

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

Université Ibn Khaldoun –Tiaret-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



**Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique**

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences Biotechnologiques "

Spécialité: "Biotechnologie microbienne"

Présenté et soutenu publiquement par

❖ **Melle GHESSAB Soumia**

❖ **Melle ROUINA Mebarka**

Thème

Etude de la biodégradation des polyhydroxyalcanoates

Membres de jury :

Promoteur : Melle MEDJBER Nacera

Examineur : Mr .YEZLI Wassim

Année universitaire: 2017-2018

Remerciement

*En premier lieu, nous tenons à remercier **Dieu** tout puissant qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté de continuer nos études.*

Nous remercions notre promotrice Mme MEDJBER Nacera, de nous avoir proposé ce thème, ainsi que pour son aide précieuse et ses considérables conseils qui nous ont facilité le travail, Nous tenons à manifester notre reconnaissance, pour votre façon de travailler, pour tous vos efforts fournis, votre présence, votre gentillesse, et pour votre soutien, Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

A Monsieur YEZLI Wassim Enseignant à l'université de Tiaret, nous vous adressons nos plus sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous tenons aussi à remercier Monsieur SASSI Mohamed le chef de la spécialité Biotechnologie microbienne .Veuillez agréer Monsieur, l'expression de notre profond respect.

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

Dédicace

Je dédie ce projet de fin d'étude

A tous ceux et à toutes celles qui me sont chers

Aux personnes qui m'ont encouragé et motivé, qui n'ont cessé d'œuvré pour ma réussite et pour mon bonheur.

A mes parents, qui ont tant sacrifié pour mon succès attendant ce jour avec impatience.

A mes grands-parents.

A mes tantes : Fatima, Torkia

A mes sœurs: Mokhtaria, Amina, Ikram, El batoul.

A tous les camarades de notre spécialité.

A toute ma famille, mes proches et mes amis.

Mebarka

Dédicace

Je dédie cette mémoire

À MES CHERS PARENTS

A ma très chère mère Gherboudj Assia

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A la mémoire de mon Père Ghessab Larbi

aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma grande mère Meriem , Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mes très chères sœurs Hadjer ,Bochera et Nadjoa.

A tous les membres de ma famille petits et grands : mes oncles, Moussa ,Nacervedine ,mes chères tantes Hafida ,Zohra, Nacera.

Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

A mes chères ami (e)s et mon binôme Mebarka

EN souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

*À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ A L'ÉLABORATION DE CE TRAVAIL
À TOUS CEUX QUE J'AI OMIS DE CI*

Soumia

TABLE DE MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

PARTIE EXPERIMENTAL

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1. Objectif de travail	04
2. Durée et lieu de travail.....	04
3. Matériel et produits.	05
4. Protocole expérimental.....	06
5. Méthodes	07
5.1 . Préparation des films de PHBV	07
5.2 . Etude de la biodégradation.....	08
5.2.1. Zone d'étude	08
5.2.2. Détermination du pourcentage de biodégradation.....	09
5.2.3. Etude des paramètres physico-chimiques du sol.....	10
5.2.3.1.Humidité	10
5.2.3.2. pH.....	10
5.2.3.3. Température	11
5.2.4. Détermination de la charge microbienne	11
5.3. Isolement de certaines souches qui dégradent le PHBV.....	13
5.3.1. Isolement et purification des souches	13
5.3.2. Dégradation de PHBV par les souches sélectionnées.....	13

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Biodégradation des PHBV dans le sol.....	14
1.1. Evaluation de la biodégradation par mesure de la perte de poids.....	14
1.2 Observation visuelle des films de PHBV après le test de biodégradation.....	15
1.3. Evaluation de la charge microbienne	15
1.4. Influence des facteurs physico- chimiques.....	19
2. Test de la biodégradation des PHBV sur un milieu gélosé	20

CONCLUSION23

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ANNEXES

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Matériels et produits utilisés.....05

Tableau 02 : Films après la biodégradation17

Liste des figures

Figure 01 : Protocole expérimentale.....	06
Figure 02 : Structure moléculaire du PHBV	07
Figure 03 : Préparation des films de PHBV.....	08
Figure 04 : Zone d'étude.....	09
Figure 05 : Préparations des suspensions dilutions du sol.....	12
Figure 06 : Pourcentage de biodégradation des PHBV.....	14
Figure 07 : Evolution de la charge microbienne dans le sol au cours de la biodégradation	18
Figure 08 : corrélation entre la charge microbienne (Log_{10} UFC /ml) et le pourcentage de biodégradation.....	18
Figure 09 : Variation des paramètres physico-chimiques au cours de la biodégradation.....	20
Figure 10 : Croissance dans le milieu synthétique.....	22

Liste des Abréviations

3-HB : 3-hydroxybutyrate

3-HB-3-HV : 3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate

3-HB-4-HB : 3- hydroxybutyrate-4- hydroxybutyrate

3-HB-3-HHx : 3- hydroxybutyrate-3- hydroxyhexanoate

pH : Potentielle d'Hydrogène

PHA : Polyhydroxyalcanoates

PHB : Poly-3-hydroxybutyrate

PHBV : Polyhydroxybutyrate-valerate

PLA : Acide polylactique

UV : Ultraviolet

UFC : Unité Formant Colonie

L'augmentation du niveau de vie, la modification des habitudes de consommation, le développement industriel ont conduit à une forte utilisation de matières plastiques. Ces produits se caractérisent, après utilisation, par un fort taux de pollution qui compliquent les opérations de retraitement (recyclage, incinération) et rendent celles-ci très onéreuses. De plus, depuis le 1er Juillet 2002, il est interdit d'enfouir, de brûler ou de mettre en décharge ces produits volumineux (Loi du 13 juillet 1992) en France. La pollution environnementale due à l'accumulation de ces polymères sous forme de déchets plastiques pose un problème écologique important. De nouvelles voies sont explorées pour réduire, voire supprimer, leur impact négatif sur l'environnement (**Lefaux, 2005**).

L'innovation la plus prometteuse reste cependant le développement de polymères et « bio polymères » biodégradables. Offrant généralement des propriétés au moins égales voire supérieures à leurs homologues non biodégradables, ces nouveaux matériaux « verts » présentent, en général, l'avantage de se dégrader en matière non toxique dans les conditions environnementales, ceci sans gaspiller les énergies fossiles. Ce phénomène connu sous le terme de « biodégradation » consiste à une dégradation résultant d'une activité biologique (présence de micro-organismes) menant à une modification de la structure chimique d'un matériau.

La biodégradation est un processus qui se déroule en trois étapes ; La première étape correspond à la fragmentation, c'est une désagrégation d'un matériau en morceaux de plus en plus petits (micro-fragments). Cette étape est susceptible d'aboutir à une séparation partielle ou totale des constituants du matériau, ainsi qu'à une perte plus ou moins grande des caractéristiques physico-chimiques initiales de ce dernier . La deuxième étape correspond à la bioassimilation : c'est le phénomène par lequel la (micro) faune et/ou la (micro) flore, constituants élémentaires de la biomasse, utilisent un matériau comme nutriment. Les molécules ou les fragments des molécules sont incorporés par les voies métaboliques des micro-organismes. La dernière étape c'est la minéralisation au cours de laquelle les composés assimilés sont minéralisés (**Saadi, 2008**).

En raison d'un manque de solubilité dans l'eau et de la taille des molécules de polymères, les micro-organismes ne peuvent pas les absorber directement. Ils doivent dans un premier temps excréter des enzymes extracellulaires qui vont couper les chaînes des polymères. Ainsi, les micro-organismes dégradent ces biomolécules grâce à la production d'enzymes intra et extracellulaires comme les dépolymérase et les hydrolases.

Dans le cas d'une minéralisation complète en composés inorganiques, les produits finaux de ces processus métaboliques sont l'eau, le dioxyde de carbone et le méthane (dans le cas de la dégradation anaérobie), ainsi qu'une nouvelle biomasse. La biodégradabilité des polymères dépend de leur masse molaire et de leur aspect (film, poudre). Les monomères, les dimères et les oligomères sont plus facilement dégradés et minéralisés que les polymères correspondants (**Lefaux, 2005**).

La biodégradation d'un bioplastique dépend des facteurs environnementaux spécifiques ; la température, l'humidité, l'oxygène, le pH et de la structure chimique même du polymère. Sa dégradation biologique peut donc être excessivement lente si les conditions du milieu ne sont pas optimales. Le facteur temps et environnement sont d'une importance majeure sur la biodégradation des polymères (**Lapointe, 2012**).

Il existe une très grande diversité de polymères issus de ressources renouvelables, parmi lesquels on trouve des polyesters tels que le polylactide (PLA) et les polyhydroxyalcanoates (PHA). Le PLA est synthétisé à partir d'acide lactique obtenu par fermentation de sucres ou d'amidon, les PHA, dont il existe une très grande variété, sont produits naturellement par de nombreux microorganismes à partir de sources de carbone variées. Ces bioplastiques constituent une alternative intéressante dans le cadre du remplacement des polymères issus de la pétrochimie (**Gerard, 2013**).

Les polyhydroxyalcanoates ou PHA sont des polyesters linéaires d'hydroxyalcanoates (HA). Le polymère s'accumule dans le cytoplasme de certaines bactéries placées en condition de fermentation et en excès d'une source de carbone (**Betancourt, 2008**).

En 1926, le polyhydroxyalcanoate (PHA) a été identifié comme un biopolymère constitutif de *Bacillus megaterium* par le scientifique français Lemoigne Maurice. Plus tard, le poly-hydroxybutyrate (PHB), un des PHA les plus communs et d'autres PHAs ont été découverts; 40 PHAs ayant été caractérisés (**Song, 2007**).

À l'heure actuelle, quatre types de PHA, le poly[(R)-3-HB], le copolymère de (R)-3-HB-(R)-3-HV, le copolymère de (R)-3-HB-4-HB, et le copolymère de (R)-3-HB-(R)-3-HHx sont produits à grande échelle dans une vingtaine de plantes à travers le monde . De manière générale, le processus de production de PHAs consiste en plusieurs étapes, comprenant la fermentation qui est suivie d'une étape de séparation de la biomasse, du séchage de la biomasse, de l'extraction de PHA, du séchage de PHA et de l'emballage (**Rivero et Raquet, 2017**).

Depuis, plus de 300 souches bactériennes capables de produire des PHAs ont été recensées dans le monde. Une telle variété permet d'optimiser le choix du couple bactérie-substrat carboné afin d'obtenir le meilleur rendement. Les PHAs ont comme avantages d'être biodégradables/compostables, biocompatibles et semi cristallins. Par contre, ils ont comme désavantages d'avoir une faible stabilité thermique, d'être un matériau très cassant et d'avoir une mise en œuvre délicate sur équipements classique.

Les PHA sont des polymères thermoplastiques. Leurs propriétés diffèrent en fonction de leur composition chimique, sont insolubles dans l'eau et relativement résistants à la dégradation hydrolytique en conditions neutres ; présentent une pauvre résistance aux acides et aux bases, bonne résistance aux UV, soluble dans le chloroforme et autres hydrocarbures chlorés, biocompatibles et convenable pour des applications médicales, plus denses que l'eau, facilitant leur biodégradation anaérobie dans les sédiments. Ces polyesters ne sont pas toxiques, moins collants que les polymères traditionnels à l'état fondu (**Wertz, 2016**).

Les PHAs trouvent des applications dans des domaines aussi variés que l'emballage, l'élaboration de matériaux ménagers, pour l'agriculture, les textiles, etc. Mais les applications plus innovantes et peut-être les plus importantes sont les applications médicales (tissu osseux, ingénierie du tissu cartilagineux, pancréas semi-artificiel, conduits nerveux, patch cardio-vasculaire et prothèses) et thérapeutiques (élaboration de microsphères et microcapsules). Selon les applications, le prix relativement élevé de production des PHAs n'est plus un obstacle à son développement commercial (**Rivero et Raquet, 2017**).

Notre travail a pour objectif de suivre la biodégradation des PHAs dans le sol et ainsi l'étude de l'influence de la charge microbienne et le changement des facteurs physicochimiques sur la biodégradation du polymère en question.

1. Objectif de travail

L'objectif principal de notre travail consiste à étudier la biodégradation du copolymère de 3-hydroxybutyrate et 3-hydroxyvalérate (3-PHB/3-PHV) dans le sol et ainsi l'influence de la charge microbienne et les paramètres physico-chimiques sur cette biodégradation.

2. Durée et Lieu de travail

Cette présente étude a été effectuée au sein de laboratoire de microbiologie, de sciences des sols et de biochimie de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie de l'université IBN KHALDOUN –Tiaret. La durée de cette étude s'étale de 26/02/2018 jusqu'au 03/06/2018.

3. Matériel

Tout le matériel ainsi que les produits utilisés dans notre travail sont données ci-dessous.

Tableau 1 : matériel et produits utilisés.

Appareils)	Agitateur magnétique thermique (IKA RCT basic)
)	Autoclave (WOLF)
)	Balance analytique (KERN ALSi2C_4N, Sartor)
)	Broyeur
)	Etuve (memmert, Heraeus)
)	Microscope optique (Optika)
)	pH mètre
)	Tamis
)	Thermomètre

Verreries	<ul style="list-style-type: none">) Becher) Boîtes) Burette) Ecouvillons de Pétri) Burette) Dessiccateur stérile) Erlenmeyer) Eprouvette stérile) Embouts stériles) Micropipettes) Pipettes Pasteur) Spatule stérile) Tubes à essai) Verre de montre
Produits	<ul style="list-style-type: none">) Chloroforme) Eau distillée) Violet de gentiane) Lugol) Ethanol) Fuchsine basique) PHBV
Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none">) Gélose Nutritive) Bouillon Nutritif) Milieu Synthétique

4. Protocole expérimental

Le travail effectué est résumé dans le diagramme suivant :

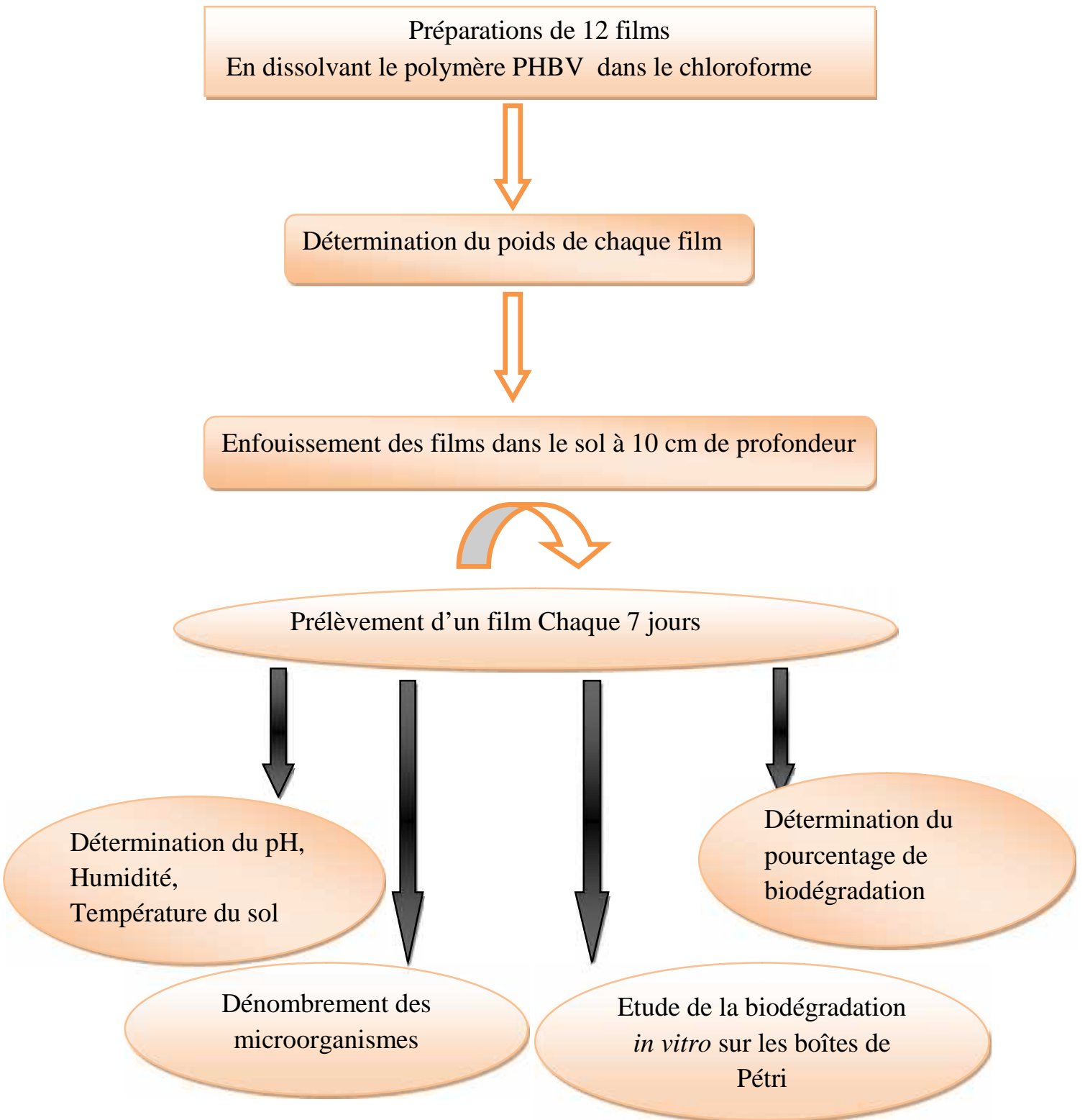


Figure N°01 : Protocole expérimental

5. Méthodes

5.1. Préparation des films de PHBV

Le PHBV est un copolymère constitué à la fois d'un monomère d'acide hydroxybutyrique et d'un monomère d'acide valérique. Ces monomères ont des propriétés qui diffèrent, c'est la raison pour laquelle un copolymère est créé. Ainsi, le PHBV a une rigidité supérieure à celle du PHB. Actuellement le PHBV a un intérêt important du point de vue industriel (Gelinas, 2013). Le PHBV utilisé dans notre travail est un copolymère de synthèse chimique. La structure moléculaire est montrée dans la figure N°2 .

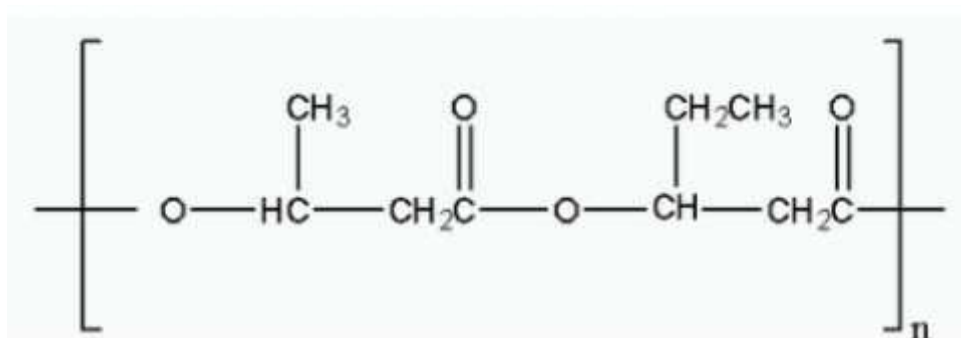


Figure N° 02: Structure moléculaire du PHBV (Gelinas, 2013)

La technique conventionnelle de Moulage par dissolution du copolymère dans le chloroforme a été utilisée pour la préparation des films (Altaee *et al*, 2016).

Pour cela (0.3g) de PHBV est dilué dans (30 ml) de chloroforme ; le mélange est mis dans un bécher sous une agitation magnétique pendant 30 minutes à 30°C. Le mélange est versé dans des boîtes de Pétri en verre. Les boîtes sont couvertes avec du papier Aluminium perforé et laissées dans l'obscurité à 30°C pendant 24h jusqu'à l'évaporation totale du chloroforme.

Les poids des films sont déterminés avant l'enfouissement dans le sol (Figure N°03).



Figure N°03 : Préparation des films de PHBV

5.2. Etude de la biodégradation

L'étude de la biodégradation de notre polymère dans ce travail est basée sur un enfouissement dans le sol. Certains facteurs comme la charge microbienne, la température, le pH et l'humidité influencent la dégradation des matériaux. L'effet de ces paramètres sera donc pris en compte tout au long du test d'enfouissement.

5.2.1. Zone d'étude

La zone d'étude de la biodégradation doit être une zone fertile. Les films sont enfouis à une profondeur de 10 cm dans une parcelle de culture situé à la faculté SNV Tiaret.



Figure N° 04 : Zone d'étude.

5.2.2. Détermination du pourcentage de biodégradation

Chaque semaine un film est prélevé, lavé avec de l'eau distillé pour éliminer les débris du sol puis laisser à une température ambiante pendant 24h. Les films séchés sont mis dans un dessiccateur pendant 1h. Les poids des échantillons ont été déterminés et le pourcentage de biodégradation a été calculé par la formule suivante en fonction de perte de poids. (Volova *et al.*, 2010 ; Altaee *et al.*, 2016)

$$x = \frac{X2}{X1} \times 100$$

X : Pourcentage de biodégradation.

X1 : Poids du film avant la biodégradation.

X2 : Poids du film après la biodégradation.

5.2.3. Etude des paramètres physico-chimique du sol

5.2.3.1. Humidité

Le taux d'humidité dans le sol en particulier va déterminer les caractéristiques de diffusion ou stockage de l'eau dans le sol.

Pour déterminer le taux d'humidité on a utilisé la technique gravimétrique. Cette méthode consiste à sécher un échantillon de sol dans un four à 105°C ; et connaître ensuite par pesé finale le poids d'eau contenu par échantillon.

$$\% \text{Hum} = \frac{P_{\text{air}} - P_{105^\circ}}{P_{\text{air}}} \times 100. \text{ (Baize, 1988)}$$

P_{air}

P_{air} : poids du sol avant séchage.

P_{105° : poids du sol après séchage.

5.2.3.2. pH

Le pH traduit le degré d'acidité ou d'alcalinité (basicité) de l'eau en contact avec le sol. Par ses interactions avec de nombreux processus chimiques et biologiques, le pH conditionne et reflète la disponibilité des éléments dans le sol. Il constitue donc un indicateur utile, en combinaison avec d'autres, pour appréhender la fertilité chimique des sols. La mesure du pH doit s'effectuer impérativement à l'aide d'un pH-mètre sur la couche allant de 0-20 cm de profondeur.

La détermination du pH se fait au laboratoire. Elle implique les étapes suivantes :

- Préparation d'une suspension sol : est réalisée en introduisant dans un flacon un volume de sol pour 5 volumes d'eau déminéralisée. Après fermeture, le flacon est mélangé énergiquement afin de disloquer les agrégats.

-Étalonnage et préparation du pH-mètre ; Avant toute série de mesures, le pH-mètre est calibré à l'aide de deux solutions tampons (pH 4 et pH 7).

- Prise du pH : la mesure de pH peut être effectuée en immergeant l'électrode dans le surnageant juste après agitation de la suspension. La lecture du pH se fait après stabilisation de la valeur.

5.2.3.3. Température

La température du sol va être influencée par les échanges thermiques avec l'extérieur (convection due au vent, flux radiatifs avec le ciel, ...). Ces apports étant variables en fonction du climat et de la saison.

La mesure de température se fait à l'aide d'un thermomètre.

5.2.4. Détermination de la charge microbienne

Chaque semaine la quantification de la charge microbienne dans le sol à proximité des films de PHBV enfouies a été effectuée par la technique de dénombrement sur milieu gélosé.

) Préparation de la solution mère et les dilutions

Pour cela des échantillons de sol qui couvre les films ont été prélevés et utilisés pour la préparation des solutions mères et les dilutions.

- 10 g de sol sont introduite dans 90 ml d'eau distillé stérile, le mélange soumis sous agitation puis laissé décanter; c'est la solution mère et on parle de la dilution 1/10.

- Pour la réalisation des autres dilutions ; 6 tubes à essai avec 9ml d'eau distillé stérile ont été préparés. A partir de la solution mère, 1ml de surnageant a été prélevé et, transférer dans le tube 01 contenant déjà 9ml d'eau distillé, c'est la suspension dilution 10^{-2} ; transférer dans le tube 02 c'est la suspension dilution 10^{-3} agiter bien et recommencer l'opération pour le reste des tubes en transférant 1ml de solution d'un tube à l'autre, afin de préparer les suspensions dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (Guiraud, 1998).

) Numération sur milieu gélosé

Les microorganismes à dénombrer présentes dans l'inoculum sont introduites à la surface d'un milieu gélosé (Gélose nutritive (GN), Trypticase Soja Agar (TSA)). Chaque microorganisme isolé donne naissance à une colonie ou UFC pour « unité formant colonie ».

Les tubes ont été bien Homogénéisés, 0.1ml de chaque dilution ont été prélevés à l'aide d'une micropipette puis étalé avec un râteau sur la surface d'un milieu gélosé. Incubées toutes les boîtes à 30°C pendant 48h.

Compter le nombre de colonies développées par boîte et déterminer pour chaque dilution la moyenne dans l'intervalle [30-300] UFC. (Guiraud, 1998)

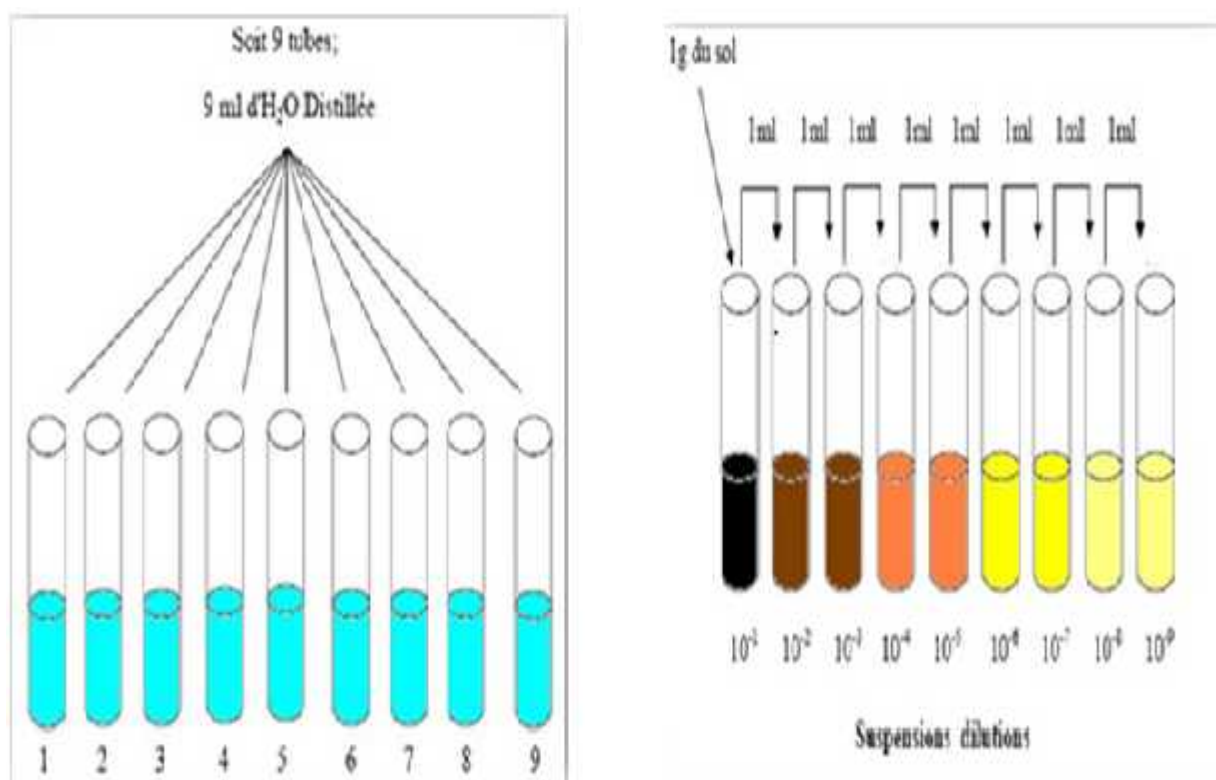


Figure N° 05 : Préparations des suspensions dilutions du sol

L'étude de la corrélation entre la charge microbienne et le taux de biodégradation a été effectuée à l'aide de logiciel statistica .

5.3. Isolement de certaines souches qui dégradent le PHBV

5.3.1. Isolement et purification des souches

Afin d'étudier la capacité de certaines souches d'utiliser le PHBV comme seule source de carbone ; six colonies ont été sélectionnées à partir des cultures microbiennes obtenues des échantillons de sol utilisés pour la quantification de la charge microbienne décrite précédemment.

Les 06 isolats choisis sont purifiés par la technique classique de repiquage-étalement sur Gélose nutritive, laissés incuber à 30°C pendant 48h. Afin de conserver ces souches jusqu'à leur utilisation un ensemencement sur gélose inclinée a été effectué. Une étude de l'aspect macroscopique de colonie et microscopique des cellules par la coloration de Gram a été réalisé.

5.3.2. Dégradation de PHBV par les souches sélectionnées

Pour savoir si les 6 isolats sélectionnés sont capables de métaboliser le PHBV, il suffit de les cultiver dans un milieu de culture dans lequel le polymère en question est ajouté comme seule source de carbone (Jbilou, 2011).

) Composition du milieu synthétique utilisé pour l'étude de la biodégradation selon Ghadhban et Jadouh , 2014) Pour 1L est la suivante :

MgSO₄.7H₂O (0.5g), PHBV (0.15g), KH₂PO₄ (4.54g), CaCl₂.2H₂O (0.005g), NH₄Cl (1g), Na₂HPO₄. 12H₂O (4.1g), Agar (20g).

) Mise en culture

Les souches ont été revivifiées dans le bouillon nutritif, incubées pendant 24h à 30°C, puis étalées à l'aide d'un écouvillon sur toute la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu synthétique, les isolats ont été incubés à 30°C pendant 48h à 5 jours jusqu'à l'apparition des colonies sur la surface de la gélose, des boîtes témoins sans cultures microbiennes ont été aussi réalisées.

1. Biodégradation des PHBV dans le sol

Un matériau est dit biodégradable si sous l'action d'organismes vivants, il peut se décomposer en éléments divers dépourvus d'effets dommageables sur le milieu naturel. Journal Officiel du 12 avril 2009. La méthode d'enfouissement dans le sol a été utilisée dans ce travail pour étudier la biodégradation du PHBV.

Des films de ce polymère ont été préparés par la technique conventionnelle de Moulage par dissolution dans le chloroforme.

Au totale ; 12 films ont été préparé et enfouies dans la zone d'étude (le Sol)

1.1 Evaluation de la biodégradation par mesure de la perte de poids

Le pourcentage de biodégradation des films de PHBV par mesure de perte de poids en fonction du temps est représenté dans la figure N° 6.

D'après les résultats obtenue on remarque que les premières semaines d'enfouissement aucune perte de masse n'a été enregistrer, au-delà de 44 jours, une perte de masse considérable a été constatée avec un pourcentage de biodégradation de 80%, puis au fil du temps le pourcentage de biodégradation commence à augmenter, il atteint 94% après 90 jours d'enfouissement.

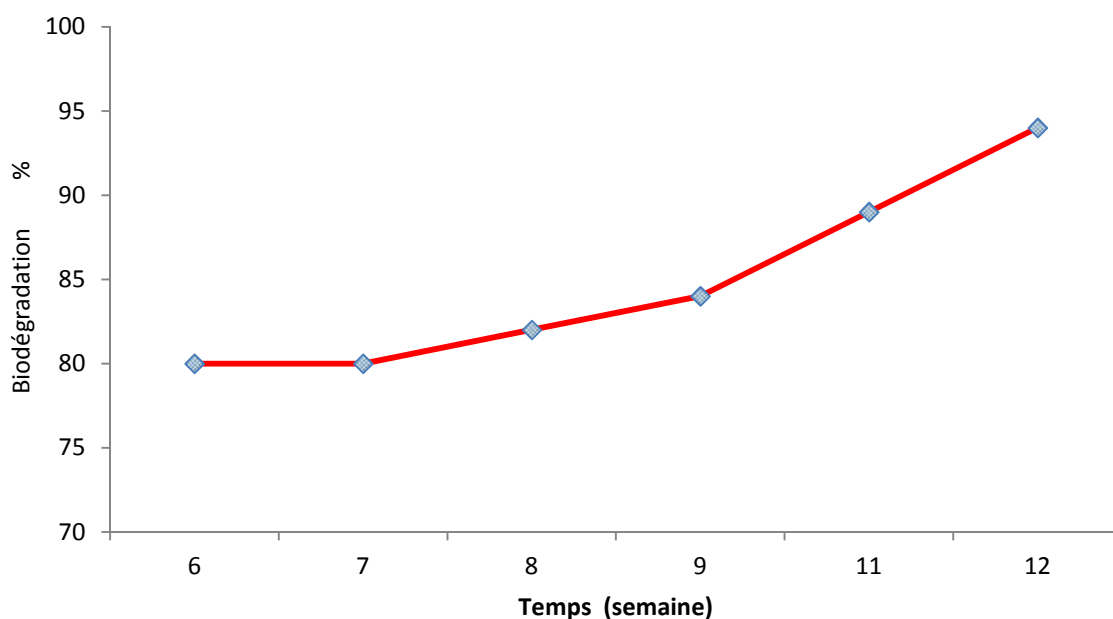


Figure 06 : Pourcentage de biodégradation des PHBV.

1.2. Observation visuelle des films de PHBV après le test de biodégradation

L'observation des films toute la durée de l'enfouissement (Tableau N° 2) pendant 90 jours montre que les films restent intacts au cours des premières semaines. Par contre, après la 5^{ème} semaine des érosions considérables ont été remarqué sur la totalité des films ; une modification de l'épaisseur a été aussi constatée. Les parties lisses qui ne sont pas dégradées correspondent probablement à des régions cristallines. Après 74 jours, il est devenu difficile de récupérer le matériau du sol, car il s'est dégradé en partie fine. La dégradation des polymères par les microorganismes s'effectue de manière sélective en attaquant en premier lieu les parties amorphes avant les parties cristallines. Cette sélectivité peut être justifiée par le fait que les régions amorphes sont moins ordonnées et moins denses ce qui facilite par conséquent l'accès des enzymes aux chaînes des polymères (Jbilou, 2011).

1.3. Evaluation de la charge microbienne

Le nombre de micro-organismes dans le sol du site enfoui a été exprimé en log₁₀ UFC / ml (Figure N° 7). La population microbienne a augmenté avec le temps d'incubation qui a conduit à l'augmentation de la dégradation du polymère.

Les premières semaines la charge microbienne était entre 5.10^6 et $8.5.10^6$ UFC/ml puis une évolution significative a été remarquée les derniers jours de l'enfouissement (3.10^{10} UFC/ml).

Les microorganismes du sol entraînant un changement dans la structure et la masse molaire du polymère par une activité enzymatique afin de l'utiliser comme une source de carbone et un nutriment en plus dans le Sol, donc il enrichi le milieu et favorise la croissance microbienne dont l'explication de l'augmentation de la biodégradation.

Généralement il y'a deux phases de biodégradation du polymère: dans un premier temps, les PHBV pourraient être dépolymérisés et leurs chaînes de polymère brisées sous l'impact d'enzymes dépolymérisantes des micro-organismes dégradant les PHAs. Dans la deuxième phase, des produits de biodégradation des polymères (tétra-, di- et monomères d'hydroxyacides) pourraient être utilisés, ce qui aboutit à une perte de masse des films. (Volova *et al.*, 2010).

Ces résultats sont compatibles aux résultats rapportés par (Altaee *et al*, 2016). Ils ont obtenus les même résultats à travers une étude de plusieurs formulations de PHB enfouis dans le sol ; un changement visuelle et une diminution de poids des différents films a été remarqué, La population microbienne a augmenté avec le temps d'enfouissement qui a conduit à une augmentation de la dégradation du polymère, Il s'agit d'une activité enzymatique bactérienne dans lequel les microbes du sol peuvent excréter des enzymes dépolymérase qui peut hydrolyser les polymères de PHB. Il a été noté qu'il y avait une corrélation entre la perte de poids et les changements physiques de la morphologie de la surface des films, Cette corrélation augmente semaine après semaine.

Donc la présence de micro-organismes/enzymes spécifiques dans le milieu de dégradation va accroître le processus de dégradation, Les micro-organismes suivant le cas, donneront lieu à une dégradation aérobie ou anaérobie. (Sambha, 2011).

La figure 08 montre que la biodégradation et la charge bactérienne sont Corréliées positivement ($R^2 = 0.8843$) et de manière significative ($P < 0.05$) logiciel statistica.

Tableau 02 : Films de PHBV après la biodégradation.

 <p>7 jours</p>	 <p>44jours</p>	 <p>51jours</p>
 <p>67jours</p>	 <p>74jours</p>	 <p>90jours</p>

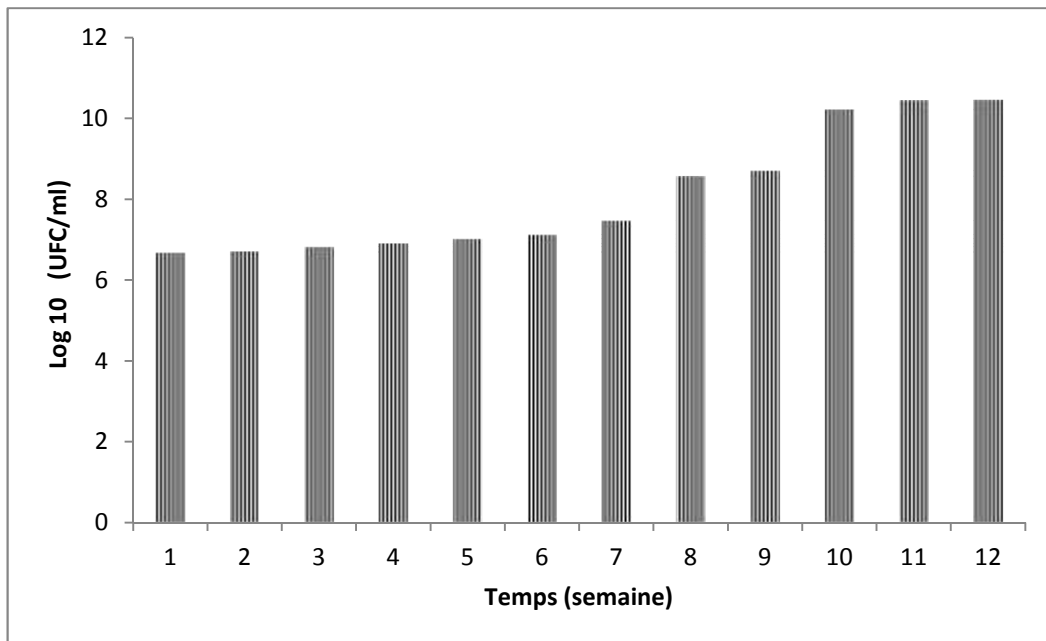


Figure 07 : Evolution de la charge microbienne dans le sol au cours de la biodégradation

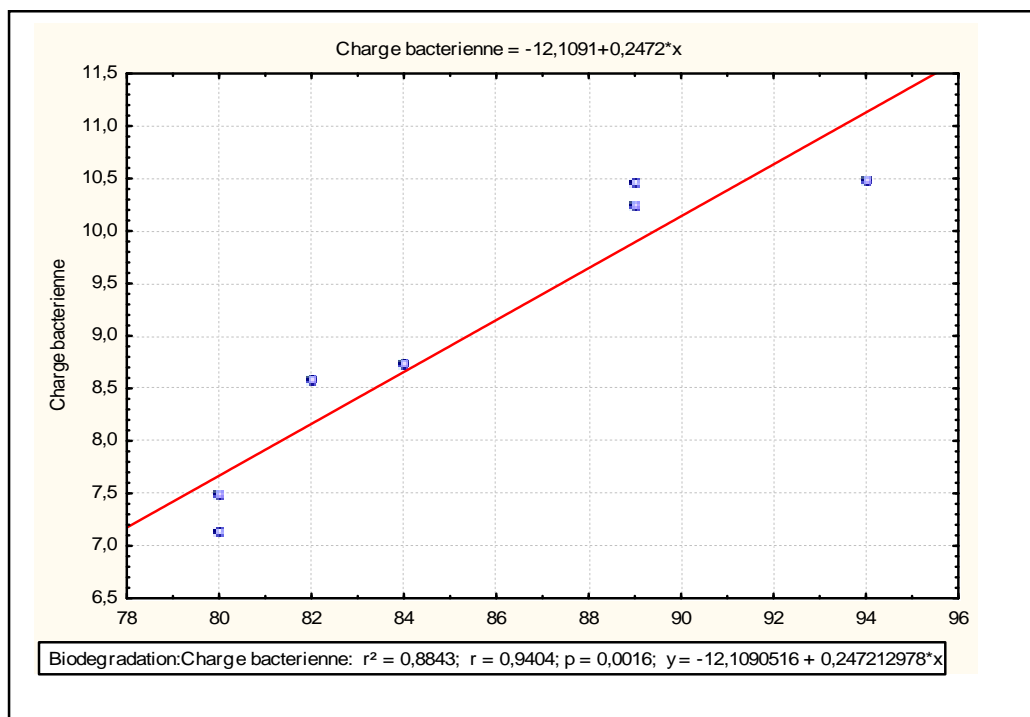


Figure 08 : Courbe de corrélation entre la charge microbienne (Log₁₀ UFC /ml) et le pourcentage de biodégradation

1.4. Influence des facteurs physico- chimiques

La biodégradation des biopolymères est influencée par un certain nombre de facteurs l'un des caractères les plus important sont les paramètres physico-chimiques du milieu de dégradation. Dans ce travail certains facteurs ont été étudié tel que la température, l'humidité et le pH.

Toute la période de l'enfouissement, il a été remarqué que la température varie entre 9 et 16°C. Le taux d'humidité ne dépasse pas 26% et le pH reste neutre pendant les 12 semaines « 6.30 - 7.50 ».

La température est un paramètre influant dans la diversité de la population de micro-organismes : une température trop basse ne permettra pas le bon développement des bactéries alors qu'une température trop élevée va sélectionner les bactéries les plus thermorésistantes (**Audrey, 2015**).

La teneur en eau du milieu doit être suffisante pour permettre une bonne croissance des microorganismes (**Sambha, 2011**). C'est aussi un vecteur pour les micro-organismes qui vont pouvoir migrer plus facilement dans le milieu de dégradation et parfois même au travers du matériau à dégrader (**Audrey, 2015**).

Le pH c'est un facteur clé pour la survie et le développement des microorganismes. Le pH optimale est proche de la neutralité, plusieurs travaux suggèrent d'utiliser un milieu à pH neutre ou faiblement basique (**Jbilou, 2011**).

Les facteurs physico-chimiques influencent la croissance microbienne, les températures basses limitent la variation des populations microbiennes isolées.

La biodégradation des matériaux dépend aussi des saisons et qu'une étude réalisée en hiver ne sera pas comparable à une autre réalisée en printemps ou en été.

En se basant sur la norme ISO 14855/1999 qui exige un pourcentage de biodégradation ultime de plus de 70% au bout de 45 jours, les matériaux à base de polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalérate sont biodégradables. (**Jbilou, 2011**).

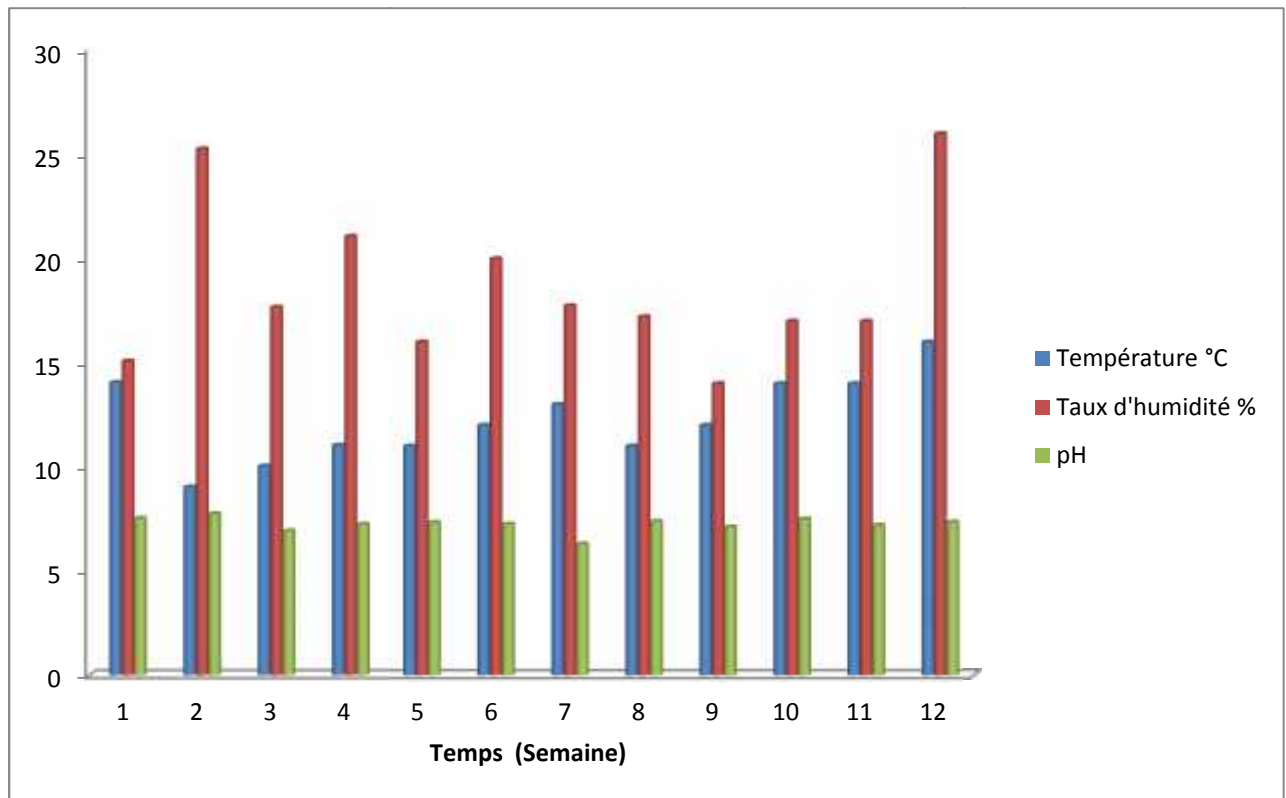


Figure 09 : Variation des paramètres physico-chimiques au cours de la biodégradation

2. Test de la biodégradation des PHBV sur un milieu gélosé

Ce sont des méthodes qui se basent sur le développement microbien pour déterminer la capacité des microorganismes (Bactéries ou Champignons) à dégrader un polymère particulier. Pour se faire, la croissance de ces microorganismes est mise en évidence en utilisant le polymère comme source de carbone. (Jbilou, 2011).

L'objectif principal de cette étude est d'isoler quelques souches à partir du site d'enfouissement à proximité des films et de tester leur capacité de développement dans un milieu synthétique avec seulement le PHBV comme substrat carboné.

Pour connaître la microflore contenue dans l'extrait de sol lors de la biodégradation six colonies ont été sélectionnées aléatoirement à partir du sol étudié, pour cela un repiquage sur gélose nutritive a été réalisé, après incubation pendant 48h, toutes les souches ont subi un examen macroscopique des colonies (couleur, forme, taille) et un examen microscopique après une coloration de Gram.

D'après ces deux examens les résultats suivants ont été obtenus :

-) La souche 01 : Petit bacille Gram positif sporulé, mode de regroupement isolé avec des colonies de grande taille irrégulière de couleur beige.
-) La souche 02 : Grand bacille Gram positif sporulé, en chaînette avec des colonies moyennes, circulaires, lisses de couleur beige.
-) La souche 03 : Petit bacille Gram positif en amas, présence de spores avec des colonies punctiformes de couleur beige.
-) La souche 04 : Colonie filamenteuse, l'aspect microscopique du mycélium est caractérisé surtout par la présence des macroconidies.
-) La souche 05 : Petit bacille isolé Gram négatif, les colonies sont de petite taille de couleur jaune.
-) La souche 06 : Petit bacille isolé Gram négatif, avec des colonies de petite taille de couleur orange.

D'après les caractères culturels et l'aspect microscopique on peut attribuer les probabilités d'identification préliminaires suivantes : les souches 1, 2 et 3 appartiennent au genre *Bacillus* (bacille, G+, présence de spores). La souche 4 c'est *Fusarium redolens*.

Par contre les souches 5 et 6 sont caractérisées par la présence des pigments dans le milieu et Gram négatif qui nous permet de suggérer le genre *Pseudomonas*.

La culture de ces microorganismes sur le milieu synthétique (5.3.2) en présence du PHBV montre un développement sous forme de colonies séparées sur la surface de la gélose.

Cela explique que ces souches testées peuvent produire des enzymes pour dégrader le PHBV. Le polymère a été utilisé par ces microorganismes comme nutriment, et une comme seule source de carbone dans le milieu synthétique. Cette méthode a été utilisée par plusieurs auteurs (**Volova et al, 2010 ; Ghadban et Jadouh, 2014**).

Ghadban et Jadouh ont testés la biodégradation des PHB dans les boîtes de Petri par les bactéries (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteraerogenes*, *Bacillus cereus*) qui étaient toutes capable de consommer le PHB comme source de carbone par la sécrétion d'une enzyme PHB-dépolymérase .



Figure 10 : Croissance dans le milieu synthétique

Les polyhydroxyalcanoates (PHA), apparaissent comme des candidats prometteurs pour offrir une alternative aux polymères issus de la pétrochimie. Les PHA sont des biopolymères issus de ressources renouvelables, produits par une grande variété de bactéries qui le stockent comme réserve énergétique intracellulaire. Les PHA peuvent être totalement dégradés par des microbes.

Le procédé de biodégradation est souvent utilisé pour le traitement des déchets naturels et présente une importance majeure pour réduire et éliminer le problème de pollution atmosphérique. Un produit ne se biodégrade que s'il est en contact avec un environnement favorable en microorganisme.

Dans cette étude la biodégradation du Polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalérate ; un copolymère de la famille des PHAs, consiste à un enfouissement des films de PHBV dans le sol fertile pendant 90 jours. En parallèle, un dénombrement de la charge microbienne, mesure de la perte de poids des films PHBV avec un suivi des facteurs physico-chimiques du milieu ont été aussi exploités.

Les résultats obtenus montrent que la biodégradation des PHBV atteint un pourcentage de 94% après 3 mois d'enfouissement, la biodégradation dépend de plusieurs facteurs y compris la température, qui influence surtout la variation de la charge microbienne.

L'évaluation de la capacité de certaines souches à utiliser le copolymère comme source de carbone isolé à partir du sol enfouit de films de PHBV a montré l'application des espèces du genre (*Pseudomonas*, *Bacillus* et *Fusarium*) dans la biodégradation.

- 1. Altaee N, El-Hiti G.A, Fahdil A, Sudesh K and Yousif E. (2016)** Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *Springer Plus* 5:762

- 2. Audrey R. (2015).** Evolution moléculaires au cours de la dégradation biotique et abiotique de polymères bio-sourcés (PLA et PBS) et fossiles à l'aide de la viscoélasticité à l'état fondu. Thèse doct. Univ Blaise pascal U.F.R Sciences et Technologies.

- 3. Baize D. (1988)** .Guide des analyses courant en pédologie. Paris :INRA 163p.

- 4. Bent MA, Mint SB. (2008).**Manuel de travaux pratiques de microbiologie .Univ de Nouakchott.

- 5. Betancourt AO. (2008).** Analyse, extraction et récupération de poly-3-hydroxybutyrate présent dans la biomasse. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie, Univ du Québec Montréal.

- 6. Ghadban AKA et Jadouh SNA. (2014).** Effet des conditions environnementales sur les membranes de polyhydroxybutyrates produites par *Bacillus cereus*. Univ de Bassorah

- 7. Gerard T. (2013).** Elaboration et caractérisation de matériaux multiphasiques à base de polylactide (PLA) et de polyhydroxyalcanoates (PHA). Thèse doct. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris,

- 8. Gelin L. (2013).** Plastiques biosourcés : étude de leur performance environnementale comparativement aux plastiques pétrochimiques. Thèse de Maitrise environnementale. Univ Sherbrooke. Québec

- 9. Guiraud JP. (1998)** .Microbiologie alimentaire. Ed DUNOD Paris. 652p

- 10. Jbilou F. (2011).** Elaboration de matériaux à base de farine de maïs : évaluation et compréhension des relations entre structure et cinétique de biodégradation. Thèse Doctorat .Université Claude Bernard - Lyon I

- 11. Lefaux S. (2005).** Biodégradation de films polymères a usage agricole : Caractérisation physico-chimique des résidus et identification biomoléculaire des bactéries actives. Thèse Doctorat. Univ du Maine -U.F.R. Sciences et Techniques.

- 12. Lapointe R. (2012).** Bioplastiques Biodégradables, compostables et biosourcés pour les emballages alimentaires, distinctions, subtiles mais significatives, centre universitaire de formation en environnement. Univ de Sherbrooke

- 13. Rivero P C, et Raquet H G. (2017).** Polyhydroxyalcanoates : une alternative 'bio' aux plastiques traditionnels. 99-112 Univ de Toulouse, France.

- 14. Saadi Z. (2008).** Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous-produits de dégradation- Etude de l'écotoxicité de ces polymères. Thèse Doct. Univ Maine.

- 15. Song Y. (2007).** Production de polyhydroxyalkanoate (PHA) en utilisant les eaux usées comme source de carbone et les boues activées comme source de micro-organismes. Thèse Doct, Université Québec, Institut national de la recherche scientifique.

- 16. Sambha L. (2011).** Contribution a l'étude de la structure et de la texture du PLA .effet de la dégradation hydrothermale .Thèse doctorat en chimie des matériaux .Univ de Haute alsace.

- 17. Volova T.G, Boyandin A.N. , Vasiliev A.D, Karpov V.A. d, Prudnikova S.V, Mishukova O.V , Boyarskikh U.A, Filipenko M.L, Rudnev V.P, Bùi Bá Xuân , V Vi t D-ung , Gitelson I.I. (2010).** Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. Scincedirect 1-10.

- 18. Wertz J L. (2016).** Polymères biobasés : amidon, PLA, PHA, PE et PET. VALBIOM.

Annexe 01

Coloration de Gram

La coloration de Gram, c'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que chez les bactéries Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Technique

1. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme
2. Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
3. Jeter le colorant et finir de le chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min
4. Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
5. Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min. Laver abondamment.
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen (**Bent et Mint, 2008**)

Annexe 02

1. Composition de gélose nutritive(GN)

La gélose servant de milieux de culture est composée de :

Peptone.....	15g/l
Extrait de viande.....	10g/l
Extrait de levure.....	02g/l
Chlorure de sodium.....	05g/l
Agar.....	20g/l
Eau distillée.....	1000ml

pH=7.8-7.4

2. Composition de bouillon nutritif (BN)

Extrait de viande sec.....	10g/l
Bacto-peptone	02g/l
Chlorure de sodium	05g/l
Eau distillée.....	1000ml

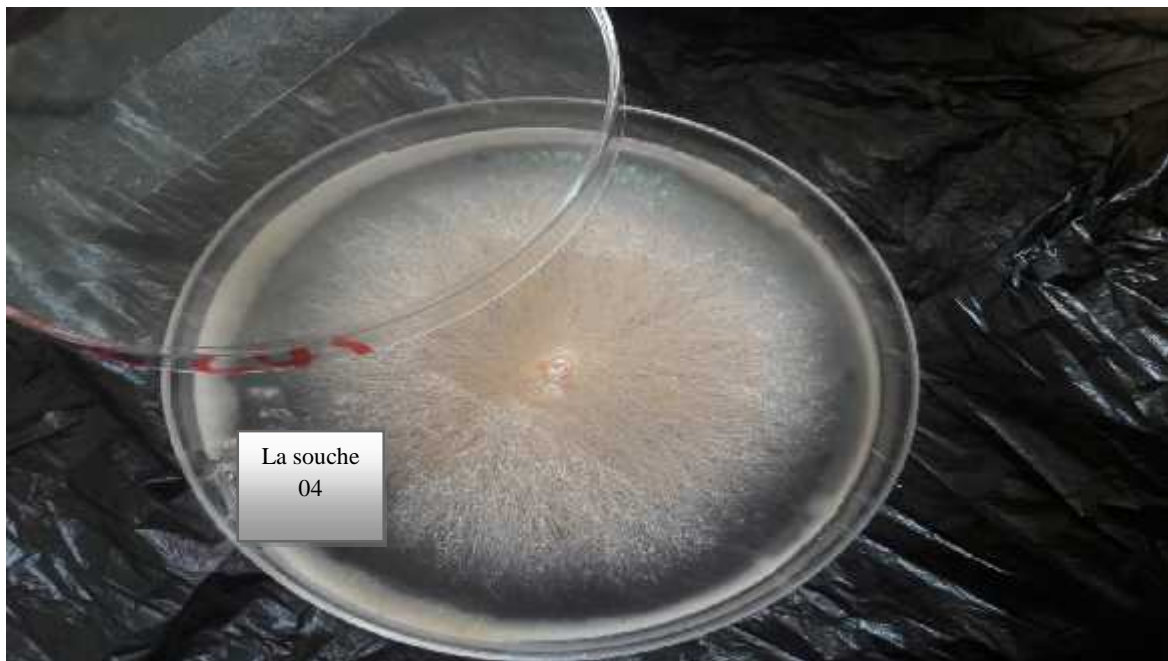
PH=7.8-7.4

3. Compostion de Trypticase Soja Agar (TSA)

Peptone de caséine	15,0 g/l
Peptone papainique de soja :	5,0 g/l
Chlorure de sodium	5,0 g/l
Agar.....	15g/l
Eau.....	1000 ml

pH final = 7,3

Annexe 03



Culture sur PDA de *Fusarium redolens*



Observation microscopique de la souche *Fusarium redolens*

Annexe 04



Culture sur des six souches isolées du sol

Résumé

L'étude de la biodégradation du Polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalérate dans notre travail consiste à un enfouissement des films de PHBV dans le sol pendant 90 jours avec un suivi des facteurs physico-chimiques et variation de la charge microbienne dans la même zone.

Les résultats obtenus montrent que la biodégradation des PHBV *in situ* commence après 35 jours, un pourcentage de biodégradation de 94% a été obtenu après 90 jours. L'étude *in-vitro* de la capacité de 6 souches isolées à proximité des films d'utiliser le PHBV comme substrat carboné a été confirmé par le développement de ces isolats sur milieu synthétique en présence du polymère. D'après une identification préliminaire ; il s'agit des souches qui appartiennent au genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et une espèce de moisissure (*Fusarium redolens*).

Les mots clés : Polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalérate (PHBV), biodégradation, polymère, sol

Abstract

The biodegradation study of the polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalerate in our work consists to buried PHBV films in the soil for 90 days with a follow-up of the physicochemical factors and variation of the microbial population in the same zone.

The results obtained show that the biodegradation of PHBV in soil begin after 35 days; 94% of biodegradation was obtained after 90 days. *In-vitro* study of the ability to use PHBV as a carbon substrate by 6 strains isolated near the films was confirmed by the development of these isolates on synthetic medium in the presence of the polymer. Based on a preliminary identification; these strains belong to the genus *Bacillus*, *Pseudomonas* and a fungi specie (*Fusarium redolens*).

Key words: Polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalerate (PHBV), biodegradation, polymer, soil.