

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire
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 : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie.

Spécialité : Biotechnologie Microbienne.

Présenté par :

Mme BENASLA Amel

M^r BOUZAR Kadda

M^r MEFLAH Kadda

Thème

**Étude in-vitro de la biodégradation des biopolymères de type
Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)**

Soutenu publiquement le 28/06/2019

Jury:

Président: AIT ABDERRAHIM. L

Encadreur: MEDJEBER. N

Examineur1: YEZLI. W

Grade

MCB

MCB

MCB

Année universitaire : 2018 /2019

Remerciement



En premier lieu, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné la force, la volonte et de nous avoir guidé sur le bon chemin.

Nos vifs remerciements pour Mme MEDJEBER Nacira d'avoir accepté de diriger ce modeste travail et pour sa patience ; présence et ses précieux conseils et ainsi sa gentillesse et son soutien

Nous tenons également à présenter nos vifs remerciements à Mme AIT Abderrahim. Leila et à Monsieur YEZLI Wassim d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ainsi,

Un grand merci pour Mr. SASSI Mohamed le chef de la spécialité biotechnologie microbienne Nous lui adressons tous nos respects pour sa disponibilité et sa gentillesse, et tout l'ensemble des enseignants qui ont participés à notre formation de Master.

Nos remerciements vont aussi aux étudiants de notre spécialité de biotechnologie microbienne, pour leur soutien et leurs complicités.

Nous tenons aussi à adresser un grand remerciement à Mr BENALLOU Bouabdellah, directeur de l'institut vétérinaire, de nous avoir permis d'effectuer ce travail au sein de laboratoire de l'institut vétérinaire.

Un grand merci pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour réaliser ce travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux

Êtres les plus chers dans ce monde

Mes très chères parents, qui m'ont toujours soutenus et encouragés et sacrifier pour moi pour tous leurs soutiens qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude de leur amour pour je réussie dans mes études et la vie je ne le remercierai jamais assez que Dieu les bénisse.

Mon chère mari qui été toujours là pour moi et mes chères enfants ; Foucef, Rayen et Anes, que dieu les protègent et les guident dans leurs vie.

Mes chères frères Amine, Rachid, Olies.

Ma chère sœur Hadjira.

Mes belles sœurs, et tous mes Neaux, et mes nièces.

A La mémoire des mes grands parant et mon cousin Aymen qu'ils reposent en paix.

Tous mes collègues de promotion.

B. Amel

Dédicaces

Je dédie ce travail modeste, a

Mes chers parents, d'avoir été la toujours pour moi et que nulle dédicace n'exprime ma gratitude et mes sincères sentiments, pour leur aide et leur sacrifice je témoigne mon profond amour et respect

Mes chers frères et sœurs, Cherifa, Mokhtaria, Fatima et Walid, pour leur soutien inconditionnelle et leur encouragement contenu

Mes trois nièces et mon neveu

Ma chère femme et mes chères enfants, Sarah, Malek et le petit dernier Mohammed Yousef, d'avoir été la joie de leur papa, que dieu les protègent et les guident dans leurs vie

Mes ami(e)s, a qui je souhaite une longue vie pleine de succès, et sur tous pour mes camarade d'étude avec qui j'ai partagé cette aventure, je souhaite bonheur et réussite

«قُلْ رَبِّ اشْرَحْ لِي صَدْرِي وَيَسِّرْ لِي أَمْرِي وَاخْلُكْ مِنْ لِسَانِي
يَفْقَهُوا قَوْلِي»

M Kadda

Dédicaces

Avec toute mon affection, je dédie ce modeste travail à :

Mon très cher père et ma très chère mère pour leurs sacrifices et leur affection. Je leur serai éternellement reconnaissant.

Mes très chères frères et sœurs.

Mes collègues de travail en particulier Tayeb, Noria, Malika, Fayçal.

Tous mes amis(es).

Mes camarades de la promotion, surtout Mme Benasla Amel, Mevlah Zadda, ainsi que tous ceux qui me connaissent.

Enfin à tous ceux que j'aime et tous ceux qui ont une place particulière dans mon cœur.

B. Zadda

SOMMAIRE

REMERCIEMENT

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

PARTIE EXPERIMENTAL

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

1. Objectif de travail	5
2. Durée et lieu de travail	5
3. Matériels et produits.....	5
3.1. Les polymères	6
3.1.1. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBV.....	6
3.1.2. Polychlorure de vinyle (PVC)	7
3.2. Les micro-organismes	7
3.2.1. <i>Fusarium redolens</i>	8
3.2.2. <i>Trichoderma harzianum</i>	8
3.2.3. <i>Bacillus megaterium</i>	8
3.2.4. <i>Bacillus subtilis</i>	8
3.2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
4. Protocole expérimental	10
5. Méthodes	11
5.1. Préparation des films de polymères	11
5.1.1. Préparation des films de PHBV	11
5.1.2. Préparation des films de PVC	11
5.2. Analyse RMN des polymères.....	11
5.3. Identification des microorganismes	12
5.3.1. Examen microscopique	13
5.3.2. Recherche de la catalase.....	13
5.3.3. Test d'oxydase	13
5.4. Préparation des milieux de culture	14
5.5. Préparation de la suspension fongique	14

5.6. Préparation de la suspension bactérienne.....	15
5.7. Étude de la biodégradation des polymères.....	15
5.7.1. Pour les champignons.....	15
5.7.2. Pour les bactéries.....	16
5.8. Etude de l'effet fongicide et bactéricide.....	16

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des souches microbiennes.....	18
1.1. Souches fongiques.....	18
1.1.1. <i>Fusarium redolens</i>	18
1.1.2. <i>Trichoderma harzianum</i>	18
1.2. Souches bactérienne.....	19
1.2.1. <i>Bacillus megaterium</i>	19
1.2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2. Caractérisation de la structure chimique des polymères par RMN.....	20
2.1. Spectres du PHBV.....	20
2.2. Spectre du PVC.....	23
3. Biodégradation.....	24
3.1. PVC.....	25
3.2. PHBV.....	25
3.2.1. <i>Bacillus megaterium</i>	26
3.2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	26
3.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.2.4. <i>Fusarium redolens et trichoderma harzianum</i>	27
2.4. Etude des effets fongicide et bactéricide des polymères.....	31

CONCLUSION

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

CVM : Chlorure de vinyle.

DMSO : diméthylsulfoxyde

FeCl₃: chlorure de fer.

HCL : acide chlorhydrique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂S : sulfure d'hydrogène

KH₂PO₄: phosphate de potassium.

K₂HPO₄ : hydrogénophosphate de potassium.

MgSO₄ 7H₂O: magnésium sulfate heptahydrate.

Na Cl : chlorure de sodium.

NH₄NO₃: nitrate d'ammonium.

PHA : polyhydroxyalcanoates.

PHB : poly (hydroxybutyrate).

PHBV: Poly (3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate)

PHV : poly (hydroxyvalérate).

PVC : Polychlorure de vinyle

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

RMN 1H : RMN proton

RMN13C : RMN carbone 13

THF : Tétrahydrofurane.

TMS : tetraméthylsilane

UV : Ultra-violet.

Liste des figures

Figure -1 : Structure chimique du PHBV	7
Figure -2 : Structure chimique du PVC.....	7
Figure -3 : Protocole expérimental.....	10
Figure -4 : RMN 400 MHz Bruker Ascend	12
Figure -5 : ensemencement de la solution fongique sous forme de goutte sur les films.....	18
Figure -6 : ensemencement de la solution bactérienne sur les films.....	19
Figure -7 : évolution de la croissance des microorganismes au cours de la biodégradation ..	19
Figure -8 : biodégradation bactériennes.....	20
Figure -9 : biodégradation fongique	20
Figure -10 : effets bactéricide	21
Figure -11 : effets fongicide.....	22
Figure -12 : spectre RMN ^{13}C du PHBV solubilisé dans le CDCl_3	22
Figure -13 : Spectre RMN ^1H du PVC solubilisé dans le DMSO déterré	23
Figure -14 : Spectre RMN ^{13}C du PVC	24
Figure -15 : Evolution de l'indice de croissance microbienne au cours de la biodégradation.	28
Figure -16 : Taux de biodégradation des films de PHBV par les espèces étudiées	28
Figure -17 : Biodégradation du PHBV et PVC par <i>Bacillus megaterium</i> après 40 jours.....	29
Figure -18 : Biodégradation des films de PHBV et PVC par <i>Bacillus subtilis</i> après 40 jours	29
Figure -19 : Biodégradation de PHBV et PVC par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après 40jours.	30
Figure -20 : Biodégradation de PHBV et PVC par <i>Trichoderma harzianum</i> après 40jours.....	30
Figure -21 : Biodégradation de PHBV et PVC par <i>Fusarium redolens</i> après 40jours	31
Figure -22 : Effets des films sur <i>Bacillus megaterium</i>	32
Figure -23 : Effets des films sur <i>Bacillus subtilis</i>	32
Figure -24 : Effets des films sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Figure -25 : Effet des films sur <i>Fusarium redolens</i>	33
Figure -26 : Effet des films sur <i>Trichoderma harzianum</i>	33

Liste des tableaux

Tableau 01 : matériels et produits utilisés	5-6
Tableau 02 : Les signaux des déplacements chimiques obtenus dans le spectre RMN ^{13}C pour le PHBV	21

INTRODUCTION GENERAL

INTRODUCTION GENERALE

Le plastique est un atout majeur pour le développement économique mondial. Dans notre vie quotidienne on utilise fréquemment les matières plastiques, ils sont utilisés dans divers secteurs car c'est un matériel polyvalent, peu coûteux et durable. On l'utilise comme moyen d'emballage des aliments, dans les vêtements, les jouets mais pas seulement, on peut le trouver aussi dans le secteur automobile, les appareils électroménagers, le matériel médical et même dans le secteur aéronautique et navale et dans mille choses encore (**Ait-Zoura et Chikbouni, 2017**). Le plastique est devenu aujourd'hui comme une matière incontournable pour la vie quotidienne et l'économie mondiale et on n' imagine pas un monde sans plastique.

L'utilisation de matières plastiques remonte à l'antiquité car avant notre ère les populations de l'Amérique du sud utilisaient la sève des arbres pour fabriquer des objets en latex, et les égyptiens employaient des colles à base de gélatine d'os (**Gontier et Jaeger, 2017**). Mais son utilisation a vraiment connu un boom économique dans la deuxième moitié du 20^{ème} siècle grâce au développement industriel, qui a permis l'apparition de diverses méthodes de fabrication ou de transformation, comme l'injection soufflage, l'extrusion, le thermoformage, etc. (**Saidi et al., 2014**). Ces techniques de fabrication ont permis la variation des produits, ainsi plusieurs secteurs économiques ont été touchés, car le plastique a remplacé peu à peu divers matériaux de constructions comme le métal, le bois, le verre et ceci à cause de plusieurs raisons, on peut citer parmi elles; l'apparition de nouveaux polymères de plastique, nouvelles techniques de fabrication, propriétés chimique et physique du plastique ainsi que leurs cout qui est plus faible par rapport à d'autres matériaux de constructions.

La consommation du plastique a été multipliée par 20 fois dans les 50 dernières années, on estime que la production mondiale de matière plastique a atteint le chiffre exorbitant de 8 milliards de tonnes produites en 60 ans, elle est passée de 2 millions en 1950 à 400 millions en 2015 (**Marine, 2017**). On estime aujourd'hui que 6% de la production mondiale du pétrole est converti en plastique, et que ce chiffre devra atteindre les 20% en 2050 (**Roland et al., 2017**).

Le plastique peut être divisé en trois grandes catégories, les thermoplastiques, Les thermodurcissables et les élastomères.

Les thermodurcissables regroupent tous les polymères qui sont remodelés par la chaleur et qui prennent leur forme finale après refroidissement, mais qui ne peuvent pas être transformés une seconde fois (**Laurent, 2013**). Cette opération est irréversible et ces produits ne sont pas recyclables. L'utilisation de la chaleur une seconde fois sur ces polymères conduit à la décomposition du produit au lieu de le ramollir de nouveau. Ce genre de polymères est le plus produit dans le monde. On peut citer comme exemples ; Polyuréthane (PUR), silicone.

INTRODUCTION GENERALE

Les élastomères sont des polymères qui ont des caractéristiques spécifiques parmi elles, une grande élasticité, étanche et un grand pouvoir amortissant. Ils se font souvent appelés caoutchouc. Ils peuvent être d'origine synthétique ou naturelle, et l'exemple le plus connu de ces polymères est le caoutchouc qui est utilisé dans la fabrication des pneumatiques.

Les thermoplastiques sont la deuxième catégorie la plus produites dans le monde après les thermodurcissables à raison de 20% de la production mondiale (**Jérémy, 2009**). Elle regroupe tous les polymères transformable par chaleur, c'est-à-dire qu'ils subissent un échauffement jusqu'à ce qu'il ramollit avant de leur donner leur forme finale qui vont conserver après refroidissement. Cette opération est réversible et peut être appliquée plusieurs fois, car ces polymères sont facilement recyclable.

Par contre la plupart ne sont pas biodégradable, par exemple une bouteille de plastique peut persister dans la nature pendant 450 ans avant d'être entièrement dégradé (**Jérémy, 2009**). Parmi ces polymères, on peut citer; polyéthylène (PE), polystyrène (PS), polyoxyméthylène (POM), polyamides (PA), PVC (polychlorure de vinyle). Ce dernier occupe une place importante dans divers secteurs industriels. C'est un produit synthétique dérivé du pétrole et du sel de mer, il peut être utilisé tel qu'il est ; rigide ou bien souple en lui ajoutant un produit plastifiant (**Cantor et al, 2011**). Le PVC est une matière recyclable qu'on peut réutiliser plusieurs fois, mais jeté dans la nature elle ne subit pas de dégradation par les microorganismes et peut persister pour plusieurs centaines d'années. Malgré l'intérêt important du plastique pour l'économie mondiale, son impact sur la nature et l'environnement est un vrai désastre qui prend de l'ampleur chaque année. Ceci est dû principalement aux énormes quantités de plastique produites, dont la majeure partie se disperse dans la nature, on estime que chaque année 13 millions de tonnes de matières plastiques se retrouvent dans les mers et les océans (**Jenna et al., 2015**). Deuxièmement la durée de vie de ces matières qui peut s'étaler sur une centaine d'années, qui est due à la composition chimique des plastiques et à l'incapacité des microorganismes à les dégrader en matières simples.

Par ailleurs de multiples solutions sont proposées, parmi elles les tris des déchets et le recyclage. Mais, le retraitement des matières plastiques synthétiques peut poser de véritables problèmes. En effet, le « recyclage » par combustion pour la production d'énergie se heurte à la nécessité du retraitement des fumées, en particulier pour les plastiques contenant des halogènes ou du soufre, et à la réduction des émissions de dioxyde de carbone issu de matières carbonées fossiles. Le recyclage pour la fabrication de nouveaux matériaux se heurte quant à lui aux problèmes du tri et du nettoyage des matières rejetées (**Bewa, 2006**).

INTRODUCTION GENERALE

Pour trouver des solutions innovantes certains chercheurs sont allés loin pour combattre le mal à sa source et ceci en mettant au point des matières plastiques biodégradables, parmi ces polymères on trouve le Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) ou PHBV.

Le PHBV est un biopolymère biodégradable non toxique, il est produit naturellement par certaines bactéries mises dans des conditions de stress, comme il peut être synthétisé chimiquement à partir de lactone substituée appropriée, c'est ce qui a été fait pour la première fois par une société britannique appelée Imperial Chemical Industries (ICI) en 1983. La biosynthèse du PHBV se fait par l'addition de deux polymères qui sont le PHB (poly (hydroxybutyrate)) et le PHV (poly (hydroxyvalérate)) relié entre eux par des liaisons esters, il fait partie de la famille des PHA (polyhydroxyalcanoates). Il représente 1% de la production mondiale du plastique.

Le PHBV présente plusieurs propriétés intéressantes pour l'industrie des matières plastiques, Ces propriétés peuvent être ajustées selon le rapport massique entre le PHB et le PHV, car chacun des deux polymères apporte une propriété donnée. En effet le PHB apporte de la rigidité à la matière tandis que le PHV apporte de la souplesse. De point de vue environnemental le PHBV présente un immense intérêt par rapport à sa biodégradation complète et dans un laps de temps très court.

Entre Octobre 1990 et Juin 1992, une confusion quant à la véritable définition de «biodégradable» conduit à des procès concernant la publicité environnementale trompeuse. Ainsi, il est devenu évident à la Société américaine pour les essais des matériaux (ASTM) et à l'organisation internationale de normalisation (ISO) que des méthodes de test communes et des protocoles pour les plastiques dégradables soient nécessaires. La biodégradation correspond à la destruction d'un produit par des agents biologiques (**Kolybaba et al, 2003**).

Comme définition pour la biodégradation on peut dire que c'est l'action qu'exercent des organismes biologiques (bactéries, champignons, algues) sur un matériau donné dans un environnement favorable à leurs développements (humidité, température, nutriments,...) pour la simplification ou la décomposition de cet élément complexe en éléments simples qui seront le dioxyde de carbone CO₂, eau, gaz. La biodégradation se divise en deux principaux stades, Un stade primaire dans la transformation des matériaux donnent naissance à des métabolites qui peuvent avoir un effet toxique supérieur au produit initial, ou un stade ultime qui conduit à l'apparition de molécule simple facilement absorbable et assimilable par d'autres organismes vivants (eau, CO₂, sels organiques...).

Ce dernier stade se déroule en deux phases; la détérioration physico-chimique et/ou bio-fragmentation qui se traduit par la dégradation du produit sous l'action de plusieurs agents comme l'action mécanique (microorganismes, insectes, vers de terre,...), action chimique (UV) et action enzymatique (enzyme extracellulaire des microorganismes), le résultat de cette phase c'est le fractionnement du matériau et l'augmentation de la surface de contact avec les microorganismes. La

INTRODUCTION GENERALE

bioassimilation c'est la seconde phase de la biodégradation qui se traduit par l'utilisation des molécules issus du matériau par les organismes vivants pour être intégrées aux cycles physiologiques (anabolisme, catabolisme). Le résultat final de cette phase est la minéralisation qui correspond à la libération du dioxyde de carbone, eau, et dans certain cas des gaz (CH_4 , H_2S) (Gu JD, 2003).

La dégradation environnementale de polymères synthétiques et/ou naturels dépend de la présence des micro-organismes susceptibles de les décomposer dans l'écosystème. C'est la raison pour laquelle les études menées sur la recherche de micro-organismes pouvant dégrader les polymères sont nombreuses. Certains micro-organismes ont pu être isolés pour leur capacité de dégradation des polymères naturels, des polymères synthétiques et des plastiques commerciaux. Ce sont des bactéries et des champignons naturellement présents dans le sol, les eaux douces ou le milieu marin (Lefaux, 2005).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, nous avons testés la biodégradation par trois bactéries et deux champignons sur deux types de plastiques : Le PVC plastique synthétique largement utilisé dans notre pays et dans la plupart des pays du monde et l'autre naturel, le PHBV prometteur pour les emballages et comme support pour certains médicaments et même pour les films plastiques agricoles.

MATERIELS
ET
METHODES

Le but de cette partie est de présenter les différents matériaux utilisés dans cette étude, le processus expérimental et les méthodes employées.

1. Objectifs du travail

L'objectif de notre travail consiste à étudier la biodégradation invitro de deux polymères, le Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ou PHBV et le Polychlorure de vinyle ou PVC par trois espèces bactériennes et deux espèces fongiques, et ainsi l'effet bactéricide et fongicide de ces deux polymères sur les microorganismes utilisés.

2. Période et lieu de travail

Ce présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de l'Institut Des Sciences Vétérinaires de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret. Cette étude a été étendu sur la période entre le 17/ 02 /2019 jusqu'au 30 / 04 /2019.

3. Matériel et produits

Le tableau suivant montre tout le matériels et produits utilisés dans ce travail.

Tableau n°1 : matériels et produits utilisés

Appareils	Autoclave Agitateur magnétique thermique Balance analytique Balance de précision (Sartorius Basic) Microscope optique (OPTIKA) Spectrophotomètre Bec bunsen Agitateur pour mélanger les solutions dans les tubes à essais. Etuve.
Verreries et autres	Becher. Boîtes de Pétri en verre et en plastique. Embouts stériles. Pipettes Pasteur. Tubes à essais. Verre de montre.

	Erlen meyers. Micropipettes. Spatule. Eprouvettes graduées Anse de platine. Papier aluminium.
Produits	Chloroforme. Tétrahydrofurane. Eau distillée stérile. PHBV. PVC. Lugol. Fushine. Ethanol. NaOH Bandelettes de PH.
Milieus de cultures	Milieu synthétique pour les champignons Milieu synthétique pour les bactéries Gélose nutritif

3.1. Polymères

3.1.1. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBV

Le PHBV est un copolymère de R(-)-3-hydroxybutyrate -3-hydroxyvalérate, il fait l'objet d'un grand intérêt de la part des chercheurs et des industriels pour plusieurs raisons dont notamment son origine naturelle, sa biodégradabilité, sa biocompatibilité et sa thermoplasticité. Ces diverses propriétés rendent ce biomatériau prometteur pour les industriels.

Le PHBV peut être produit par fermentation bactérienne de bioproduits tels que le glucose contenant de l'acide propionique ou valérique, suivie d'une étape d'extraction et de purification du polymère (Salima, 2016)

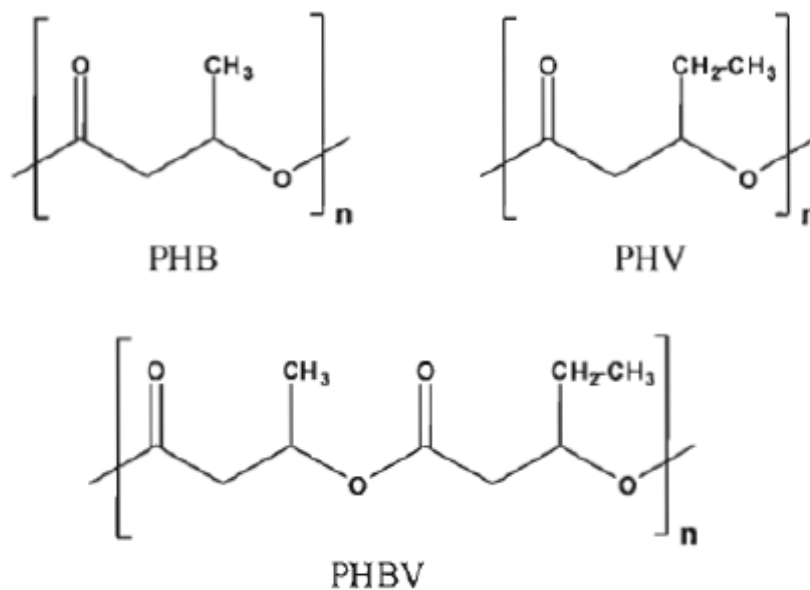


Figure 01 : Structure chimique du PHBV.

3.1.2. Polychlorure de vinyle (PVC)

Le PVC est un polymère thermoplastique d'origine synthétique, il est préparé essentiellement par l'utilisation de deux composés, 57 % de sel de mer (NaCl) et à 43 % de pétrole. La synthèse se fait par polymérisation ou bien une polyaddition de monomère de chlorure de vinyle (CVM) dans une chaîne linéaire de n éléments (Cantor *et al.*, 2011).

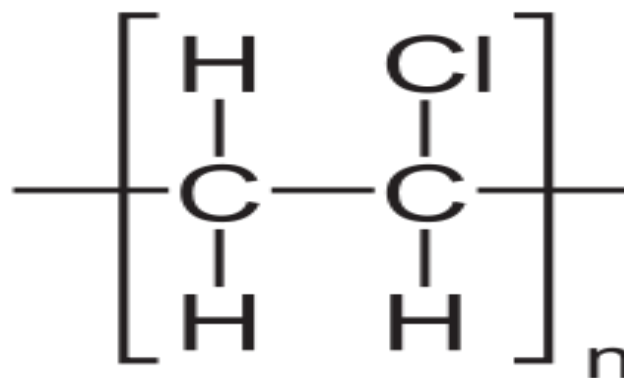


Figure 02 : Structure chimique du PVC.

Le PHBV et le PVC utilisés dans cette étude sont des polymères commerciaux fournis par le laboratoire de chimie faculté des sciences et de la technologie.

3.2. Micro-organismes utilisés

Dans notre travail cinq espèces microbiennes ont été choisies pour étudier la biodégradation du PHBV et du PVC ; dont deux espèces fongiques (*Fusarium redolens*, *Trichoderma harzianum*) fournies par le laboratoire de microbiologie appliqué de l'université d'Oran I (Ahmed Ben Bella), et trois souches bactériennes (*Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*) qui ont été données par le laboratoire de microbiologie de l'université SNV de Tiaret.

3.2.1. *Fusarium redolens*

C'est un genre de champignon filamenteux qui appartient au groupe des hyphomycètes. Ils sont la plupart du temps associés aux plantes. Ils tirent leur nom du mot latin *fusus* à cause de la forme en fuseau de ses macroconidies. Dans les colonies, le thalle des *F. redolens* donne des mycéliums de couleur blanche ou crème. (Leslie et Summerell, 2006).

3.2.2. *Trichoderma harzianum*

Ce sont des champignons filamenteux imparfaits, non pathogène et saprophyte fréquent dans des sols humides et associés aux plantes. Il appartient à l'embranchement des Deutéromycota. Les colonies sont de forme laineuses à croissance rapide, leurs couleurs varient entre le blanc, le jaune-vert et le vert. Au microscope optique on distingue des hyphes jaunes, septés et ramifiés qui composent le mycélium. (M'zahem et Mihoubi, 2017).

3.2.3. *Bacillus megaterium*

C'est l'une des bactéries les plus grosses qui se trouvent dans le sol. C'est un genre de bactérie en forme de bâtonnet, Gram positive, aérobie strict, peuvent se trouver sous forme de streptobacilles, les cellules sont jointes entre elles par des polysaccharides issus de leur paroi. *B. megaterium* est capable de produire des endospores lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables. (Patricia et al., 2007).

3.2.4. *Bacillus subtilis*

Ce sont des bactéries sous forme de bâtonnets de petites tailles par rapport à *O*-colonies de *B. subtilis* sont larges de forme irrégulière à ronde, de couleur blanche, ou crème, translucide ou opaque. Ces bactéries ont la capacité de former des spores ellipsoïdales ou cylindriques non déformantes dans le corps bactérien, sont aérobies, mais peuvent se

développer en milieu anaérobie par fermentation en présence de nitrate comme accepteur finale d'électrons (**Bouhairi, 2017**).

3.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

C'est un bacille Gram négative en forme de bâtonnet qui appartient au genre *Pseudomonas*. Ces bactéries sont mobiles grâce à des flagelles uniques dans une position monotriche (polaire). Très répandus dans le sol et dans l'eau notamment l'eau douce et l'eau saline des mers. *Pseudomonas aeruginosa* est dépourvu de spores et de capsule. C'est une bactérie aérobie stricte mais capable de survivre dans des conditions anaérobies en utilisant les nitrates. (**Darghouthi et Metheni, 2016**).

4. Protocole expérimental

Le diagramme suivant représente les différentes étapes de notre étude.

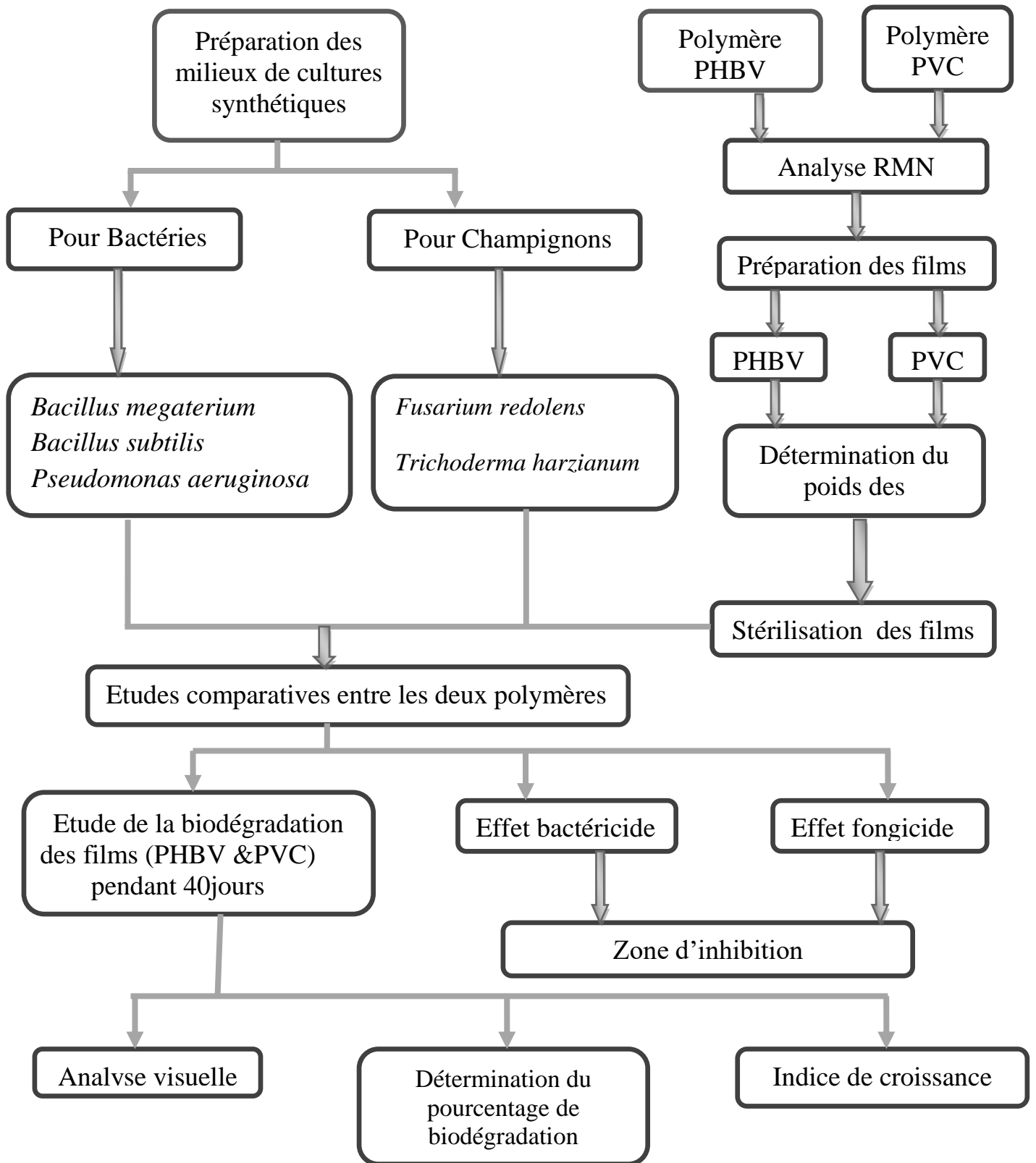


Figure 03: Protocole expérimental.

5. Méthodes

5.1. Préparation des films

5.1.1. Préparation des films de PHBV

La préparation des films de PHBV a été réalisée par la technique de dissolution dans un solvant, elle consiste à faire dissoudre les particules de PHBV dans le chloroforme. Pour cela il faut (0.3 g) de PHBV diluée dans (30ml) de chloroforme, la solution obtenue est recouverte par du papier aluminium pour minimiser l'évaporation du solvant puis homogénéisée sous agitation magnétique dans un bécher. (Altaee *et al.*, 2006). Le mélange obtenu est versé dans des boîtes de Pétri de (5.5cm) de diamètre. Ces dernières sont recouvertes de papier aluminium perforé et laissées pendant 24 heures pour permettre l'évaporation complète du chloroforme. Les films de PHBV, une fois formés, ont été rangés et mis au réfrigérateur pour les conserver et éviter toutes réactions de photo-oxydation. Avant le début de l'expérience, les poids des films ont été déterminés grâce à une balance de précision.

5.1.2. Préparation des films de PVC

Pour la préparation des films de PVC ; la même technique de dissolution dans un solvant a été adoptée. 0.3g de PVC en poudre a été dilué dans (10ml) de Tétrahydrofurane(THF). Le mélange a été mis dans un bécher recouvert de papier aluminium et soumis sous une agitation (Mariana *et al.*, 2011). Après dissolution complète du PVC, on verse le mélange dans des boîtes de Pétri de (5.5cm) de diamètres et en les laissent sécher pendant 24h pour permettre l'évaporation complète du THF. Le poids de chaque film a été aussi déterminé grâce à une balance de précision.

5.2. Analyse RMN des polymères

RMN signifie Résonance magnétique nucléaire : il s'agit d'une technique d'analyse qui permet de déterminer la structure d'une molécule organique.

Cette technique est basée sur la propriété magnétique de certains atomes (ou noyaux) dont le proton (^1H), le carbone (^{13}C) ou encore le phosphore (^{31}P). Les différentes fréquences de résonance des atomes sont consignées dans un graphique permettant de déterminer la structure de la molécule. (Maes, 2009).

Les spectres RMN des deux polymères étudiés ont été enregistrés au moyen d'un Spectrophotomètre BRUKER 400 MHz, AVANCE III HD en utilisant une sonde BBO multi noyaux à 400,13 MHz en RMN ^1H et à 100,62 en RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques

sont exprimés en parties par millions (ppm) dans l'échelle δ par rapport au singulet du tetramethylsilane (TMS) utilise comme référence interne ($\delta = 0$).

Les échantillons sont préparés par dissolution d'une masse comprise entre 1 et 10 mg d'échantillon sec dans un volume d'1 ml de solvant deutéré approprié. Les deux solvants utilisés au cours de nos analyses RMN sont le chloroforme deutéré (CDCl_3) pour l'analyse du polymère PHBV et DMSO deutéré (diméthylsulfoxyde deutéré) pour le PVC

Les analyse RMN ont été effectué dans le centre de recherche et d'analyse physico-chimiques *CRAPC (Bousmail à Tipasa)*.



Figure 04: RMN 400 MHz Bruker Ascend

5.3. Identification des microorganismes

Les microorganismes utilisés dans ce travail ont subi un certain nombre de tests de confirmation de la souche.

5.3.1. Examen microscopique

Pour s'assurer de la pureté des bactéries on a eu recours à la coloration de Gram qui sera détaillée dans l'annexe. Cette technique permet de faire la différenciation entre les bactéries Gram+ et les Gram- par rapport à la structure chimique de la paroi. On peut aussi voir la forme des bactéries (bacille, cocci ...), leurs modes de regroupement (individuelle ou regroupées sous différente forme) et ainsi présence des spores intracellulaires si il s'agit de bactéries sporulantes (**Clair, 2007**).

Pour les champignons il suffit d'appliquer la technique de drapeau pour observer la structure du mycélium et la morphologie des spores. Pour cela il faut placer un morceau de scotch sur la culture de champignon à identifier en suite le fixer sur une lame pour l'observer directement sous microscope optique, et comme on connaît déjà l'aspect des champignons utilisés on peut facilement détecter les contaminations potentiels ; ainsi on peut s'assurer de la pureté des espèces utilisées. (**Benabdallah et Boulaioun, 2013**)

5.3.2. Recherche de la catalase

L'importance de cette enzyme est d'empêcher l'accumulation d' H_2O_2 dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, catalysant la réaction suivante :



Sur une lame propre on dépose une goutte d'eau oxygénée (30 Volume) puis on écrase une parcelle de culture bactérienne. Si la bactérie possède cette enzyme, alors un dégagement gazeux sera observé (**Leyral et Vierling, 2007**).

5.3.3. Test d'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : **le N diméthyl paraphénylène diamine**.

Après oxydation, il apparaît une couleur violette intense. Pour le test un papier filtre est humecté avec quelques gouttes de réactif de l'oxydase ; un fragment de colonie est répandu

sur la partie humide du papier filtre au moyen d'une spatule en verre ou d'une boucle en platine les espèces contenant de l'oxydase donne immédiatement une réaction positive violette (Singleton et Sainsbury, 1984).

5.4. Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour étudier la biodégradation et l'effet bactéricide et fongicide des polymères sont des milieux synthétiques qui favorisent la croissance des microorganismes choisies (Milieu spécifique pour Bactéries et milieu spécifique pour champignons). La composition complète en sels minéraux de chaque milieu sera détaillée dans l'annexe n°1. Après addition des sels minéraux à un litre d'eau distillée, on doit ajouter de l'agar-agar à raison de 20g/l. Le milieu ainsi obtenu est un milieu gélosé incomplet sans source de carbone. Le mélange est porté à ébullition sous agitation. Le pH du milieu a été ajusté entre 6 et 6.5 avec une solution de NaOH 0.01 mol/l.

Les milieux incomplets sans source de carbone sont utilisés pour l'étude de la biodégradation, la croissance des microorganismes ne peut se faire qu'en présence d'une seule source de carbone qui sera les films de PHBV ou PVC.

Pour l'obtention d'un milieu de culture complet on doit ajouter une source de carbone, qui sera le glucose à une concentration de 30 g/l (Saadi, 2008). Ces milieux seront utilisés pour étudier l'effet fongicide et bactéricide des films sur les microorganismes étudié.

5.5. Préparation de la suspension fongique

Pour la préparation de la suspension fongique des cultures de champignon de 72 heures ont été utilisées. En premier lieu les cultures fongiques ont été émergées par l'eau distillée stérile, ensuite les mycéliums sont raclés de la surface du milieu de culture, le tout est déposé dans une compresse stérile, puis pressé pour obtenir une suspension de spores. Après cette étape nous sommes passés à la préparation des suspensions dilutions, qui consiste à l'ajout de 1ml de la suspension obtenue dans 9 ml d'eau distillé stérile, c'est la suspension 10^{-1} , puis nous avons prélevé 1ml de la suspension 10^{-1} qui a été versé dans 9 ml d'eau distillé, est ainsi de suite jusqu'à obtenir 6 suspensions ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$). Le principal but de cette étape est d'avoir une [suspension fongique] = 10^6 spores /ml (Saadi, 2008).

La lame de Malassez a été utilisée pour déterminer la concentration de 10^6 spores /ml. Le principe de l'utilisation de cette lame consiste à mettre en évidence la concentration cellulaire d'une suspension à un instant donné. La cellule de Malassez possède 25 rectangles composé chacun de 20 carrés. Pour l'observation au microscope optique en place une goutte

de la suspension entre la lame de Malassez et une lamelle, nous attendons 5 minutes pour la sédimentation cellulaire. En suite nous comptons le nombre de cellules dans 10 rectangles différent, et comme on sait d'avance le volume de chaque carré et chaque rectangle on peut ainsi déduire le nombre exact de cellule par la formule suivante :

$$N = \frac{n \times k}{v} . \text{ (Émilie, 2015).}$$

N : nombre de cellules par litre.

n : nombre de cellules comptées.

K : facteur de dilution.

V : volume de comptage (en ml).

5.6. Préparation de la suspension bactérienne

Des suspensions bactériennes de 10^8 cellules/ml (0,5 Mcfarland) qui correspondent à des densités optiques entre 0.08 et 0.1 ont été préparées (Piton et Fontanier, 1990).

Pour cela chaque culture bactérienne doit êtreensemencée en stries sur gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation de 24h à une température comprise entre 30 et 37°C, prélever 4 à 5 colonies bien isolées avec une lance de platine et les transférer dans un tube d'eau distillée stérile puis préparer des dilutions et mesurer la densité optique à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre ; choisir la dilution qui correspond à la concentration bactérienne désirée (Kouame, 2011).

5.7. Étude de la biodégradation des polymères

5.7.1. Pour les champignons

Pour réaliser cette étude nous avons eu recours à l'utilisation des milieux de culture incomplet (ou milieu gélosé sans source de carbone) pour savoir si les champignons étudiées (*Fusarium redolens*, *Trichoderma harzianum*) ont la capacité de dégrader les films de (PHBV, PVC) et ainsi les utilisés comme substrat carboné.

Des boîtes de Pétri remplit avec le milieu de culture incomplet ont été préparé pour chaque espèce. Des films de polymère PHBV ou PVC ont été déposés à raison d'un film par boîte avant d'ajouter les suspensions de 10^6 spores /ml. Une boîte témoin sans suspension fongique est réalisée pour chaque film.

Les films sont décontaminés avec l'éthanol et rincés successivement avec l'eau distillé stérile avant chaque utilisation.

La culture des champignons est effectuée sous forme de 6 gouttes de 10 μ l (6 points) sur les films. L'ensemble milieu de culture, le film et suspension fongique ont été incubés à 30°C pendant 40 jours. (Saadi, 2008).

Le contrôle des résultats se fait tous les sept jours ; pour voir toute modification apparu sur l'aspect visuel des cultures et des films.

5.7.2. Pour les bactéries

Pour l'étude la biodégradation des polymères par les bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *B. megaterium* et *B. subtilis*) on procède de la même manière que pour les champignons. La seule différence consiste dans la façon d'ensemencement des bactéries qui se fait par étalement d'une suspension de 10⁸ bactéries/ml sur la surface des films et des milieux de cultures. L'incubation des boîtes se fait à 30°C pendant 40 jours aussi.

5.8. Etude de l'effet fongicide et bactéricide

Pour réaliser cette étude des milieux de culture complets ont été utilisé (milieu avec source de carbone qui est le glucose), car l'objectif principal est de savoir si les films (PVC, PHBV) ont un effet toxique ou inhibiteur sur le développement et la croissance des microorganismes étudiés.

Pour chaque espèce, des suspensions microbiennes (champignon ou bactérie) ont été étalées sur la surface du milieu synthétique avec 30g/l de glucose à raison de trois boîtes de Pétri pour chaque espèce. Après une période d'incubation de 24 heures à 30°C pour les bactéries et 72 heures pour les champignons, les boîtes ont été retirées et les films sont déposés sur les cultures microbiennes comme suit : la 1^{ère} boîte un film de PHBV a été déposé, dans la 2^{ème} un film de PVC et la 3^{ème} boîte reste comme témoin avec la culture seulement. Ces boîtes sont à nouveau incubé à 30°C pendant 40 jours. Le milieu de culture est renouvelé chaque fois qu'il est nécessaire.

Un contrôle des résultats chaque semaine est obligatoire pour suivre tout changement détectable.

Toute inhibition de la croissance sur le plastique ou dans le milieu nutritif (zone d'inhibition) met en évidence l'activité fongicide ou bactéricide du plastique.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

1. Identification des souches microbiennes

Les microorganismes utilisés dans cette étude ont subi des examens macroscopique et microscopique. Tests catalase et oxydase pour les souches bactérienne ont été aussi réalisé.

1.1. Souches fongiques

1.1.1. *Fusarium redolens*

Sur milieu sabouraud cette espèce est de couleur blanche à crème avec un thalle qui donne un mycélium aérien. L'aspect microscopique de *Fusarium redolens* montre la présence de macronides fusiformes et cloisonnés de forme asexuée.

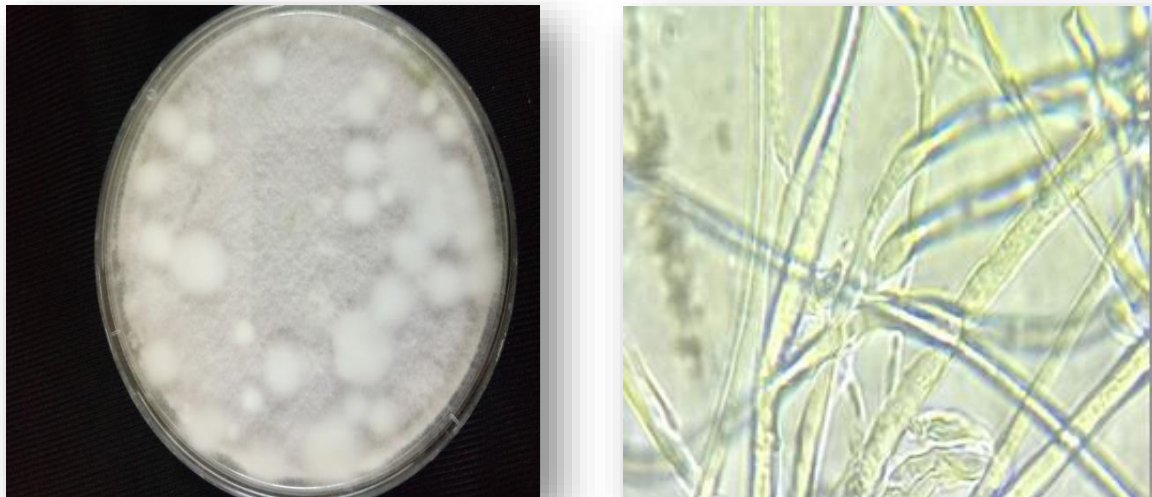


Figure 05: Aspect macroscopique et microscopique de la souche *Fusarium redolens* $\times 100$

1.1.2. *Trichoderma harzianum*

L'espèce *Trichoderma harzianum* après 72h de culture montre des colonies colorées en fonction de la pigmentation des phialides en blanc, jaune-vert et le vert comme elle présente une bonne croissance et sporulation.

L'examen microscopique montre un mycélium composé d'hyphe jaune, septés, ramifié à paroi lisse. Leur phialides porte les spores.



Figure 06 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche *Trichoderma* $\times 100$ *harzianum*.

1.2. Souches bactérienne

1.2.1. *Bacillus megaterium*

Les colonies de cette souche sur gélose nutritive sont de couleur blanchâtre ou jaunâtre, brune après une incubation prolongée avec une forme ronde et aspect lisse et brillant à contour régulier. C'est une bactérie Gram positif sporulante, catalase et oxydase positif ; elle à une forme cellulaire en bâtonnet, bout droit arrondi ; c'est une espèce ubiquitaire que l'on trouve habituellement dans le sol, mobile grâce à une ciliature peritriche ; mésophile dont la température optimal est de 30°C.

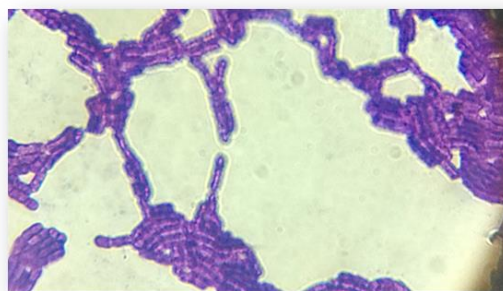


Figure 07 : Aspect microscopique après coloration de Gram de la souche *Bacillus megaterium* $\times 100$

1.2.2. *Bacillus subtilis*

Les colonies de *Bacillus subtilis* sont de forme irrégulière ; translucide de couleur blanche ou jaune avec une élévation bossue, une surface brillante et consistance gluante.

C'est une bactérie Gram positif, catalase et oxydase positif ; peut constituer d'une coque protectrice dure « endospore » lui permettant de tolérer des conditions environnementale extrême .C'est une bactérie aérobie stricte.



Figure 08 : Aspect microscopique après coloration de Gram de la souche *Bacillus Subtilis* ×100.

1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

L'aspect des colonies de *P. aeruginosa* après incubation à 37°C pendant 24h sur gélose nutritive est de couleur beige ou mate sont des petites colonies isolées, bombées à contour régulier. L'examen microscopique après coloration de Gram montre que cette bactérie est de type Gram - de forme bacillaire fine droite, mobile grâce à une ciliature monotriche polaire, dépourvue de spore et capsule, souvent isolé possède des oxydases et des catalases, peut produire des pigments, la température optimale est de 42°C.

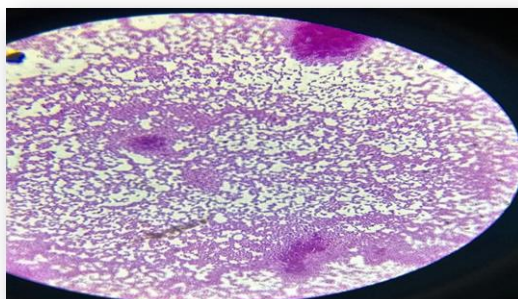


Figure 09 : Aspect microscopique après coloration de Gram de *Pseudomonas aeruginosa* ×100.

2. Caractérisation de la structure chimique des polymères par RMN

Pour analyser la structure chimique des deux polymères étudiés ; les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisés dans le chloroforme deutéré (CDCl_3) pour le PHBV et DMSO deutéré pour le PVC.

2.1. Spectres du PHBV

D'après le spectre ^1H (Figure 11) du produit pur nous remarquons 4 signaux différents qui correspondent aux hydrogènes de la structure chimique du polymère.

L'RMN ^1H a montré un doublet à 2,5 et 2,8 ppm correspondant aux groupement (-CH₂ et -CH-), le signal à 5,3 ppm coïncide au groupement (-CH-O) et un autre signal à 1,3 ppm correspond au groupe méthyle (-CH₃), par contre le déplacement chimique obtenue à 7,2 est lié au solvant résiduaire qui est le chloroforme.

Les analyses RMN ^{13}C du même polymère (figure 9) ont révélé des pics importants à 20, 40, 67 – 68 et 170 ppm, qui correspondent aux groupements méthyle (-CH₃), méthylène (-CH₂-), ester (-O-CH-) et le groupement carbonyle (-C=O).

Le tableau suivant montre les déplacements chimiques des différents signaux obtenus par RMN ^{13}C .

Tableau 02 : Les signaux des déplacements chimiques obtenus dans le spectre RMN ^{13}C pour le PHBV.

Fonction	Déplacements Chimiques
C=O(a)	170 ppm
-O-CH (b)	68 ppm
CH ₂ (c)	40 ppm
CH ₃ (d)	20 ppm

L'analyse RMN a été utilisée pour déterminer la qualité et la composition structurale du PHBV étudié dans ce travail.

Les spectres RMN obtenus indiquent la structure conforme au copolymère poly3-hydroxybutyrate- 3- hydroxyvalérate. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par Lopez *et al.*, (2011).

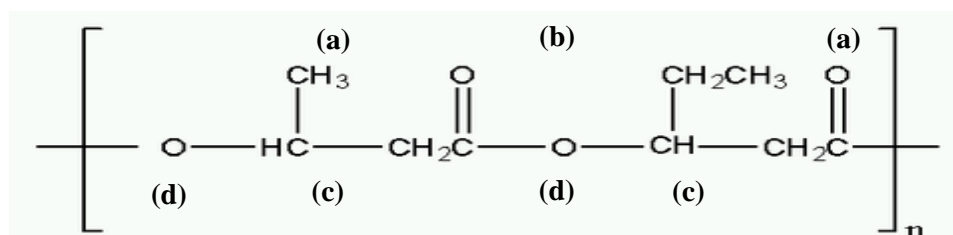


Figure N°10 : Structure chimique du PHBV et la position des signaux proton (a, b, c, d)

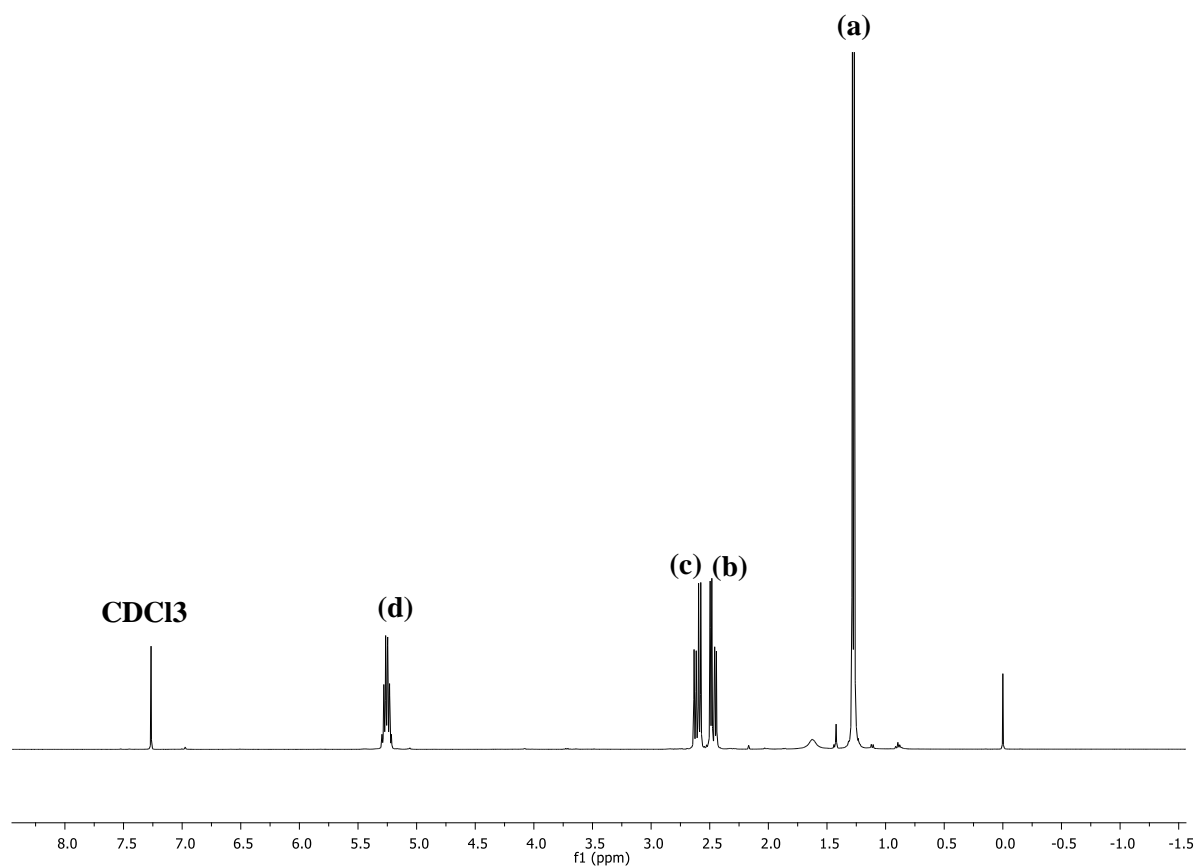


Figure N°11 : spectre RMN ^1H du PHBV solubilisé dans le CDCl_3 .

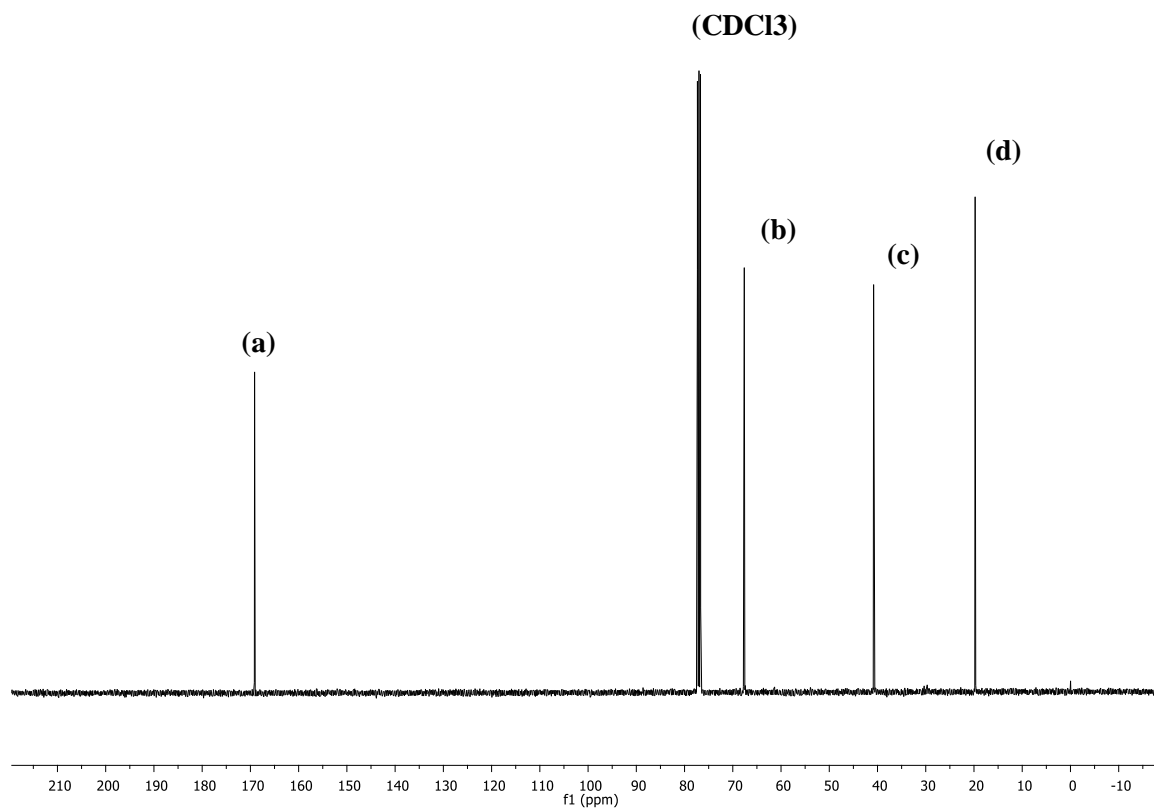


Figure N° 12: spectre RMN ^{13}C du PHBV solubilisé dans le CDCl_3 .

2.2. Spectres du PVC

Le spectre RMN ^1H du PVC (figure 13) présente un signal à 2,5 ppm correspondant aux protons méthylène (-CH₂-), et un autre signal à 3,3 ppm qui indique les protons des groupements chimique (CH-Cl).

Par rapport à la figure 14 du spectre RMN ^{13}C , les pics observés correspondant aux différents types d'atomes de carbone présents dans la structure du PVC ; ainsi il a été remarqué un pic à 40 ppm qui indique les groupements chimiques (CH-Cl) et d'autres pics entre 55–58 ppm qui correspondent aux fonctions méthylènes.

Les résultats qui ont été obtenus dans cette étude pour l'analyse RMN du PVC sont similaires à ceux obtenus par Mekki et Belbachir (2007).

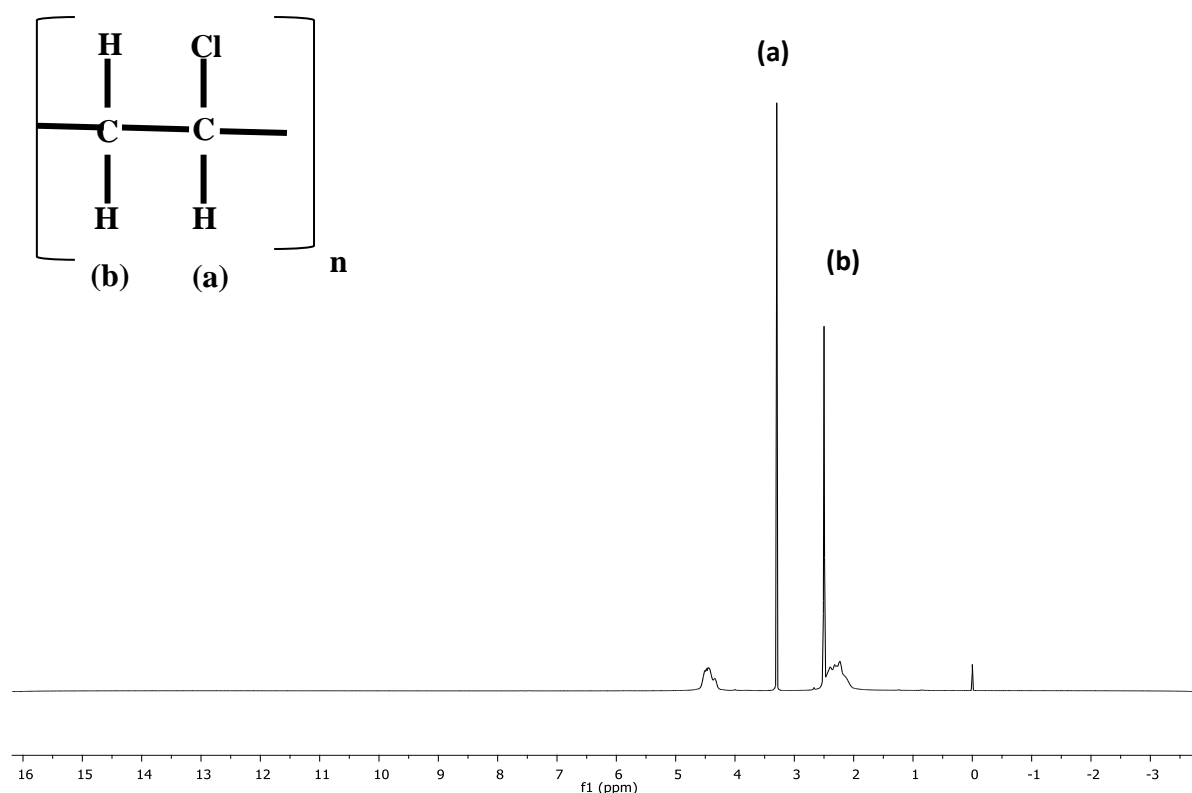


Figure N°13 : Spectre RMN ^1H du PVC solubilisé dans le DMSO deutéré.

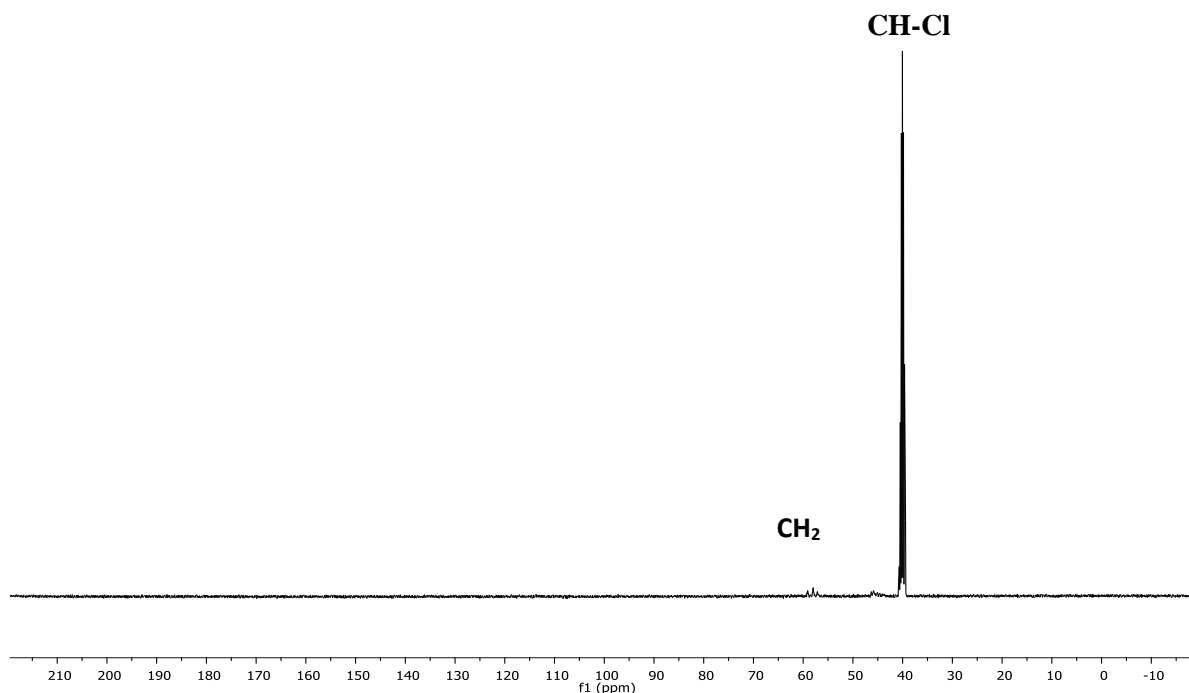


Figure N°14 : Spectre RMN ^{13}C du PVC.

3. Biodégradation

Pour tenter de résoudre le problème de la maîtrise des déchets plastiques et leur pollution, une des solutions consiste en la mise au point dans les années 1980, de plastiques dits « biodégradables ». Le polyhydroxybutyrate-valérate (PHBV) est des plus communs des bioplastiques appartenant à la famille des PHA (Yeza, 2012). Les bonnes propriétés barrières aux gaz du PHBV peuvent entre autres mener à des applications pour les emballages alimentaires (Lapointe, 2012). L'identification des micro-organismes capables de dégrader les plastiques sur les sites pollués et les effets positifs possibles résultant de cette élimination de plastiques biodégradables *in situ* sont devenues deux problématiques de recherches importantes. En effet, comme il semble possible de laisser les plastiques se dégrader dans l'environnement, les études portant sur la dégradation de polymères par les micro-organismes sont devenues essentielles dans la mise au point et la synthèse de nouveaux plastiques biodégradables (Lefaux, 2005).

Ce présent travail a été fondé sur une partie de cette thématique. Des souches bactériennes et fongiques sont mis en contact avec des films de PHBV et de PVC préparé au laboratoire par dissolution dans des solvants ; le chloroforme et Tétrahydrofurane respectivement.

L'envahissement des polymères par les microorganismes permet de mettre en évidence la sensibilité des matériaux étudiés à l'attaque microbienne. Les films plastiques soit PVC soit PHBV sont déposés à la surface d'un milieu gélosé incomplet sans source de carbone puis étalement de la suspension microbienne. L'estimation de la biodégradabilité basée sur la méthode d'envahissement fondée sur l'observation directe du matériau envahie par les microorganismes, puis estimation du taux de biodégradation par mesure des poids avant et après contact.

3.1. PVC

D'après nos résultats et comme il fallait s'y attendre et en accord avec la bibliographie consulté, nos microorganismes que ce soit les champignons ou les bactéries n'ont eu aucun effet sur le film PVC et n'ont montré aucune croissance, et c'est tous l'intérêt économique de l'utilisation de ce genre de polymère, qui peut être exposé aux éléments naturelles et résisté aux agressions extérieurs. On peut citer comme exemple les conduites d'eau souterraines qui sont fabriquées de PVC. Si se polymère a tendance à être modifier ou dégrader par des organismes vivants dans le sol, alors d'un côté c'est une perte économique de voir changer la tuyauterie chaque fois et dans un autre côté les molécules résultants de cette interaction entre le PVC et ces formes biologiques peuvent être toxique, en suite véhiculer par l'eau jusqu'aux consommateurs (**Cantor et al, 2011**).

3.2. PHBV

De nombreux types de PHA, auxquels appartient le PHBV, ont été identifiés aujourd'hui. Mais le premier d'entre eux le PHB avait été découvert dès 1926 chez la bactérie *Bacillus mégaterium*. L'on a compris que les PHA sont synthétisés et stockés dans le cytoplasme des cellules bactériennes grâce à une enzyme, la PHA synthase (**Bruzaud, 2015**).

Afin d'évaluer l'indice de croissance ; selon (**RAPA**) ; un examen visuel a été effectué conformément, les résultats sont présentés par un score compris entre 0 et 4: la note 0 indique qu'il n'ya pas de colonisation microbienne; grade 1 correspond à une colonisation microbienne qui n'est pas visible à l'œil mais visible par le microscope optique et correspond à 25% de la surface couverte par les micro-organismes. Développement moyen des micro-organismes de degré 2 également visible à l'œil nu; la surface des spécimens est couverte à raison de 50%, le grade 3 indique une large colonisation par des microorganismes; la surface des spécimens est recouverte à plus de 50% et la note 4 indique un degré de colonisation très élevé; la surface des spécimens est complètement recouverte (**RAPA, 2014**).

La figure N°15 indique les différents scores de croissance obtenus pour chaque microorganisme

3.2.1. *Bacillus megaterium*

Nos résultats montrent que c'est la bactérie *Bacillus megaterium* qui a présenté le pourcentage de biodégradation le plus élevé : 37.14% et ce en l'espace de 40 jours, avec un indice de croissance bactérien strictement croissant, qui passe d'un score de 2 à 7 jours, 3 à 12 jours et 4 après 40 jours d'incubation. Il se pourrait que cette biodégradation augmente en fonction du temps.

L'examen visuel des films de PHBV après 40 jours a montré des érosions considérables et ainsi une modification de l'épaisseur a été remarquée (Figure 17). Les parties du film qui reste intacte correspondent probablement à des régions cristallines. Selon **Djbilou, (2011)** la biodégradation des polymères par les microorganismes s'effectue de manière sélective ; les parties amorphes dont les chaînes du polymère sont moins ordonnées et moins dense sont plus accessibles par les enzymes microbiens par rapport aux parties cristallines.

En effet, L'indice de biodégradabilité établis avec la méthode de Sturm, pour une durée de 28 à 60 jours, a été de 100 % pour les polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalérate (PHBV), initialement commercialisés sous le nom de Biopol TM par Monsanto) (**Routot et Dubois, 2004**). Puisque cette bactérie (*Bacillus megaterium*) synthétise et utilise le PHBV comme source de nutriments, il est normal qu'à défaut d'utiliser sa machinerie enzymatique pour en produire et s'en servir de son propre polymère.

3.2.2. *Bacillus subtilis*

La souche *Bacillus subtilis* a donné un pourcentage de dégradation de 24.52%, elle est classé en deuxième position dans notre étude avec un indice de croissance continue, qui montre que cette bactérie également utilise continuellement le PHBV mis à sa disposition (figure 18).

Une étude menée par **Vimala et Matthew (2016)** sur la biodégradation du polyéthylène (Matière plastique obtenue par polymérisation de l'éthylène) par *Bacillus subtilis* avec adjonction de surfactant (surfactine) et traitement préalable aux ultra-violets, a montré un une dégradation de l'ordre de 9,36% en 30 jours.

3.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

La troisième bactérie testée il s'agit d'une bactérie Gram négatif *P. aeruginosa* qui est très répandu dans le sol, le pourcentage de dégradation était faible 8.71% malgré que les résultats obtenus ont montré des indices de croissance continu, cela peut signifier que cette utilisation est lente et qu'elle pourrait prendre de l'ampleur avec le temps (figure 19).

Des études entreprises avec *Pseudomonas.sp* sur les pastiques naturels ont montré des indices de biodégradation de 31% à 46% (Nanda et al., 2010; Deepika et Madhuri, 2015).

3.2.4. *Fusarium redolens* et *Trichoderma harzianum*

L'examen visuel après 40 jours des films exposées à des suspensions de spores de *Fusarium redolens* et *Trichoderma harzianum* (figure 20, 21) montre des indices de croissance faibles, ce qui peut dire qu'ils sont arrivés à leur capacité d'assimilation maximale, ou que cette biodégradation demande un temps assez long.

Les pourcentages de dégradation respectifs sont assez bas voisins de 6,07% et 6,91%. Cependant il est à noter que le taux de dégradation des plastiques peut varier en fonction de la composition chimique et de la masse moléculaire initiale du polymère, la technique utilisée pour préparer les échantillons et leur masse, y compris le pH et la température du milieu (Volova et al. 2010).

Il a été découvert que les champignons dégrade mieux le PHBV, mais nécessite un lapse de temps supérieur à 40 jours, (Volova et al. 2010).

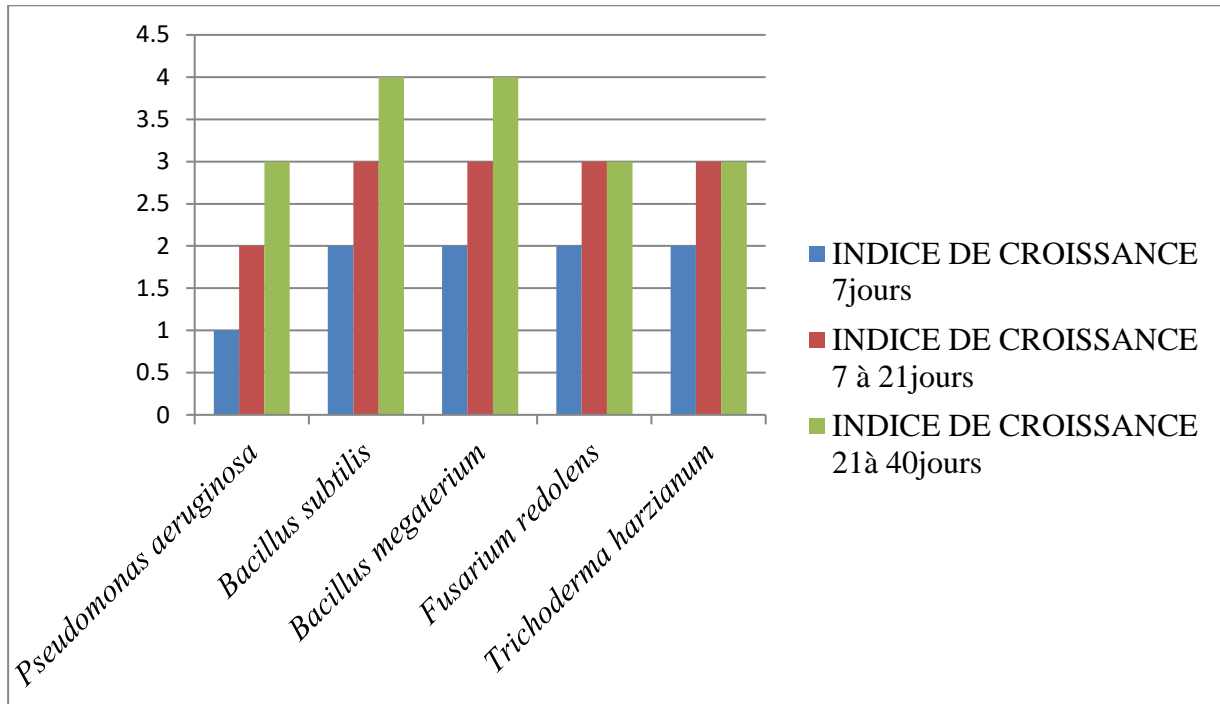


Figure15: Evaluation de l'indice de croissance microbienne au cours de la biodégradation

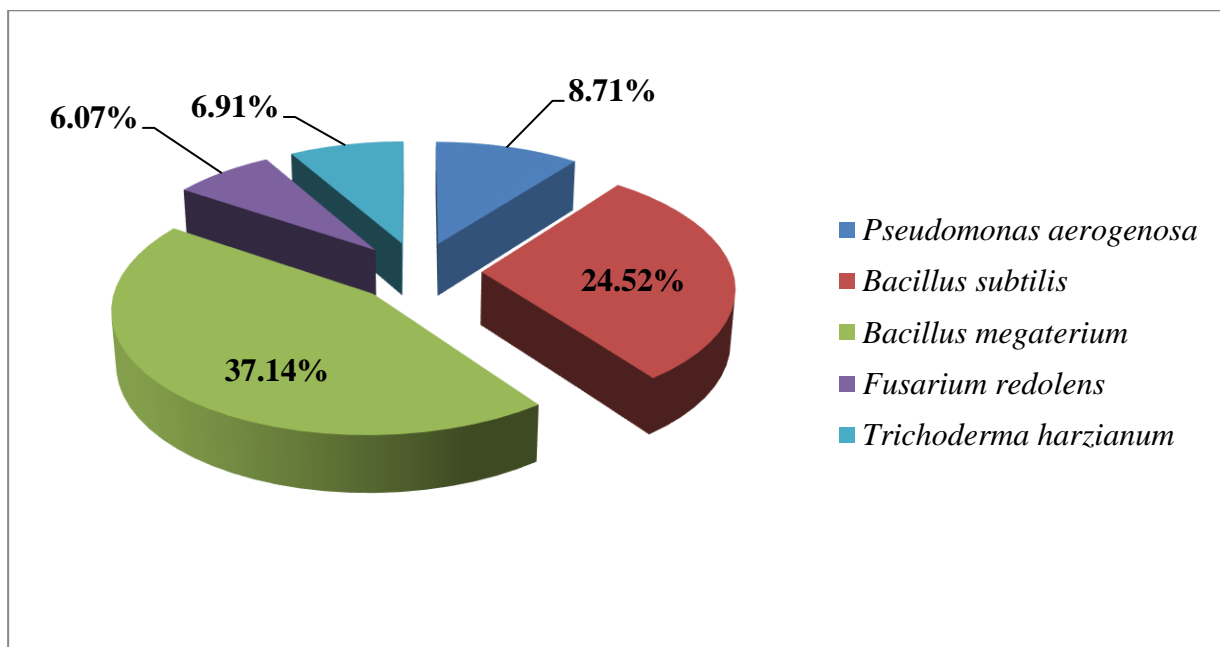
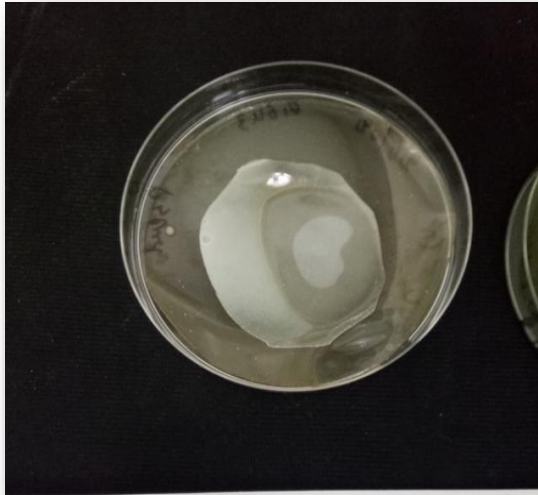
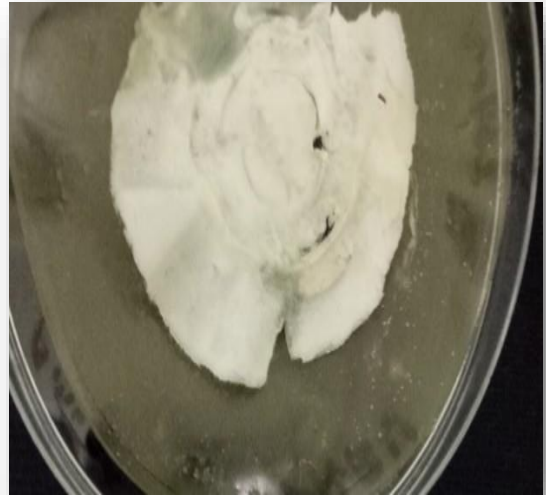


Figure 16: Taux de biodégradation des films de PHBV par les espèces étudiées.



PVC



PHBV

Figure 17 : Biodégradation du PHBV et PVC par *Bacillus megaterium* après 40 jours



PVC

PHBV

Figure 18 : Biodégradation des films de PHBV et PVC par *Bacillus subtilis* après 40 jours

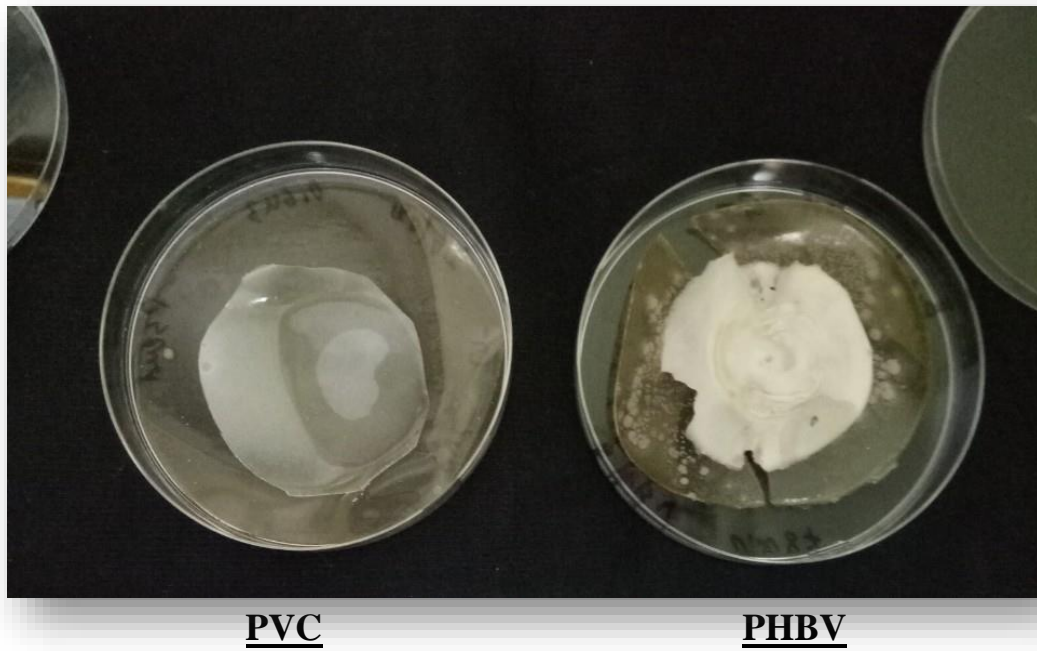


Figure 19: Biodégradation de PHBV et PVC par *Pseudomonas aeruginosa* après 40 jours

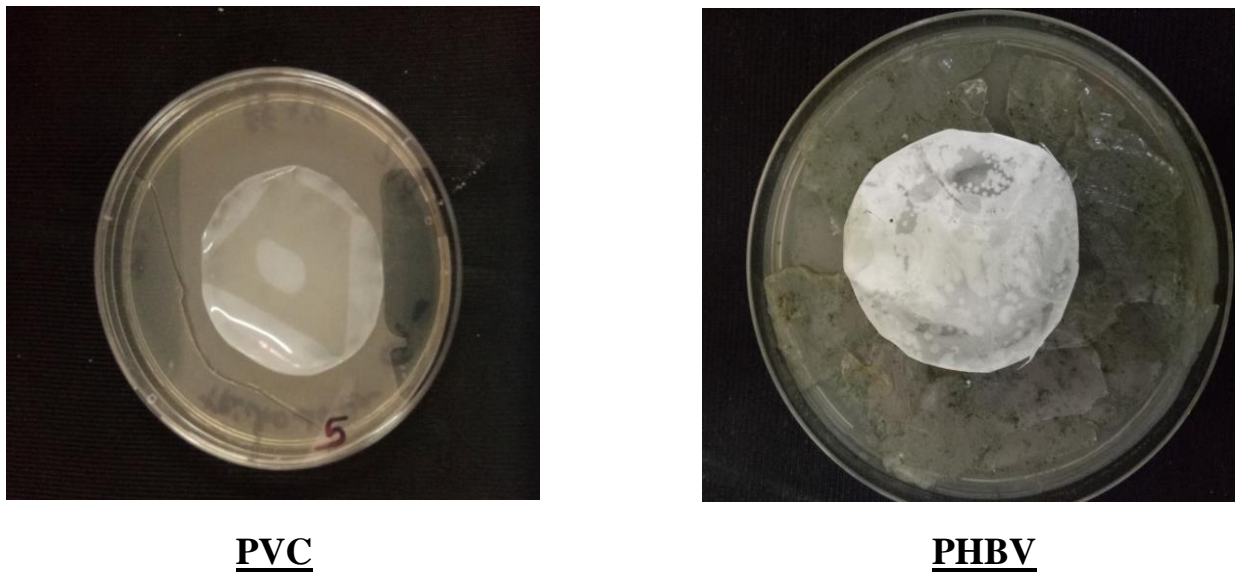


Figure20 : Biodégradation de PHBV et PVC par *Trichoderma harzianum* après 40jours

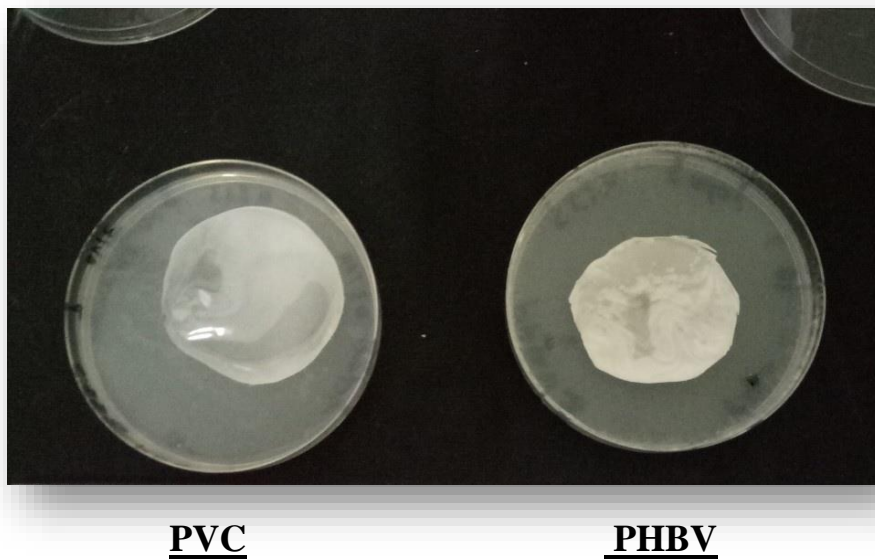


Figure 21 : Biodégradation de PHBV et PVC par *Fusarium redolens* après 40 jours

4. Etude des effets fongicide et bactéricide des polymères

L'évaluation de l'action toxique ou inhibitrice des deux polymères étudiés (PHBV et PVC) sur les espèces microbiennes testées s'effectue visuellement par observation de la croissance de ces souches sur un milieu complet en présence de glucose comme source de carbone. Les résultats obtenus (figures 22, 23, 24, 25,26) montrent une croissance bactérienne et fongique visible à l'œil nu. Il y a donc absence totale d'effet fongicide ou bactéricide pour les deux matériaux. On peut dire que le PHBV et le PVC n'inhibent pas la croissance des microorganismes métabolisant le glucose dans le milieu de culture. Les deux polymères n'ont aucun effet toxique ou inhibiteur sur les microorganismes utilisés.

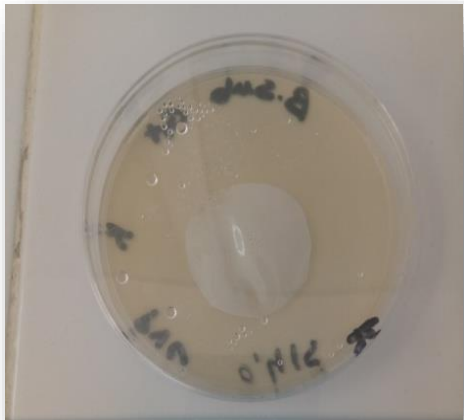


PVC

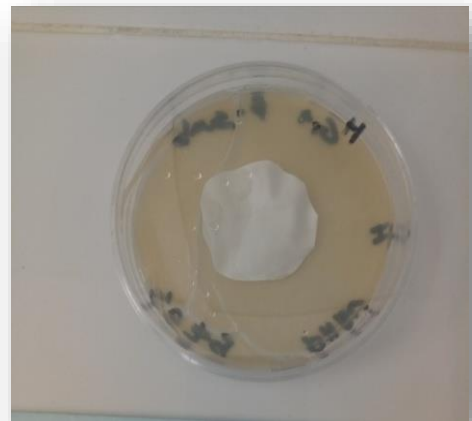


PHBV

Figure 22 : Effets des films sur *Bacillus megaterium*

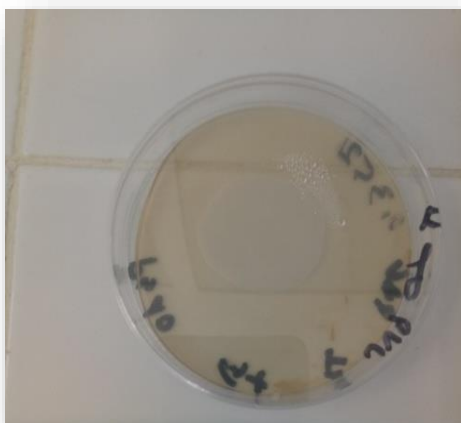


PVC

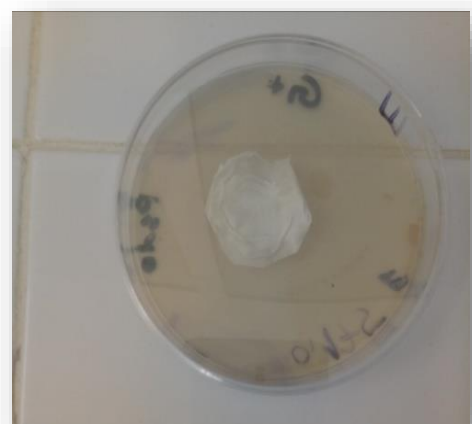


PHBV

Figure 23 : Effets des films sur *Bacillus subtilis*

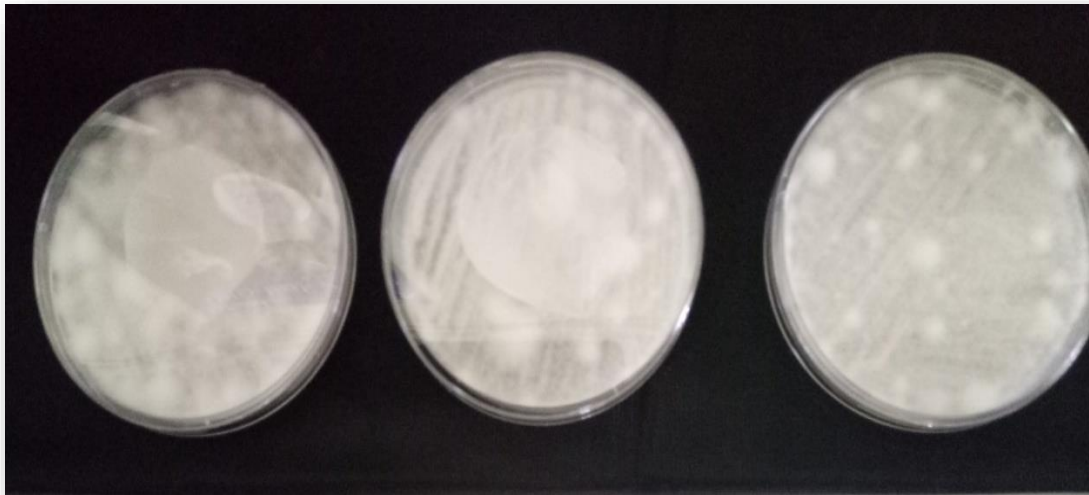


PVC



PHBV

Figure 24 : Effets des films sur *Pseudomonas aeruginosa*



PVC

PHBV

Témoins

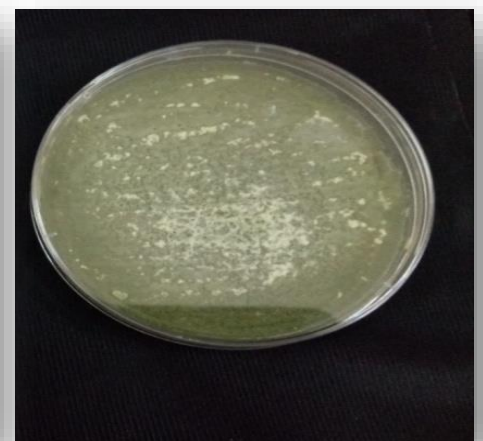
Figure 25 : Effet des films sur *Fusarium redolens*



PVC



PHBV



Témoins

Figure 26 : Effet des films sur *Trichoderma harzianum*

CONCLUSION

L'exploitation intensive du plastique pour des usages courants, se traduit par l'accumulation dans l'environnement des déchets non biodégradables à durée de vie très longue. Le plastique est considéré comme l'un des polluants les plus importants. Environ 90 % du plastique produit à ce jour n'a pas été recyclé. Le flux de matières plastiques dans notre environnement a donc atteint le niveau de crise, et l'impact dévastateur de cette pollution se fait le plus sentir dans notre environnement où termine chaque année entre 8 et 12 millions de tonnes de déchets plastiques.

Par ailleurs de multiples solutions sont proposées, parmi elles la fabrication des matières plastiques biodégradables, parmi ces polymères on trouve le Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ou PHBV.

L'objectif de ce travail était d'étudier la biodégradation *in vitro* pendant 40 jours d'un polymère, issu de ressource renouvelables (PHBV), et d'un polymère issu de ressources pétrolières (PVC) et de sélectionner des bactéries (trois espèces), et des champignons (deux espèces) qui ont la capacité de dégrader ces polymères.

Il a été remarqué que ces cinq souches isolées et identifier capables de croître à proximité des films en utilisant que le polymère PHBV comme substrat carboné avec des pourcentages de dégradation variables et cela selon l'espèce. Ce qui confirme la biodégradation du PHBV et non biodégradation du PVC

La biodégradabilité d'un matériau plastique ne peut être estimée par une seule méthode du fait de la complexité biologique impliquée dans le phénomène de biodégradation et le nombre de paramètre à prendre en compte. Cependant en perspective il est nécessaire d'aller plus loin dans les recherches pour mieux cerner le sujet, par exemple on peut envisager d'étudier la biodégradation sur une longue période pour avoir des résultats plus concluante. Les méthodes microbiologiques peuvent être complétées par les méthodes enzymatiques. Les tests menés dans un laboratoire ne peuvent pas exclure des tests dans des conditions similaires à celles de l'environnement.

Références
Bibliographiques

- 1-Ait-Zoura A, Chikbouni, 2017.** Modélisation de l'influence d'une charge minérale et d'un cycle de recyclage sur la diffusion de l'irganox 1076 dans un emballage alimentaire à base de polyéthylène haute densité.
- 2-Altaee N EL-HITI G.A, Fahdila, Sudesh K and Youcef E. 2016** Biodegradation of different of polyhydroxybutyrate films in soil. Springer plus 5:762.
- 3-Behloul L et Hamlaoui L 2015.** Effet d'un Renfort Biodégradable sur les Propriétés Physico-mécaniques d'un Biopolymère PHBV .Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés Option : Polymère et Composites. Université A. MIRA – Bejaia Faculté de Technologie Département de Génie des Procédés
- 4-Benabdallah A, Boulaïoun F. 2013.** contribution a l'étude de la biodégradation de la colle a base d'amidon.
- 5-Bouhairi S, 2017.**Bacillus subtilis : caractères et applications.
- 6-Bewa H , 2006.**Matériaux polymères biodégradables et applications. Note de Synthèse
- 7-Cantor K, Watts P et Kutz, M, 2011.**Plastics Materials. Applied Plastics Engineering Handbook: Processing and Materials.
- 8-Claire k, 2007.** Les différentes bactéries, Gram et sa coloration.
- 9-Darghouti S, Metheni A. 2016.** Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches de *Pseudomonas aerogénosa* dans la région de Constantine.
- 10-Deepika S, Jaya Madhuri R, 2015.** Biodegradation of low density polyethylene by micro-organisms from garbage soil. J Exp Bio AgriSci 3(1): 15-21.
- 11-Gontier A, Jaeger C, 2017.** Les plastiques : histoire et synthèse.
- 12-Gu JD, 2003.** "Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials" recent research advances.
- 13-Hilaire B 2006.**ADEME (Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables. Note de synthèse
- 14-Jenna R ,Roland G,ChrisW,Theodore R ,Miriam P, Anthony A, Ramani N, Kara L,2015.** Plastic waste inputs from land into the ocean.
- 15-Jérémie A, 2009.** Etude comparative du comportement de composites à matrice thermoplastique ou thermodurcissable.
- 16-Jbilou. F, Degraeve. P, Sebti. I. 2011.** Synthèse sur les différentes méthodes d'évaluation de la biodégradabilité des polymères à base de ressources renouvelables. *IUT A – Univ Claude Bernard Lyon 1*
- 17- Kolybaba M, Tabil L.G, Panigrahi S, Crerar W.J, Powell T, Wang B,2003.** Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future.
- 18-Kouame D, (2011).**Biotechnologie alimentaire : travaux pratiques.

- 19-Kumar AA, Karthick K, Arumugam KP 2011.** Biodegradable polymers and its applications. *Int J Biosci Biochem Bioinform* 1(3):173–176
- 20-Laurent G, 2013 .**Plastiques biosourcés : Étude de leur performance environnementale comparativement aux plastiques pétrochimiques.
- 21-Lefaux S ,2005.** Biodégradation de films polymères à usage agricole : Caractérisation physico-chimique des résidus et identification biomoléculaire des bactéries actives.
- 22-Leslie J.F., Summerell B.A.2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing.
- 23-Leyral. G, Vierling. E. 2007.**Microbiologie et toxicologie des aliments hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques .Wolters Kluwer
- 24-Lopez. C, Alba. F, Gracida. R, Perez.G. 2011.** Production of polyhydroxyalkanoates with canola oil as carbon source. *Internet J of Biological Macromolecules* 48-74–80.
- 25-Maes E, 2009.** Résonance magnétique nucléaire. Université des Sciences et Technologie de Lille F-59655 Villeneuve d'Ascq.
- 26-Maria R Pă, Mona Elena POPA, Petruța Călina CORNEA, Vlad Ioan POPA, Elena GROSU, Mikaela GEICU-CRISTEA, Petruța STOICA, Elisabeta Elena TANASE, 2014.** Romanian Biotechnological Letters, Vol. 19, No. 3.
- 27-Mariana D, Melissa V, Andre M, Marisa B. 2011.**Polyvinylchloride (PVC) and natural rubber films plasticized with a natural polymeric plasticizer obtained through polyesterification of rice fatty acid.
- 28- Marine L ,2017.**plus de 8 milliards de tonnes de plastiques produites en 60 ans.
- 29-Mekki. H, Belbachir. M. 2007.** Preparation of vinyl chloride – vinyl ether copolymers via partial etherification from PVC.*EXPRESS Polymer Letters Vol.1, No.8.* 495–498
- 30-M'zahem R, Mihoubi R, 2017.**Activités antifongiques des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes.
- 31-Özkan D, Ayşeş O, Azade A, Bulent M. (2015).**Preparation of poly (3hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilicarchaea and their potential use in drug delivery.
- 32-Patricia S. V, Rebekka B, Tobias F, Friedhelm M, Manfred R, 2007 .** Bacillus megaterium – from simple soil bacterium to industrial protein production host
- 33-Piton C, Fontanier C, 1990.** Caractérisation d'une collection de souches de bactéries corynéformes de la morge du gruyère de Comté.
- 34-Richard Lapointe 2012.**Bioplastiques biodégradables, compostables et biosourcés pour les emballages alimentaires, distinctions subtiles mais significatives Essai présenté au

Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en Environnement. Université de Sherbrooke.

35-Roland G, Jenna R. J, Kara L.L, 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made, Science Advances.

36-Rutot D, Dubois P, 2004. Les (bios) polymères biodégradables : l'enjeu de demain ? Chimie nouvelle - N° 86.Pp : 66-75

37-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

38-Salima KENNOUCHE, 2016. Étude de la Morphologie de Nanobiocomposites de Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalérate) (PHBV)/Nanotubes d'Halloysite et Évaluation de leurs Performances

39-Saidi B, Hammami T, Louati H ,2014. Procédés de mise en forme des matières plastiques.

40-S. Bruzau D 2015. Des bactéries, des déchets et des bioplastiques La Recherche 499, 57, 2015.

41-Singleton, P, Sainsbury, D. 1984 Abrégés de bactériologie. Ed Masson Paris. 151p.

42-Sonil NandaSmitiSnigdhaSahu, Jayanthi Abraham, 2010. Studies on the biodegradation of natural and synthetic polyethylene by Pseudomonas sp. J ApplSci Environ Manage; 14(2): 57-60.

43-T.G. Volovaa,b,* , A.N. Boyandina,b, A.D. Vasiliev c, V.A. Karpov d, S.V. Prudnikova b, O.V. Mishukova e, U.A. Boyarskikh e, M.L. Filipenko e, V.P. Rudnev f, Bui Bá Xuân f, Vũ Việt Dũng f, I.I. Gitelsona, 2010. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria . Volume 95, Issue 12, Pages 2350-2359

44-Verlinden R.A.J, D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams and I. Radecka.2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates.

45-Vimala PP and. Lea Mathewb, 2016. Biodegradation of Polyethylene using Bacillus subtilis Vimala. Procedia Technology 24 , 232 – 239.

46-Yezza, I. 2012. Biodegradable Plastics – Paper Board Applications, Innovations and Trends. Présentation à Cascades Sonoco, King sey Falls, 10 octobre 2010.

ANNEXES

Annexe 01

Composition des milieux de culture

- **Bouillon nutritif**

- Extrait de viande.....1g
- Extrait de la levure.....2.5g
- Peptone.....5g
- NaCl.....5g
- Eau distillé.....1L
- pH.....7

- **Solution sels minéraux pour champignons**

Pour 1 litre, sont mélangés : NaNO_3 2,0 g

KH_2PO_4 0,7 g

K_2HPO_4 0,3 g

$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 g

KCl 0,5 g

$\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,01 g

Eau 1000 mL

Le pH de la solution est ajusté entre 6.0 et 6.5 avec une solution de NaOH 0.01 mol/L.

- **Solution sels minéraux pour bactérie**

Pour 1 litre, sont mélangés :

NH_4NO_3 1,0 g

KH_2PO_4 0,7 g

K_2HPO_4 0,7 g

$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$0,7 g

NaCl0,005 g

$\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,002 g

$\text{ZnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,02 g

$\text{MnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0.001 g

Eau1000 ml

Le pH de la solution est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 0.01 mol/l.

Annexe 02

Tableau 1: les résultats d'identification bactérienne.

Souche	Examen microscopique		Examen biochimique	
	type	Forme de paroi	catalase	oxydase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille fin	Gram ⁻	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	Petit Bacille	Gram ⁺	+	+
<i>Bacillus megaterium</i>	Grand Bacille	Gram ⁺	+	+

Tableau 2: Les résultats de la biodégradation du film PHBV :

La souche	Poids du film avant	Poids du film après 40 jours	%de biodégradation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.287g	0.262g	8.71%
<i>Bacillus subtilis</i>	0.265g	0.200g	24.52%
<i>Bacillus megaterium</i>	0.315g	0.198g	37.14%
<i>Fusarium redolens</i>	0.181g	0.170g	6.07%
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.159g	0.148g	6.91%.

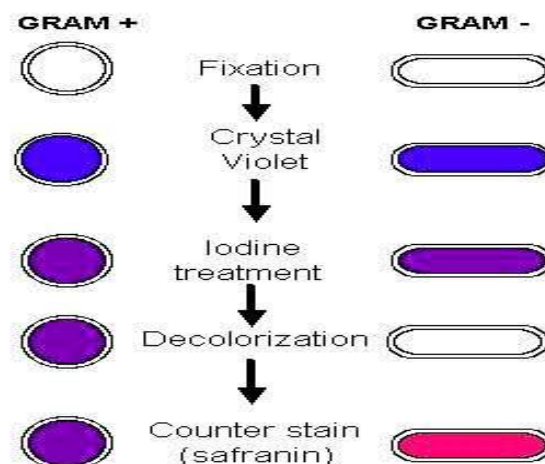
Annexe 03

Coloration de Gram

La coloration est une technique qui consiste à utiliser des réactifs pour faire la différenciation entre les bactéries. Les étapes de cette technique sont (Claire k, (2007) :

- fixation des bactéries sur une lame.
- coloration avec le violet de gentiane
- rinçage avec l'eau distillé.
- mordançage au lugol.
- lavage à l'alcool.
- coloration à la fuchsine (rouge), ou bien a la safranine.

Après l'utilisation du violet de gentiane et lugol toutes les bactéries sont violettes, le rinçage à l'alcool décolore seulement les bactéries à paroi fine. En suite la coloration à la Fushine ou à la safranine recolore seulement les bactéries décolorées par l'alcool. Les bactéries à paroi épaisses(ou dite a peptidoglycane épais) sont colorées en violet : et dites à Gram positif, les bactéries à paroi fine (ou dite a peptidoglycane fin) sont colorées en rouge et dites à Gram négatif (Claire k, (2007) .la figure 2 montre brièvement les différentes étapes de la coloration de gram

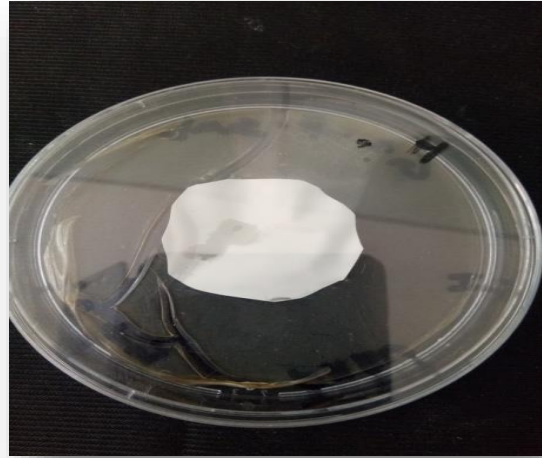


Annexe 04

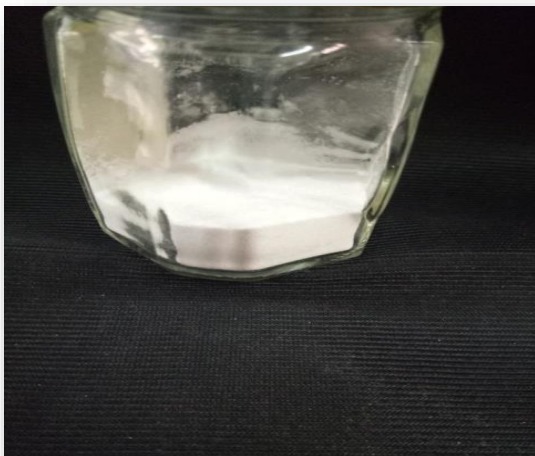
Les figures :



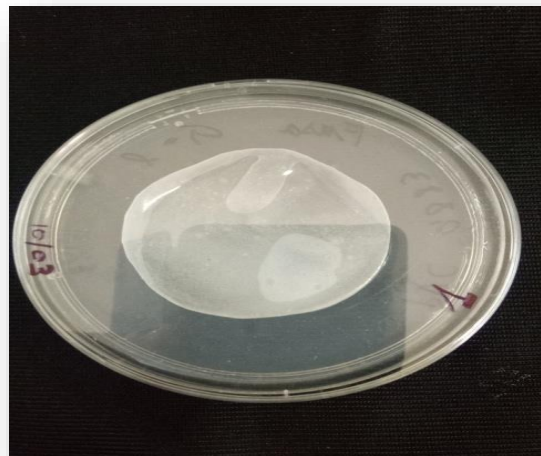
Le PHBV sous forme de granule



Le PHBV sous forme de film



Le PVC sous forme de poudre

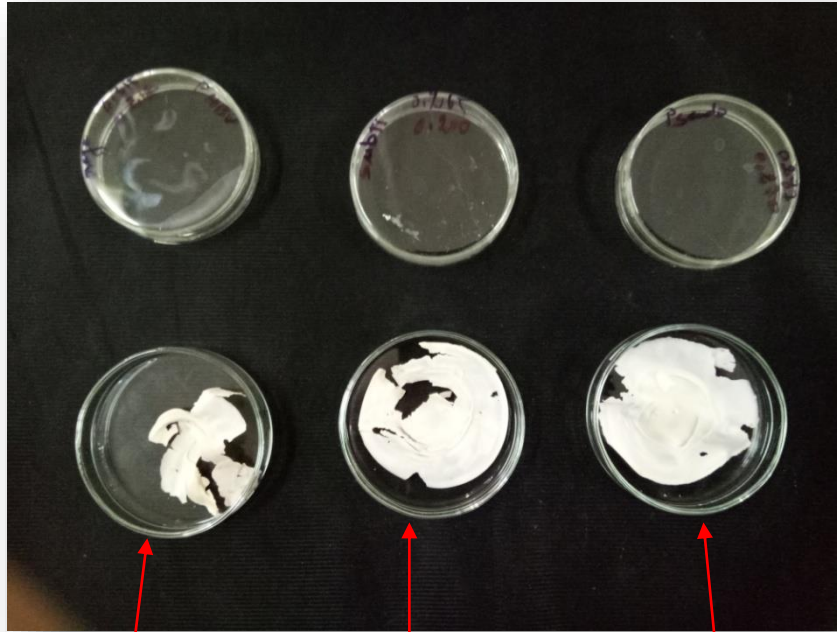


Le PVC sous forme de film



Cellule de malassez

Annexe 05

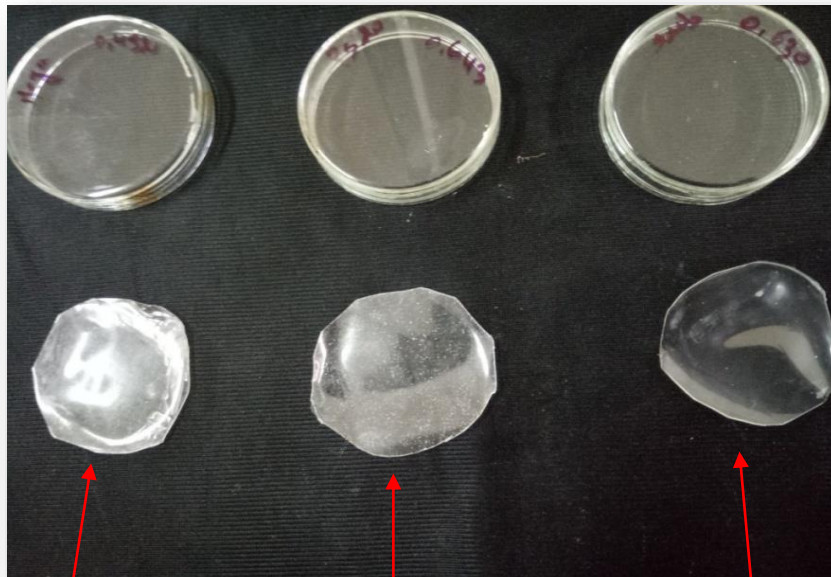


Bacillus mégaterium

Bacillus subtilis

Pseudomonas aerogènosa

Les films de PHBV après 40 jours de contact avec les bactéries

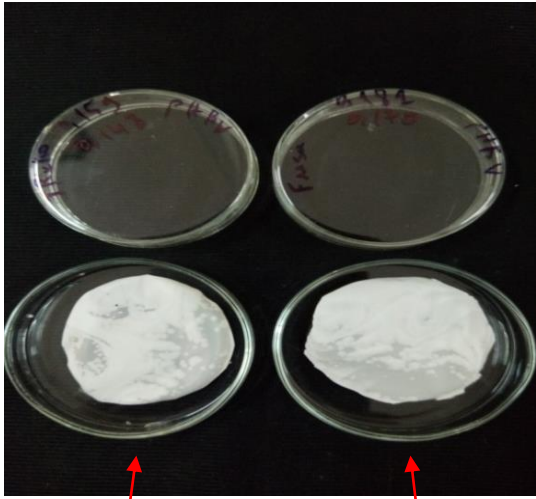


Bacillus megaterium

Bacillus subtilis

Pseudomonas aerogenosa

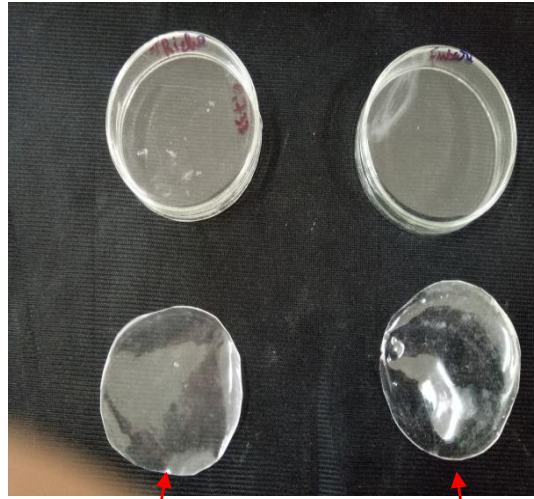
Les films de PVC après 40 jours de contact avec les bactéries



T. harzianum

F. redolens

Les films PHBV après 40 jours



T. harzianum

F. redolens

les films PVC après 40 jours

Annexe 06

Classification des microorganismes :

Tableau de classification des souches bactériennes :

Classification des souches microbiennes		
Règne	<i>Bacteria</i>	
Embranchement	<i>Firmicute</i>	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Bacilli</i>	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>	<i>pseudomonas</i>
Espèces	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>

Tableau de classification des souches fongiques :

Classification des souches fongiques		
Règne	<i>Fungi</i>	
Division	<i>Ascomycota</i>	
Sous-division	<i>Pezizomycotina</i>	
Classe	<i>Sordariomycetes</i>	
Sous-classe	<i>Hypocreomycetidae</i>	
Ordre	<i>Hypocreales</i>	
Famille	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Nectriaceae</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>	<i>Fusarium</i>
Espèces	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Fusarium redolens</i>

Résumé

Le **PHBV** est un matériau renouvelable, recyclable et biodégradable qui peut constituer une alternative prometteuse pour remplacer les matériaux plastiques traditionnels qui sont fabriqués à base de produit fossile. Ces nouveaux matériaux « verts » présentent en général l'avantage de se dégrader de manière non toxique dans les conditions environnementales.

Ce présent travail a été consacré à l'étude de la biodégradation *in vitro* de deux polymères qui sont le **PHBV** et le **PVC** sur une période de temps de 40 jours et ceci on utilisant deux espèces fongiques (*Fusarium redolens*, *Trichoderma harzianum*) et trois espèces bactériennes (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aerogenosa*).

Il a été remarqué que l'action de ces microorganismes vis-à-vis ces deux polymères est différente. Le **PVC** ne subisse aucune modification ou détérioration tout au long de l'expérience. Par contre le **PHBV** a subis une biodégradation et une détérioration avec des taux variables selon le microorganisme testé. Les espèces bactériennes montrent une biodégradabilité de **PHBV** supérieur par rapport aux champignons. *Bacillus megaterium* occupe la première place avec 37.12% de biodégradation devant *Bacillus subtilis* avec 24.52%. Les deux polymères ne présentent aucun effet toxique sur les cinq souches microbiennes et fongiques étudiées.

Mots clés : Biodégradation, **PHBV**, **PVC**, bactéries, champignons, effet fongicide, effet bactéricide

Abstract

PHBV is a renewable, recyclable and biodegradable material that can be a promising alternative to replace traditional plastic materials that are made from fossil fuels. These new "green" materials generally have the advantage of degrading in a non-toxic way under environmental conditions.

This work has been devoted to study the *in vitro* biodegradation of two polymers ; **PHBV** and **PVC** during 40 days by using two species of fungi (*Fusarium redolens*, *Trichoderma harzianum*) and three species of bacteria (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aerogenosa*). It has been noticed that the action of these microorganisms on these two polymers is different. The **PVC** does not undergo any modification or deterioration throughout the experiment. On the other hand, the **PHBV** underwent biodegradation and deterioration with varying rates depending on the microorganism tested. A higher biodegradability of **PHBV** was shown with the bacterial species compared to fungi species. *Bacillus megaterium* occupies the first place with 37.12% biodegradation before *Bacillus subtilis* with 24.52%. The two polymers have no toxic effect on the five microbial and fungal strains studied.

Key words: Biodegradation, **PHBV**, **PVC**, bacteria, fungi, fungicidal effect, bactericidal effect

(PHBV) هي عبارة عن مادة قابلة للتجديد ، قابلة لإعادة التدوير و قابلة للتحلل البيولوجي و التي يمكن أن تكون بديلا و اعدا لاستبدال المواد البلاستيكية التقليدية المصنوعة من الوقود الأحفوري.

تتمتع هذه المواد الخضراء "الجديدة" عموماً بميزة التحلل بطريقة غير سامة في ظل الظروف البيئية.

تم تكريس هذا العمل لدراسة التحلل الحيوي للبوليمرات وهما PHBV و PVC على مدى 40 يوماً و هذا باستخدام نوعين من الفطريات (*Fusarium rodolens*) ، (*Trichoderma harzianum*) وثلاثة أنواع البكتيريا (*Bacillus megaterium, Bacillus subtilis and Pseudomonas aerogenosa*) لقد لوحظ أن عمل هذه الكائنات الحية الدقيقة تجاه هذين البوليمرين لا يخضع الـ (PVC) لأي تعديل أو تدهور طوال التجربة من ناحية أخرى ، خضع (PHBV) للتحلل البيولوجي و التدهور مع معدلات متفاوتة اعتمادا على الكائنات الحية الدقيقة التي تم اختبارها. تظهر الأنواع البكتيرية قابلية التحلل الحيوي PHBV أفضل من الفطريات. حيث تحتل (*Bacillus megaterium*) المرتبة الأولى بنسبة 37.12٪ من التحلل الحيوي تليها (*Bacillus subtilis*) بنسبة 24.52٪.

البوليمرات ليس لها أي تأثير سام على السلالات الخمسة الميكروبية و الفطرية التي تمت دراستها.

الكلمات الرئيسية : التحلل الحيوي ، (PHBV) ، (PVC) ، البكتيريا ، الفطريات ، تأثير مبيدات الفطريات ، تأثير مبيد الجراثيم.