



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLAB –BLIDA-  
FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR  
Département de chimie industrielle

*Mémoire*

*Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de*

*MASTER*

*Spécialité : génie chimique Option : physico-chimie*

*Par : Benslimane Wahiba*

*THEME :*

**VALORISATION D'UNE BIORESSOURCE POUR LA  
PRODUCTION D'UN TENSIOACTIF  
ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE**

*Proposé et dirigé par : Mme : Boutemak Khalida*

*Mr : Moulai Mostefa Nadji*

2012/2013

# Dédicace

*A mes chers parents*

*A mes frères et mes sœurs*

*A ma grand-mère*

*A mes belles-sœurs*

*A mes cousins et cousines*

*A toute ma famille*

*A toute la promotion de génie chimique*

*A tout mes amis*

# Remerciements

*Tout d'abord nous tenons à remercier le bon DIEU d'avoir donnée le courage d'arriver à ce stade du savoir.*

*Nos sincères remerciements vont aux membres du jury d'avoir accepter de juger ce modeste travail.*

*Toute notre gratitude va à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.*

*Et une profonde reconnaissance et considération particulière à MrMoulay. MostefaNadji et à Mme K.BoutemaK de nous avoir encadrés ainsi que leurs disponibilités, orientations, et précieux conseil avec lequel ils ont suivi et guidé ce travail.*

*Enfin, nous souhaitons dédier ce mémoire à mes parents. Rien n'aurait été possible sans leur soutien, leur confiance et leur générosité.*

## Résumé :

Notre travail consiste à la production d'un tensioactif d'origine naturelle puis à la détermination de ses caractéristiques physico-chimiques en utilisant d'une part une souche bactérienne « Pseudomonas Aeruginos » comme matière première pour la production "des rhamnolipides" et d'autre part l'extraction des saponines à partir d'une source végétale « le lierre Hedera Helix ». Les résultats ont montré que les rhamnolipides présentaient des valeurs d'indice d'émulsion allant jusqu'à 36% et ils ont diminués la tension de surface de l'eau de 72 jusqu'à 31mN/m. Pour les saponines, l'indice d'émulsion était de l'ordre de 56%.

**Mots clés :** tensioactif, biotensioactif, rhamnolipide, saponine.

ملخص:

عملنا يرتكز على انتاج جزيئات السطح ذات مصدر طبيعي ثم دراسة خصائصها الفيزيوكيميائية.

استعملنا سلا لات بكتيرية « Pseudomonas Aeruginos » كمادة اولية لانتاج "Des rhamnolipides".

المادة الاولية الثانية تسمى « le lierre Hedera Helix » مصدر نباتي ذات لانتاج الصابونيات. rhamnolipides أعطت قيمة مؤشر استحلاب وصلت حتى 36% و خفضت توتر سطح الماء من 72 الى 31 من/م. مؤشر استحلاب الصابونيات 56%

## Abstract:

Our work consists with the production of surface-active of natural origin then to the determination of its physicochemical characteristics by using on the one hand a bacterial stock "Pseudomonas Aeruginos" like raw material for the production "of the rhamnolipides" and on the other hand the extraction of saponins starting from a vegetable source "ivy Hedera Helix".The results showed that the rhamnolipides presented values of index of emulsion going up to 36% and they decreased the surface tension of the water of 72 to 31mN/m. For saponins, the index of emulsion was about 56%.

**Key words:** tensioactif, biosurfactant, rhamnolipid, saponin

## Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumé .....	01
<b>Introduction.....</b>	<b>02</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : les tensioactifs.....</b>	<b>03</b>
I. Historique bref des tensioactifs.....	03
II. Qu'est-ce-qu'un tensioactif .....	03
III. Structures chimiques et différentes classes de tensioactifs.....	04
III.1. Les tensioactifs anioniques.....	04
III.2. Les tensioactifs cationiques.....	05
III.3. Les tensioactifs zwitterioniques.....	05
III.4. Les tensioactifs non ioniques.....	05
IV. Propriétés des agents tensioactifs .....	07
IV.1. Adsorption aux interfaces.....	07
IV.2. Concentration Micellaire Critique (CMC).....	08
IV.3. Solubilité.....	09
V. Exemples de synthèse de produits tensioactifs.....	10
V.1. Cas d'un alkyl benzène sulfonate de sodium.....	10
V.2. Cas des alcools polyéthylèneglycoether.....	11
VI. Les domaines d'applications.....	11
VI.1. Secteur de la détergence.....	11
VI.2. Secteur de la cosmétique.....	11
VI.3. Secteur industriel.....	12
VII. Biodégradabilité des tensioactifs.....	12
VII.1. Généralités .....	12
VII.2. Conditions de biodégradabilité.....	13
<b>Chapitre 2 : les biotensioactifs.....</b>	<b>14</b>

I. Définition.....	14
II. Classification des bio-tensioactifs.....	14
III. Matières premières renouvelables utilisées.....	15
III. 1. Partie hydrophile.....	15
III. 2. Partie hydrophobe.....	15
IV. Extraction des bio-tensioactifs du milieu de croissance .....	16
V. Synthèse des bio-tensioactifs.....	16
V. 1. Synthèse à partir des alcools gras.....	17
V. 2. Synthèse à partir des acides gras.....	18
V. 3. Synthèse à partir des amines grasses.....	19
V. 4. Synthèse à partir des esters méthyliques d'acides gras.....	20
VI. Utilisation des bio-tensioactifs.....	21

### **Chapitre 3 : les matières premières.....23**

#### Partie 1 : extraction des rhamnolipides du *p.aeruginosa*

I. La bactérie de « <i>pseudomonas aeruginosa</i> ».....	23
II. Caractéristiques générales .....	23
II.1. Description.....	23
II.2. Caractères structuraux.....	24
III. production des rhamnolipides.....	25
IV. La structure du rhamnolipide produire par <i>P.aeruginosa</i> .....	26

#### Partie 2 : Extraction des saponines du lierre « *Hedera Helix* »

I. Classification.....	27
II. Composition chimique des feuilles du lierre « <i>Hedera Helix</i> » .....	27
III. Distribution.....	27
IV. Les saponines .....	28

### **Partie expérimentale**

#### **Chapitre 4 : matériel et méthodes.....29**

##### Partie 1 : Production des rhamnolipides par « *Pseudomonas.aeruginosa* »

I. Matériel .....	29
I.1. Matériel biologique.....	29

I.2. matériel non biologique.....	29
II. Méthodes.....	29
II. 1. Production du biotensioactif.....	29
II. 2. Extraction du biotensioactif .....	30
III. Caractérisation physico-chimique .....	31
III. 1. Détermination de l'index d'émulsion $E_{24}$ .....	31
III. 2. Mesure de la conductivité .....	32
III. 3. Détermination de la tension de surface et de la concentration micellaire critique.....	32
III. 4. Analyse par spectrophotométrie UV/visible.....	32

#### Partie 2 : Extraction des saponines du lierre « Hedera Helix »

I. Matériel.....	33
II. Protocole expérimentale .....	33
III. Extraction des saponines.....	34
IV. Caractérisation physico-chimiques des saponines.....	35
IV. 1. Détermination de l'indice de mousse.....	35
IV. 2. Détermination de l'index d'émulsion $E_{24}$ .....	36
IV. 3. Analyse par spectrophotométrie UV/visible.....	36

### Chapitre 5 : résultats et discussions

#### Partie1 : Production des rhamnolipides par « P.aeruginosa »

I. Production du biotensioactif .....	37
II. caractérisation physico-chimique.....	38
II. 1. L'index d'émulsion $E_{24}$ .....	38
II. 2. Mesure de la conductivité .....	40
II. 3. Détermination de la tension de surface et de la concentration micellaire critique .....	41
II. 4. Analyse par spectrophotométrie UV/visible.....	41

#### Partie2 : l'extraction des saponines du lierre « Hedera Helix »

I. Extraction des saponines .....	42
II. Caractérisation physico-chimique.....	42
II. 1. Détermination de l'indice de mousse.....	42
II. 2. Détermination de l'index d'émulsion $E_{24}$ .....	43
II. 3. Analyse par spectrophotométrie UV/visible.....	44

**Conclusion .....**45

**Références .....**46

## Liste des figures

Figure 01 : Schéma simplifié d'un tensioactif .....	04
Figure 02 : Exemples de tensioactifs anioniques .....	05
Figure 03 : Exemples de tensioactifs cationiques .....	05
Figure 04 : Exemple de tensioactifs zwitterioniques.....	05
Figure 05 : Exemples de tensioactifs non ioniques.....	06
Figure 06 : Schéma représentatif de la formation des micelles en fonction de la concentration en tensioactifs.....	08
Figure 07 : Représentation schématique d'une micelle de biotensioactif .....	09
Figure 08 : Exemple d'alkylpolyglucoside .....	17
Figure 09 : Monstéarate de sorbitan.....	18
Figure10 : Tristéarate de sorbitan.....	18
Figure11 : Monostéarate de glycérol, ester de l'acide stéarique et du glycérol.....	19
Figure12 : Imidazoline avec indication de la numérotation des atomes du cycle .....	19
Figure13 : Saccharose.....	20
Figure14 : Lauramide diéthanolamine .....	20
Figure15 : Pseudomonas aeruginosa.....	24
Figure16 : Paroi de <i>P. aeruginosa</i> .....	25
Figure17 : Structure générale des biotensioactifs de rhamnolipid produit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
Figure18 : Le lierre « <i>Hedera Helix</i> ».....	27
Figure19 : Structure des saponines .....	28

Figure 20 : pseudomonas aeruginosa sur une gélose nutritive.....	annexe I
Figure 21 : incubation avec agitation du bouillon+souche.....	annexe I
Figure 22 : extraction du biotensioactif .....	annexe I
Figure 23: Schéma de production de biotensioactif à partir de la souche « pseudomonas aeruginosa ».....	31
Figure 24 : préparation des émulsions .....	annexe I
Figure 25: Appareil d'un conductimètre.....	32
Figure 26 : Montage d'extraction par l'appareil Soxhlet.....	annexe I
Figure 27 : le lierre « Hedera Helix ».....	33
Figure 28 : montage de soxhlet pour la délipidation.....	34
Figure 29 : Schéma d'extraction des saponines des feuilles du lierre « Hedera Helix »....	35
Figure 30: le milieu de culture après 5 jours d'agitation.....	37
Figure 31: Le biotensioactif produit.....	37
Figure 32 : Indice d'émulsion en fonction du volume de la solution (eau/biotensioactif) ..	39
Figure 33 : résultats du test d'émulsion.....	38
Figure 34: diagramme du système eau/huile/Biotensioactif.....	39
Figure 35 : la conductivité en fonction de concentration.....	40
Figure 36: la tension superficielle en fonction de la concentration.....	41
Figure 37 : résultat d'analyse par spectrophotométrie UV/visible.....	41
Figure 38 : les saponines .....	42
Figure 39 : production de la mousse par les saponines .....	43
Figure 40: indice d'émulsion en fonction de la quantité de saponine .....	44
Figure 41 : production d'une émulsion par les saponines.....	44



## **Chapitre 1: Les tensioactifs**

### **I. Historique bref des tensioactifs**

Parmi tous les tensioactifs que nous connaissons aujourd'hui, le plus ancien est le savon. Il tire d'ailleurs son nom du premier centre européen de cette fabrication : Savona en ITALIE du Nord. En fait le plus ancien mode opératoire de fabrication du savon a été trouvé dans les ruines de Sumer, sur une tablette d'argile, datée de 2500 avant J.C. La fabrication nécessitait alors une graisse animale ou végétale et de la cendre de bois.

C'est en 1916 que le premier détergent complètement synthétique, le «Nekal a», dérivé du naphthalène, du propane -2 ol et de l'acide sulfurique, fut créé en Allemagne. Entre temps le processus de fabrication des savons et des tensioactifs a considérablement évolué. Les progrès de la chimie et le développement des processus de fabrication industriels ont permis une croissance très rapide des tensioactifs synthétiques.

Ces derniers interviennent directement dans notre vie quotidienne, sous forme de produits de grande consommation mais aussi de façon plus discrète dans les processus de mise en œuvre de procédés industriels (exemple : extraction des pétroles) ou agricoles (exemple : antimutagène des engrais).

### **II. Qu'est-ce-qu'un tensioactif :**

Les agents tensio-actifs sont des molécules amphiphiles qui réduisent la tension superficielle entre l'eau et les hydrocarbures [1].

Le terme de composés amphiphiles s'applique aux molécules comportant deux parties de polarités différentes. Un tensioactif est toujours amphiphile ; par contre, un composé amphiphile n'est pas forcément tensioactif.

Le terme de détergent est parfois employé abusivement pour désigner les composés tensioactifs : par définition, un détergent possède un pouvoir nettoyant (élimination des impuretés) ; il s'agit donc d'un composé tensioactif ou le plus souvent d'un mélange de composés tensioactifs (formulation détergente). Par contre, un composé tensioactif peut ne pas présenter de propriétés détergentes.

### III. Structures chimiques et différentes classes de tensioactifs

Les molécules tensioactives comportent deux parties de polarités différentes.

- ✓ **Une partie apolaire**, hydrophobe, lipophile, présentant une affinité pour les huiles (soluble dans l'huile).
- ✓ **Une partie polaire**, hydrophile, présentant une affinité pour l'eau (soluble dans l'eau).

La figure 01 représente schématiquement un tel ensemble

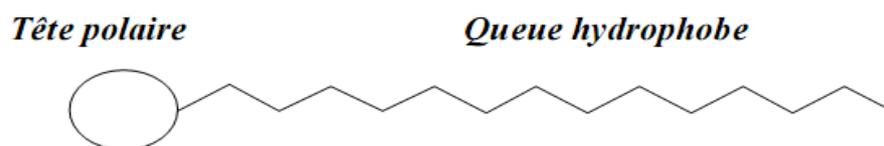


Figure 01 : Schéma simplifié d'un tensioactif

La partie lipophile est constituée par une ou plusieurs chaînes hydrocarbonée(s) aliphatique(s), linéaire(s), ramifiée(s) ou aromatique(s) ou encore alkylaromatique(s). Le caractère hydrophobe de la partie hydrocarbonée varie avec le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'insaturations et les ramifications. En règle générale, le caractère hydrophobe croît avec le nombre d'atomes de carbone et diminue avec le nombre d'insaturations.

La partie hydrophile ou tête polaire, est constituée par un ou plusieurs groupements polaire(s), ionique(s) ou non ionique(s).

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur tête polaire en quatre grandes familles [2, 3] : anioniques, cationiques, zwitterioniques ou amphotères et des tensioactifs non ioniques.

**III.1. Les tensioactifs anioniques** : comportent un groupement ionique chargé négativement en solution aqueuse : carboxylate, sulfate, sulfonate ou phosphate. Ce sont les agents tensioactifs les plus utilisés industriellement (figure 02).

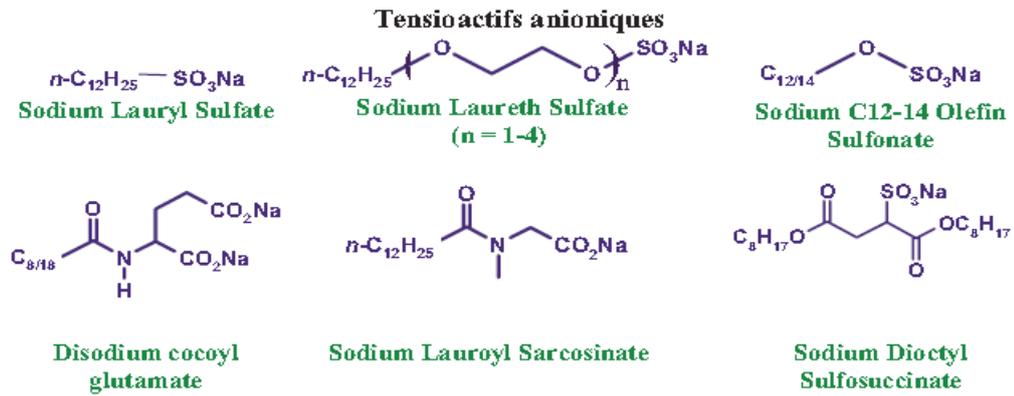


Figure 02: Exemples de tensioactifs anioniques

**III.2. Les tensioactifs cationiques :** sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement [4]. Ils sont généralement des sels d'ammonium quaternaire (figure 03).

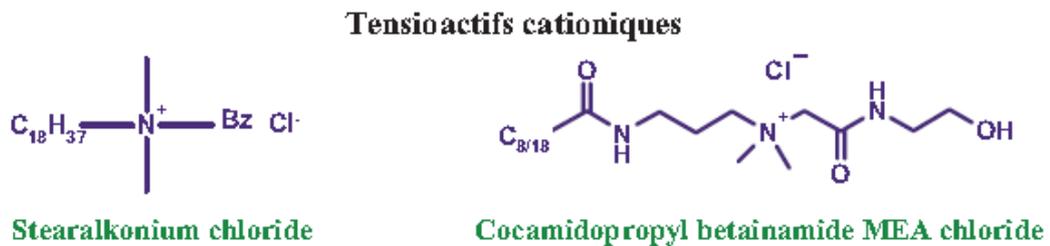


Figure 03: exemples de tensioactifs cationiques

**III.3. Les tensioactifs zwitterioniques :** comportent deux groupements ioniques, l'un cationique et l'autre anionique qui se neutralisent au pH isoélectrique. Ils sont par conséquent parfois classifiés comme non ioniques. Les composés tensioactifs zwitterioniques les plus répandus sont les bétaines et les sulfobétaines (figure 04).

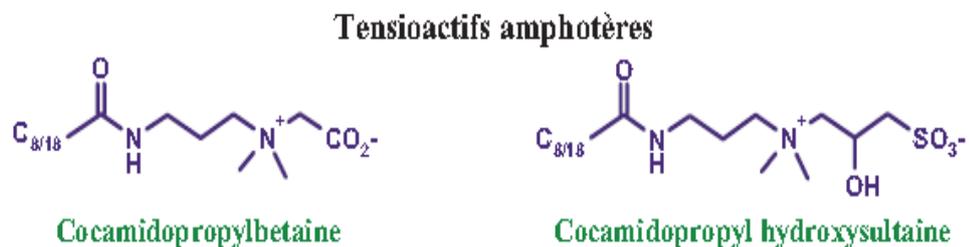


Figure 04: exemple de tensioactifs zwitterioniques.

**III.4. Les tensioactifs non ioniques :** Ces agents de surface ne donnent aucun ion en solution aqueuse [5]. Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur

molécule, de groupement polaire de type éther, alcool, carbonyle ou même amine [6] (figure 05). En raison de la faible contribution hydrophile de ces fonctions, les composés tensioactifs non ioniques sont le plus souvent polyfonctionnels : polyéthers (tensioactifs polyéthoxylés) ou polyols (tensioactifs dérivés de sucres).

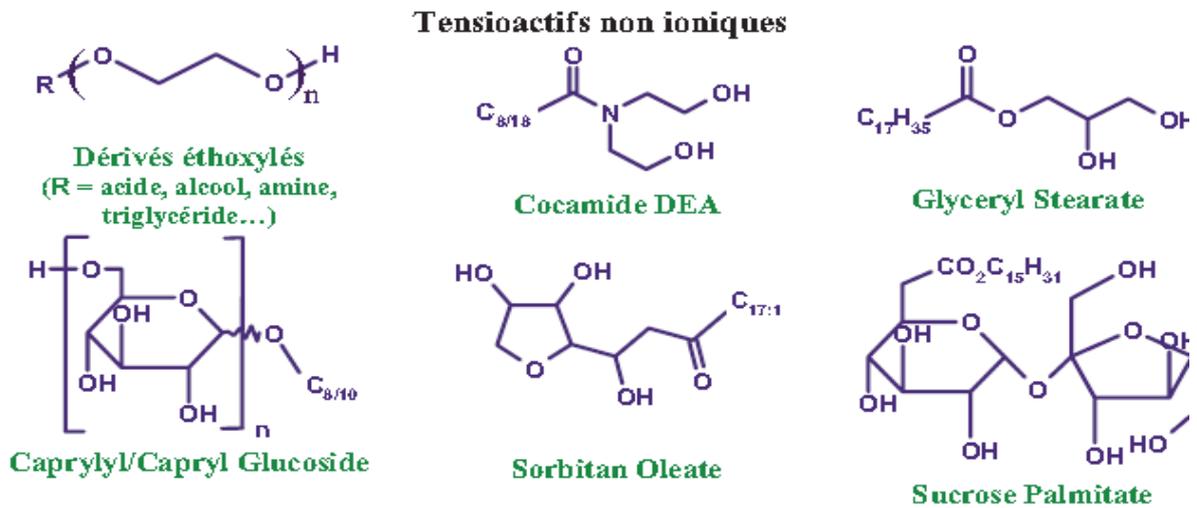


Figure 05 : exemples de tensioactifs non ioniques

- Les agents tensioactifs sont classés en fonction de la nature de la partie hydrophile puisque celle-ci gouverne leurs propriétés (tableau 01).

Tableau 01: Classes de tensioactifs

Partie lipophile	Tête hydrophile
Apolaire chaîne hydrocarbonée C <sub>4</sub> – C <sub>30</sub>	polaire ionique ou non ionique
Aliphatique : – linéaire – ramifiée – insaturée –Aromatique –Alkylaromatique	Anionique : $CO_2^- M^+$ $OSO_3^- M^+$ $SO_3^- M^+$ $(RO)_n PO_{4-n}^{(3-n)-} (3-n)M^+$
	Cationique : $(R)_n NH_{(4-n)}^+ X^-$ $R_4 N^+, X^-$
	Zwitterionique – $\overset{+}{N} \sim CO_2^-$ – $\overset{+}{N} \sim SO_3^-$
	Non ionique : OR, –OH, –CO <sub>2</sub> R, –CONHR – (CH <sub>2</sub> –CH <sub>2</sub> –O) <sub>n</sub> – Polyol
Origine : – pétrochimie – huiles végétales – graisses animales	

#### IV. Propriétés des agents tensioactifs

##### IV. 1. Adsorption aux interfaces

Les molécules de tensioactifs comportant une partie hydrophile et une partie lipophile ont tendance à s’orienter, à se concentrer aux interfaces de façon à accroître les interactions attractives (partie hydrophile/eau et partie lipophile/phase lipophile). Ce phénomène d’adsorption (concentration plus importante à la surface qu’à l’intérieur de la phase liquide) apparaît aussi bien aux interfaces liquide-liquide (eau-hydrocarbure ou

huile), liquide-solide (eau-surface apolaire, huile-surface polaire) qu'aux interfaces liquide-gaz (eau-air). Cette adsorption du tensioactif provoque une diminution de la tension interfaciale entre les deux phases considérées selon la loi de Gibbs ; la diminution de la tension interfaciale est fonction de la concentration en tensioactif à l'interface (excès superficiel) et donc de l'aire occupée par le tensioactif à l'interface. Lorsque l'interface est saturée, la tension interfaciale est minimale et constante.

L'adsorption des tensioactifs aux interfaces et la diminution consécutive de la tension interfaciale sont responsables des deux phénomènes qui suivent :

- ✓ la dispersion est favorisée puisque l'énergie nécessaire à l'augmentation de l'aire de l'interface est d'autant plus faible que la tension interfaciale est faible. Ce concept s'applique aussi bien aux dispersions liquide-liquide (émulsions) et aux dispersions solide-liquide (suspensions) qu'aux dispersions air-liquide (mousses) ;
- ✓ le mouillage est favorisé par la diminution de la tension interfaciale solide-liquide. Ce concept s'applique au mouillage d'une surface hydrophile par une huile.

L'isotherme d'adsorption et la valeur minimale de la tension interfaciale constituent donc des critères de choix fondamentaux du tensioactif à utiliser pour deux phases données.

#### IV. 2. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [7].

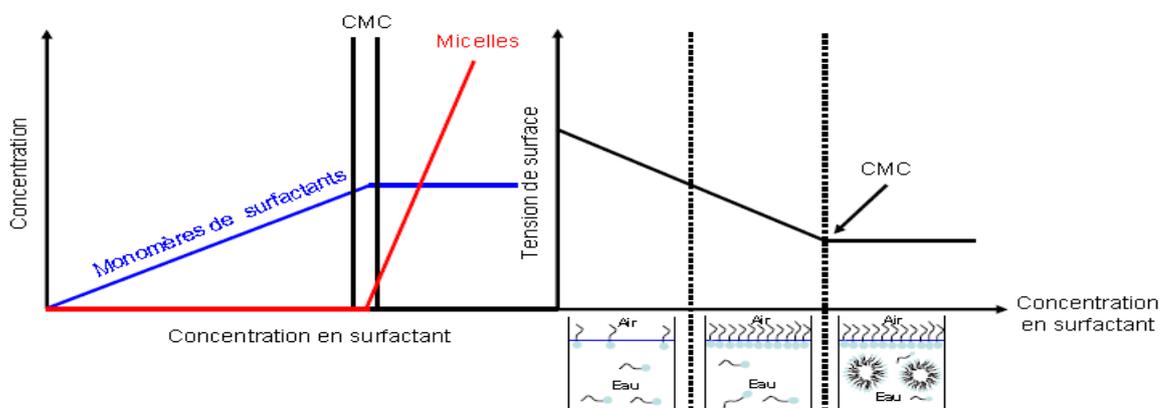


Figure 06 : Schéma représentatif de la formation des micelles en fonction de la concentration en tensioactifs

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse créent une forte augmentation de l'énergie libre du système (Figure 06). Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles [8]. En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (Figure 07).

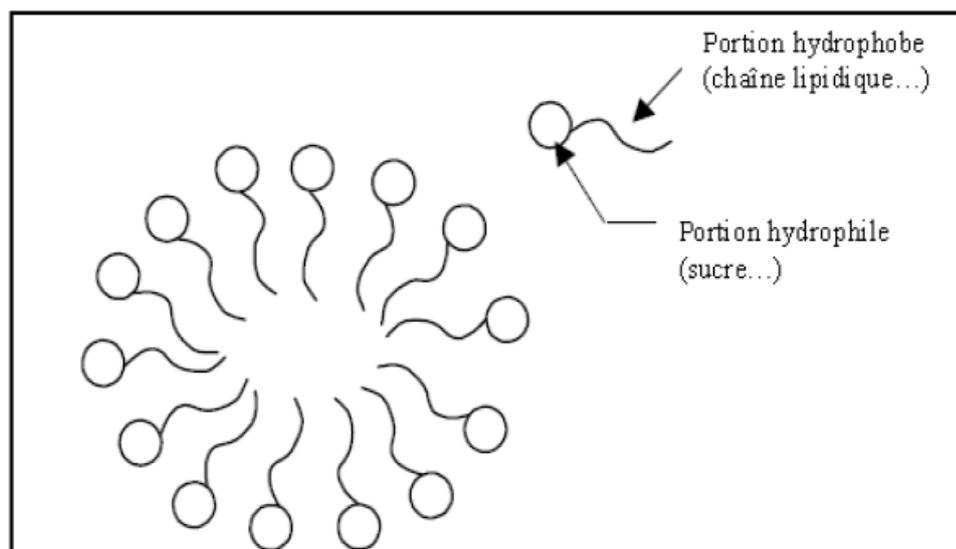


Figure 07 : Représentation schématique d'une micelle de biotensioactif [9].

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  en solution aqueuse). Pour de nombreux agents tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. Les CMC obtenues pour les biotensioactifs varient de  $1$  à  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  [10].

La CMC d'un biotensioactif varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques [11].

Les effets des électrolytes sur la CMC sont plus prononcés pour les biotensioactifs ioniques. La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du tensioactif augmente [8].

#### IV. 3. Solubilité

La solubilité des tensioactifs dans l'eau ou dans les hydrocarbures (couramment appelés huile) varie en fonction de l'importance relative de leurs parties hydrophobe et hydrophile (hlb, hydrophile lipophile balance).

En ce qui concerne la variation de la solubilité des tensioactifs dans l'eau avec la température, deux cas particuliers doivent être mentionnés.

- ✓ La solubilité dans l'eau des tensioactifs ioniques croît brusquement à partir d'une certaine température appelée point de Kraft ou température critique de micellisation. La connaissance du point de Kraft est souvent nécessaire et dans la plupart des applications, il est indispensable de choisir un tensioactif dont le point de Kraft est inférieur à la température d'utilisation.
- ✓ La solubilité dans l'eau des tensioactifs non ioniques polyéthoxylés diminue lorsque la température augmente. Les solutions aqueuses de la plupart des tensioactifs non ioniques polyéthoxylés se séparent en deux phases liquides en équilibre : le coacervat, riche en tensioactif, et la phase diluée : est appelée point de trouble. La valeur du point de trouble croît avec le nombre de motifs éthyloxy. En règle générale les tensioactifs non ioniques polyéthoxylés présentent une activité de surface maximale aux environs du point de trouble.

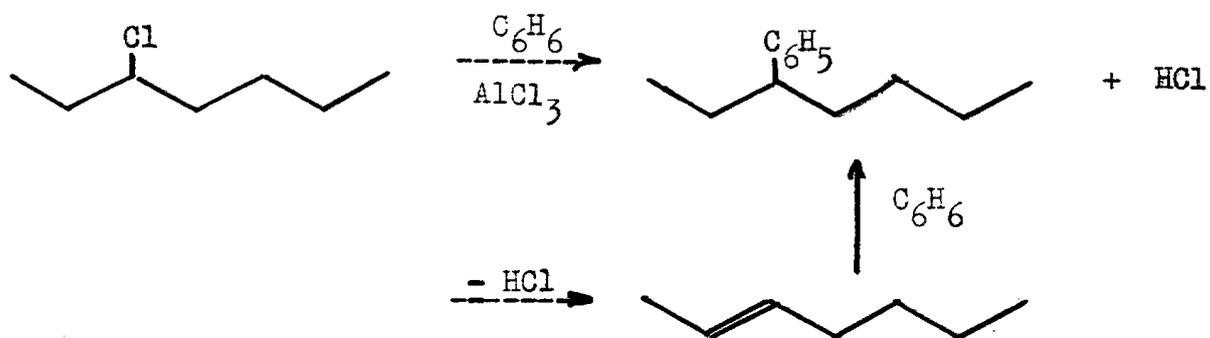
## V. Exemples de synthèse de produits tensioactifs

### V. 1. Cas d'un alkyl benzène sulfonate de sodium

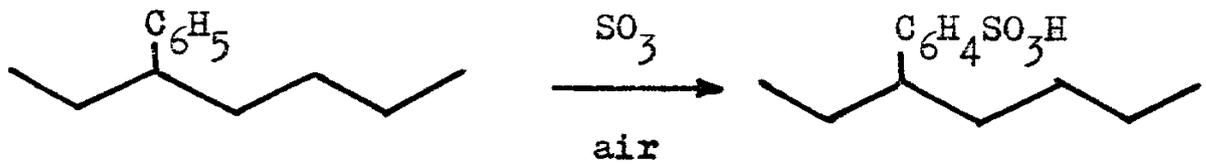
Le produit de départ est un alcane linéaire sur lequel on effectue une monochlorosubstitution :



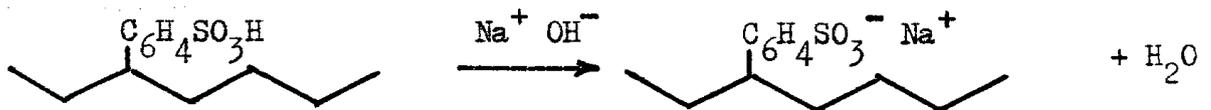
Le dérivé halogéné obtenu est traité par une réaction de Friedel et Crafts ou subit une déshydrohalogénéation suivie d'une addition avec du benzène :



L'alkyl benzène subit alors une réaction de sulfonation :

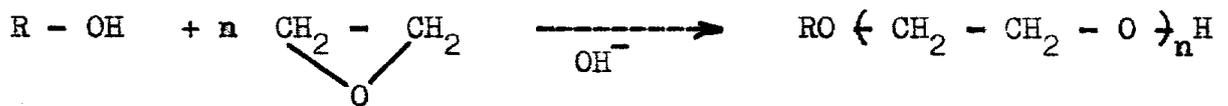


Pour donner un acide benzène sulfonique. Par neutralisation par exemple avec une solution d'hydroxyde de sodium on obtient finalement un benzène sulfonate de sodium, produit tensioactif du type anionique.



## V. 2. Cas des alcools polyéthylèneglycolether [12]

Les produits les plus intéressants résultent de l'action d'alcools gras avec l'oxyde d'éthène ou de propène selon le bilan :



## VI. Les domaines d'applications

Les domaines d'applications des tensioactifs sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents ou cosmétiques, soit de produits auxiliaires dans les procédés de fabrication de l'industrie textile, des métaux, du cuir ou du pétrole. Trois grands secteurs d'activité se partagent le marché, à savoir les secteurs de la détergence, de la cosmétique et des usages industriels.

### VI. 1. Secteur de la détergence

Les tensioactifs entrent dans la formulation de tous les détergents et représentent en moyennement 20% de leur composition. Il convient de distinguer la détergence ménagère et la détergence industrielle, cette dernière concernant en grande partie le secteur de l'agroalimentaire. La détergence ménagère quant à elle regroupe plusieurs classes de produits tels que les lessives, les adoucissants, les produits vaisselles et les produits

d'entretien. A noter que le secteur des lessives est le plus gros consommateur de tensioactifs avec plus de 50% du marché.

## **VI. 2. Secteur de la cosmétique**

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène lavant tels que les shampoings, gels douches, dentifrices) et la cosmétique blanche (produits de beauté tels que les crèmes, laits, maquillages et autres produits de soin). La cosmétique rincée utilise les tensioactifs pour leur propriété détergente tandis que la cosmétique blanche privilégie le pouvoir adoucissant et émulsion.

## **VI. 3. Secteur industriel**

Outre la détergence et la cosmétique, les domaines d'application des tensioactifs sont nombreux : les industries des additifs alimentaires, des céramiques, des matières plastiques, des peintures, du cuir, du papier, du pétrole, du phytosanitaire et du engrais, également la métallurgie et le textile.

## **VII. Biodégradabilité des tensioactifs**

### **VII.1. Généralités :**

Lorsque les produits tensioactifs se trouvent dans les eaux usées ils devraient perdre leurs principales propriétés telles que :

- ✓ propriétés tensio actives,
- ✓ capacité de produire de la mousse,
- ✓ toxicité vis-à-vis de la faune et de la flore aquatique.

La dégradation des molécules devrait se faire naturellement à l'aide des microorganismes de l'eau ou du sol et se poursuivre jusqu'à ce qu'il ne reste plus que des produits naturels tels le dioxyde de carbone, l'eau ou des sels.

La biodégradabilité est représentée par le pourcentage de la quantité de substance initiale qui s'est transformée. Ce pourcentage dépend de plusieurs facteurs, en particulier du temps, de la température du milieu et de la concentration en microorganismes [13].

La biodégradabilité des tensioactifs anioniques et non ioniques est réglementée. Selon cette réglementation, le taux de biodégradabilité des tensioactifs présents dans les détergents ou produits de lessive doit être en moyenne au moins de 90 % [14].

Pour les tensioactifs cationiques il n'y a pas encore de réglementation nationale ni européenne. On peut cependant remarquer que ces derniers ne représentent environ que 5 % de l'utilisation des tensioactifs. D'autre part ils se trouvent toujours dans les eaux usées en présence de tensioactifs anioniques avec lesquels ils réagissent pour former des précipités et se trouvent donc ainsi éliminés en grande partie au cours du traitement des eaux dans la station d'épuration.

### **VII.2. Conditions de biodégradabilité**

Le processus de biodégradation est un processus enzymatique et par conséquent très spécifique. Les microorganismes nécessaires à la dégradation des principales molécules tensioactives sont présents en grande quantité dans les eaux superficielles.

Le produit tensioactif le plus utilisé dans les poudres de lessives au début des années 60 et qui était responsable de la formation de la mousse sur les rivières, était le tétrapropylène benzène sulfonate de sodium (TPBS).

## **Chapitre 2 : Les bio-tensioactifs**

### **I. Définition**

Les bio-tensioactifs sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés [15].

### **II. Classification des bio-tensioactifs**

Les bio-tensioactifs sont classés suivant la nature biochimique du tensioactif produit par le micro-organisme. La revue bibliographique révèle que la majorité des bio-tensioactifs produits sont de type anionique ou non ionique [16,17].

Il existe peu de structures cationiques [18]. Cependant et dans certains cas, la présence de groupements contenant des atomes d'azote confère un certain caractère cationique à la molécule, ce qui va influencer ses propriétés d'adsorption ou de floculation par exemple.

On distingue cinq grandes classes de bio-tensioactifs : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres [19].

- Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques [19,20]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.
- Les lipopeptides sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide. Les lipides d'ornitine sont les plus connus.
- Les phospholipides sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique [17,19] indique que bien que présents dans tous les micro-organismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire.
- Les lipopolysaccharides ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les biotensioactifs qui possèdent la masse molaire la plus élevée.
- Les acides gras et les lipides neutres.

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les bio-tensioactifs les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [21,15].

### III. Matières premières renouvelables utilisées

#### III.1. Partie hydrophile

La partie polaire est généralement constituée de carbohydrates, de polyols ou d'acides aminés/peptides :

- ✓ *Les carbohydrates*, tels que le glucose, le saccharose, le lactose et la xylose peuvent provenir de l'industrie du sucre (betterave sucrière, canne à sucre) et de l'amidon (froment, maïs, blé).
- ✓ Il existe une large gamme de *polyols* provenant soit de carbohydrates dérivés principalement de l'amidon du maïs ou du blé, soit des huiles végétales dérivées d'oléagineux tels que le soja, le coton, le tournesol ou l'arachide :
  - Les polyols provenant de carbohydrates sont des carbohydrates hydrogénés [22]. L'hydrogénation de monosaccharides tels que l'érythrose, la xylose, le mannose et le glucose conduit aux polyols, erythritol, xylitol, mannitol et sorbitol respectivement. L'hydrogénation du sirop de glucose conduit au sirop de sorbitol. L'hydrogénation de disaccharides tels que le lactose, le maltose conduit au lactitol et au maltitol respectivement.
  - Le principal polyol issu des huiles végétales est le glycérol (encore appelé propane-1, 2,3-triol), un coproduit de la fabrication du biodiesel.
- ✓ *Les acides aminés et les petits peptides* constituent une alternative intéressante aux sucres [8]. En effet, l'association d'un acide aminé ou d'un peptide polaire et d'un composé à longue chaîne non polaire permet l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée. Leurs propriétés permettent d'envisager leurs utilisations dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, ménagers et alimentaires. Ils sont dérivés d'acides aminés basiques, neutres ou acides ou d'hydrolysats de protéine.

#### III.2. Partie hydrophobe

La partie hydrophobe est essentiellement issue des huiles végétales obtenues par trituration des graines ou fruits des plantes oléagineuses [23].

Les huiles sont d'origine végétale, minérale ou animale. Dans les plantes, en général, l'huile est contenue dans la substance dure et ligneuse des graines ou du noyau.

Elle se trouve enfermée dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes. Les huiles d'olive et de palme font exception dans la mesure où elles sont contenues dans l'enveloppe charnue du fruit. Les graisses animales sont également enfermées dans des cellules formant le tissu adipeux. Les huiles végétales et les graisses animales contiennent 98 % de triglycérides.

L'hydrolyse des triglycérides conduit au glycérol et aux acides gras. Les acides gras peuvent être classés en trois catégories : saturés, monoinsaturés et polyinsaturés.

#### IV. Extraction des bio-tensioactifs du milieu de croissance

Pour extraire le bio-tensioactif du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple).

La récupération des bio-tensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. Des techniques reposant sur la précipitation du tensioactif [15]. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices.

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) [24]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

#### V. Synthèse des bio-tensioactifs

Les intermédiaires de base utilisés pour la synthèse des bio-tensioactifs sont principalement *les acides gras, les esters méthyliques, les amines grasses et les alcools gras* [23].

Les sels d'acides gras, de par leur nature amphiphile, sont eux-mêmes des tensioactifs essentiellement utilisés dans la fabrication de savons.

Les acides gras (RCOOH) obtenus par hydrolyse des triglycérides peuvent être séparés par distillation en fonction de la longueur de chaîne.

Les esters méthyliques d'acides gras (RCOOCH<sub>3</sub>) sont obtenus par estérification des acides gras ou directement par transestérification des huiles avec du méthanol (Equation 1).



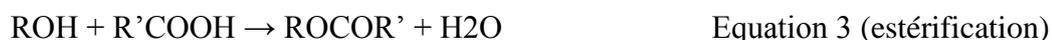
Les *alkyléthersulfates* proviennent de la sulfatation d'alcools gras éthoxyles. Ils servent de base moussante cosmétique pour la formulation de shampooings et bains moussants ainsi que pour la préparation de détergents liquides pour lavages délicats.

Les *alkylsulfates* sont obtenus par sulfatation des alcools gras. Ils sont utilisés dans les formulations de détergents doux destinés aux lavages délicats.

Les *sulfosuccinates* sont des hemi-esters de l'acide succinique ayant deux groupes anioniques : carboxylique et sulfonique. Ils sont doux pour la peau et sont inclus dans la préparation des liquides vaisselles et des shampooings.

## V. 2. Synthèse à partir des acides gras

Les acides gras peuvent être estérifiés pour donner notamment des esters de sucres (Equation 3) ou de glycérol [23].



Les *esters de sorbitan* sont obtenus par réaction d'un acide gras sur les hydroxyles du sorbitan (Figure 09 et 10). Ces produits permettent la réalisation d'émulsions très stables.



Figure 09: Monstéarate de sorbitan

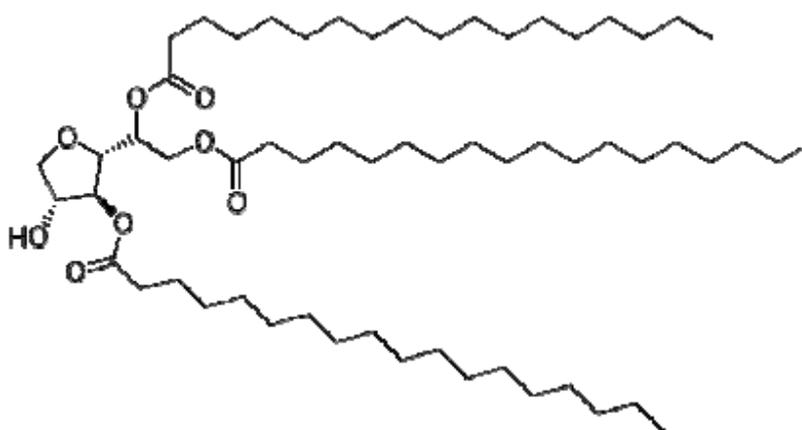


Figure 10: Tristéarate de sorbitan

Les *esters de glycérol et de polyglycérol* proviennent de la réaction du glycérol ou du polyglycérol et d'un acide gras (Figure 11). Ces esters sont des bases importantes pour la formulation de crèmes en cosmétique et en pharmacie.

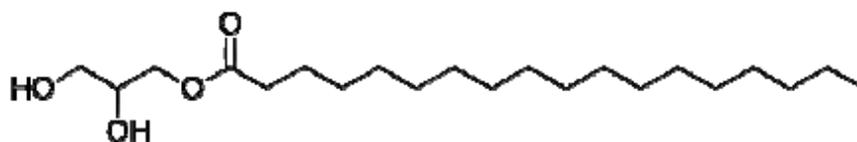


Figure 11: Monostéarate de glycérol, ester de l'acide stéarique et du glycérol

Les *acides gras éthoxylés* sont issus de la réaction de l'oxyde d'éthylène avec des acides gras (Equation 4)



Les *acides gras éthoxy-propoxylés* sont obtenus à partir d'acide gras, d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène.

Les *condensats d'acides gras peptides ou acides aminés* sont synthétisés via la réaction de peptides ou d'acides aminés avec des chlorures d'acide gras. Ces molécules sont utilisées dans les shampooings doux, les produits de lavage corporel et les crèmes et produits de beauté.

Les *alkylisothionates* (isothionate = 2-hydroxyéthane sulfonate) sont obtenus à partir des chlorures d'acides gras. Doux pour la peau et peu solubles, ils trouvent des applications dans les crèmes ou liquides opacifiés (shampooings, bains mousses) et les pains de toilette.

Les *dérivés de l'imidazoline* (Figure 12) résultent de la condensation d'un acide gras et d'un dérivé d'éthylènediamine, suivie d'une cyclisation. Ces agents de surface sont employés couramment dans les shampooings car ils sont bien tolérés par les muqueuses et la peau.

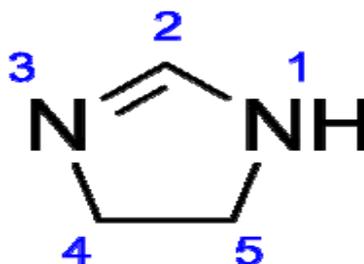


Figure 12: Imidazoline avec indication de la numérotation des atomes du cycle

### V. 3. Synthèse à partir des amines grasses

Les amines peuvent être salifiées par un agent acide ce qui conduit aux *sels d'amines* : les chlorures d'amines avec HCl, les sulfates d'amines avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les principales applications de ces sels sont la préparation de bitumes pour les revêtements routiers, l'antimottage des engrais et la flottation des minéraux.

Les *amines éthoxylées* sont obtenues par condensation d'oxyde d'éthylène et d'amines primaires ou secondaires. Elles sont utilisées comme retardateur de teintures dans les textiles.

Les *aminooxydes* sont issus d'amines tertiaires après réaction avec de l'eau oxygénée. Ils stabilisent les mousses et interviennent comme agents épaississants.

Les *sels d'ammonium quaternaire* sont synthétisés à partir d'amines tertiaires à l'aide d'un agent de quaternisation. Ils entrent essentiellement dans la composition d'assouplissement pour le linge.

#### V. 4. Synthèse à partir des esters méthyliques d'acides gras

Les esters gras de saccharose (Figure 13) ou *sucroesters* sont obtenus par transestérification avec des esters méthyliques (Equation 5). Ce sont d'excellents agents mouillants et dispersants. Les sucroesters sont des additifs très recherchés dans les domaines de l'agro-alimentaire et de la cosmétique.

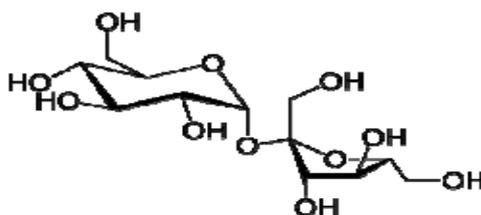


Figure 13: Saccharose



Les *alcanolamides d'acides gras* sont préparés par condensation des esters méthyliques d'acides gras sur les amino-alcools. Ils servent de promoteur et stabilisateur de mousse et ont des propriétés épaississantes, nacrantes et adoucissantes. Un exemple typique est le lauramide diéthanolamine (Figure 14).

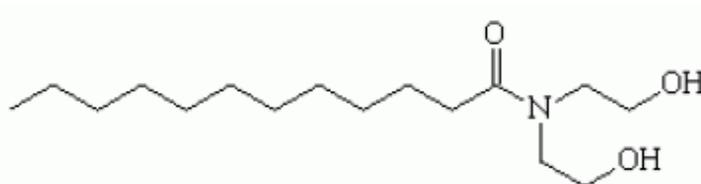
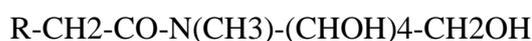


Figure 14: Lauramide diéthanolamine

Les *alkylglucosamides* sont obtenus par réaction du glucose avec la mono-méthylamine en présence d'hydrogène pour former la N-méthyl glucamine. Ce produit est ensuite réagi avec un ester d'acide gras pour produire la glucosamide. L'exemple suivant donne la structure d'une glucosamide :



Les *méthyléthersulfonates* sont issus de la sulfonation de l'ester méthylique. Ils sont utilisés dans les poudres détergentes et dans les lessives liquides.

Le Tableau 2 montre les principaux biotensioactifs obtenus à partir de différentes sources.

Tableau 2: Principaux biotensioactifs (BTA) obtenus à partir de différentes sources

<i>Source</i>	<i>BTA nonioniques</i>	<i>BTA anioniques</i>	<i>BTA cationiques et amphotères</i>
<i>Alcools gras</i>	Alkylpolyglucosides Alcools gras éthoxylés ou éthoxy-propoxylés	Alkyléthersulfates Alkylsulfates Sulfosuccinates	
<i>Acides gras</i>	Esters de sorbitan Esters de (poly)glycerol Acides gras éthoxylés ou éthoxy-propoxylés	Savons Condensats acides gras acide amine/peptide Alkyl iséthionates	Imidazolines
<i>Amines grasses</i>	Oxydes d'amines Amines éthoxylées		Sels d'amines Sels d'ammonium quaternaire
<i>Esters méthyliques</i>	Sucroesters Alcanolamides	Méthyléther sulfonates	
<i>Huile</i>	Alcanolamides Huiles éthoxylées		

## VI. Utilisation des bio-tensioactifs

Les bio-tensioactifs sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes [15,25]. C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines (Tableau 3). Cependant, il semblerait que les bio-tensioactifs soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique [15,26].

Tableau 3: Utilisations potentielles des bio-tensioactifs [15]

Fonction	Champ d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures
Solubilisant et micro-émulsions	Pharmaceutique, articles de toilette
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture
Détergent	Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie
Agent moussant	
Agent épaississant	Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais
Agent séquestrant des métaux	Peintures
Aide à la croissance bactérienne	Minerais
Dé-émulsifiant	Traitement d'huiles usagées pour boues de
Agent réducteur de viscosité	STEP, fermentation
Dispersant	Traitement de déchets
Récupération de ressources	Transport par pipeline
	Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau
	Récupération assistée de pétrole

## Chapitre 3 : matière première

Partie 1 : extraction des rhamnolipides du *P. aeruginosa*.

### I. La bactérie de « *Pseudomonas aeruginosa* »

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Pseudomonadaceae qui inclut dix genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens*. Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*. *P. aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxinomie est présentée dans le tableau 04 :

Tableau 04 : Taxinomie de *P. aeruginosa*

Règne :	<i>Bacteria</i>
Embranchement :	<i>Prokaryota</i>
Division :	<i>Proteobacteria</i>
Classe :	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre :	<i>Pseudomonadales</i>
Famille :	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre :	<i>Pseudomonas</i>
Espèce :	<i>aeruginosa</i>

## II. Caractéristiques générales

### II.1. Description

*P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif non sporulant de forme droite ou légèrement courbée. Elle mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large (Figure 15). Bien que ce pathogène, ayant un métabolisme oxydatif, soit aérobie stricte, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobie. *P. aeruginosa* est une bactérie motile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Cette bactérie est

catalase positive et oxydase positive. Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone.

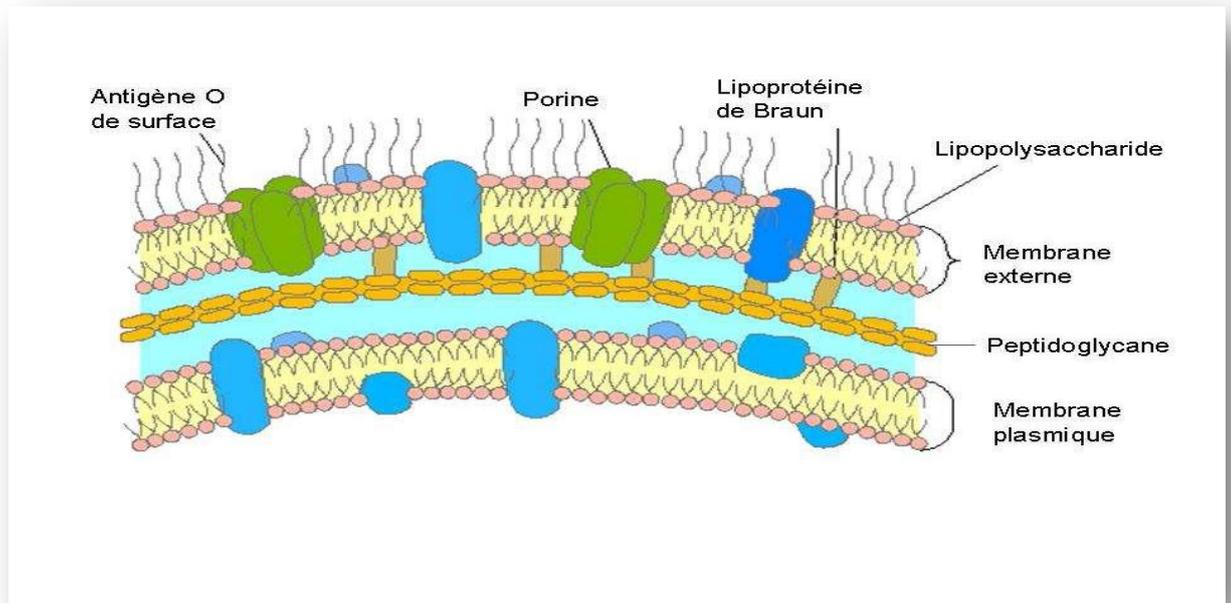
*P. aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. La morphologie de *P. aeruginosa*, de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique.



Figure 15: *Pseudomonas aeruginosa*

## II.2. Caractères structuraux

La paroi bactérienne de *P. aeruginosa* est typique des bactéries à Gram négatif, composée d'une grande variété de molécules aux fonctions multiples (Figure 2). La paroi est formée de deux membranes séparées par le périplasme.

Figure 16 : Paroi de *P. aeruginosa*

La paroi de *P. aeruginosa* est caractéristique de la paroi des bactéries à Gram négatif. Elle est constituée d'une membrane externe où sont localisés le lipopolysaccharide (LPS) et les porines et d'un espace périplasmique contenant le peptidoglycane.

### III. production des rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biotensioactifs glycolipidiques résistants à la chaleur. Ils sont composés de rhamnose lié à des acides gras  $\beta$ -hydroxylés. *P. aeruginosa* produit 25 rhamnolipides qui sont différents soit par la longueur de la chaîne ou le degré de saturation de l'acide gras. La biosynthèse des rhamnolipides implique 3 enzymes codées par les gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* [27]. Plusieurs stimuli environnementaux tels que la densité cellulaire, le stress et la carence nutritionnelle stimulent la biosynthèse des rhamnolipides [28, 29,30, 31]. Cette biosynthèse coïncide avec la phase stationnaire de croissance. Elle est régulée soit au niveau de la transcription soit à un niveau post-transcriptionnel.

#### IV. La structure du rhamnolipide produit par *P.aeruginosa* :

Parmi les diverses espèces de biotensioactifs, beaucoup de travaux ont été réalisés sur des biotensioactifs de rhamnolipide produits par la souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Deux types de rhamnolipids (RLs) sont principalement produits à partir du *P. aeruginosa* dans la condition habituelle de croissance : ils sont mono-(RL-1) et les Di-rhamnolipids (RL-2) et elles ont deux chaînes hydrophobes comme montrées dans la figure 17. Les parties hydrophiles des molécules RL sont les groupes de rhamnosyl et d'acide carboxylique. RL-1 a un seul groupe de rhamnose tandis que RL-2 a deux groupes de rhamnose jointifs entre eux avec un pont en ester.

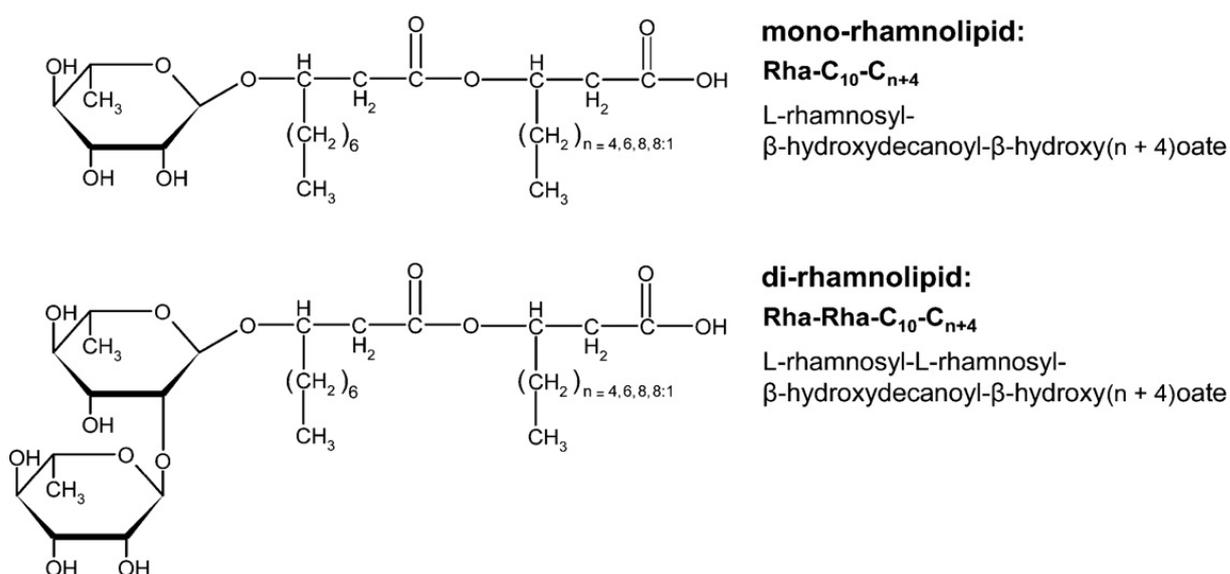


Figure 17: Structure générale des biotensioactifs de rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa*

## Partie 2 : Extraction des saponines du lierre « Hedera Helix »

**I. Classification**

La classification du lierre « Hedera Helix » est illustré dans le tableau 05

Tableau 05 : classification du lierre « Hedera Helix »

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Araliaceae
Genre	Hedera



Figure 18 : Le lierre « Hedera Helix »

**II. Composition chimique des feuilles du lierre « Hedera Helix » :**

Les principes actifs sont : les saponines et les saponosides. Les feuilles du lierre « Hedera Helix » contiennent approximativement 5-8% des saponines. Cette fraction se compose principalement de hederagenin bisdesmosidic, acide oleanolic -, et bayogeninglycosides. Hederasaponins de B à I sont caractérisés.

**III. Distribution**

Cette espèce est originaire d'Europe (Îles Britanniques, Scandinavie, France, Benelux, Europe centrale, Italie, péninsule Ibérique, Balkans), et d'Asie occidentale (Chypre, Turquie).

C'est une plante capable de s'adapter à de nombreuses régions. On la trouve sur le littoral atlantique où elle résiste aux pluies abondantes et aux embruns maritimes. Elle s'adapte aussi à la sécheresse dans les pays méditerranéens et peut pousser en montagne jusqu'à 1000 m d'altitude. Elle ne résiste cependant pas aux grands froids.

#### IV. Les saponines

Les saponines sont des tensioactifs que l'on retrouve, en quantité variable, dans de très nombreuses plantes (soit dans les feuilles de telle plante, soit dans le tronc de telle autre ou encore les fruits et les graines, les coques des noix, les racines etc.), comme la saponaire, les arbres à savon, le lierre, le soja etc.

Les saponines constituent un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques constituées d'une fraction aglycone hydrophobe liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (Figure 19). Cette structure leur donne d'excellentes propriétés émulsifiantes.

Les saponines doivent leur nom, dérivé du latin « sapo » qui signifie mousse, au fait qu'elles peuvent former une mousse stable dans des solutions aqueuses. Traditionnellement, elles ont été utilisées en tant que détergents, piscicides et molluscicides en plus de leurs applications industrielles en tant qu'agents moussants et tensioactifs.

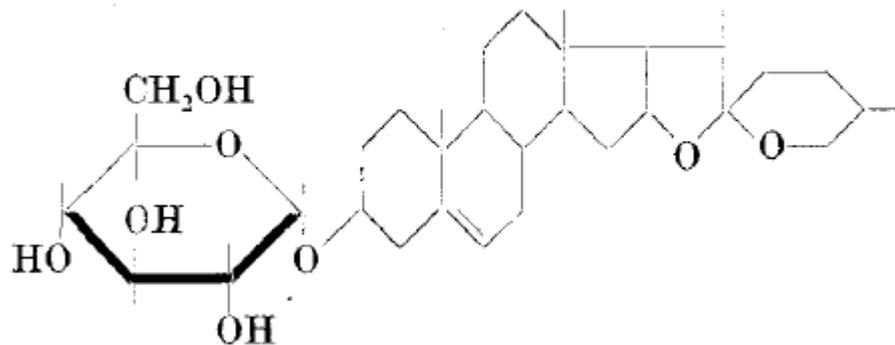


Figure 19 : Structure des saponines

## Chapitre 4 : Matériel et méthodes

Ce chapitre est consacré à :

- La production et étude physico-chimique d'un biotensioactif à partir d'une souche bactérienne « *pseudomonas aeruginosa* ».
- Extraction d'un biosurfactant (les saponines) à partir d'une source végétale : le lierre « *Hedera Helix* » et détermination de ses caractéristiques physico-chimiques.

### Partie 1 : Production des rhamnolipides par « *Pseudomonas aeruginosa* »

#### I. Matériel

##### I.1. Matériel biologique

###### Souche bactérienne

Le support bactérien utilisé pour la production du biotensioactif est la souche : « *pseudomonas aeruginosa* » de référence : TSA, F3 (voir annexe I). Cette souche a été ramenée de l'institut pasteur d'Alger. La souche est cultivée sur une gélose nutritive afin de la conserver pour un usage ultérieur.

##### I.2. Matériel non biologique

Pour les équipements, verrerie, consommables et milieux de cultures utilisés, voir annexe I.

#### II. Méthodes

##### II.1. Production du biotensioactif

###### II.1.1. Préparation de l'inoculum

Dans un environnement stérile et à partir d'une culture sur gélose nutritive, on prélève une surface d'environ 10 cm<sup>2</sup> de la souche productrice, au moyen d'un fil à boucle stérilisé et on l'introduit dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon nutritif préalablement autoclavé. L'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation à 180t/min pendant 16 heures [32]. (Voir figure 21 dans l'annexe I)

### **II.1.2. Milieu de production et conditions de culture**

La production d'un biotensioactif est réalisée selon le mode opératoire suivant [33]: Dans un erlenmeyer de 2000 ml contenant 1000 ml de milieu M préalablement autoclavé dont la composition est donnée dans l'annexe I. Additionné de 4 % d'huile d'olive comme seule source de carbone. Ce milieu est inoculé par 1 % d'une préculture précédente et l'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation à 180t/min pendant 5 jours.

Les prélèvements sont effectués toutes les 24 heures, avec le suivi régulier d'index d'émulsion.

### **II.2. Extraction du biotensioactif**

L'extraction du biotensioactif s'effectue selon la méthode par « précipitation acide » avec quelques modifications [32].

Après l'incubation, les cellules bactériennes ont été enlevées deux fois du milieu d'incubation par centrifugation à 8500t/min pendant 10 minutes à 4°C après la neutralisation de son pH à 7 au moyen d'une solution de NaOH 0,1 mole/l. Ensuite, le surnageant a été ajusté à un pH de 2, au moyen d'une solution de HCl à une concentration de 1 mole/l avant d'être recentrifugé à 8500 t/min pendant 20 minutes à 4°C. Le culot obtenu subit un lavage avec de l'eau distillée plusieurs fois par centrifugation à 8500t/min durant 45 minutes à 4°C. Le culot formé représente le biotensioactif produit par la souche.

Le mode opératoire est décrit selon le schéma suivant

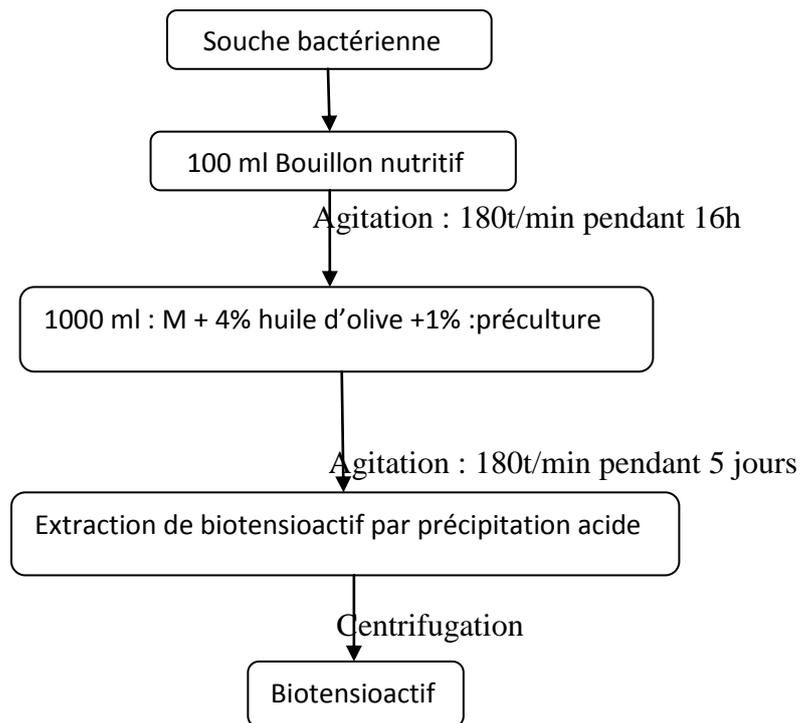


Figure 23: Schéma de production du biotensioactif à partir de la souche « pseudomonas aeruginosa »

### III. Caractérisation physico-chimique :

#### III.1. Détermination de l'index d'émulsion $E_{24}$

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (huile d'olive) dans une phase hydrophile (milieu de culture).

L'index d'émulsification d'une solution du biotensioactif de concentration de 2g/l a été évalué selon la méthode de Cooper and Goldenberg avec quelques modifications [34]

Le test consiste à mélanger 3 ml d'huile d'olive avec 3 ml de la solution du biotensioactif dans des tubes à essai (voir l'annexe I). Les tubes sont agités dans un vortex pendant 3 min puis après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion  $E_{24}$  selon l'équation 6. Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante.

Par la suite, un deuxième calcul d'index d'émulsion est refait pour vérifier la stabilité de l'émulsion. Le calcul d' $E_{24}$  est effectué selon la relation suivante :  $E_{24} = (h_e / h_t) \times 100$  (Equation 6)

he : hauteur de l'émulsion.

ht : hauteur totale du mélange.

### III.2. Mesure de la conductivité :

Tous les tensioactifs ioniques peuvent être déterminés par détection de la conductivité.

On prépare des solutions du tensioactif à différentes concentrations : 0.05, 0.3, 0.5, 1, 1.5 et 2 g/l en mesurant leurs conductivités à l'aide d'un conductimètre.



Figure 25 : Appareil d'un conductimètre

### III.3. Détermination de la tension de surface et de la concentration micellaire critique :

La tension superficielle du soluté à différentes concentrations en agent tensioactif ont été mesurées directement à l'aide d'un tensiomètre. La mesure de la tension superficielle a été effectuée à la température  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cette mesure a été répétée trois fois et une valeur moyenne a été calculée.

Pour le calibrage de l'instrument, la tension superficielle de l'eau comme référence a été mesurée avant chaque expérience. [35]

La concentration micellaire critique (CMC) est déterminée à partir du point d'arrêt de la tension superficielle (obtention des valeurs presque constantes) [35].

### III.4. Analyse par spectrophotométrie UV/visible

L'analyse par spectroscopie UV visible a été réalisée sur un appareil de spectrophotomètre « model UV/visible 303, GBC Cintra australia » au niveau de laboratoire d'analyse physico-chimique.

On prépare une solution de tensioactif de concentration 1g/l, ensuite on mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre.

## **Partie 2 : Extraction des saponines du lierre « Hedera Helix »**

### **I. Matériels :**

Les feuilles de lierre utilisées pour l'extraction des saponines ont été récoltées durant le mois de Juin 2013 de la région de Blida.

Son identification botanique et la systématique ont été confirmées au niveau de laboratoire botanique de jardin d'essai d'Elhama.

Pour le matériel non biologique on a utilisé : le montage soxhlet, hexane, méthanol, butanol et eau distillée.



Figure 27 : le lierre « Hedera Helix »

### **II. Protocole expérimentale :**

Avant de passer à l'extraction des saponines à partir des feuilles de lierre ; une délipidation de la plante a été réalisée. Tout d'abord, le matériel végétal doit être lavé, sécher à l'air libre avant d'être broyé. Par la suite, une délipidation est effectuée durant deux heures par 250 ml d'hexane à l'aide d'un montage de soxhlet (voir figure 26)



Figure 28 : montage de soxhlet pour la délipidation

### III. Extraction des saponines [36] :

L'extraction des saponines de lierre a été réalisée à l'échelle de laboratoire selon les étapes suivantes :

#### a) Mode opératoire

Dans un montage de soxhlet ,300g du broyat délipidé est placé. La durée d'extraction est de 3 heures. Le mode opératoire est décrit selon le schéma suivant.

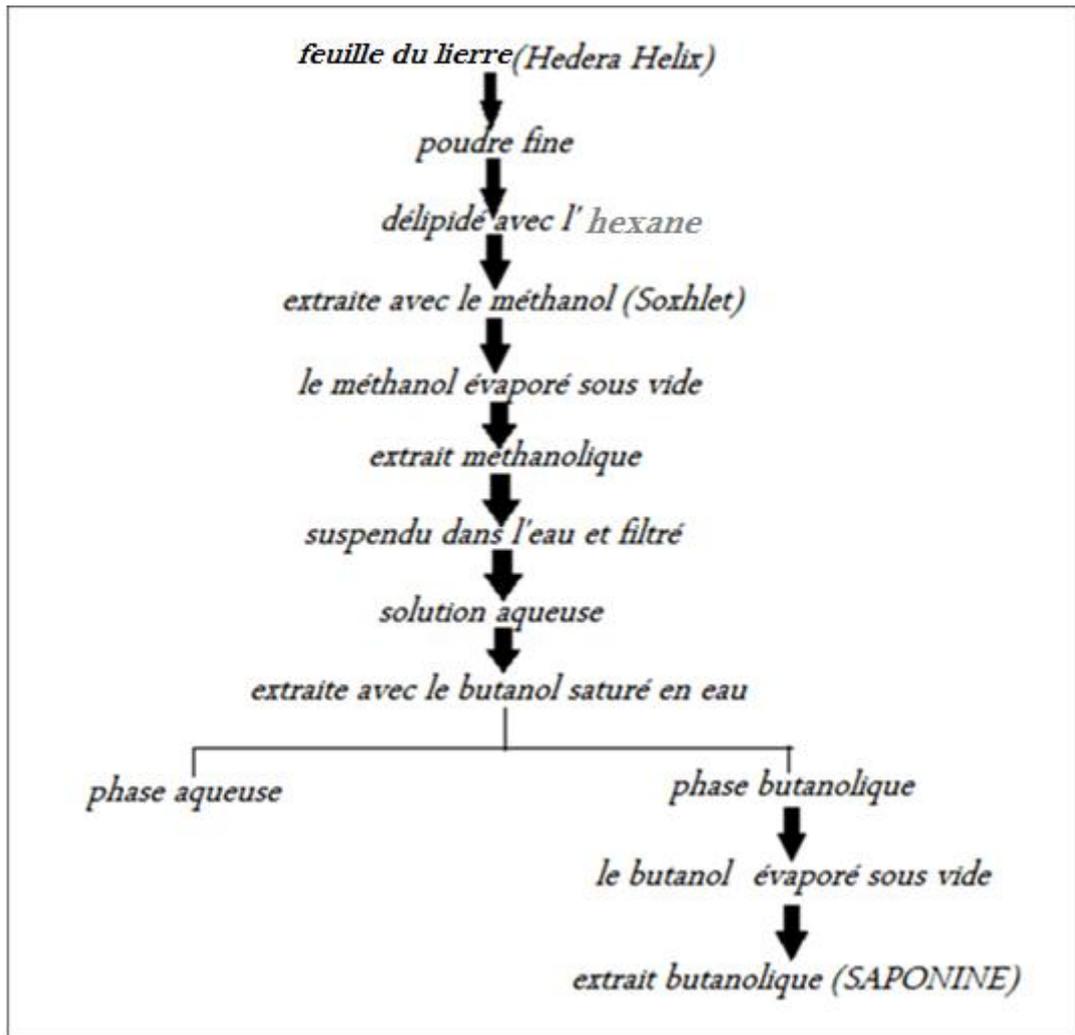


Figure 29: Schéma d'extraction des saponines des feuilles du lierre « Hedera Helix » [36]

#### IV. Caractérisation physico-chimiques des saponines :

##### IV.1 Détermination de l'indice de mousse :

L'indice d'émulsion est déterminé selon la méthode de Das et al [37]

On prend 6 tubes à essai, chaque tube contient 3ml d'eau distillé puis on ajoute différentes volumes de saponines : 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3ml. Après l'agitation on calcul l'indice de mousse selon la formule suivante :

$$\text{Indice de mousse(\%)} = \frac{\text{hauteur de la mousse}}{(\text{hauteur de liquide} + \text{mousse})} \times 100$$

Si l'indice de mousse est supérieur à 100, on a un test positif [38]

**IV.2 Détermination de l'index d'émulsion  $E_{24}$** 

L'index d'émulsion est calculé selon la mode opératoire donné dans le paragraphe **III.1** mais dans ce cas on utilise l'hexane comme partie hydrophobe.

**IV. 3. Analyse par spectrophotométrie UV/visible**

La solution a été préparée dans l'eau distillée. Les mesures d'absorbance ont été enregistrées sur un appareil de spectrophotomètre « model UV/visible 303, GBC Cintra australia » dans des cellules en quartz.

## Chapitre 5 : résultats et discussions

### Partie1 : Production des rhamnolipides par « P.aeruginosa »

#### I. Production du biotensioactif

Après 5 jours de l'incubation du milieu, on observe qu'il y'a une formation d'un surnageant.



Figure 30: le milieu de culture après 5 jours d'agitation

L'isolation de biotensioactif à partir de la souche « Pseudomonas Aeruginosa » a été réalisé suivant le protocole expérimental précédemment décrit. Une quantité de 1.5g de biotensioactif a été mesurée.



Figure 31 : Le biotensioactif produit

## II. Caractérisation physico-chimique

### II.1. L'index d'émulsion $E_{24}$ :

Un mélange formé de l'huile d'olive (phase organique), de l'eau (phase aqueuse) et du biotensioactif produit a été agité et laissé au repos pendant 24 heures à température ambiante afin de tester l'efficacité de ce biotensioactif à émulsionner les deux phases suivant le protocole décrit précédemment [34].

Après 24h, le calcul de l'indice d'émulsion a donné les résultats représentés dans la figure suivante.

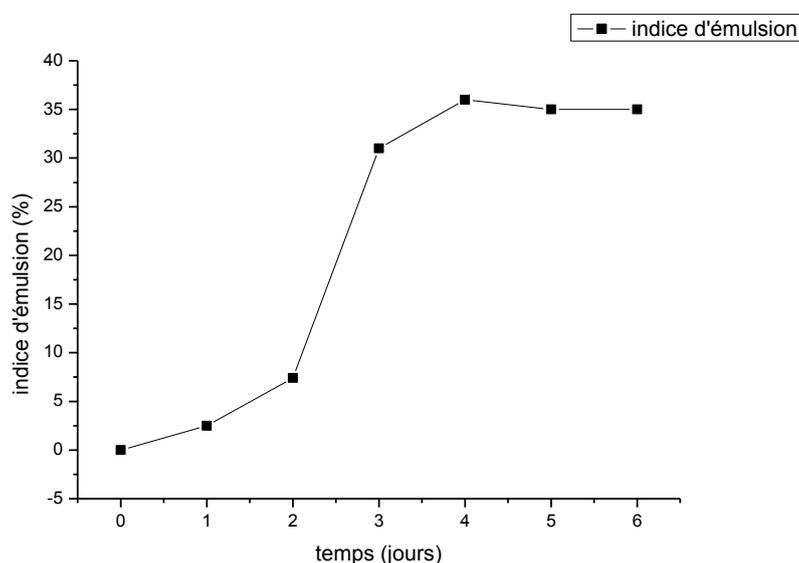


Figure 32 : Indice d'émulsion en fonction du temps

Le biotensioactif a une capacité de diminuer la tension interfaciale entre la phase aqueuse (eau) et la phase huileuse (huile d'olive) donc on obtient une formation d'une émulsion et une meilleure homogénéisation (voir figure 31).

L'allure générale de la courbe représentant l'indice d'émulsion en fonction du temps est croissant. Les résultats ont montré que l'indice augmente (de 2.5% jusqu'à 36 %) au cours du temps jusqu'à ce qu'il atteigne un palier et l'indice d'émulsion prend des valeurs constantes. On remarque au bout de 4 jours la courbe prend l'allure d'un pallier où l'indice d'émulsion prend sa valeur maximale.



Figure 33 : résultats du test d'émulsion

- **Le diagramme ternaire :**

Pour bien préciser le domaine d'émulsification on trace le diagramme ternaire. On prend les mêmes quantités (en gramme) utilisé pour la production des émulsions et on trace le diagramme ternaire pour connaître le domaine de présence de l'émulsion. La figure suivante représente le diagramme ternaire du système eau/huile/Biotensioactif.

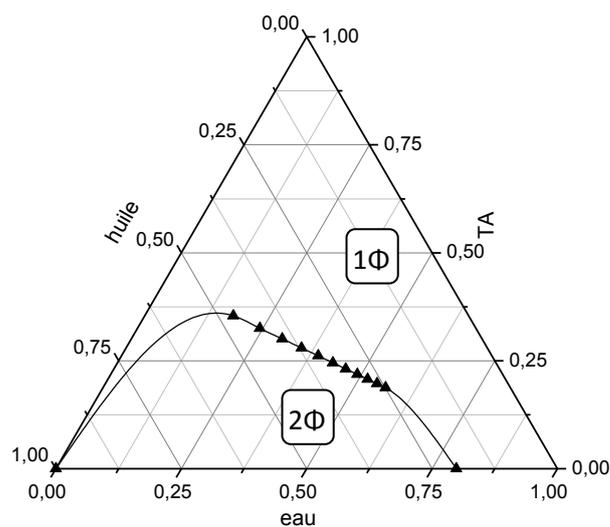


Figure 34: diagramme du système eau/huile/Biotensioactif

Le tracé du diagramme ternaire eau/huile/biotensioactif montre la présence deux parties : l'une au dessous du notre graphe et l'autre au dessus de ce dernier.

A partir de ce diagramme on peut dire qu' :

- Il y a une absence d'émulsion parce qu'on a deux phases dans la première partie.
- L'existence d'émulsion dans la deuxième partie où il y a une seule phase.

## II.2. Mesure de la conductivité :

Après la mesure directe de la conductivité à l'aide d'un conductimètre. Le tracé de la variation de la conductivité en fonction de la concentration du biotensioactif est représenté par la figure suivante.

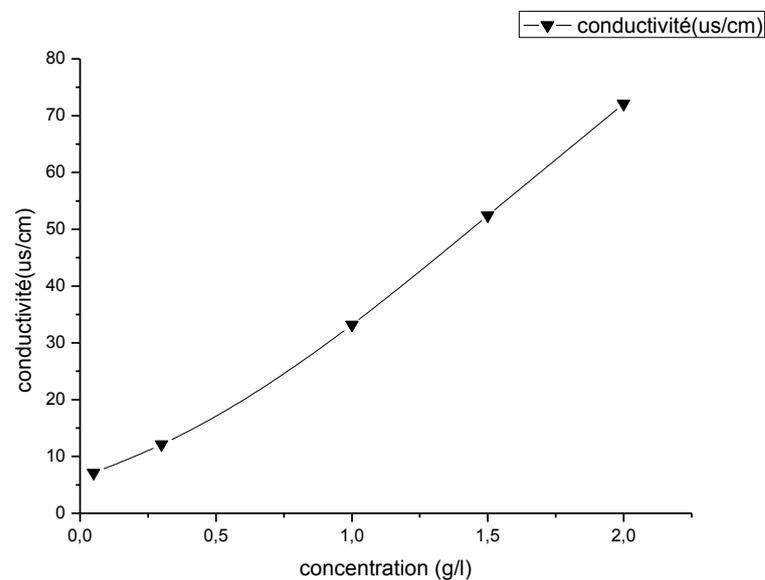


Figure 35 : la conductivité en fonction de concentration

Les rhamnolipides sont des biotensioactifs anioniques [39]. On remarque que la conductivité augmente au fur et à mesure que la concentration en biotensioactif augmente.

## II.3. Détermination de la tension de surface et de la concentration micellaire critique :

La variation de la tension superficielle en fonction de la concentration du biotensioactif est illustrée dans la figure 25.

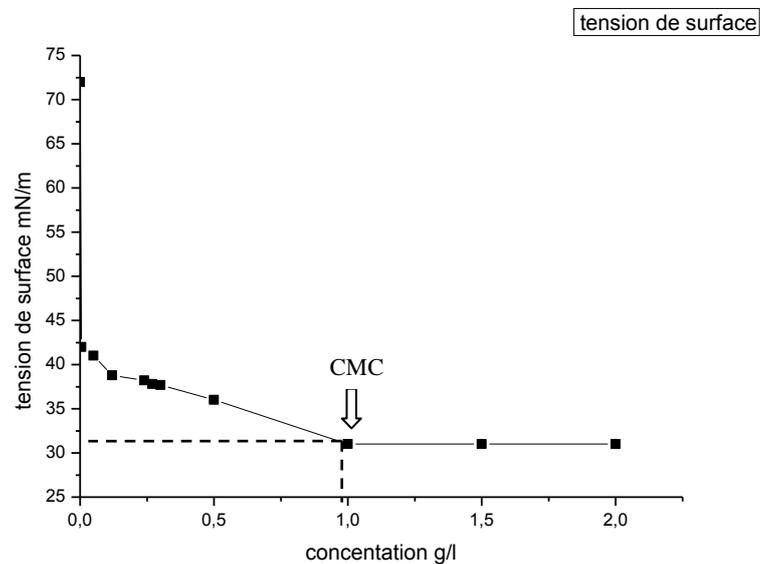


Figure 36: la tension superficielle en fonction de la concentration en fonction du biotensioactif

La tension superficielle (72mN/m de l'eau) diminue graduellement avec l'augmentation de la concentration en agent tensioactif. À une certaine concentration ( $c=1\text{g/l}$ ) appelée la concentration micellaire critique (CMC), la tension superficielle du biotensioactif prend une valeur constante égale à 31mN/m . En comparativement nos résultats aux travaux réalisés par Sineriz [39] sur la production du biotensioactif. Il a trouvé que la tension superficielle des rhamnolipides varient entre 25-31 mN/m . Cette résultat sont est en concordance avec celle de notre étude.

#### II.4. Analyse par spectrophotométrie UV/visible

Pour une concentration en biotensioactif de 1g/l, on a trouvé les longueurs d'onde d'absorption compris entre 210 et 190 avec une absorbance de 9.2 (voir la figure 35)

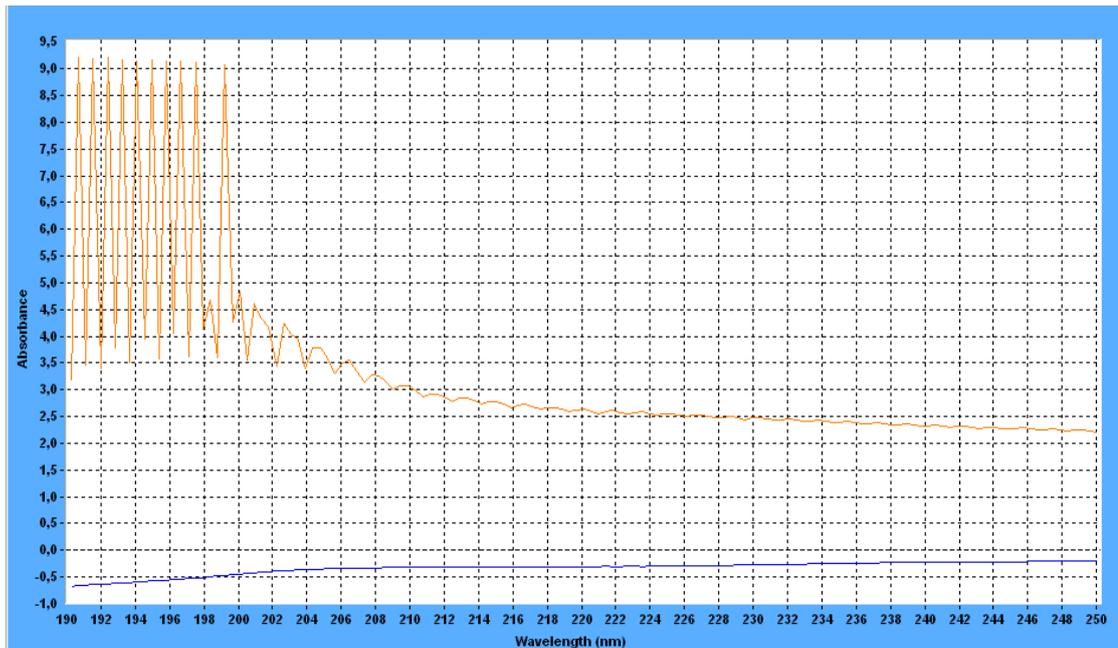


Figure 37 : résultat d'analyse par spectrophotométrie UV/visible

## Partie2 : L'extraction des saponines à partir du lierre « Hedera Helix »

### I. Extraction des saponines :

Après l'extraction des saponines du lierre suivant le protocole donné, on obtient un liquide visqueux qui représente les saponines.



Figure 38 : les saponines

### II. Caractérisation physico-chimique :

#### II.1. Détermination de l'indice de mousse :

Après l'agitation du mélange eau /saponine, on remarque qu'il y a une formation de la mousse (figure 39)

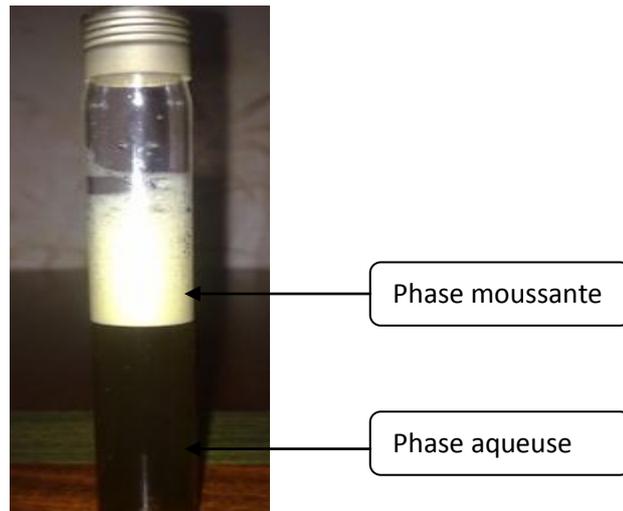


Figure 39 : production de la mousse par les saponines

Le test de capacité de produire la mousse par les saponines conduit à l'obtention des valeurs d'indice de mousse de 85%.

## II.2. Détermination de l'index d'émulsion $E_{24}$

Après 24 h de mélange de la phase organique (hexane), de la phase huileuse (eau) et du biotensioactif (saponines), on remarque une formation d'une émulsion (figure 41) sachant que les saponines sont des bons émulsifiants.

L'allure de la figure 40 montre que l'indice d'émulsion augmente en fonction de l'augmentation du volume des saponines jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur maximale égale à 56%.

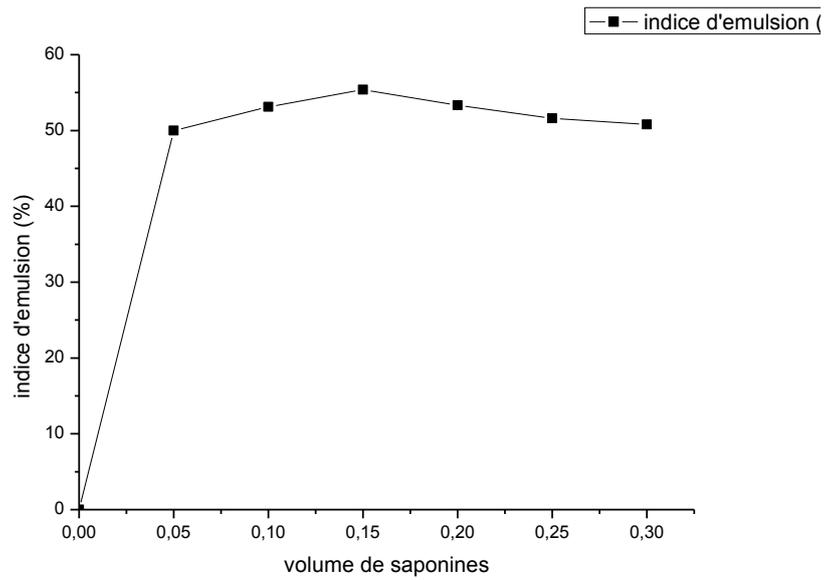


Figure 40 : indice d'émulsion en fonction de la quantité de saponine

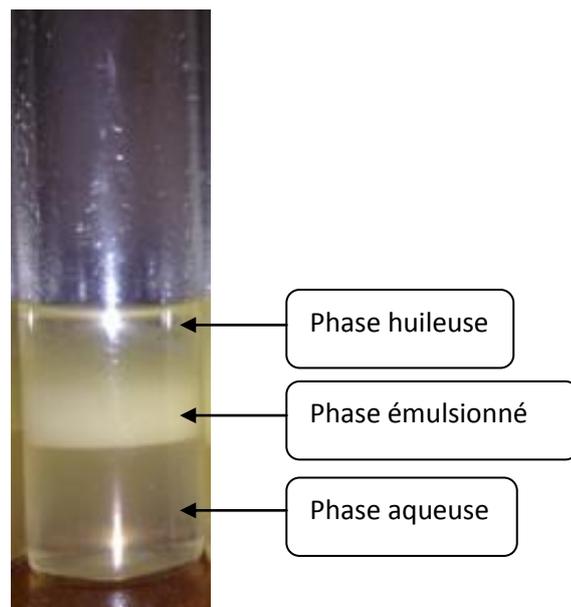


Figure 41 : production d'une émulsion par les saponines

### II.3. Analyse par spectrophotométrie UV/visible

Après l'analyse par spectrophotométrie on trouve que les saponines absorbent dans les longueurs d'onde suivantes : 672, 416, 326 et 285.5 nm

### Conclusion

L'objectif de ce travail est la production d'un biotensioactif à partir d'une bioressource.

- Une source animal : la souche bactérienne « *Pseudomonas aeruginosa* »
- Une source végétale : le lierre « *Hedera Helix* »

La culture de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de l'huile d'olive comme source de carbone a permis la production d'une quantité de biotensioactif capable de réduire la tension superficielle et ayant un bon index d'émulsion.

Après la détermination des caractéristiques physico-chimiques des deux biotensioactif (rhamnolipide, saponine) on a trouvé que :

- ✓ Les rhamnolipides et les saponines donnent des bons indices d'émulsion 36% pour les rhamnolipides et 56% pour les saponines.
- ✓ La conductivité des rhamnolipides augmente en fonction de l'augmentation la concentration des rhamnolipides.
- ✓ Les rhamnolipides diminue la tension de surface de l'eau jusqu'à 31mN/m
- ✓ Les saponines donnent un indice de mousse de 85%

### Références

- [1] Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T., 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy saving materials to gene delivery carriers. *J.*
- [2] Pour revue : Morelli. J. J., Szajer G., *J. Surfact. Deterg.*, 2000, 3, 539-552
- [3] Yu Y., Zhao J., Bayly A, E., *Chin. J. Chem. Eng.*, 2008, 16, 517-527
- [4] Nowiki J., Sokolowski A., Reksa D., *J. Surfact. Deterg.*, 2010, 14, 179-184
- [5] Bonnevie C. (glucidiques. Chambéry, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Chambéry, Université de Savoie. thèse de doctorat.
- [6] Giardi C., Lapinte V., Charnay C., Robin J-J., *Reactive and Functional Polymers*, 2009, 69, 643-649
- [7] PORE J., (1992). *Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples*, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, 270 p.
- [8] HAIGH S.D., (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*, 185 :161-170.
- [9] GABET S., (2004). *Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.*
- [10] ABALOS A., PINAZO A., INFANTE M. R., CASALS M., GARCIA F. et MANRESA A., (2001). *Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes*, *Langmuir*, 17 (5) :1367- 1371.
- [11] EDWARDS D. A., LUTHY R.G. et LIU Z., (1991). *Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions*, *Environ. Sci. Technol.*, 25 : (1), 127- 133.
- [12] B. FABRY, *Chemie in unserer Zeit*, 25/4, p 214 (1991).
- [13] *La biodégradabilité : association des industries des savons et des détergents.*
- [14] *Journal Officiel du 30 décembre 1987.*

## Références

---

- [15] DESAI J.D. et BANAT I.M., (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**, (1), 47-64.
- [16] CAMEOTRA S.S. et MAKKAR R.S., 1998, Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 520-529.
- [17] BOGNOLO G., (1999), Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, **152**, (1-2), 41-52.
- [18] MULLIGAN C.N., YOUNG R.N. et GIBBS B.F., (2001), Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, **60**, 371-380.
- [18] HEALY M.G., DEVINE C.M. et MURPHY R., (1996), Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling*, **18**, 41-57.
- [20] RON E.Z. et ROSENBERG E., (2002), Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*, **3**, 249-252.
- [21] FALATKO D.M. et NOVAK J.T., (1992), Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbon, *Water Environmental Research*, **64**,(2), 163-169.
- [22] L. GUERIN-DEREMAUX, *Dietary fibres and polyols*, International Symposium on "Carbohydrates for Healthy Future: Lifestyle to product Development", Roquette, 2012
- [23] ADEME, *Tensioactifs et oléagineux, Etude sur les matières premières oléagineuses disponibles sur le marché européen*, 2001
- [24] PARRA J.L., GUINEA J., MANRESA M.A., ROBERT M., MERCADÉ M.E., COMELLES. F. et BOSCH M.P., (1989), Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, *J.A.O.C.S.*, **66**, (1), 141-145.
- [25] BANAT M., MAKKAR R.S. et CAMEOTRA S.S., (2000), Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 495-508.
- [26] CHRISTOFI N. et IVSHINA I.B., (2002), A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *Journal of Applied Microbiology*, **93**, 915-929.
- [27] Déziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005–2013.

## Références

---

- [28] Dekimpe, V. & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates Las R-specific factors. *Microbiology* 155,712–723.
- [29] McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 2702–2708.
- [30] Medina, G., Juarez, K., Diaz, R. & Soberon-Chavez, G. (2003a). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149,3073–3081.
- [31] Medina, G., Juarez, K. & Soberon-Chavez, G. (2003b). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyl-L-homoserine lactone. *J Bacteriol* 185, 377–380.
- [32] LAPOINTE M., (1996). Mobilisation en colonne d'un hydrocarbure Aromatique polycyclique (pyrène) adsorbé au sol au moyen d'un biotensioactif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de Maîtrise es Sciences, Université de Québec, Sainte-Foy. P. 164.
- [33] SIFOUR M., AL-JILAWI M. H. et AZIZ J. M., (2007). Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10 (8) : 1331-1335.
- [34] Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G.: Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 224–229 (1987).
- [35] YOSHIHIKO HIRATA, MIZUYUKI RYU, YUKA ODA, KEISUKE IGARASHI, ASAMI NAGATSUKA, TARO FURUTA, et MASAKI SUGIURA: Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants
- [36] ALBERTO ESTRADA, GEORGIOS S. KATSELIS, BERNARD LAARVELD, BRANKA BARL: Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L.
- [37] Das, M., Das, S. K., and Mukherjee, R. K.: Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars, *Bioresour. Technol.*, 63, 231–235 (1998).

## *Références*

---

- [38] YEMOA A.L, GBENOU J.D., JOHNSON R.C., DJEGO J.G., ZINSOU C., MOUDACHIROU M., QUETIN-LECLERCQ J., BIGOT A., PORTAELS F : Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin
- [39] F.Sineriz : Institute of microbiology, University of Tucuman-PROIMI, Argentina

## Annexe I

Matériels utilisés :

- Plaque chauffante avec agitation
- Erlenmeyers
- Tubes à essais
- Centrifugeuse



Figure 20 : pseudomonas aeruginosa sur une gélose nutritive

**Bouillon nutritif :**

Ingrédients	Quantité
Peptone	5,00 g
Extrait de viande de boeuf	3,00 g
Eau distillée	1000 ml

**Milieu M**

Ingrédients	Quantité
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Fe SO <sub>4</sub>	0,008 g
CaCl <sub>2</sub>	0,05g
Urée	6 g
Extrait de levure	0,1 g
Solution d'éléments traces	1 ml
Eau distillée	1000 ml

- Composition de la solution d'éléments traces

Ingrédients	Quantité
Fe SO <sub>4</sub>	0,00152 g/l
Mn SO <sub>4</sub>	0,00151 g/l
Cu SO <sub>4</sub>	0,00016g/l
Zn SO <sub>4</sub>	0,000161g/l



Figure 21 : incubation avec agitation du bouillon+souche

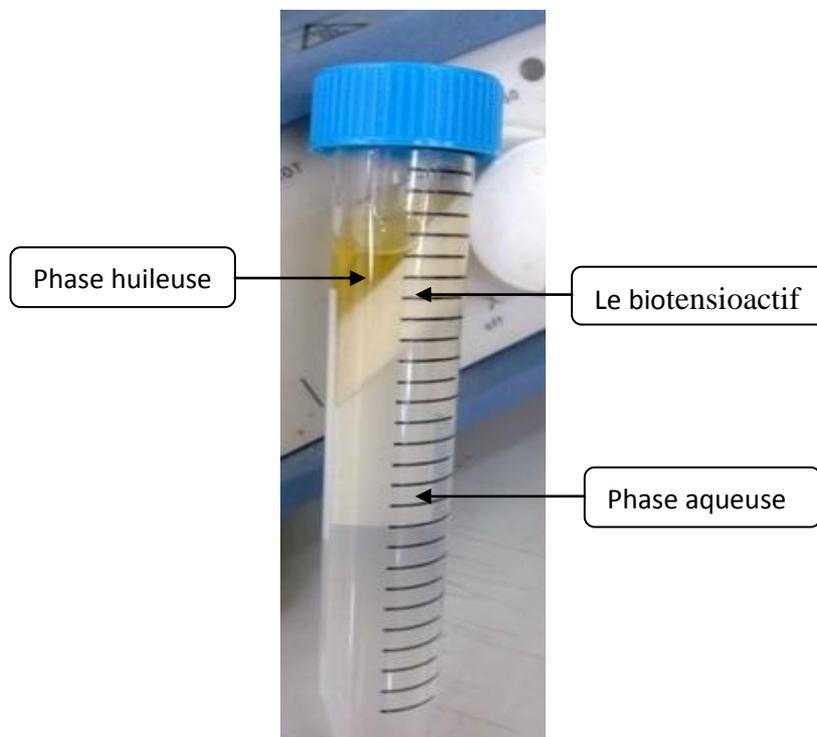


Figure 22 : extraction du biotensioactif

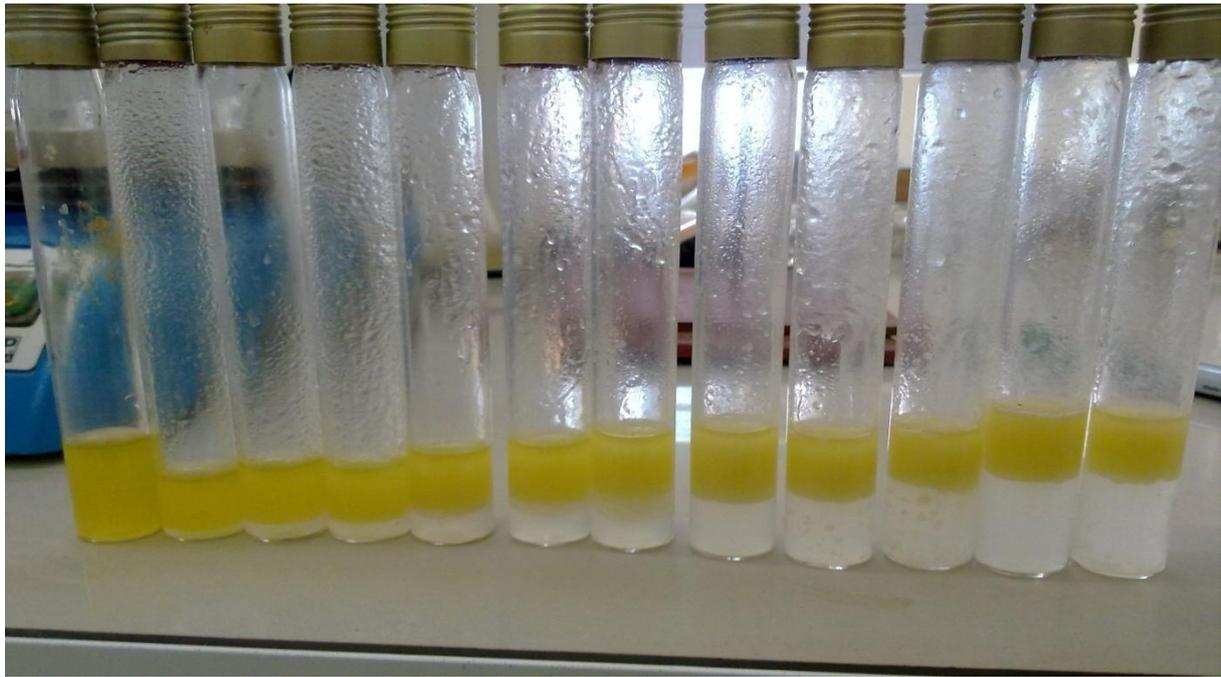


Figure 24 : préparation des émulsions

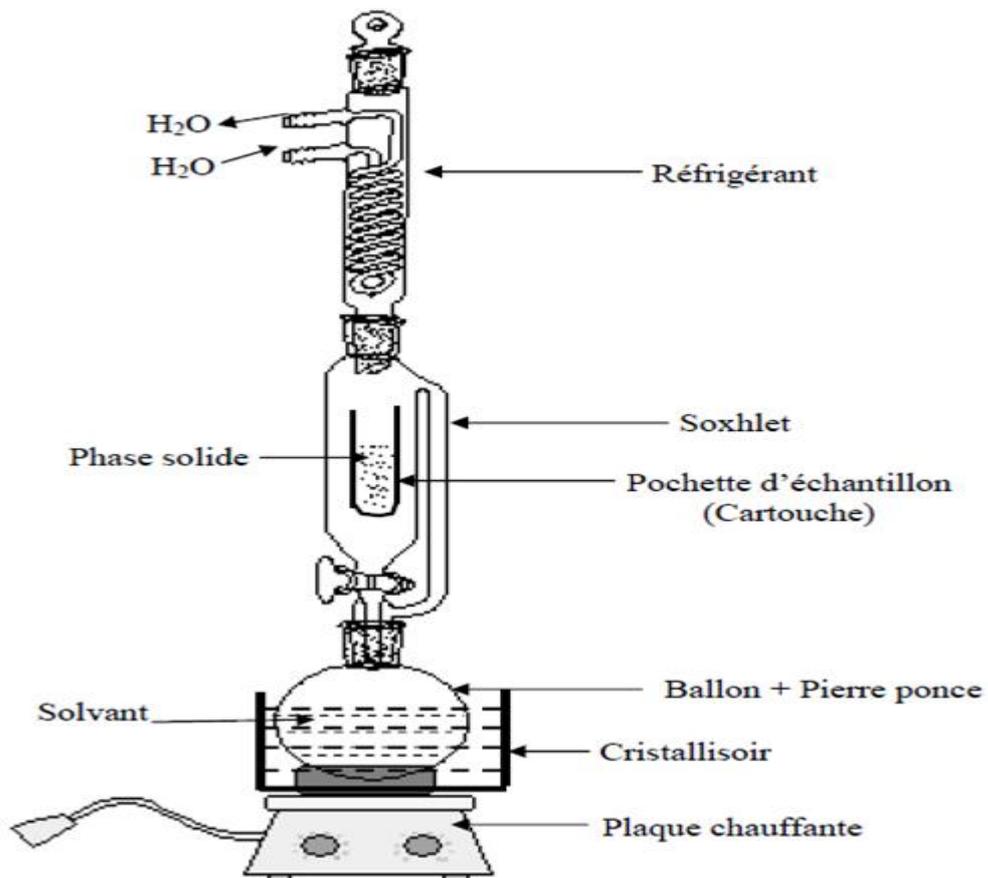


Figure 26 : Montage d'extraction par l'appareil Soxhlet

## Annexe II

Tableau 06 : indice d'émulsion en fonction du te

Temps (jours)	0	1	2	3	4	5	6
Indice d'émulsion (%)	0	2,5	7,4	31	36	35	32

Tableau 07 : quantité des constituants pour la production des émulsions

<b>M<sub>E</sub> (g)</b>	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5
<b>M<sub>E</sub> (g)</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>M<sub>E</sub> (g)</b>	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65

Tableau 08 : pourcentages des constituants des émulsions

% E	% TA	% H
0	0	1
0,17699	0,35398	0,46903
0,2439	0,3252	0,43089
0,30075	0,30075	0,3985
0,34965	0,27972	0,37063
0,39216	0,26144	0,34641
0,42945	0,2454	0,32515
0,46243	0,23121	0,30636
0,4918	0,21858	0,28962
0,51814	0,20725	0,27461
0,54188	0,19704	0,26108
0,56338	0,18779	0,24883
0,79848	0	0,20152

Tableau 09 : les résultats de la conductivité

## *Annexe*

---

Concentration g/l	0,05	0,30	0,50	1.00	1,50	2.00
Conductivité $\mu\text{s/cm}$	7,10	12,12	31,90	33,20	52,40	72,10

Tableau 10 : les résultats de la tension superficielle

C (g/l)	0	0,005	0,05	0,12	0,24	0,27	0,3	0,5	1	1,5	2
$\delta$ (mN/m)	72	42	41	38,8	38,2	37,8	37,7	36	31	31	31

Tableau 11 : les résultats du test d'émulsion des saponines

Volume de la saponine (ml)	0	0.05	0.1	0.1	0.2	0.25	0.3
Indice d'émulsion (%)	0	50	53.13	55.38	53.33	51.61	50.79

## Liste des tableaux

Tableau 01 : Classes de tensioactifs.....	07
Tableau 02 : Principaux biotensioactifs (BTA) obtenus à partir de différentes sources.....	21
Tableau 03 : Utilisations potentielles des bio-tensioactifs .....	22
Tableau 04 : Taxinomie de <i>P. aeruginosa</i> .....	23
Tableau 05: classification du lierre « Hedera Helix ».....	27
Tableau 06 : indice d'émulsion en fonction du volume de mélange (eau/biotensioactif).....	annexe II
Tableau 07 : quantité des constituants pour la production des émulsions.....	annexe II
Tableau 08 : pourcentages des constituants des émulsions.....	annexe II
Tableau 09 : les résultats de la conductivité .....	annexe II
Tableau 10 : les résultats de la tension superficielle.....	annexe II
Tableau 11 : les résultats du test d'émulsion des saponines .....	annexe II