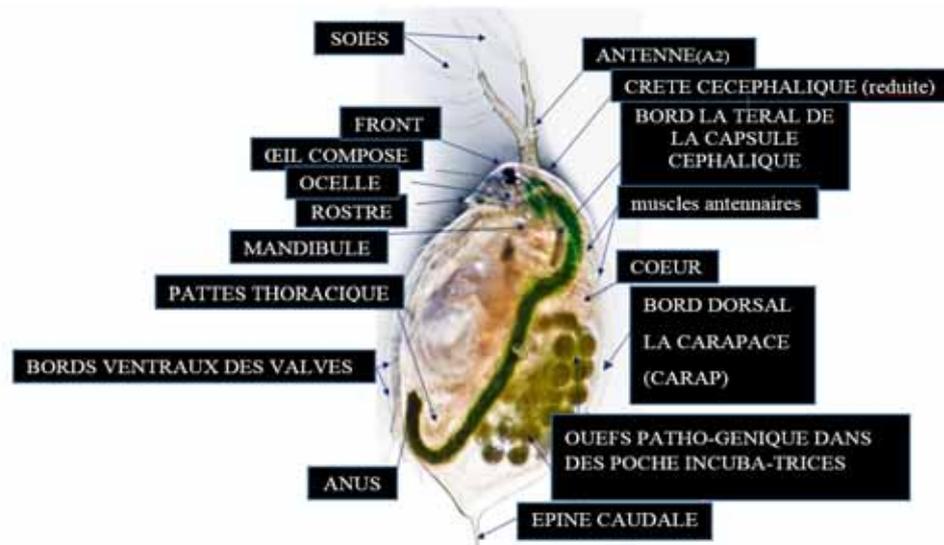


Figure 1.4 : Organisation générale d'un cladocère.

1.2.4.3.3 Cycle de vie

Selon les conditions environnementales, la daphnie peut se reproduire de façon sexuée ou asexuée. Si les conditions sont favorables, les daphnies se reproduisent par reproduction asexuée ou parthénogénétique. Dans ce cas, les femelles adultes produisent à partir d'ovules non fécondés d'autres jeunes daphnies femelles (diploïdes) qui leur sont génétiquement identiques. Après 3 jours, les jeunes daphnies bien développées sont prêtes à être expulsées de la poche incubatrice par des flexions ventrales des femelles adultes. Juste avant la ponte, les daphnies adultes subissent une mue puis déposent à nouveau une nouvelle ponte dans leur poche incubatrice. Les générations parthénogénétiques se succèdent tant qu'il n'y a pas apparition de conditions défavorables (manque de dioxygène ou de nourriture, diminution de la température, effet de masse de daphnies, accumulation de déchets,...), le cycle parthénogénétique de la daphnie est illustré dans la figure 1.5.

Lorsque les conditions deviennent défavorables (cycle sexuel de la figure 1.5), les daphnies femelles adultes produisent des œufs diploïdes asexués qui se développent en mâles. En outre, les daphnies femelles peuvent aussi produire des œufs haploïdes qui nécessitent la fécondation par les mâles. Les œufs fécondés sont placés dans une coquille de protection ou éphippie, qui contient deux œufs de résistance de couleur noire (figure 1.5) et doivent subir une diapause. Lorsque les conditions redeviennent favorables, ces œufs de résistance éclosent mais donnent toutefois naissance à une population génétiquement différente des daphnies mères (Chèvre, 2000) [42].

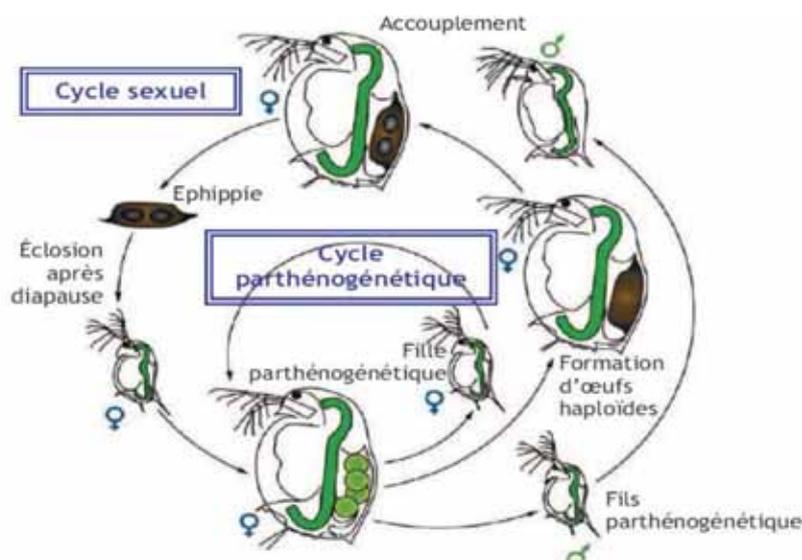


Figure.1.5 : Cycle de vie de la daphnie [42].

1.2.4.3.4. Milieu de vie

Les daphnies sont essentiellement des organismes littoraux, largement répandues dans les eaux tempérées et colonisent en particulier les eaux stagnantes. Ces organismes peuvent se retrouver dans les flaques d'eau, les mares, les étangs de pisciculture, les canaux, les étangs, les lacs, mais rarement dans les rivières [42].

1.2.4.2 ARTEMIA

1.2.4.2.1 Artemia en écotoxicologie

L'utilisation d'*Artémia* en écotoxicologie pose un nombre raisonnable de questions à répondre, à savoir des considérations pratiques de culture et de réalisation en laboratoire. Ce qui rend réalisable le développement durable dans les essais biologiques à base d'*Artémia*. Néanmoins, une grande attention est nécessaire pour bien comprendre la complexité d'espèces ou souches provenant des sites distincts géographiquement et la possibilité d'implication de ces caractéristiques générales sur la culture, les pratiques et l'interprétation finale des résultats. *Artémia* depuis longtemps est l'un des exemples les plus frappants d'organismes bien adaptés à la pratique en laboratoire, à condition qu'un contrôle rigoureux des facteurs influençant soit appliqué [43].

Ainsi, les études et les tests de toxicité réalisés sur l'*Artémia* l'ont référencé comme une espèce moins sensible par rapport à d'autres organismes ou les algues, dans les mêmes conditions expérimentales telles que *Streptocephalus rubricaudatus*, *Sphaerocarpos texanus*, *Echinometra lucunter*, *Crassostrea rhizophorae* [43] et *Selenastrumcapricornutum*, *Dunaliella tertiolecta* [43]. Guerra (2001) [43]. a également signalé une sensibilité inférieure des analyses basées sur *Artemia*, par rapport à des tests de dépistage disponibles dans le commerce (Microtox et Rotoxkit) *Artémia* a été considéré d'être l'organisme le moins sensible parmi un groupe d'espèces variées de crustacés, comme *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* et *Thamnocephalus platyurus*. *Artemia franciscana* était l'organisme le moins sensible testé. Mais il a été trouvé plus sensible que *Daphnia similis* et *Ceriodaphnia dubia* appartenant à Niclosamide [43]. Mais malgré ça, leur utilisation reste massive et plus efficace dans les essais toxicologiques [43].

1.2.4.2.2. Avantages des bioessais d'Artémia

Artémia a été suggéré par de nombreux auteurs comme un organisme modèle pour étudier la biologie des infections, les interactions hôte-microbes ou l'effet des agents de chimiothérapie contre les maladies qui se produisent dans les crevettes pénéides, les homards et autres crustacés [44].

Artémia a également été utilisé comme modèle pour étudier la régulation de l'expression des gènes pendant le développement embryonnaire. Selon Marques *et al* 2005 [44], Artemia a plusieurs caractéristiques et avantages biologiques frappants, permettant leur utilisation potentielle comme système modèle pour la recherche fondamentale en biologie animale [44] tels que :

- La possibilité d'être cultivé dans des conditions axéniques et gnotobiotiques utilisant différents types de sources d'alimentation avec un appareil expérimental simple.
- Temps de génération court (2-3 semaines), bien que dans des conditions optimales, l'Artemia peut vivre pendant plusieurs mois, elles peuvent passer du nauplius à l'adulte en 8 jours seulement.
- Disponibilité de grandes quantités de kystes, différentes espèces et souches de tous les continents (et par conséquent, différents antécédents génétiques).
- Organisme de petite taille qui peut être facilement cultivé à haute densité et / ou à petite échelle, en utilisant des systèmes de culture très simples.

1.2.4.2.3 *Artemia franciscana*

1.2.4.2.3.1 Classification

Le statut taxonomique du genre Artemia est le suivant (Martin et Davis, 2001) [45] :

Sous-phylum : Crustacea Brünnich, 1772

Classe : Branchiopoda Latreille, 1817

Sous-classe : Sarsostraca Tasch, 1969

Ordre : Anostraca Sars, 1867

Famille : Artemiidae Grochowski, 1896

Genre : Artemia Leach, 1819.



Figure.1.6 : Nauplius d'*Artemia*.

A ce genre appartiennent les espèces suivantes [45] :

salina, *monica*, *urmiana*, *franciscana*, *persimilis*, *sinica*, *tibetiana*, sp. Pilla et Beardmore 1994, et la population (s) parthénogénétique (s) d'Europe, Afrique, Asie et Australie.

Les espèces de ce genre de l'anémie habitent plus de 500 lacs salés, mais pas les mers, des zones tempérées, subtropicales et tropicales. Ils sont très bien adaptés aux eaux à haute salinité (jusqu'à 70g/l, mais peuvent survivre même à 250 g/l (Ruppert & Barnes, 1994) [45] avec une diversité assez faible d'organismes vivants et l'absence de prédateurs ou d'espèces compétitives.

1.2.4.2.3.2 Morphologie d'Artemia

L'Artémia vient de nombreuses couleurs - du blanc au rose, de l'ombre ou du vert (Figure 1.6). Les différentes couleurs résultent probablement d'un régime spécifique ainsi que par rapport à des conditions environnementales. Les femelles peuvent atteindre la taille de 30 mm (le plus souvent de 12 à 18 mm), les mâles sont plus petits. Les mâles adultes, sont très grands et modifiés 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 nauplius, mais les mâles portent une paire de tubulaire, pénis rétractiles ; juste derrière la dernière paire de phyllopoies et la larve de ces crevettes ou les nauplius est rose ou plutôt auburn, sa taille est d'environ 0,4 mm [45], généralement dans le corps d'artémie on distingue 3 parties (figure 1.7) [46] :

-La tête : Elle porte un œil nauplius médian et un pair d'yeux latéraux, dans sa partie antérieure on remarque une paire d'antennes courbées portant la forme d'une grosse pince qui sert à saisir la femelle lors de l'accouplement chez cette dernière paire d'antennes est beaucoup plus petite, on trouve sur la tête 3 appendices, (une paire de mandibules, une paires de maxillules), L'ensemble recouvert par une sorte de masques est appelé par Joly, (le chaperon).

-Le thorax : Est composé de 11 segments chaque segment porte une paire d'appendices natatoires foliacés.

-L'abdomen : Il est composé de huit segments : les 2 premiers segments dit génitaux (deux pénis chez le mâle/la poche incubatrice des femelles); le dernier segment abdominal porte deux appendices portant de longues soies. Entres ces appendices se trouve l'anus.

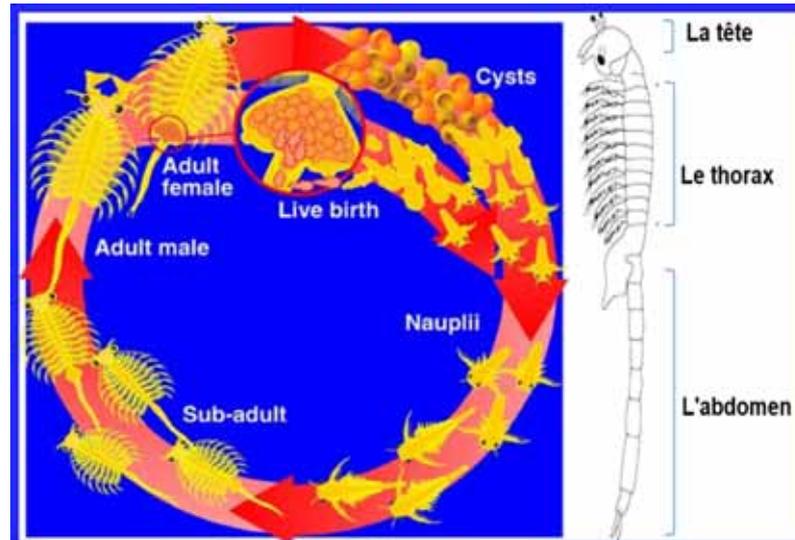


Figure 1.7 : le cycle de vie d'*artémia franciscana* [46].

1.2.4.2.3.3 Cycle de vie

L'adulte femelle peut produire 300 nauplis ou cysts chaque 04 jours, le nauplius passe au stade adulte en 8 jours. Les larves éclosent généralement après 20 à 48 heures de développement embryonnaire et atteignent leur taille terminale après 8 à 10 jours, au cours desquelles ils subissent environ 17 mites, La durée de vie de *A. franciscana* varie de 2 à 4 mois en fonction de la salinité et de la température. La reproduction du genre *Artémia* peut se dérouler en deux modalités [45] : sexuelle ou parthénogénétique.

1.2.5 Méthodes de Détermination de la LC50 et la DC50.

1.2.5.1 Probit et Logit

La régression, probit ou Logit est une méthode couramment utilisée et satisfaisante d'analyse des données quantiques mathématiquement. Les logits sont supérieurs, mais les probits ont été couramment utilisés en écotoxicologie. À l'instar de doute les autres méthodes, celle-ci est des plus efficaces si les données sont assez lisses et régulières. Pour les données quantiques telles que les résultats des essais de toxicité létale, la mortalité d'un organisme est un phénomène binaire, en tout ou rien (oui ou non) [47].

- Dans un récipient, le nombre d'organismes touchés (y) est la somme des résultats binaires individuels. Pour ce récipient, les résultats expérimentaux s'expriment par y (le nombre d'organisme dans le récipient).

- Habituellement, plusieurs récipients sont exposés à différentes concentrations. Si les propositions d'organismes touchés dans chaque récipient sont portées sur un graphique, en fonction du logarithme de la concentration, et si on réunit les points, la relation dose-effet empirique qui s'en dégage ressemble à une fonction de répétition de la loi normale (figure 1.8, graphique de droite) ou à une distribution de Gompertz. Cette distribution décrit la résistance de l'échantillon d'organismes au toxique.
- Cette distribution peut désormais être traitée comme normale ou logistique, etc. Les effets binomiaux dans la distribution sont transformés à l'aide des transformations probit, Logit ou de Gompertz etc., qui redressent la courbe dose-effet sigmoïde (figure 1.8).
- La relation linéaire résultante entre le logarithme de la concentration et l'effort binomial sert à estimer les ordonnées à l'origine et les pentes, on utilise le modèle linéaire à la manière d'une régression inverse, pour estimer la CE en %. La régression logistique et probit sont deux méthodes courantes que l'on emploie pour la transformation de l'étape 4 ; les transformations en question sont montrées dans la figure 1.8 La partie gauche de la figure 1.8 montre schématiquement le calcul des probits.

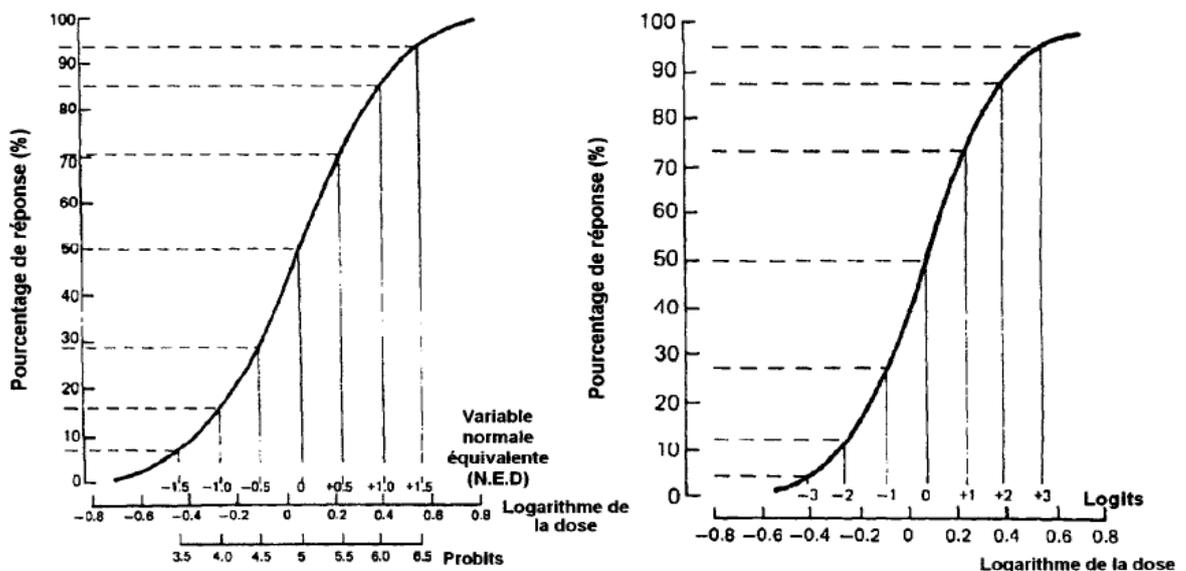


Figure.1.8 Démonstration graphique des transformations en Logit et probit

(D'après Hewelitte et Placktt, 1979).

La courbe est une courbe typique du pourcentage d'effet en fonction du logarithme de la concentration. Les tirettes horizontales représentent l'écart types de la courbe normale cumulative (écart types par pas de 0,5 sur l'échelle verticale du pourcentage d'effet). A partir de leur point d'intersection avec la courbe, ils aboutissent sur l'échelle horizontale des logits dans le bas de la figure 1.8. Le résultat est similaire ; la courbe est redressée lorsque l'on exprime les logits en fonction du logarithme de la concentration. Après la transformation en probits (ou en logits), on procède à l'analyse statistique.

1.2.5.2 Méthode de la moyenne mobile

Cette méthode n'est pas recommandée pour les programmes d'environnement canada, mais, ailleurs, on l'a considérée comme une solution possible pour l'analyse des données quantique, et Stephan (1977) [47]. l'a considérée comme « méthode choix » en toxicologie des organismes aquatiques. La méthode mis en point par Thompson (1947) [47], a besoin des résultats d'au moins quatre traitements, entre lesquels les intervalles géométriques ou logarithmiques doivent être égaux. En outre, elle suppose que la distribution des données est symétriques pour estimer la CE50, mais non là CE d'autres pourcentages d'effet, comme la CE25. En théorie, avec la méthode de moyenne mobile on devrait estimer la CE50 avec un ou sans effet partiel, elle ne donne pas les limites de confiance sans au moins effet partiel. Dans la pratique, le programme ordinaire offert pour appliquer la méthode ne fonctionne pas moins qu'il n'y ait deux effets partiels ou plus [47].

Pour un ensemble d'observation, la méthode de la moyenne mobile estime plusieurs ensembles de CE50 et leurs limites de confiance, un ensemble pour chaque « fourchette » utilisée dans les calculs, c'est-à-dire le nombre d'intervalles entre les calculs. Le programme de Stephan imprime les résultats des calculs utilisant plusieurs de ces fourchettes, de sorte que l'expérimentateur peut examiner les modifications produites par diverses fourchettes [47].

1.2.5.3. Méthode de Spearman- Karber

Nous recommandons cette méthode (la S.-K.) pour les données quantiques qui englobent :a) un effet partiel : des effets à 0 et à 100%. Autrement dit, la méthode peut être utilisée lorsque les méthodes des probits ou des logits ne fonctionnent pas parceque les données ne comprennent pas deux effets partiels. Cette méthode est offerte dans la plupart

des programmes commerciaux tels que CETIS et TOXSTAT ainsi que sur le site web <http://www.epa.gov/nerleed/stat2.htm>. Elle est également disponible dans le programme du MEEQ (OMEE), bien que cette version semble mal fonctionner dans certains cas où les données sont irrégulières et qu'il soit préférable d'éviter de l'utiliser [47].

Préconisée pour les essais d'écotoxicité par Hamilton *et al.* (1977), la méthode (S.-K.) procède très différemment, mathématiquement, de la régression probit. Elle estime la CE 50 à partir des moyennes pondérées des points milieux entre les concentrations, sur une échelle logarithmique, la pondération appliquée à chaque point milieu est la modification de la proportion de l'effet entre les deux concentrations, similairement à l'estimation de la moyenne d'une distribution de fréquences par multiplication des centres de classe [47].

1.2.5.4 Méthode binomiale

Méthode mathématique connue, la méthode binomiale est actuellement offerte sous forme de logiciel commode pour l'analyse quantitative dans un programme de Stephan *et al.* (1978) et elle est également modifiée pour la plateforme WINDOWS 1995. Nous la recommandons pour les nombreux ensembles de données dans lesquels une concentration entraîne un effet nul sur les organismes en expérience et où la concentration supérieure suivante provoque un effet à 100%. On doit aussi l'utiliser pour un ensemble de données dans lesquelles se trouve un effet partiel, mais qui ne peuvent pas être analysées de façon satisfaisante par la méthode de Spearman-Kärber. Les opérations mathématiques sont très simples [47].

Quand aucun effet n'est partiel, la méthode binomiale suppose, par approximation, que la CE50 est la moyenne des logarithmes des deux concentrations causant les effets de 0 à 100%. Elle n'estime pas des limites de confiance, mais elle emploie les mêmes concentrations comme bornes d'un intervalle prudent (large) à l'intérieur duquel se trouve la CE50. Les vraies limites de confiance se trouveraient probablement bien à l'intérieur de cette fourchette. Le calcul de base d'une CE50 peut se faire facilement, sans programme informatique, par la moyenne des logarithmes des deux concentrations, qui encadrent la CE50. C'est la moyenne géométrique, que l'on peut également estimer en multipliant les valeurs arithmétiques des deux concentrations, puis en extrayant la racine carrée du produit, comme dans l'équation $CE = \sqrt{(C_{inf})(C_{sup})}$.

C_{inf} : La valeur arithmétique de la concentration « inférieure » sans effet

C_{sup} : La valeur arithmétique de la concentration « supérieure » causant l'effet total.

L'intervalle à l'intérieur duquel on présume que se trouve la CE50 est donné par les deux mêmes concentrations. De ce fait, cette méthode binomiale est une simple interpolation linéaire sur une échelle logarithmique de la concentration. L'appellation méthode binomiale a été retenue pour un usage ancien [47].

2.1 MATERIEL

Ce projet de fin d'étude s'inscrit dans un contexte global qui s'intéresse à la bioremédiation de l'eau de mer contaminé par le pétrole. À cet effet et afin de justifier l'introduction du bioémulsifiant produit par la souche hydrocarbonoclastes marine SdK644, des séries d'expériences sur la toxicité de cet agent ainsi que le pétrole sont avérées nécessaires. L'organisme test choisi comme « représentatif » de la toxicité sur la vie aquatique marine est le microcrustacé *Artemia*. Eventuellement et dans un contexte environnemental global, nous avons testé la toxicité d'autres dérivés pétroliers (le phénol et le naphthalène). Ainsi, un essai (timide) de bioémulsifiant, du phénol et du bichromate de potassium a été réalisé sur un organisme plus sensible aux toxiques, celui de la Daphnie.

2.1.1 L'origine de la souche bactérienne

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.

2.1.2 Milieux de culture utilisés

- Milieu Luria Bertani LB
- Milieu minimum des sels mineurs MSM

Tableau 2.2 : composition des milieux LB et MSM

produits	Concentrations	Utilisations
Chlorure de sodium NaCl	23 g/l	Composition de milieu LB
Peptone	5 g/l	
Extrait de levure	10 g/l	
l'agar	18-22 g/l	
KH ₂ PO ₄	0,7 g/l	Composition de milieu MSM
Na ₂ HPO ₄	0,9 g/l	
MgSO ₄	0,4 g/l	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g/l	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001 g/l	
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5 g/l	Composition d'éléments traces
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,7 g/l	
H ₃ BO ₃	0,26 g/l	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,06 g/l	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,5 g/l	

Glycerol	20	ml/l	Source de Carbone
Glucose	40	g/l	
NaNO₃	2	g/l	Source d'azote
NaH₄Cl	2	g/l	

Tableau 2.3 : produits chimique utilisées

Produits	Utilisation
oxyde de sodium (NaOH)	ajustement de pH
sulfate de sodium anhydride (Na₂SO₄)	séchage d'huile
Ethanol absolu (C₂ H₅ OH)	Extraction de la biomasse
Methanol (CH₃OH)	
Chloroforme (CH₃Cl)	
Acetate d'éthyle	

2.1.2 Appareillages

Tableau 2.4: Appareillages utilisées

Appareils	marque	Utilisation
Autoclave	AESULAP	Stérilisation a T=120 C°
Incubateur-agitateur (shaker)	DAIHAN SCIENTIFIC WISE CUBE WIS-010	Production bactérienne
Centrifugeuse	CENTURION SCIENTIFIC C2 SERIES	Elimination de la biomasse
Centrifugeuse à froid	CENTURION SCIENTIFIC K3SERIES	Elimination de la biomasse
Spectromètre	Jasco V-360 spectrophotomètre	La Mesure de la DO (Croissance bactérienne)
Tension mètre	GIBERTINI TSD 132389, Italie,	La Mesure de la tension de surface TS

Rota-vapeur	Inutilisable	Récupération de produit
Lyophilisateur		
Dialyse		

2.2 Méthodes de production

2.2.1 REPIQUAGE ET CONSERVATION DE LA SOUCHE

Pour maintenir la souche bactérienne dans les bonnes conditions et prévenir tout problème de contamination, un repiquage périodique (chaque quinze jour) fait en boîtes et en tubes inclinés.

2.2.1.1 Repiquage en boîte (courte période)

- **L'étape première** : préparation de milieu

dans des boîtes de pétri contenant un milieu de culture solide Luria Bertani (LB) composer par NaCl, peptone ,extrait de l'levure et l'agar (Tableau 2.2) dissoudre dans de l'eau distillée et compléter à un litre sous agitation et chauffée à une température de 50 C° ,sachant l'agar additionné pour gélifier le milieu est moins soluble, le milieu est ajuster par NaOH d'une concentration molaire de 6 mol/l pour un pH=7, Puis réparti en flacons d'une capacité de 250 ml et autoclavé pendant 20 min.

- **Deuxièmes étapes** : coulage des boîtes

Après le refroidissement de milieu d'une température arrive à 50 C° (l'existence de l'agar) dans la zone stérile (bec benzène), nous avons remplis les boîtes voulus qui restant 30 min pour être le milieu bien solide et bien étalé, et avec lance de pasteur stérile, nous avons pris une quantité mince à partir d'une souche conservées au froid (+ 4°C) dans un tube de glycérol ou boîte déjà repiqué à l'avance striés sur la surface des boîtes colées.

- **Troisième étapes** : incubation et conservation

Les semences bactériennes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 48 h. Après le développement des colonies, les boîtes sont conservées au froid (+ 4°C).

2.2.1.2 Repiquage en tubes incliné (longue période)

Nous faisons pratiquement les mêmes étapes précédentes (Repiquage en boîte) avec un petit changement. Le milieu LB gélosé est réparti dans des tubes essais au lieu des flacons d'un volume de 7ml. Après stérilisation les tubes sont inclinés sur un support horizontale (une burette endormie par exemple) pour obtenir des surfaces inclinées l'intérêt de ce repiquage il conserve la souche jusqu'à 6 mois.

2.3. PRODUCTION DE BIOÉMULSIFIANT

2.3.1 Préparation de la préculture (l'inoculum)

La préculture de la souche a été préparée dans le milieu LB Comme nous avons cité dans le repiquage de la souche mais sans agar et dans les mêmes conditions et après stérilisation et refroidissement nous avons ajouté une petite quantité de colonies de la souche nouvellement repiquée à l'aide d'une anse de platine (pasteur) dans la zone stérile. Les flacons ensemencés sont incubés à 30 °C pendant 18h.

2.3.2 Milieux de production

La production de bioémulsifiant est faite dans deux milieux différents ; un milieu des sels minéraux (MSM) et un milieu riche (LB).

2.3.2.1 Milieu des sels minéraux(MSM)

Ce milieu préparé à partir des sels minéraux (Tableau 2.2) dissoudre dans de l'eau distillée et compléter à un litre sous agitation plus 1ml d'élément trace (Tableau 2.2) préparé à la même façon précédente, Le pH du milieu est ajusté à 7 avec une solution de 1 mol/l NaOH. Un volume de 100 ml de milieu est distribué dans des erlenmeyers de 500 ml. Les erlenmeyers sont bouchés à l'aide du coton cardé couvert par un papier aluminium, puis stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min. La source de carbone est ajoutée au milieu soit directement avec les ingrédients soit séparément.

Pour éviter le problème de précipitation nous avons préparés des solutions mères stérilisés de chaque produit de $MgSO_4$, le $CaCl_2$ et le $FeSO_4$, les volumes prenaient soit à l'équivalent des concentrations cité dans le Tableau 02 ensuite ajouter dans le milieu après la stérilisations successivement avec l'agitation dans la zone stériles , puis Le milieu de

production prêt pour l'incubation à 30°C sous une agitation de 150 tr/min pendant 3 jours dans SHEAKER.

2.3.2.2 Milieu riche (LB)

De la même façon, nous avons essayé de produire le bioémulsifiant à partir du milieu LB. (Préparation de la préculture) de la même manière décrite pour la Ensuite, il est distribué dans les erlenmeyers de 500 ml avec un volume effectif de 100 ml.

La source de carbone inductrice de la production est ajoutée avec la composition du milieu ou stérilisée séparément puis ajoutée dans le milieu.

Le milieu de production a été incubé à 30°C sous une agitation de 150 tr/min pendant 2 jours.

2.3.3 Influence de la source de carbone, d'azote, du rapport C/N et du milieu de production

Deux sources de carbone ont été testées ; le glycérol à raison de 2 % (v/v) et le glucose à une concentration de 2 % (m/v). Le glycérol a été introduits directement dans le milieu avant stérilisation, tandis que le glucose ait introduit séparément après stérilisation d'une solution mère de glucose sur filtre seringue de 0,22 µm. Dans ce cas, les éléments des milieux (LB et MSM) sont préparés en doubles concentrations puis mélangés volume par volume (v/v) avec une solution de glucose de double concentration de 40 g/l. Comme ça, le mélange des deux solutions se trouvera à sa concentration finale.

2.3.3.2 Influence de la source d'azote

Deux sources d'azote ont testées dans le cas du milieu MSM ; le chlorure d'ammonium (NH₄Cl) et le nitrate de sodium (NaNO₃). Les deux sources sont employées à une concentration de 2 g/l et introduites directement avec les ingrédients du milieu.

2.3.3.3 Influence du rapport C/N

Le rapport C/N calculer à partir de la concentration de la source de carbone (g/l) rapportée aux différentes concentrations de la source d'azote préparer par des solutions mères stériles : 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 et 6 g/l ajouter dans le milieu MSM séparément a l'équivalent de 2ml de chaque 100ml de milieu afin d'obtenir les rapports suivants de la source de carbone sur la source d'azote (g /g) : 50,4 ; 25,2 ; 12,6 ; 6,3 et 4,2.

2.3.3.4 Effet de la salinité

L'effet des sels sur la production de bioémulsifiant a été évalué dans le milieu MSM additionné de NaCl (23 g/l) et dans un autre milieu MSM dépourvu de sel (0 g/l de NaCl).

2.3.3.5 L'effet de la nature du milieu

L'influence du milieu (riche LB ou pauvre MSM) a été évalué dans les deux milieux LB et MSM avec la meilleure source de carbone, et la source d'azote et le meilleur rapport C/N dans le cas du milieu MSM.

2.3.3.6 Cinétique de production

Après la sélection des meilleures sources de carbone et d'azote et le rapport C/N, nous avons suivi la production de bioémulsifiant dans les deux milieux, pratiquement chaque 12 heures. Les milieux de culture sont préparés de la même façon décrite auparavant. Des prélèvements réguliers du surnageant sont prises pour évaluer les paramètres suivants :

La croissance bactérienne (DO à 600 nm), l'activité émulsifiante (E24), l'activité de surface (Ddp), et la tension de surface (TS).

2.4 EVALUATION DE LA PRODUCTION DU BIOÉMULSIFIANT

En générale le bioémulsifiant a été évaluée par l'indice d'émulsification (E24). Eventuellement, nous avons opéré avec deux techniques pour évaluer l'activité de surface : le test de déplacement de pétrole (Ddp) et la réduction de la tension de surface (TS). Ainsi, la croissance bactérienne de la souche a été surveillée pour déterminer à quelle phase de croissance la production est maximale. Cette dernière est estimée par mesure de la densité optique du bouillon de culture à une longueur d'onde de 600 nm (Annexe A).

Pratiquement, un volume de 20 ml de la culture microbienne a été centrifugé à 6000 tr/min pendant 15min. Le surnageant ainsi récupéré est filtré sur papier filtre ordinaire. Le volume de surnageant utilisé dépend de la technique de mesure employée (E24, TS ou Ddp).

2.4.1 Indice d'émulsification (E24)

L'émulsification est estimée par l'indice d'émulsification E24 selon le protocole développé par Cooper et Goldenberg (1987). En effet, 2 ml du surnageant de culture est ajoutée à 2 ml d'un substrat hydrophobe (gasoil ou autre) dans un tube à essai, le mélange est bien agité au vortex, à vitesse maximale pendant 2 min jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène, puis laisser au repos pendant 24 h avant de prendre la mesure.

L'indice d'émulsification (E24) est défini comme étant le rapport entre la hauteur de l'émulsion (H_e) formée et la hauteur totale (H_T) du mélange (la figure 2.1), il est exprimé en pourcentage comme l'indique la formule suivante : $E24(\%) = \frac{H_e}{H_T} \times 100$

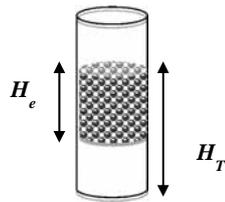


Figure 2.1 : Mesure de l'indice d'émulsification.

2.4.2 Test de déplacement de pétrole (Ddp)

Cette méthode est basée sur la caractéristique de bioémulsifiant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La force de surface du bioémulsifiant est capable de déplacer l'huile. La méthode décrite ci-dessous est basée sur celle déjà décrite par Morikawa *et al*, 1993 [49].

Dans une boîte de Pétri contenant 10 ml d'eau distillée, nous ajoutons deux gouttes de pétrole brut à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite, une goutte du surnageant de culture est légèrement placée au centre du film de pétrole. Le diamètre (en cm) de la surface halo claire est mesuré après 30 secondes. Plus le diamètre est grand, plus l'activité de surface du bioémulsifiant est importante.

2.4.3 Tension de surface (TS)

La mesure de la tension de surface a été réalisée à l'aide d'un tensiomètre, qui détermine la tension de surface ou interfaciale. Ce dernier est doté d'une sonde idéale, permettant un mouillage parfait quels que soient les liquides étudiés. Le périmètre de mouillage de la sonde étant parfaitement défini et connu (longueur de la lame). Nous pouvons utiliser la force mesurée pour calculer la tension de surface ou interfaciale.

Un volume d'environ 15 ml de surnageant de culture est nécessaire pour la mesure de la tension de surface.

2.5. EXTRACTION DE BIOÉMULSIFIANT

2.5.1 Élimination de la biomasse

La production de bioémulsifiant après sélection des meilleures conditions, a été réalisée dans un erlenmeyer de 5 litres, avec un volume opérationnel de 1 litre. Le bioémulsifiant BioE644 a été synthétisé par la souche bactérienne Sdk644 dans les deux milieux MSM et LB avec le glycérol. Après atteinte du temps optimal et lorsque l'activité émulsifiante est maximale dans le milieu (cela est vérifié par un calcul du E24), le volume entier du bouillon de culture est éliminé de la biomasse à l'aide d'une centrifugeuse à une vitesse de 6000tr/min pendant 15min suivie par une filtration (papier filtre ordinaire).

2.5.2 Méthodes d'extraction

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

2.5.2.1 Précipitation par l'éthanol

Cette méthode est très recommandée pour les bioémulsifiants avec un taux de glucides élevé, du fait qu'elle résulte d'une faible fixation de sels avec les polysaccharides des bioémulsifiants, contrairement à la méthode de précipitation avec le sulfate d'ammonium. Ainsi, la méthode est destinée à une large gamme de bioémulsifiants à structures inconnues [50]. dans notre cas nous avons appliqué une version modifiée [51,52, 53], car l'inutilisable de lyophilisation et le dialyse (manque de matériel) , sachant le rendement obtenu de bioemulsifiant reste même.

- **Mode opératoire**

Après la filtration de surnageant par un papier filtre ordinaire nous avons ajouté l'éthanol absolu 4V_{éthanol}/V surnageant comme suit :

1- Dans un erlenmeyer placé dans un récipient contient quelques morceaux de glace (à froid) et sous agitation, Nous mettons le volume de surnageant, puis nous ajoutons l'éthanol goutte à goutte (burette) pour assurer une bonne précipitation.

2-le mélange obtenu (surnagent /éthanol) est laissé au réfrigérateur à 4 °C pendant 24h, et ensuite centrifugée à froid a une vitesse de 6000tr /min pendant 30min (à une température de 4 °C) .

3- le culot récupéré dans des boites de petri qui quotient le produit est solubilisé dans un volume minimal d'eau distillée. Puis sécher a une température de 50 °C.

4-A la fin Peser la quantité du produit obtenu et calculer la concentration de bioémulsifiant par rapport à un litre de bouillon de culture.

2.5.2.2 Extraction par solvants

Cette méthode est destinée généralement pour extraire les biosurfactants de faibles poids moléculaires, elle est utilisée dans notre cas en comparaison avec les méthodes conventionnelles d'extraction des bioémulsifiants, dont on est dépourvu d'équipements essentiels pour compléter l'opération (lyophilisation et dialyse). Le but recherché est d'avoir un rendement d'extraction plus élevé et/ou une capacité émulsifiante plus importante.

Deux solvants sont généralement utilisés pour l'extraction des bioémulsifiants : l'acétate d'éthyle et le mélange chloroforme : méthanol (2:1, v/v). Les deux solvants ont été utilisés dans nos expérimentations pour l'extraction. Le protocole d'extraction est détaillé ci-dessous :

1. Extraire le surnageant avec un volume égal de solvant dans une ampoule à décanter, boucher hermétiquement l'ampoule et l'agiter jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gaz dégagé (cela est vérifié en retournant l'ampoule à l'envers et en ouvrant de temps en temps le robinet de l'ampoule pour permettre le dégazage des vapeurs de solvant). Laisser les deux phases (aqueuse et organique) se séparer entièrement (une durée de 15 à 20 min généralement suffisse).
2. Récupérer la phase organique contenant le produit (la couche supérieure dans le cas de l'acétate et inférieure dans le cas du mélange).
3. Répéter à nouveau l'extraction de la phase aqueuse (récupérée) avec le solvant en répétant la même opération précédente. combiné les deux phases organiques extraites.
4. Eliminer les traces d'humidité, en passant la phase organique sur papier filtre garnie du sulfate de sodium anhydre.

Commenté [H1]: Mr BELKASSIMER UNE EXPLCATION SIMPLE la phrase a refaire

5. Evaporer le solvant dans évaporateur rotatif sous vide (de type Rotavap à une température de 40 °C). Jusqu'à un volume minimal. Transvaser dans une boîte de pétri en verre et rincer le ballon (utilisé dans l'évaporation) avec un volume supplémentaire de solvant pour récupérer le résidu du produit, combiner-le dans la boîte de pétri et laisser se sécher à température ambiante sous la hotte.
6. A la fin Peser la quantité du produit obtenu et calculer la concentration de bioémulsifiant par rapport à un litre de bouillon de culture.

2.6. Tests de toxicité sur l'*Artemia*

2.6.1 Principe

Détermination de la concentration qui tue 50 % de la population des organismes *Artemia franciscana* du stade nauplius II – III après une exposition de 24 h aux toxiques selon les précisions du protocole de Vanheacke *et al* [54] sauf à indication contraire.

2.6.2 Matériel biologique

2.6.2.1 Origine et maintien des cysts

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



Figure 2.3 : Cysts de l'artémia.

Après ouverture de la boîte, les cysts sont conservés au froid à une température de 5 °C (\pm 2 °C) à l'obscurité. De cette façon, les cysts peuvent conserver leur viabilité à une durée pas moins de 6 mois [54].

Tableau 2.5 : produit chimique utilisée

produits	Concentrations (g/l)	Utilisations
NaCl	26,4	Composition de l'eau de mer artificielle (<i>Artemia</i>)
KCl	1,67	
CaCl ₂	0,84	
MgCl ₂	4,6	
MgSO ₄	5,58	
NaHCO ₃	0,17	
H ₃ BO ₃	0,03	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	11.6	Composition de l'eau de dilution (<i>Daphnia</i>)
MgSO ₄ .7H ₂ O	4.93	
NaHCO ₃	2.59	
KCl	0.23	

Tableau 2.6 : produit toxique utilisée

Produit toxique	Concentration (mg/l)	Origine
Lauryl sulfate de sodium (SDS)	100	surfactant chimique
BioE644	6000	produit dans le milieu LB
Phénol	100	drivée pétrolier (commercial)
Naphtalène	30	drivée pétrolier (commercial)
Pétrole brut	50	raffinerie de baraki

Appareillage

- Fioles de jaugées de 50ml.
- Balance analytique précise de 4chiffres.
- Boîte de pétri stérile.
- Lance de pasteur.
- Incubateur.

2.6.3 Méthodes opératoires

2.6.3.1 Préparation de l'eau de dilution

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

L'eau de dilution utilisée est une eau de mer artificielle (milieu de sels minéraux appelé ACR : Artemia Center Reference) dont composition citer dans le tableau 2.5 préparé dans l'eau distille et compléter jusqu'à tris jaugée d'une fiole de 1litre, les sels minéraux de milieu soit à la quantité exacte (balance analytique) et ajouter par ordre et sous agitation [55] .

2.6.3.2 Eclosion des cystes

L'obtention des nauplius II – III est possible en utilisant deux méthodes, la première citée par Auade et M'kemmeche 2016 [56] qui consiste à éclore les cysts dans une ampoule bullée d'air, avec exposition à la lumière d'une intensité de pas moins de 500 lux, à une température de 25 °C. Après 24 h d'exposition, les cysts éclos sont transférés dans une eau de mer fraîche pour être transférées en stade II – III dans les mêmes conditions d'élevage.

Cette fois-ci, nous avons adopté un protocole plus facile à réaliser et qui permis d'obtenir des nauplius en stade II – III directement (sans passer par l'étape intermédiaire) au bout de 30 heures d'élevage, en augmentant juste l'intensité lumineuse à environ 3000 – 4000 lux. Les cysts sont introduits dans une boite de pétri (90 mm de diamètre) remplie avec 20 ml milieu ARC et environ 100 mg de cysts. Les boites de pétri sont fermés par leur couvercle (pour minimiser l'évaporation de l'eau) et incubées à une température de 25 °C (± 2 °C). Après 30 heures, la plupart des cysts se trouveront en stade nauplius II – III.



Figure 2.4 : Dispositif d'éclosion des cysts d'*A. Franciscana*.

2.6.3 Préparation des toxiques

2.6.3.1 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.

A partir de la solution mère d'une concentration égale 100mg dissoudre dans de l'eau de mer compléter à un litre nous avons fait une série de dilution comme suit : 10 ; 13,5 ; 18 ; 24 et 32 dans des fioles jaugée et compléter jusqu'à 50ml, Les concentrations testées préconisées par Vanhaecke *et al* [54].

La CL 50 du SDS doit se situer entre 13,3 et 19,9 mg/l pour que le test soit valide.

2.6.3.2 Bioémulsifiant BioE644 (Surnageant de culture)

A partir d'une solution mère de BioE644 (produit dans le milieu LB) de 6000 mg dissoudre dans de l'eau de mer compléter à un litre, nous avons préparé les concentrations suivantes : 100, 500, 2000, 4000 mg/l (même préparation avec SDS).L'indice d'émulsification de chaque solution est calculé en parallèle.

Les surnageants de culture (issu des milieux LB et MSM) considérés comme étant les bioémulsifiants bruts, sont étudiés dans la plage de concentration suivante : 20 %,50% ,100%.

La dilution par exemple pour la dilution de 50 % est fait comme suit : nous mesurons 25 ml de surnageant que nous l'introduisons dans une fiole jaugée de 50 ml et nous complétons avec le milieu ACR au tri de jauge.

2.6.3.3 Phénol

Deux gammes de concentrations de phénol ont été testées. Tout d'abord, nous avons travaillé avec des concentrations en échelle logarithmique (concentrations décimales) pour déterminer une plage limitée de concentration dont la CL50 est comprise. A partir de cette plage limitée, nous avons établi les concentrations qui donnent au moins trois valeurs de mortalité entre 5 et 95 %. Les concertations déterminé à partir une solution de mère d'une concentration égale de 100 mg/l.

- Les concentrations décimales testées sont : 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 mg/l.
- Les concentrations finales sont : 10 ; 30 ; 50 ; 70 ; 100 et 300 mg/l.

2.6.3.4 Naphtalène

Le naphthalène est un hydrocarbure poly aromatique avec deux cycles benzoïque, sa solubilité dans l'eau est de 31,8 mg/l à 25 °C, elle s'étend entre 30 – 34 mg/l à 20 – 25 °C [57]. Le naphthalène étant très volatile et peu soluble dans l'eau. Afin d'atteindre sa solubilité maximale, nous avons préparé une solution de naphthalène au-dessus de sa solubilité (50 mg/l). La solution mère préparée est maintenue dans l'incubateur-agitateur pendant 24 heures, avec une agitation de 150 tr/min à une température de 25 °C (± 2 °C). A partir de cette solution nous avons préparé quatre solutions filles dans des tubes à essai juste avant le début de l'essai de toxicité (afin de minimiser la volatilisation du naphthalène). Les concentrations initiales sont : 31 ; 16,8 ; 9,6 ; 5,4 et 3 mg/l. Afin de déduire les concentrations finales après 24 h d'exposition (du fait de sa diminution), nous avons établi une courbe d'étalonnage du naphthalène avec les concentrations opérées. Pour cela, la longueur d'onde maximale du naphthalène a été déterminée par l'une des solutions. L'absorbance de chaque solution est mesurée à cette longueur d'onde. Nous traçons ensuite la courbe d'étalonnage en portant à l'axe des abscisses X les valeurs de l'absorbance et dans l'axe Y les valeurs de la concentration.

2.6.3.5 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 mélange contient un solvant polaire organique aprotique d'une propriété de solubiliser les composés polaire et apolaire le Diméthylsulfoxyde (DMSO) et un surfactant chimique le Tween 80. De plus, les deux produits sont connus de leur faible toxicité vis-à-vis l'Artemia.

Pour effectuer faire une solution de pétrole parfaitement soluble dans le milieu ACR, nous avons ajouté à 50 mg de pétrole brut 1000 mg de Tween 80 et 500 mg de DMSO, la solution est complétée à 200 ml avec le milieu ACR [57]. Bien agiter cette solution dans un agitateur magnétique (pas moins de 2 heures). Des dilutions sont faites à partir de cette solution avec le milieu ACR donnant les concentrations suivantes : 5 ; 15 ; 25 ; 50 ; 75 ; 125 (mg/l).

2.6.4 Déroulement de l'essai de toxicité

L'essai de toxicité est effectué dans des boites de pétri d'un diamètre de 60 mm [58] pour la plupart des expérimentations, ou dans des puits de 3 ml [57] pour l'expérimentation du naphthalène. Dans chaque boite de pétri ou puits, dix (10) individus d'artémia sont transférés à l'aide d'une pipette pasteur.

Les boîtes de pétri sont remplies avec 10 ml de toxique, tandis que les puits sont remplies avec 2 ml. Assuré de transférer les larves d'artémia dans un volume minimal d'eau. Cela peut s'assurer facilement avec un prélèvement à l'aide du col de la pipette pasteur (à 2 cm maximum de l'ouverture de la pipette) .

- Les solutions sont incubées à 25 °C pendant 24 h à l'obscurité. Après 24h d'incubation compter le nombre de mort et le nombre total dans chaque boîte. Les individus de l'Artemia sont considérer comme morts si aucun mouvement n'est observé dans un délai de 10 secondes. 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.

-Un essai préliminaire avec des concentrations décimales (seulement avec une seule réplique) est réalisé dans le cas où nous ne connaissons pas l'intervalle dont la CL 50 est située.

-Le test définitif a pour but la détermination de la CL50 – 24 h. Normalement, cinq concentrations suffisent pour le déterminer. Cependant, pour une CL50 satisfaisante, au moins trois données doivent se situer dans un intervalle de mortalité entre 5 – 95 %. Le test définitif est opéré avec trois répliques indépendantes pour chaque concentration (3 boîtes ou 3 puits pour chaque concentration).

-Un témoin (contrôle négatif) constitué de 10 ml de milieu ACR et 10 individus d'artémia (en trois répliques) est nécessaire à chaque nouvel ensemencement. Dans les expériences de toxicité sur le pétrole, ce témoin est remplacé avec un milieu ACR additionné de DMSO (0,5 %, m/v) et Tween 80 (1 %, m/v) [57]. Ainsi, pour les expériences des surnageants MSM et LB, le témoin est constitué de milieu LB ou MSM (préparé immédiatement sans inoculum bactérien) dilué avec le milieu ACR de la même façon que ceux des surnageants.

-Dans les expériences du naphthalène, les puits contenant des concentrations croissantes sont fermés hermétiquement à l'aide du parafilm pour minimiser l'évaporation du naphthalène. Ainsi, un éventuel puits pour chaque concentration, non

-ensemencé avec l'Artemia est incubé dans les mêmes conditions. Il sert à la mesure de l'absorbance des solutions après 24 h d'incubation.

2.6.5 Détermination de la CL50 et traitement statistique des résultats

La CL₅₀ et son intervalle de confiance à 95 % sont déterminés par un logiciel XLSTAT qui utilise le modèle de régression des probits.

Les courbes de l'influence des toxiques sur la mortalité de l'Artemia sont tracées avec un logiciel Excel 2013. La moyenne et l'Ecart -type sont calculés par les fonctions du tableur. Le coefficient de variation qui indique l'écart (en %) entre les répétitions ou les répliques est égale à l'Ecart-type divisé sur la moyenne fois cent (100).

La mortalité corrigée (qui élimine la mortalité due à l'effet des témoins) est calculée selon l'équation suivante :

$$M_c(\%) = \frac{(M-T)}{(100-T)} \times 100 \quad \text{Où :}$$

M_c : la mortalité corrigée.

M : la mortalité due à l'effet du toxique

T : Mortalité naturelle (dans les témoins).

2.7 Tests de toxicité sur la daphnie

La méthode d'analyse utilisant la daphnie (*Daphnia magna*) est employée pour déterminer la toxicité aiguë d'échantillons liquides. La daphnie est un microcrustacé d'eau douce de l'ordre des cladocères et est utilisée pour la détermination de la toxicité des effluents industriels depuis plusieurs années. Cette espèce est sensible à une large gamme de contaminants et est relativement facile à conserver au laboratoire. L'essai consiste à mesurer le pourcentage d'immobilisation après 24 heures ou de mortalité après une période d'exposition de 48 heures [59].

Les essais sont réalisés sur *Daphnia magna Straus* (*Cladocera, Crustacea*) de troisième génération de descendants au moins (3^{ème} ponte), obtenues par parthénogenèse acyclique.

Les individus utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24 heures (= néonates) [59]. Toutefois, cela implique – pour un nouvel élevage – un isolement des néonates pour procéder à une nouvelle reproduction. L'élevage nécessite des conditions strictes que nous avons pu leur assurer pour enfin obtenir des néonates issus au moins de la troisième ponte (une nourriture quotidienne avec des algues unicellulaires, renouvellement du milieu, cycle de lumière 16h de lumière/8h d'obscurité). Ajouter à cela, le manque de personnel qualifié qui a travaillé sur ce microcrustacé (contrairement à ce que nous avons pensé). La souche *Daphnia magna* se trouve dans un bassin d'élevage de grande capacité à l'extérieur. La daphnie se reproduit par parthénogénèse sans l'intervention humaine (à l'exception du renouvellement de l'eau). Le bassin est occupé par des algues vertes, ce qui offre à la daphnie la nourriture.

Malgré cela, nous avons essayé d'opérer un essai test en isolant les daphnies des petites tailles (qui passent à travers le tamis de 0,35 mm, mais dont nous ne savons pas de quelle ponte elles sont issues).

2.7.1 Préparation de l'eau de dilution

L'eau de dilution est utilisée pour préparer les différents toxiques ainsi que la substance de référence. Il contient du $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, du $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, du NaHCO_3 et du KCl . préparé individuellement dans un litre d'eau distillée avec la quantité exacte et sous agitation, puis prendre 25ml de chaque solution préparé dans une fiole de 1 litre sous agitation et conservée dans le réfrigérateur (+4°C) [60].

2.7.2 Mode opératoire

Les solutions à tester sont dispensées, à raison de 20 ml, dans les récipients adéquats, généralement des berlines en polypropylène de 30 ml pour les échantillons environnementaux (ou des berlines en verre de 50 ml en cas de contre-indication). Pour chaque concentration ou dilution ainsi que pour le(s) témoin(s), quatre répliques sont préparées.

A l'aide d'une pipette adéquate (par exemple une pipette pasteur, côté col large et non coupant). Transférer 5 daphnies dans les berlines en débutant par la concentration la plus faible. (Attention, une pipette qui a été en contact avec l'échantillon ou la substance ne doit plus être mise en contact avec le réservoir de daphnies).

Recouvrir chaque berlin contenant 5 daphnies d'un verre de montre. Incuber à 20 ± 2 °C à l'obscurité.

Si certains berlins ne contiennent pas 5 daphnies, le nombre total de daphnies transférées dans le récipient d'essai doit être noté sur la feuille d'essai afin d'en tenir compte lors du traitement des résultats [60].

Vingt-quatre heures après l'introduction des daphnies dans les différentes dilutions de l'échantillon, les daphnies immobiles sont dénombrées dans chaque récipient. Les individus incapables de se déplacer dans les quinze secondes qui suivent une légère agitation du récipient sont considérés comme étant immobilisés, même si des mouvements d'antennes peuvent encore être décelés. Si l'essai ne dure que 24 h, immédiatement après le dénombrement, la concentration en oxygène dissous est mesurée pour la plus faible concentration pour laquelle toutes les daphnies sont immobilisées (1réplique). Si l'essai dure 48 h, les berlins sont replacés à l'obscurité [60].

L'essai de contrôle avec la substance de référence est réalisé chaque semaine d'essai et à chaque fois qu'un élément du mode opératoire de l'essai ou de l'élevage est modifié. A cette fin, préparer les dilutions suivantes dans de l'eau de dilution à partir de la solution d'essai. Par exemple dans des jaugés de 100 ml : solutions à 2.4 mg/l ; 1.8 mg/l ; 1.3 mg/l ; 1,0 mg/l ; 0.75 mg/l ; 0.56 mg/l ; 0.42 mg/l en $K_2Cr_2O_7$ [60] .

Les valeurs des essais de contrôles sont reportées en carte de contrôle d'acceptation, la EC50-24 h du dichromate de potassium devant être comprise entre 0,6 et 2,1 mg/l [60].

3.1 PRODUCTION DE BIOEMULSIFIANT

3.1.1. Effet de la source de carbone, d'azote, du rapport C/N et du sel

La production de bioémulsifiant est influencée par divers facteurs environnementaux, comme les sources de carbone et d'azote, le rapport C/N, le pH, la salinité, etc. Dans notre cas, nous avons choisi trois paramètres intéressants : la source de carbone, la source d'azote, le rapport C/N et l'effet de sel. Le milieu de culture utilisé est un milieu à base des sels minéraux (MSM).

3.1.1.1 Influence de la source de carbone

Rahman *et al* 2008 [61] un certain nombre de substrats de carbone qu'ont été utilisés dans de nombreuses recherches pendant la production de biosurfactants donne un effet sur le type, la qualité et la quantité de biosurfactant produit, sachant sont influencées par la nature du substrat de Carbone(hydrophile ou hydrophobe). Cet effet trouver aussi dans la production de bioémulsifiant, le produit dépend fortement de la nature de la source de carbone utilisée [62, 63] .Le choix des substrats carbonés recyclés et à bas prix est un facteur clés de réussite de la production à grande échelle avec un coût de revient acceptable. La source de carbone généralement utilisées dans la production de bioémulsifiants et divisées en trois catégories : les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales [64], Pour la production des bioémulsifiants, de sources de carbone différentes ont utilisées : substances hydrophobes (d'hydrocarbures ou d'huiles végétales), des glucides, etc. Egalement, plusieurs sources de carbone ont été associées pour une meilleure production de bioémulsifiants [65].

Les résultats obtenus montrent que l'ajout du glycérol améliore fortement la croissance bactérienne (DO). Par exemple, les valeurs de DO sont 2,2 et 1,4 en présence de glycérol et de glucose respectivement. Le glycérol a augmenté trois fois l'activité émulsifiante (E24) par rapport au glucose. La valeur d'E24 a augmenté de 13% à 40 % en remplaçant le glucose par le glycérol. En revanche, l'activité de surface dans les deux milieux est presque identique

Par conséquent le glycérol est un précurseur d'acide gras simple avec une grande solubilité dans le milieu, de sorte qu'il est facilement utilisé par les bactéries pour leur carbone et leur source d'énergie. Alor le glycérol présente une bonne source de carbone.

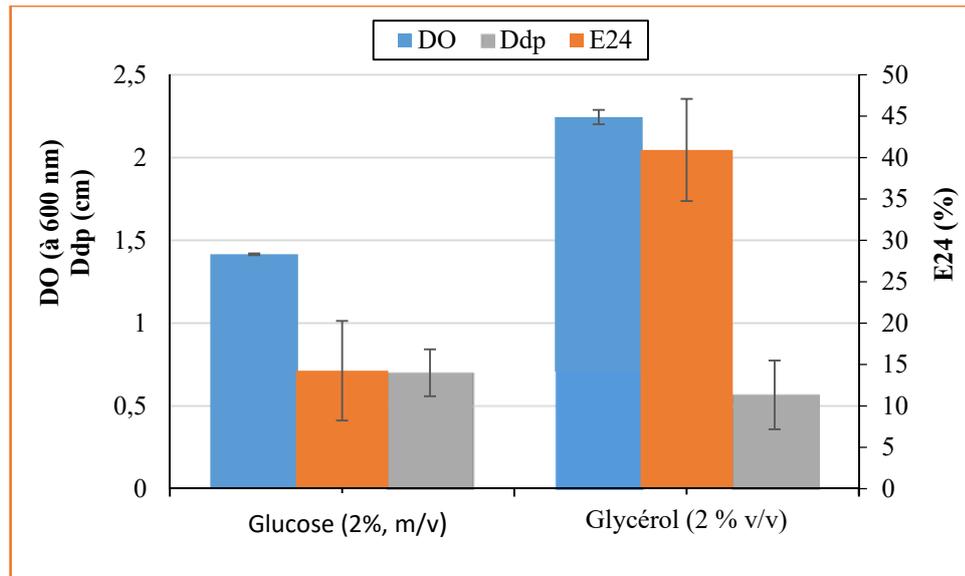


Figure 3.1 : Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne (DO à 600 nm), l'activité de surface (Ddp en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %).

Des résultats similaires ont été trouvés par Gizele *et al* [66], Le moyen le plus favorable pour la production de biosurfactant de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, était composé à la fois de glucose (4%, m/v) et de glycérol (2%, m/v). Anna Joice1 et Parthasarathi (2014) [67]. En présence de *P. aeruginosa* PBSC1 et en utilisant le glycérol et le glucose comme deux sources de carbone, ils ont montré que le milieu MSM avec le glycérol conduit à une production plus élevée de biosurfactant (3,93 g/l) par rapport au milieu contenant le glucose (3,27). La réduction de la tension superficielle minimale et l'activité d'émulsification maximale enregistrées étaient de 30,25 mN/m et 79,65% respectivement. Une bonne formation de mousse a été observée dans le milieu de culture contenant du glycérol.

L'utilisation du glycérol comme source de carbone, permet d'obtenir un rendement plus élevé en biosurfactants. D'une part, les bactéries acidifient le milieu en consommant le glycérol, ce qui rend le pH favorable à la production, d'autre part la biomasse bactérienne sera importante pour assumer la dégradation [68].

Hamed .N *et al* 2016 [69] Trouve que la production de biosurfactant maximal de *Pseudomonas aeruginosa* dans le glycérol est meilleure que le glucose.

La meilleure production de bioémulsifiant de la souche l'actinobactérie *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 a été détectée dans le glycérol et de l'urée comme substrats de carbone et d'azote. Après l'utilisation de différentes sources de carbone et d'azote. Encore, nous avons démontré la faisabilité d'utiliser de glycérol pour soutenir la croissance et la production de bioémulsifiants par *A. tucumanensis* DSM 45259, ce qui contribuera à la viabilité d'un processus de production économique. De même, de Souza Monte Ont rapporté une production efficace de bioémulsifiants par les *mycotoxinivorans* de *Trichosporon* CLA2 en utilisant des esters méthyliques de glycérol et d'acides gras dérivés de la synthèse du biodiesel comme source de carbone [70].

3.1.1.2. Influence de la source d'azote

Il est prouvé que les sources d'azote jouent un rôle essentiel dans le processus de la production de bioémulsifiants [71].

La source d'azote est le deuxième complément le plus important pour la production de bioémulsifiants. Diverses sources d'azote organiques et inorganiques ont été utilisées dans la production de bioémulsifiants [72]. Dans notre cas, deux substrats ont été utilisés : le nitrate de sodium NaNO_3 et le chlorure d'ammonium NH_4Cl avec une concentration de 2g/l pour les deux sources. La figure 3.2 montre l'effet de l'azote sur la production de bioémulsifiant.

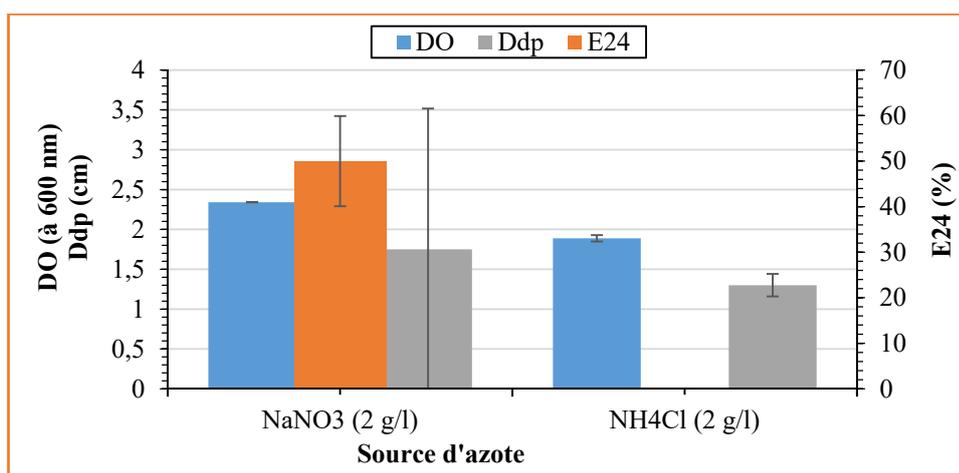


Figure 3.2 : Influence de la source d'azote sur la croissance bactérienne (DO à 600 nm), l'activité de surface (Ddp en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM.

Les résultats obtenus révèlent que le nitrate de sodium est une excellente source d'azote pour la production des bioémulsifiants, l'activité émulsifiante (E24) est de 50%. Concernant

la croissance bactérienne, le NaNO_3 a bien amélioré la biomasse par rapport au NH_4Cl ; les valeurs de DO sont 1,9 et 2,4 pour NaNO_3 et NH_4Cl respectivement. D'autre part, les de l'activité de surface de deux milieux sont proches. Par conséquent les résultats montrent que le NaNO_3 est la bonne source d'azote pour une bonne production de bioémulsifiant. Il semble que le nitrate de sodium est facilement assimilable par les bactéries [73]. La présence de NaNO_3 à 1,0% (m/v) en tant que la seule source d'azote avec une concentration de 1,0% (m/v) de l'huile d'olive donne une bonne production de biosurfactant. D'autre part P. Anna Joice1 et R. Parthasarathi (2014) [74] ont montré que le nitrate de sodium conduit à une bonne production de biosurfactant. Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) et Meyer (2011) [75], [76] ont trouvé des résultats similaires, ils ont signalés que la bonne production de bioémulsifiant a été obtenue dans le cas où le nitrate d'ammonium et le nitrate de sodium sont utilisés comme source d'azote.

3.1.1.3. Influence du rapport C/N

Dans de nombreux processus biologiques, le rapport C/N est un facteur critique, affectant l'accumulation du produit [77].

Pour avoir des rendements de production optimale, il est donc nécessaire d'optimiser le rapport C/N (GABET S, 2004) [78]. Les rapports C/N étudiés sont : 50,4 ; 25,2 ; 12,6 ; 6,3 ; 4,2. Les deux sources de carbone et d'azote sont le glycérol et le nitrate de sodium NaNO_3 . Les résultats sont illustrés dans la figure 3.3.

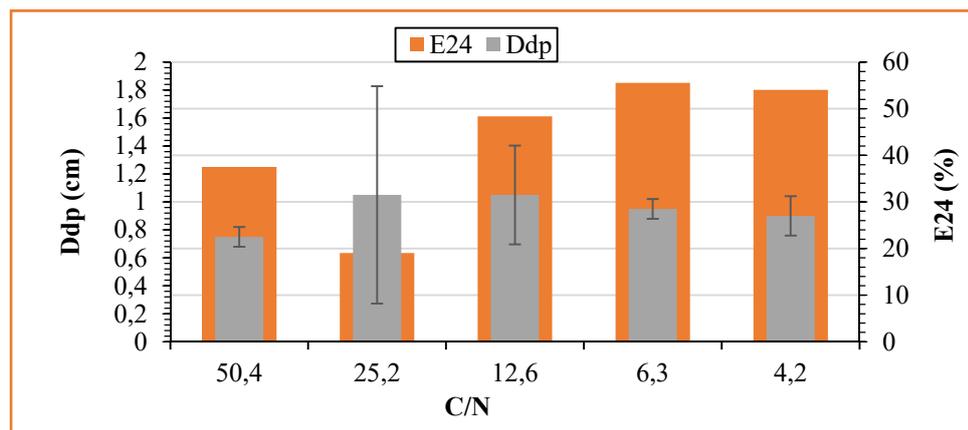


Figure 3.3 : Influence du rapport C/N sur l'activité de surface (Ddp en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM.

Les résultats obtenus montrent que l'activité émulsifiante maximale a été enregistrée dans le cas où le rapport C/N égal à 6,3 et 4,2, les valeurs de E24 sont de 55,55% et 54,05 respectivement. D'autre part et excepté la valeur 50,4 de C/N, l'activité de surface n'est influencée par le C/N dans la gamme étudiée (4,2 – 25,2). Cela montre que l'excès de la valeur du rapport C/N a effet négatif sur la production de bioémulsifiant.

Ces résultats s'accordent avec les travaux de Santa Anna *et al.* (2002), Rashedi *et al.* (2005) et Chen *et al.* (2005) [79, 80, 81], qui ont constaté qu'un faible rapport de C/N est efficace pour augmenter la production de biosurfactant.

D'autre part AM Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) [75] ont travaillé sur l'optimisation de la production de surfactant produit par *Bacillus subtilis* isolé BS5. Une meilleure production a été obtenue en présence de 4,96 g/l de nitrate de sodium, ce qui donne un rapport de C/N compris 6,3 et 4,2. Afin de confirmer les résultats, nous avons refait l'essai pour une deuxième fois avec trois rapports C/N. Le tableau 1.1 récapitule l'effet du rapport C/N dans les deux essais.

Tableau 3.1 : Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « L'influence du rapport C/N ».

Capacité émulsifiante							
C/N	Essai N°1	E24 (%)	Essai N°2	E24 (%)	Moy. Essais	E.S Essais	CV (%) Essais
25,2		19,04		7,28	13,16	8,31	63,16
12,6		48,38		36,88	42,63	8,13	19,07
6,3		55,55		33,81	44,68	15,37	34,4

Moy. : Moyenne arithmétique, *E.S* : Erreur standard issu des deux essais, *CV* : Coefficient de variation.

Les résultats montrent que les deux rapports 12,6 et 6,3 donnent une meilleure production de bioémulsifiant. Le coefficient de variation CV détermine l'écart ou la marge d'erreur. Le CV est maximale pour un rapport de C/N = 25,2. En sciences biologiques, nous pourrions assister à un écart plus de 30 % avec des répliques opérés dans le même temps (répétabilité) ou à temps différent (reproductibilité).

3.1.1.4. L'effet de la salinité

La salinité est aussi l'un des paramètres les plus importants influençant sur la production de bioémulsifiant.

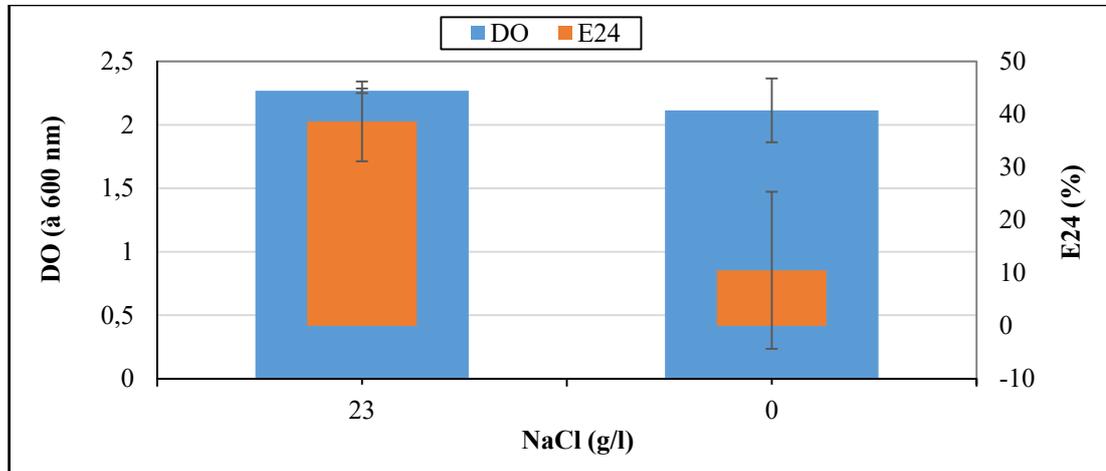


Figure 3.4 : Influence du sel sur la croissance bactérienne (DO à 600 nm), et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM.

Les résultats obtenus montrent que la salinité joue un rôle important dans la production de bioémulsifiant. L'absence de sel a un effet négatif sur la production. Une valeur de salinité de 23 g/l conduit une activité d'émulsification E24 de 40%. Cependant, la croissance microbienne n'est pas influencée par la salinité. Par conséquent et d'après ces résultats, la présence de NaCl est indispensable pour la production de bioémulsifiant.

Selon Pepi *et al* [82], la souche *Halomonassp.* ANT3b était capable de produire un glycolipide dans un milieu de base contenant 24 g/l de NaCl et 2% (v/v) d'hexadécane comme source de carbone. En utilisant une souche marine *Bacillus megaterium*, Thavasi *et al* [83], ont abouti à une production maximale de biosurfactant en présence de 30 g/l NaCl. Le biosurfactant, produit par *Pseudomonas aeruginosa* RS29 en utilisant le glycérol comme source de carbone, garde son activité dans un intervalle de salinité de 20 à 100 g/l [84].

3.1.2. Influence du milieu de production

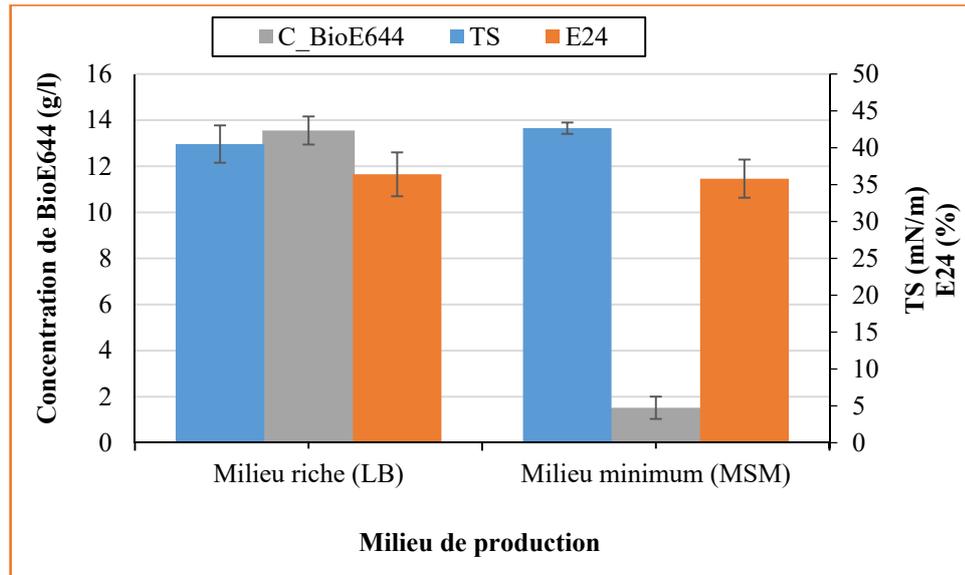


Figure 3.5 : Influence de la nature du milieu (riche ou minimum) sur l'activité de surface (TS en mN/m et Ddp en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %).

Les résultats obtenus ont révélé que l'activité émulsifiante (E24) dans le milieu LB et le milieu MSM est presque égale, nous avons enregistré les valeurs de 36.40 % et 35.81% respectivement. D'autre part, l'activité de surface (TS) est presque proches dans les deux milieux testés, nous avons trouvés 42.663 mN/m pour le milieu MSM et 40.506 mN/m pour le milieu LB.

Cependant, la quantité de Bioémulsifiant BioE644 obtenue est très intéressante en utilisant un milieu LB. Les quantités obtenues en bioémulsifiant BioE644 sont 13.55 et 1.51825 (g/l) respectivement pour les milieux LB et MSM. Donc d'après les résultats obtenus nous avons conclu que le milieu LB est le meilleur pour une concentration optimale de bioémulsifiant produit.

Nous concluons qu'à cette valeur de concentration (13,55 g/l), la production de bioémulsifiant est bien optimisée.

Tableau 3.2 : Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « L'influence du milieu de production ».

Capacité émulsifiante							
Milieu	Essai N°1	E24 (%)	Essai N°2	E24 (%)	Moy. Essais	E.S Essais	CV (%)
LB		36,01		36,40	36,21	0,28	0,77
MSM		40,92		35,82	38,37	3,61	9,4

Moy. : Moyenne arithmétique, **E.S** : Erreur standard issu des deux essais, **CV** : Coefficient de variation.

Remarque : la capacité émulsifiante de surnageants obtenus à partir de deux milieux sont très proche (E24 du milieu LB= $36,2 \pm 0,28$ % et celui du milieu MSM= $38,37 \pm 3,61$ %). Toutefois, la concentration obtenue à partir du milieu riche LB est nettement supérieure par rapport à celle obtenue à partir du milieu MSM.

3.1.3. Cinétique de production

Afin de déterminer la relation entre la croissance microbienne et la production de biosurfactant et d'optimiser le temps de production, des mesures de l'absorbance du trouble microbien à longueur d'onde de 600 nm, de la tension de surface et de l'activité émulsifiante ont été étudiées (figure 3.6).

Deux milieux ont été testés ; LB et MSM, plus la source de carbone glycérol et source de d'azote ne nitrate dans les conditions opératoires (Chapitre 02).

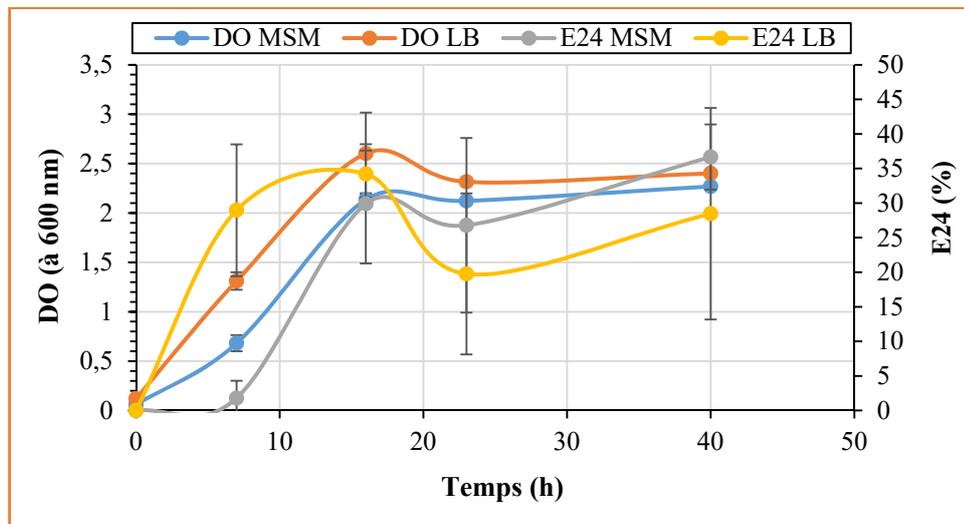


Figure 3.6 : Cinétique de croissance (DO à 600 nm) et de production de BioE644 (E24 en %).

Les résultats obtenus indiquent que la biomasse microbienne (DO) est maximale au bout d'un temps de 15 h dans les deux milieux. a d'autre part nous avons remarqué que l'activité émulsifiante et maximale après 7 h incubation seulement dans le milieu LB (à la fin de la phase exponentielle de croissance), contrairement au milieu MSM où l'activité maximale est atteinte au bout de 40 h (durant la phase stationnaire).

.Donc d'après ces résultats, nous pouvons dire que nous sommes devant deux situations différentes pour la synthèse de bioémulsifiant produit par la souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644. Avec le milieu riche LB, le bioémulsifiant est produit autant que métabolite primaire associé à la cinétique de croissance (*growth associated Kinetic*).

A l'inverse, la synthèse du bioémulsifiant dans le milieu MSM ne se produit que lorsqu'il y a épuisements des éléments nutritifs (durant la phase stationnaire) (*Non-growthassociatedkinetic*). Franzetti *et al*, 2012 [5] a trouvé que l'activité émulsifiante maximale d'un bioémulsifiant produit par la souche *Variovoraxparadoxus* 7bCT5 dans le milieu LB est observée à la fin de la phase exponentielle et reste constante après 48 h d'incubation.

3.2. EXTRACTION DU BIOEMULSIFIANT

Pour extraire le bioémulsifiant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire d'éliminer la biomasse microbienne—de ce milieu de culture (par centrifugation).La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou liés aux cellules). L'extraction par solvants est la technique la plus utilisée. Différents solvants sont utilisés : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. Desai et Banat, 1997 [64]. D'autres techniques reposant sur la précipitation du tensioactif sont ainsi employées.

Dans notre cas deux méthodes d'extraction été opérées :

- L'extraction par solvant ; en utilisant le mélange chloroforme : méthanol et l'acétate d'éthyle,
- La précipitation par l'éthanol à froid.

Le tableau 3.3 illustre l'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction de bioémulsifiant.

Tableau 3.3 : Efficacité des différents solvants utilisés pour l'extraction de Bioémulsifiant.

Solvants	Concentration de BioE644 (g/l)		Capacité émulsifiante (E24 en %)	
	LB	MSM	LB	MSM
Cold éthanol	2,08±0.13	1,15±0.37	65	NR
CHCl₃/CH₃OH	4,24±0,75	0,554±0.63	60	30
Acétate d'éthyle	0,38±0.68	2,255	57	0

^{NR} : non réalisé

D'après les résultats obtenus, la production de bioémulsifiant est meilleure dans le milieu LB où on a enregistré une concentration en bioémulsifiant plus élevée par rapport au milieu MSM. La concentration maximale obtenue, en utilisant un milieu LB, est extraite avec un mélange de chloroforme/méthanol. Cependant, la concentration n'aura aucun intérêt si ne s'associer pas avec une bonne émulsification. Donc, d'après tous ces résultats c'est le milieu LB qui donne le meilleur pouvoir émulsifiant.

3.3 Tests de toxicité sur l'Artemia

3.3.1 Suivi de l'éclosion des cysts et développement des nauplius

Les étapes qui procèdent l'obtention des nauplius stade II ont été suivi par une observation microscopique avec un microscope photonique avant et après 24 h de l'éclosion. Différentes formes morphologiques ont été prises ; cysts non éclos, nauplius stade I et nauplius stade II (figure 3.7).

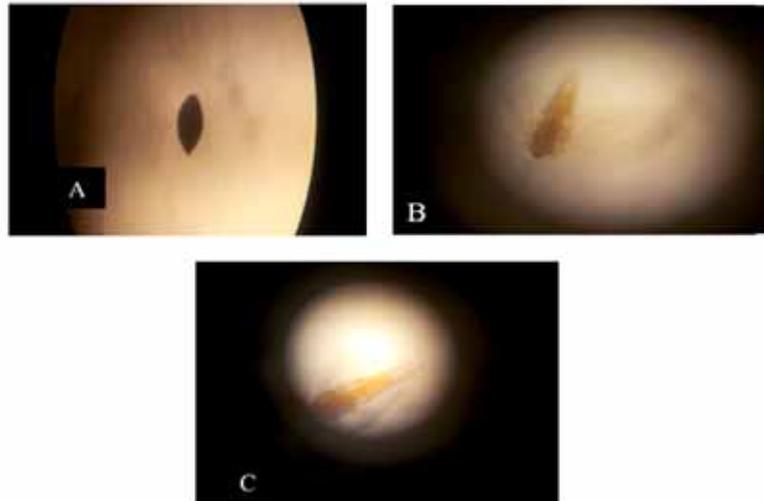


Figure 3.7 :.A : Cysts près à éclore, B : nauplius stade I,
C : nauplius stade II.

3.3.2 Choix des nauplius

D'après Sergeloos *et al*, [85], 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.

3.4. Etude de la toxicité du bioémulsifiant

La toxicité de bioémulsifiant est fonction de son activité émulsifiante. Deux préparations à partir du milieu LB ont été étudiées de leur toxicité sur *A. franciscana* ; le premier est extrait par le mélange chloroforme/méthanol et le deuxième avec l'éthanol à froid, les deux avec une concentration de 6 g/l. Avec le BioE644 du mélange, du fait de sa conservation, son indice d'émulsification était 10 %, cela a conduit à une mortalité de 10 %. Quand l'activité émulsifiante était maximale (E24 de 60 %) la mortalité de l'*Artemia* était 100%. Nous avons observé que la mortalité de l'*Artemia* est due un problème de solubilité du bioémulsifiant BioE644, donc la solution de bioémulsifiant n'est pas transparente. Ceci est due à la turbidité du bioémulsifiant a causé la mortalité. Ce phénomène (problème de solubilité limite) est bien connu et reporté dans la littérature [86].

Ces problèmes, nous retournent au fait que le bioémulsifiant n'est pas bien purifié.

D'autres tests ont été réalisés avec le surnageant du milieu MSM, dont son témoin (milieu MSM préparé à l'immédiat et dilué deux fois) a donné une mortalité de 5 %, les résultats ont

montré qu'avec un surnageant dilué à 50 % (ce qui donne un E24 de 22% avec le gasoil), la mortalité était de 9 %.

Globalement, nous ne pourrions pas dire de grandes choses sur la toxicité du bioémulsifiant, du fait de sa pureté. Des étapes indispensables de purification ont été prévues (lyophilisation, dialyse, perméation sur gel) pour obtenir un produit pur avec sa maximale capacité émulsifiante. Franzetti *et al*, 2012[5] a trouvé que le bioémulsifiant produit par la souche *Variovorax paradoxus* 7bCT5 à une concentration limite de 500 mg/l est non toxique vis-à-vis *Daphnia magna* (une mortalité nulle).

3.5. Etude de la toxicité des hydrocarbures pétroliers

3.5.1 Toxicité de phénol

La toxicité du phénol a été procédée en deux étapes, un test préliminaire avec des concentrations décimales et le test définitif. Le test préliminaire a pour but de limiter la plage de concentration. Ses résultats sont portés dans la figure 3.8.

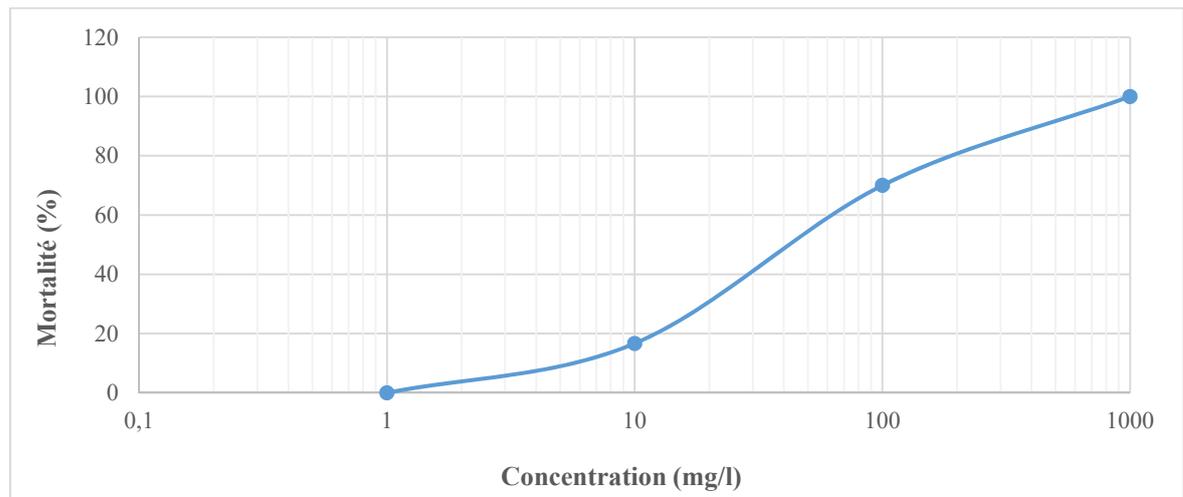


Figure 3.8 : Evaluation de la toxicité du phénol vis-à-vis *A. franciscana* avec des concentrations décimales.

Nous remarquons d'après la figure que les concentrations conduisant à une mortalité entre 5 et 95 % (Vanheacke *et al.* 1981) [54] sont délimités dans un intervalle entre 10 à 1000 mg/l. Par conséquent, la gamme de concentration pour test définitif a été choisie dans cet intervalle de concentration. La figure 3.9 présente l'effet de concentration du phénol sur la mortalité de l'Artemia.

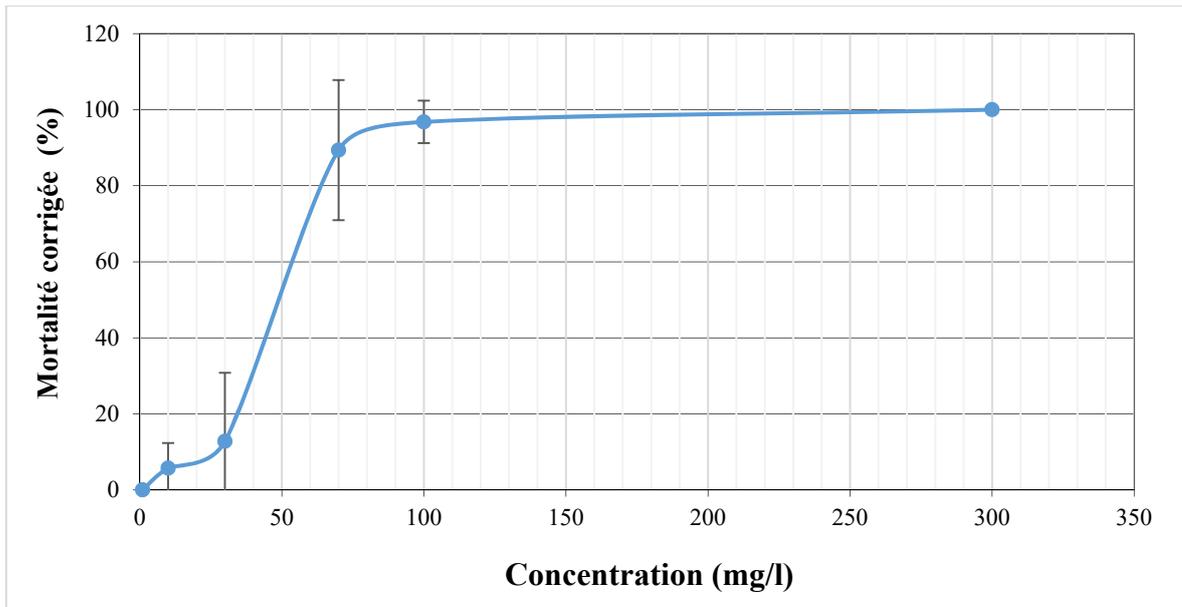


Figure 3.9 : Influence de la concentration du phénol sur la mortalité corrigée de *A. franciscana*.

Nous remarquons que la mortalité de l'artémia est fonction de la concentration du phénol, la courbe est d'une forme sigmoïde montrant bien l'effet toxique du phénol. Pour que nous puissions calculer la CL50 et son intervalle de confiance avec la méthode des probits, il faut que trois des concentrations testées donnent une mortalité entre 5 et 95 %. La condition est donc remplie. Le logiciel XLSTAT donnera le suivant :

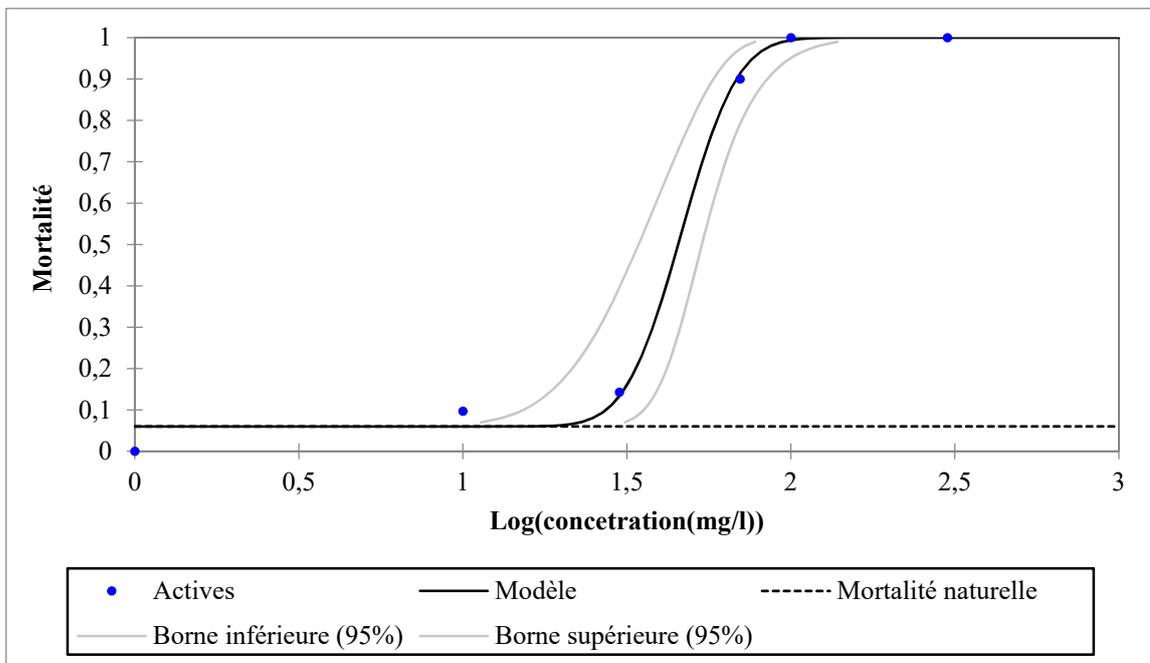


Figure 3.10 : Régression logistique de la mortalité en fonction de la concentration du phénol établie par XLSTAT en utilisant la méthode Probits. La mortalité naturelle est de 6 %.

C'est une courbe tracée à partir des paramètres du modèle des probits. Nous remarquons que la régression est parfaite pour l'ensemble des points. Les valeurs de la mortalité sont coincées avec la courbe du modèle. La mortalité naturelle (dans le témoin) est moins de 10 %, ce qui rend le test valide.

Tableau 3.4 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du phénol).

Probabilité	Concentration (mg/l)	Borne inférieure 95%	Borne supérieure 95%
0,01	-	-	-
0,05	-	-	-
0,10	27,3248	15,2894	35,6255
0,20	33,7064	21,5592	41,8539
0,30	37,9329	26,0620	45,9981
0,40	41,6593	30,1957	49,7360
0,50	45,3290	34,3522	53,5594
0,60	49,2312	38,7841	57,8607
0,70	53,7083	43,7663	63,2128
0,80	59,4014	49,7590	70,8432
0,90	68,2235	58,0539	84,7152
0,95	76,4360	64,8221	99,7203
0,99	94,5081	77,7774	138,4563

La CL₅₀ du phénol est de 45,32 mg/l avec une limite inférieure de 34,35 mg/l et une limite supérieure de 53,56 mg/l en admettant une marge d'erreur de 5 %. Si nous retenons la classification de Viala [87] pour la toxicité des produits :

- Extrêmement toxique : **CL₅₀ < 5 mg/l**,
- Très toxique : **5 mg/l < CL₅₀ < 50 mg/l**,
- Toxique : **500 mg/l < CL₅₀ < 5000 mg/l**,
- Peu toxique ou non toxique : **CL₅₀ > 5000 mg/l**

Nous pourrions dire d'après cet échelle que le phénol est toxique, voire très toxique.

Avec le phénol, nous avons réalisé cinq tests, pour étudier la reproductibilité des résultats. De la même façon, nous avons calculé la CL₅₀ et son intervalle de confiance. Le tableau 3.5 récapitule les données recueillies.

Tableau 3.5 : Test de reproductibilité de la CL50 des bioessais d'*A. franciscana* sur le phénol.

Test N°	Gamme de concentrations (mg/l)	CL50 (mg/l)	-IC (mg/l)	+IC (mg/l)
1	1 ; 10 ; 30 ; 70 ; 100 ; 300	45,3290	57,1422	18,45916
2	1 ; 10 ; 30 ; 70 ; 100 ; 300	41,6238	32,5571	50,3183
3	10 ; 30 ; 50 ; 70 ; 100	45,3788	30,9651	60,3523
4	10 ; 30 ; 50 ; 70 ; 100	83,0146	57,1053	279,4804
5	10 ; 30 ; 70 ; 100	70,3645	37,6918	347,3100
Moyenne		57,1422	43,0923	151,1840
Ecartype		18,45916	13,0479	150,8025
CV (%)		32,30392	30,2789	99,74763

D'après le tableau, la toxicité médiane moyenne du phénol est autour de 57 mg/l avec écart relativement acceptable si nous tenons compte des contraintes pratiques.

Ali *et al.*, (2014)[88], a comparé entre la toxicité de cinq composés phénoliques : bisphénol-A (BPA), t- butyl phenol (t-BP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), n-hexylphenol (n-HP) et Nonylphenol (NP) contre les larves de *A. sinica* et a trouvé avec ordre croissant la toxicité des produits : BPA (CL50 de 70 mg/l) < t-BP (CL50 de 13,2 mg/l) < 2,4-DCP (CL50 de 11,8 mg/l) < NP (CL50 de 10,5 mg/l) < n-HP (CL50 de 7,7 mg/l).

3.5.2 Toxicité du naphthalène

Le naphthalène est un hydrocarbure aromatique bicyclique, très volatile et peu soluble dans l'eau. Il est utilisé dans notre étude comme modèle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) puisqu'il le plus soluble parmi les 16 HAP. Du fait de sa volatilité élevée, le naphthalène est préparé juste avant de procéder au bioessai avec l'*Artemia*. Ainsi et bien que les puits sont bien fermés avec le parafilm avant de les mettre dans l'incubation à 25 °C pendant 24 h, l'ampleur de la volatilité a été déterminée pour chaque concentration, en préparant un puits de chaque concentration sans l'ensemencé avec les animaux de l'*artemia*. La concentration finale du naphthalène (après 24 h d'incubation) a été déduite à partir d'une courbe d'étalonnage préparée avec la même solution mère du naphthalène, le même jour de la réalisation du bioessais.

La courbe d'étalonnage du naphthalène est présentée dans la figure 3.11

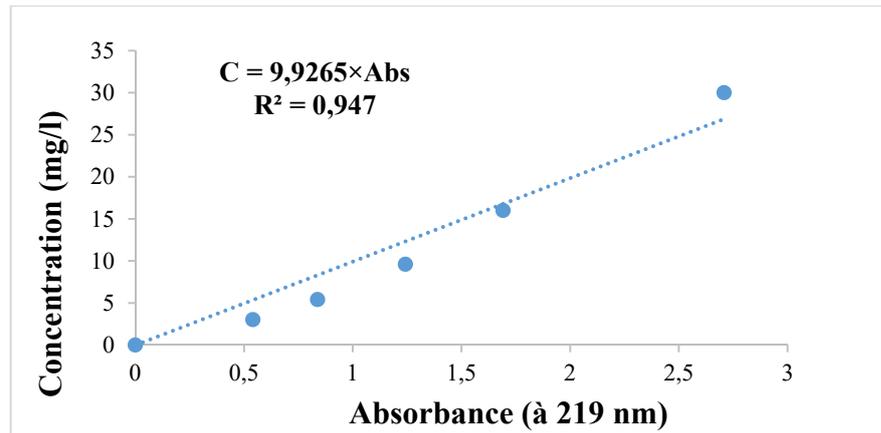


Figure 3.11 : Courbe d'étalonnage du naphthalène dans le milieu ACR.

Le **tableau 3.6** donne les mortalités (en %) de *A. franciscana* en fonction de la concentration effective du naphthalène.

Tableau 3.6 : Effet de la concentration effective du naphthalène sur la mortalité de *A. franciscana*.

Concentration du naphthalène avant incubation (mg/l)	Concentration du naphthalène après incubation (mg/l)	Mortalité (%)
0	0,0	6,39 ± 3,49
3	0,0	11,67 ± 5,09
5,4	4,6	13,33 ± 8,17
9,6	3,3	21,25 ± 12,37
16,8	3,4	7,50 ± 5,53
30	2,3	0,00 ± 0,00

D'après le tableau, nous remarquons que le phénol se volatilise très rapidement, ce qui conduit à des mortalités relativement faibles (de l'ordre de 20 %). A titre d'exemple, le taux de volatilisation pour la concentration la plus élevée est de 92 %. De l'autre côté, les résultats montrent que la volatilisation du naphthalène est un phénomène complexe. L'ordre de volatilisation n'est pas lié uniquement à la concentration.

En conclusion, nous pouvons dire que le test d'*Artemia* n'est pas adéquat pour l'étude de la toxicité du Naphthalène du fait de sa volatilité. Il convient mieux donc de réaliser des tests de toxicité des vapeurs du naphthalène sur un organisme cible.

3.5.3 Toxicité du pétrole brut

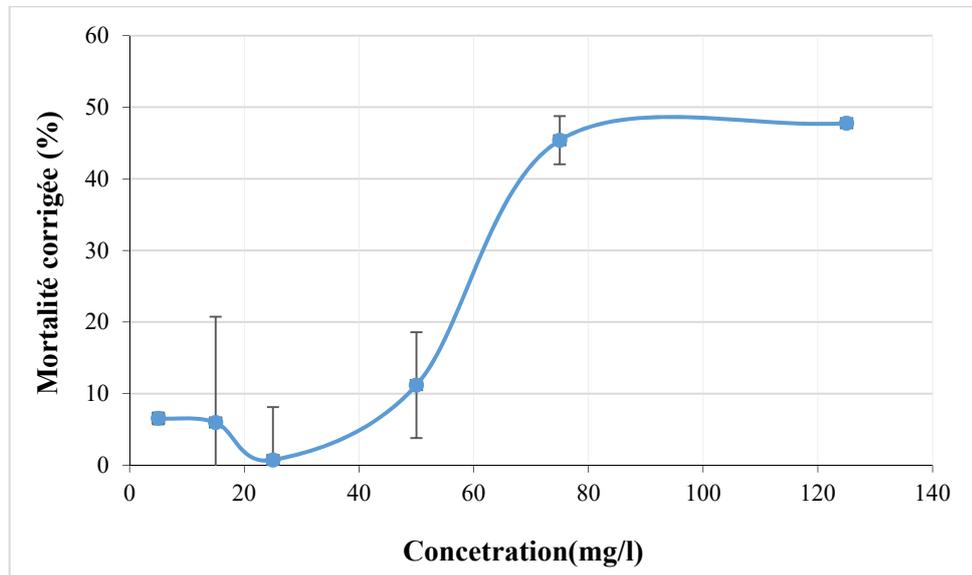


Figure 3.12 : Influence de la concentration du pétrole brut sur la mortalité corrigée de *A. franciscana*.

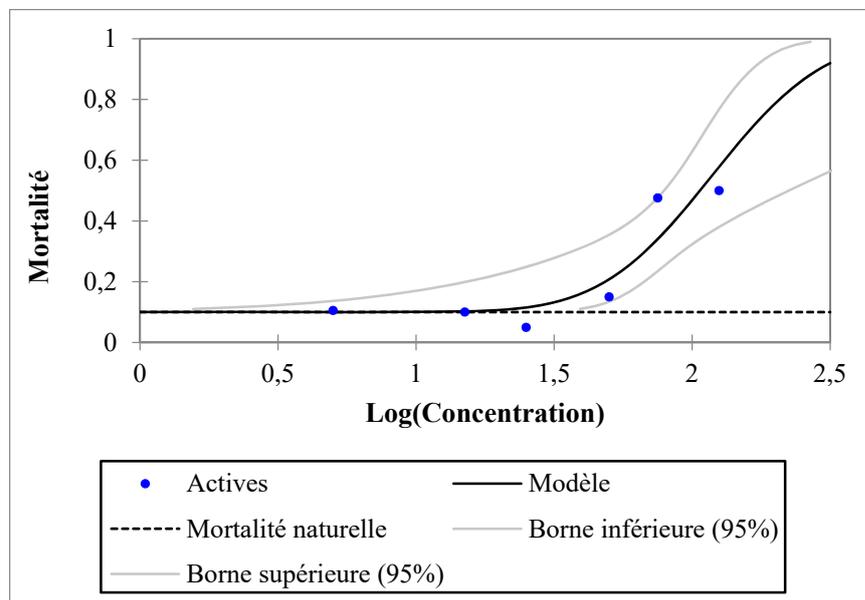


Figure.3.13. Régression logistique de la mortalité en fonction de la concentration du pétrole brut établie par XLSTAT en utilisant la méthode *Probits*. La mortalité naturelle est de 10 %.

Tableau 3.7 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du pétrole).

Probabilité	Concentration (mg/l)	Borne inférieure 95%	Borne supérieure 95%
0,01	-	-	-
0,05	-	-	-
0,10	118,2895	-	-
0,20	48,4610	15,2381	67,0822
0,30	67,6317	36,9041	92,3148
0,40	86,3356	60,2803	136,5029
0,50	106,8041	79,1564	224,1484
0,60	131,0099	95,3468	389,1544
0,70	162,0698	112,1032	713,6972
0,80	206,8910	132,7109	1456,1194
0,90	288,7352	164,9357	3904,7813
0,95	379,1347	195,9381	8790,6613
0,99	629,3986	268,3120	40043,1688

Les résultats expérimentaux montrent que le pétrole est toxique sur les larves de *A. franciscana* (une CL 50 de 107 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 composants. Ainsi, la solubilité de chaque fraction dans le mélange (DMSO – Tween 80) 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.

3.6. Toxicité du SDS

Le surfactant SDS est le control positif (ou substance de référence), sa toxicité est bien connue. Le test est considéré valide si la CL50 de celui-ci est comprise entre 13,3 et 19,9 mg/l.

La figure 3.14. et le tableau 3.8 étalent les données de mortalité des larves de *A. franciscana* en fonction des concentration normalisés du SDS.

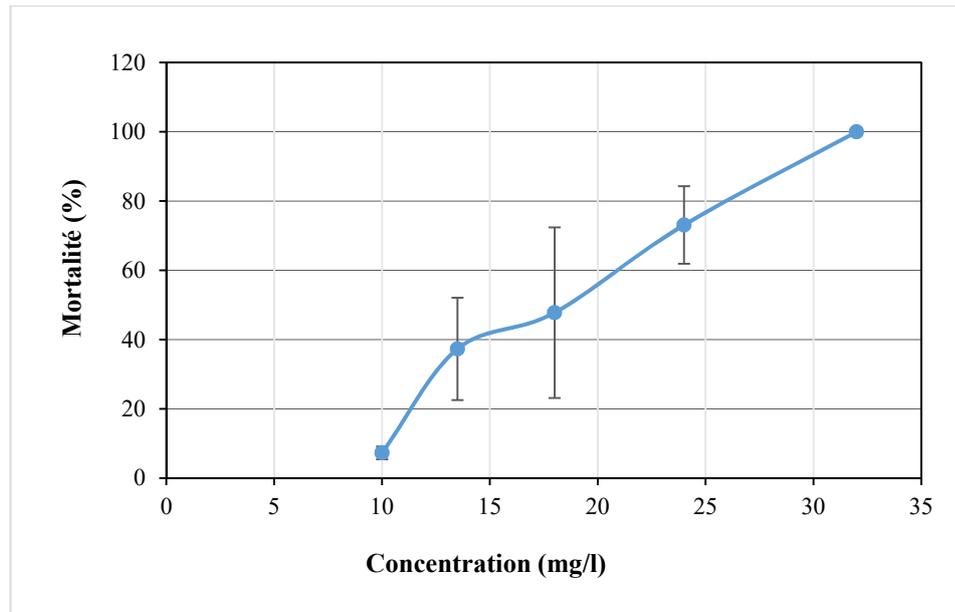


Fig.3.14 : Influence de la concentration du SDS sur la mortalité corrigée de *A. franciscana*.

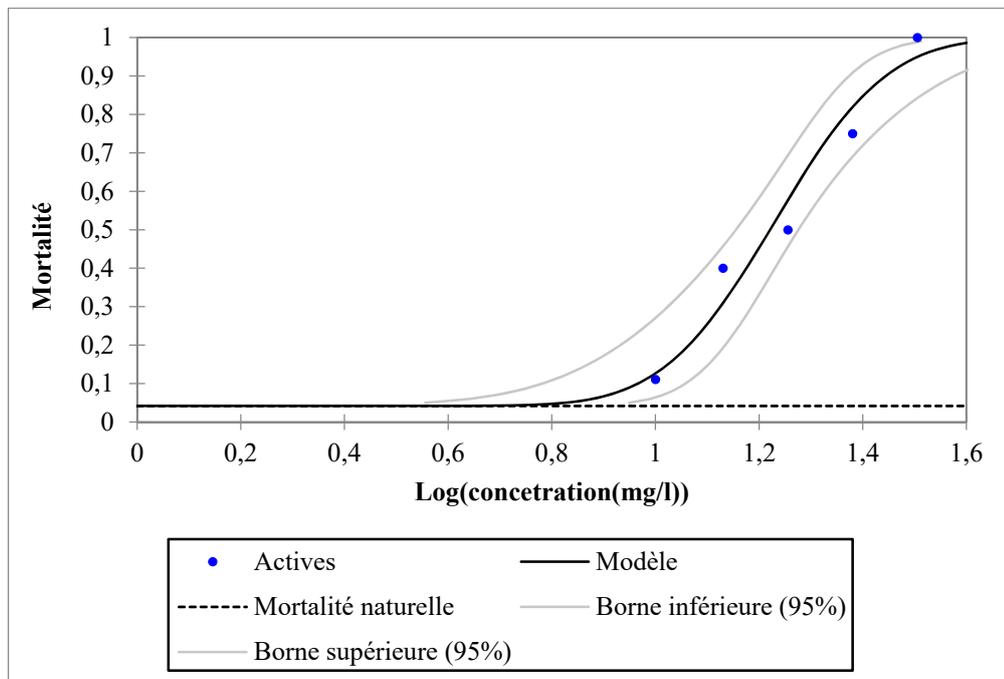


Figure 3.15 : Régression logistique de la mortalité en fonction de la concentration du SDS établie par XLSTAT en utilisant la méthode *Probits*. La mortalité naturelle est de 4,2 %.

Tableau 3. 8 : Analyse des probabilités après ajustement du modèle (Variable mortalité due à l'effet du SDS).

Probabilité	Concentration (mg/l)	Borne inférieure 95%	Borne supérieure 95%
0,01	-	-	-
0,05	6,6511	3,5981	8,8952
0,10	9,2551	6,0452	11,4193
0,20	11,5983	8,5598	13,6336
0,30	13,3532	10,5654	15,3304
0,40	14,9771	12,4445	16,9987
0,50	16,6300	14,2994	18,8733
0,60	18,4369	16,1761	21,2084
0,70	20,5652	18,1462	24,3766
0,80	23,3475	20,4150	29,1086
0,90	27,8099	23,6399	37,7608
0,95	32,1120	26,4893	47,0920
0,99	42,0218	32,5325	71,6885

La CL50 du SDS est comprise dans la plage de concentration requise pour que le test soit valide. Le test avec SDS est opéré de temps en temps pour confirmer la validité des expériences. Le paramètre déterminant de la validité des expériences est la mortalité dans les témoins qui ne doit en aucun cas dépassée 10 %, sinon le test est refait.

Les résultats d'un deuxième test avec SDS comparés aux valeurs du premier test sont portés dans le tableau 3.9

Tableau 3.9 : Test de reproductibilité des bioessais d'*A. franciscana* sur le SDS.

Test N°	Gamme de concentrations (mg/l)	CL50 (mg/l)	-IC (mg/l)	+IC (mg/l)
1	10 ; 13,5 ; 18 ; 24 ; 32	16,63	14,30	18,87
2	10 ; 18 ; 24 ; 32	18,16	12,92	21,31
Moyenne		17,40	13,61	20,09
Ecartype		1,08	0,98	1,73
CV (%)		6,22	7,17	8,59

Les données montrent que les deux tests réalisés sont valides avec un écart très rétréci (une CL50 moyenne de 17,4 mg/l avec un écart de 6 % seulement).

3.7. Toxicité sur la daphnie

Le test préliminaire que nous avons réalisé avec le toxique de référence n'est pas valide, de même qu'une mortalité supérieure à 10 % est constatée dans le témoin. Ceci est due à plusieurs problèmes liés à la maîtrise d'un élevage qui donne des nauplius de moins de 24 h issus de femelles après une troisième ponte ou plus. D'autres conditions environnementales sont ainsi à respecter (température d'incubation de 20 °C, etc.).

D'autres tests offrant des larves de daphnie près à éclore sont plus faciles à réaliser. Nous recommandons comme perspective d'opérer le test sur daphnie selon le protocole E-V-4v1- Détermination de la toxicité aiguë (EC50-48h) par *Daphnia magna* Straus – Méthode en kit (DAPHTOXKIT F MAGNA) [60].

CONCLUSION

La substitution des produits chimiques par des produits biologiques est une nécessité de grande valeur et d'une grande importance économique. Les biosurfactants représentent le groupe de biomolécules les plus commercialisés et les plus utilisés en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles offrent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques et polluants. A cet effet, les essais de toxicité de ces derniers sont vivement exigés.

La première partie de ce présent travail est relative à la production d'un bioémulsifiant produit par la souche bactérienne hydrocarbonoclaste marine « *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Sdk644 ». Les résultats liés à cette partie montrent que :

- Les meilleures sources de carbone et d'azote sont respectivement, le glycérol (2 % v/v) et le nitrate de sodium de (2%, m/v) d'un rapport C/N de 6,3.
- Le chlorure de sodium est qualifié comme élément précurseur de la production.
- Un bon rendement de production avec un milieu riche LB est obtenu comparativement avec le milieu pauvre MSM (13,55 g/l et 1,52 g/l, respectivement).
- La production maximale a été obtenue à un temps plus réduit dans le milieu LB (16 h) par rapport au milieu MSM (40 h).
- Un meilleur rendement d'extraction de bioémulsifiant est obtenu avec le mélange Chloroforme/Méthanol (4,74 g/l).
- Une bonne émulsification a été enregistrée en utilisant le milieu LB-glycérol (E24 de 60%).

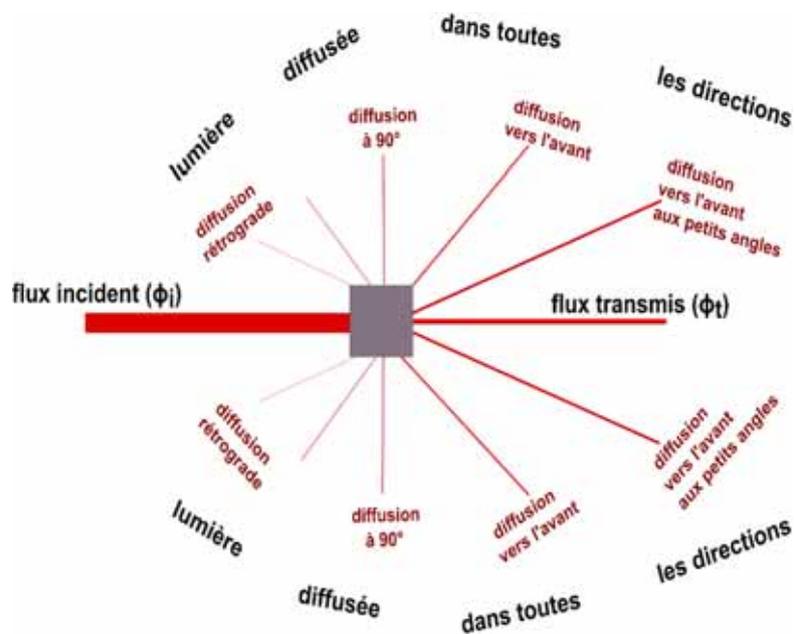
La deuxième partie relatives aux essais de la toxicité de notre bioémulsifiant a donné les résultats qui se résument comme suit : La toxicité du bioémulsifiant (surnageant de culture) à une concentration de 50 % montre que celui-ci n'est pas toxique (une mortalité de 5 %). Les bioessais de toxicité sur ce produit nécessitent une étude supplémentaire du fait de problème de pureté et de solubilité dans de l'eau. Ainsi, la toxicité de quelques produits pétroliers a été évaluée. La CL50 du phénol est de 45,32 mg/l et celui du pétrole est de 106,8 mg/l. Les deux produits sont classés comme toxique. Il a été estimé que le bioessai d'*Artemia* sur le naphthalène est non adéquat à cause de sa volatilité.

A la lumière de ces résultats, nous recommandons comme perspectives :

- D'optimiser la production de bioémulsifiant, en cherchant d'autres sources de carbone, etc. et de purifier encore le produit ;
- D'envisager la production de bioémulsifiant à échelle plus grande (semi pilote) pour obtenir des rendements et des quantités plus élevés.
- La mise en application du bioémulsifiant dans le domaine de la biotechnologie environnementale (bioremédiation, nettoyage, récupération assisté du pétrole) ;
- Elargir la batterie des bioessais avec le bioémulsifiant sur d'autres organismes, en particulier, la daphnie, les moules, les oursins, etc.

Principe de Mesures de biomasse et de la densité optique (DO) des Microorganismes

Il est possible d'utiliser un spectrophotomètre visible ou UV-visible comme opacimètre pour mesurer des concentrations en biomasse. En mode de mesure "absorbance" (A) ou "densité optique", l'appareil affiche le logarithme décimal du rapport du flux de référence au flux transmis. La DO ainsi affichée compte 2 composantes additives, l'effet dû à la biomasse et l'effet du milieu de culture. L'effet du milieu de culture correspond à l'absorbance propre des composants du milieu et un éventuel trouble du milieu. La composante DO due à la biomasse est la conséquence de la turbidité due à la biomasse et aussi éventuellement d'une absorbance de "pigments absorbants" de la biomasse.



A priori, toutes les longueurs d'onde du visible et du proche IR sont utilisables car aux dimensions des microorganismes, la diffusion est peu dépendante de la longueur d'onde dans ces domaines. Comme les milieux absorbent généralement vers 400-550 nm et peu au-delà de 550-600 nm, on mesure généralement avec un éclairage monochromatique au-delà de 600 nm.

La relation $DO_x = f([\text{biomasse}])$ est linéaire jusqu'à une certaine limite. En général vers 0,5-0,7 de DO, ce qui est peu. Au-delà, la courbure en plateau devient très forte. Attention, les valeurs de DO obtenues dépendent de l'appareil utilisé, en effet, le spectrophotomètre va mesurer une partie de la lumière diffusée, celle aux très petits angles avant. Or cette fraction mesurée dépend de la surface du photodétecteur et de son

ANNEXE A

éloignement de la cuve de mesure, Il faut donc étalonner son appareil, Même si en pratique les spectrophotomètres classiques du commerce donnent des résultats proches et ainsi on peut utiliser des règles du type "0,1 de DO pour environ $2 \cdot 10^8$. bactéries par ml chez les entérobactéries".

GLOSSAIRE

BIOACCUMULATION (BIOCONCENTRATION), BCF : Bioconcentration Factor : Phénomène par lequel des êtres vivants absorbent des substances naturellement présentes dans leur biotope ou polluantes et les accumulent dans leur organisme à des concentrations parfois supérieures à celles auxquelles elles se rencontrent dans le milieu naturel. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

BIODEGRADATION : Phénomène généralement lié à l'action de micro-organismes des sols ou des eaux qui permettent la dégradation (minéralisation) – et en règle générale – la neutralisation d'agents polluants dans milieux terrestres ou aquatiques. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

BIODISPONIBILITE : Etat physique (solubilisé ou adsorbé) ou chimique (complexé ou ionisé) dans lequel se trouve un polluant et qui conditionne son écotoxicité. La biodisponibilité joue un rôle très important dans la nocivité réelle d'un élément – métal ou métalloïde contaminant les eaux ou les sols. (Extrait du Précis d'écologie et du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

BIOESSAIS : Tests biologiques ou biotests effectués en laboratoire. Ils ont pour objet de déterminer à l'aide

D'expérimentations sur divers types d'êtres vivants la toxicité de substances chimiques.

BIOINDICATEUR : Individu, espèce, ou population dont la présence, le comportement et l'abondance peuvent permettre de caractériser la qualité des milieux. (Extrait de bioindicateurs et biomarqueurs : des outils pour la surveillance du milieu aquatique.

BIOMARQUEUR En réponse à une agression de type agent chimique, l'organisme mobilise son système de défense basé sur la sécrétion d'enzymes chargées d'éliminer le toxique avant qu'il ne se concentre dans l'organisme. Les biomarqueurs sont une mesure du niveau d'expression de ces enzymes dans l'organisme, élevée, ou très basse, elle traduit une exposition à des agents polluants.

BIOTOPE : Espace localisé où l'ensemble des facteurs physiques et chimiques de l'environnement reste sensiblement constant. (Extrait du dictionnaire de l'Environnement – AFNOR).

CE 50 : Concentration efficace 50 %. Concentration d'un polluant qui cause un effet toxique donné chez 50 % des individus exposés après un temps d'exposition normalisé, par exemple 24 heures. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

CI 50 : Concentration d'inhibition 50 %. Il s'agit de la concentration d'un toxique qui, après un temps donné d'action, par exemple 24 heures, provoque une inhibition d'activité (motrice ou autre) chez 50 % des individus faisant l'objet du bioessai. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

CL 50 : Concentration létale 50 %, c'est à dire la concentration d'un polluant toxique de l'air ou des eaux provoquant 50 % de mortalité dans une population exposée à ce dernier. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

CONTAMINATION : Processus par lequel un biotope – et (ou) une population, voire une communauté toute entière – se trouve exposé à un polluant chimique ou radioactif. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

Cytotoxicité : est la propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules, éventuellement jusqu'à les détruire.

DL50 : Dose létale 50%. Dose d'un toxique qui cause 50 % de mortalité dans une population exposée au bout d'un temps donné. C'est donc en règle générale une mesure de la toxicité aiguë qui s'évalue après un temps d'exposition de 24 h à 96 h selon l'espèce considérée. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions.

ECOSYSTEME : Système dans lequel il existe des échanges cycliques de matières et d'énergie dus aux interactions entre les différents organismes présents (biotope) et leur environnement (biocénose). (Extrait du dictionnaire de l'Environnement).

ECOTOXICOLOGIE : Science qui étudie les effets toxiques sur les organismes vivants, les voies de transfert et les interactions avec l'environnement des agents polluants d'origine anthropique. (Extrait du précis d'écotoxicologie).

EFFLUENTS : Désigne de façon générale tout fluide émis par une source de pollution, qu'il soit le fait de zones d'habitations ou d'installations industrielles. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions).

ELEMENTS TRACES : Eléments que l'on retrouve en quantité très faible.

MATIERES INHIBITRICES (MI) : Désigne l'ensemble des polluants des eaux – minéraux et organiques – ayant une toxicité suffisante pour inhiber le développement et/ou l'activité des organismes aquatiques. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions).

MATIERES ORGANIQUES (OXYDABLES (MO)) : Désigne les matières organiques (ensemble des substances d'origine biologique) et autres substances oxydables contenues dans un effluent ou un biotope aquatique pollué. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions).

MINERAUX (SELS MINERAUX) : Ensemble des sels inorganiques présents dans un biotope terrestre ou aquatique c'est à dire selon le cas dans les sols, dans l'eau ou dans les sédiments superficiels. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions).

Gnotobiotique : une culture ou un environnement présentant uniquement des formes définies de vie (biotique)

MICROORGANISMES : Organismes de taille microscopique (bactéries et champignons essentiellement) qui sont impliqués dans les processus de décomposition et de biodégradation.

MICROPOLLUANT : Dégradation physique ou chimique d'une substance qui conduit à sa simplification en substances minérales (H₂O, CO₂, CH₄).

NOEC : No Observe Effet Concentration. Concentration sans effet observé.

Concentration mesurée suite à des essais de toxicité chronique et pour laquelle aucun effet n'est observé. C'est à dire que la substance ne présente pas de toxicité chronique en dessous de cette concentration.

PLCATON : regroupe l'ensemble des organismes vivants qui flottent et dérivent en pleine eau. Ce mot vient du grec planktos qui signifie " errant ", Le plancton se divise en 2 grands règnes, que sont le plancton végétal ou phytoplancton, et le plancton animal, ou zooplancton.

POLLUTION DISPERSEE : Pollutions identifiées géographiquement dont les sources sont nombreuses, identifiables et localisables – Ex. Déchets Toxiques en Quantités Dispersés. (DTQD).

POLLUTION : Introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou des écosystèmes terrestres, qui entraînent des détériorations aux biens matériels, une détérioration ou une entrave à l'agrément de l'environnement ou à d'autres utilisations légitimes de ce dernier. (Directive Européenne 2000/60/CE du 23 octobre 2000).

POPULATION BISEXUELLE : Reproduction se fait en présence du male (mode sexué).

POPULATION PARTHENOGENIQUE : Reproduction se fait à partir d'un ovule non fécondé (mode asexué), la femelle donnera des générations filles.

SEDIMENTS : Particules solides qui se déposent au fond des cours d'eau dont le courant est faible. Ils sont utilisés pour connaître la pollution historique. Ils stockent des substances chimiques.

TOXICITE : Particularité propre à diverses substances dont l'absorption a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme encore dénommée toxicité chronique, résultant de l'exposition permanente à de faibles concentrations d'un toxique. (Extrait du dictionnaire encyclopédique des pollutions).

TOXICOLOGIE : Science dont l'objet est l'étude des substances toxiques dans l'environnement de l'homme et dans les populations et les individus exposés ainsi que des effets biologiques qui en résultent, en particulier au plan pathologique pour notre espèce ainsi que pour l'ensemble des êtres vivants.