

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE 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 Master

En vue de l'obtention du diplôme de Master Biotechnologie Microbienne
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par

- M. ARABI Zakaria
- M. BENYAMINA Abderrahmane
- Mlle. SLIMANI Fatima Zohra

Thème :

***Isolement des bacteries capables de dégrader
le polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalerate
(PHBV).***

Soutenu devant le jury :

Président :	Dr YEZLI W	MCA
Encadrant :	Dr. MEDJEBER N	MCB
Examineur :	Dr. AIT ABDERRAHIM L.	MCA

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Allah qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser cette mémoire.

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements

À notre encadrante le Dr Medjeber.N Pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant cet encadrement

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de cette mémoire, pour son aide ; ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce travail.

Nous remercions également tous les techniciens de laboratoire

Nous remercions les membres du jury Dr. AIT ABDERRAHIM Leïla et YEZLI Wassim, qui ont bien voulu accorder du temps, à l'évaluation de ce modeste travail.

Enfin, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de cette mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, pour leur soutien constant et leur confiance et qui m'ont donné la force, la patience et la volonté durant mon cycle d'études.

A mes chères sœurs et frères

A tous mes amis.

A toute la promo biotechnologie
microbienne 2019/2020

ABDO

DÉDICACE

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL :

À MES TRÈS CHERS PARENTS POUR VOTRE PATIENCE ET LE
SACRIFICE QUE VOUS AVEZ
CONSENTI À MON ÉGARD PENDANT TOUTE LA DURÉE DE MES
ÉTUDES.

À MES FRÈRES ET SŒURS.

À TOUS MES COUSINS ET COUSINES, MES ONCLES ET TANTES.

À TOUTE MA FAMILLE ET MES AMIS (ES).

À TOUTE MA PROMOTION 2020.

ZAKARIA

Je dédie ce modeste travail :

Aux joyaux de ma vie « mes parents ».

A la femme qui est la source de ma réussite ma mère

Fadhila.

A mon frère Sofiane.

A mes sœurs.

A mes meilleures amies.

Fatima Z

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVEATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

PARTIE EXPERIMENTAL

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

1.Objectif de travail.....	06
2.Durée et lieu de travail	06
3.Matériels et produits.....	06
3.1.les polymères	07
3.1.1. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBV.....	07
3.1.2. Polychlorure de vinyle (PVC)	08
4.Protocole expérimentale	09
5.Methodes	10
5.1. Préparation des films.....	10
5.1.1. Préparation des films de Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBV.....	10
5.1.2. Préparation des films de Polychlorure de vinyle (PVC).....	10
5.2. Analyse RMN des polymères.....	11
5.3. Etude de la biodégradation	12
5.3.1. Enfouissement dans le sol	12
5.3.2. Immersion dans l'eau.....	13
5.4. Étude des paramètres physico-chimique du sol	13
5.4.1. Humidité	13
5.4.2. pH du sol.....	14
5.4.3. Température	14
5.5. Taux de biodégradation.....	14
5.6. Détermination de la charge microbienne	15
5.7. Isolement et purification des souches	16
5.8. Criblage des souches capables de dégrader le PHBV.....	16

5.9. Identification des souches capables de dégrader le PHBV	17
5.9.1. Etude macroscopique.....	17
5.9.2. Etude microscopique	17
5.9.3. Test biochimique	18
5.9.3.1. Recherche de la catalase	18
5.9.3.2. Test d'oxydase	18
5.9.3.3. Mannitol – mobilité.....	18
5.9.3.4. Milieux sélectifs	19
5.9.3.5. Galeries API	19

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude de la biodégradation des PHBV	22
1.1. Taux de biodégradation des films de PHBV et PVC	22
1.2. Aspect visuelle des films	24
2. Les souches bactériennes qui dégradent les PHAs.....	27

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

HV : Hydroxyvalérate.

HB : hydroxybutyrique

PHA : Polyhydroxyalcanoate.

PHB : Poly3-hydroxybutyrate.

PHV : Poly3-hydroxyvalérate.

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

ISO : International Standards Organisation

PEHD : polyéthylène haute densité

PEBD : polyéthylène basse densité

PP : polypropylène,

PS : polystyrène

PVC : polychlorure de vinyle

PE : polyéthylènes

PA : polyamides

ICI : Société Imperial Chemical Industries

Tg : Transition de vitreuse

Tm : Température de fusion

PHA MCL: Medium chain length

PHASCL: short chain length

MEB : microscopie électronique à balayage

RMN : Résonance magnétique nucléaire

THF : Tétrahydrofurane

Liste des figures

Figure 1 : Principaux pays émetteurs de déchets plastiques dans les océans

Figure 2 : Biosynthèse et biodégradation des PHAs dans l'environnement.

Figure 3 : Structure chimique du PHBV

Figure 4 : Structure chimique du PVC

Figure 5 : Film de PHBV

Figure 6 : Film de PVC

Figure 7 : Protocol Expérimental

Figure 8 : Zone d'enfouissement

Figure 9 : une cage de protection des films à émerger dans l'eau

Figure 10 : Les dilutions décimales

Figure 11 : Taux de perte de poids des éprouvettes de P (3HB) et P (3HB-co-10% 3HV) incubées dans différents sols à différentes températures.

Figure 12 : Dégradation du film de PHBV avant et après l'enfouissement dans le sol.

Figure 13 : Films de PHA après différentes périodes d'exposition marine

Figure 14 : observation morphologique des films de PHBV par microscopie électronique à balayage (MEB) avant et après le contact avec la souche *Nocardiopsis aegyptia*.

Figure 15 : Formation des zones claires sur milieu synthétique par l'activité de l'enzyme dépolymérase des bactéries dégradant le PHA.

Figure 16 : Colonies microbiennes forment des zones claires sur une plaque de gélose minimale

Figure 17 : taux de biodégradation de film de PHBV, marquer par la perte de poids et aussi par la croissance microbienne de la souche *Streptomyces. Omiyaensis SSM 5670* en présence du PHBV

Liste des tableaux

Tableau 1 : Matériels et produits utilisés

Tableau 2 : Principales caractéristiques physico-chimiques du PHBV

Tableau 3 : Films de PHBV avant et après l'enfouissement et émergement dans l'eau

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plastiques ont un grand rôle dans le développement des sociétés modernes, grâce à leur faible coût d'élaboration, leur polyvalence et leur durabilité (**Laurent, 2013**), un plastique est une « matière synthétique, constituée des macromolécules obtenues par polymérisation ou polycondensation et qui peut être moulée ou modelée ».

La production annuelle mondiale en 2015 a été de 300 millions de tonnes (**Geyer, 2017**) et en 2018 elle atteint 359 millions de tonnes. grâce à leur polyvalence, les plastiques sont utilisées presque dans tous les domaines (l'agriculture, emballages, vêtements...). Tout ce plastique produit a réussi de résoudre plusieurs problèmes liés aux industries, la santé, l'agricultureCependant, le plastique est considéré comme une grande source des problèmes écologiques, on parle du point du vue déchets, leur persistance dans l'environnement pose un problème de pollution dans le monde. (**Geyer, 2017**).

Aujourd'hui, les entreprises dépendent essentiellement sur les ressources non renouvelables pour produire le plastique, tel que le pétrole et le gaz naturel.

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

Les élastomères sont des polymères de source naturelle issu du latex d'Hévéas (arbre d'Amazonie) ou synthétique obtenu par les méthodes modernes de fabrication. (**Benmesli, 2016**), l'élastomère le plus connu est le caoutchouc.

Les thermoplastiques, sont des polymères transformables par la chaleur, ils obtiennent leurs formes finales après refroidissement ; ces plastiques sont facilement recyclables mais ils sont hautement non biodégradables, ils peuvent persister à plusieurs centaines d'années dans le sol , Cette classe englobe des polymères comme polyéthylène téréphtalate, polyéthylène haute densité (PEHD), polyéthylène basse densité (PEBD), polypropylène (PP), polystyrène (PS), polychlorure de vinyle (PVC). (**Traore, 2018**).

Les thermodurcissables sont des polymères remodelés par la chaleur, ils prennent leur forme finale par refroidissement comme les thermoplastiques, ils sont non recyclables. (**Laurent,2013**).

Le plastique est un polymère durable ; il persiste des centaines d'année avant d'être biodégradé complètement, un sac de plastique persiste dans la nature pendant 200 ans avant d'être entièrement dégradé (**Sanae, 2015**). Les fuites annuelles des plastiques dans les océans sont supérieures à 9 millions de tonnes par ans, car la croissance de la

consommation de plastique dépasse celle de la capacité de gestion des déchets (**Advisors et al., 2019**).

les Principaux pays émetteurs des déchets plastiques dans les océans (voir l'annexe 01 figure 1).

Pour combattre ce danger de pollution environnementale les chercheurs ont utilisé plusieurs méthodes, comme le recyclage des déchets plastiques ; Cette méthode est un procédé de valorisation et réutilisation des polymères pour minimiser les déchets dans l'environnement. ;en estime que seulement 19.50% des plastiques sont collectés pour le recyclage en 2015. (**Geyer et al., 2017**).

Une autre méthode a été développés par les scientifiques pour combattre la pollution, c'est la production des bioplastiques.

Les bioplastiques sont considérés comme une alternative prometteuse de plastique pétrochimique, leur grand avantage est la biodégradabilité.

Selon ISO ; un matériau dit biodégradable, s'il est susceptible d'être dégradé par des microorganismes.

Le processus de biodégradation se déroule d'une manière générale en deux étapes. La première étape c'est la biodétérioration ; ou la fragmentation des matériaux biodégradables avec combinaison entre les facteurs abiotiques (pH, température, humidité, aération, UV...), les décomposeurs comme les vers de terre, les insectes ; les communautés microbiennes (Bactéries, champignons et algues) Les paramètres physicochimiques peuvent conditionner la biodégradation d'un matériau enfoui dans le sol ; car ils influencent le taux d'activités microbiennes, (**Anais, 2017**).

Chaque écosystème contient sa propre communauté microbiologique qui le caractérise. (**Bewa, 2005**). Les bactéries possèdent un arsenal d'exo-enzyme et d'endo-enzyme, par exemple des amylases, des protéases, des nucléases, des cellulases, estérases, et autres hydrolases. Les endo-enzymes provoquent la rupture aléatoire des liaisons esters de la chaîne carbonée du polyester et les exo-enzymes hydrolysent spécifiquement les liaisons esters situées au bout de la chaîne carbonée et libérant des monomères. (**Morgan, 2014**).

La deuxième étape de la biodégradation correspond la bio-assimilation : les molécules résultantes de l'hydrolyse sont intégrées aux cycles physiologiques pour les transformer à des matériaux de synthèse (l'anabolismes) et de source d'énergie (catabolismes), puis la

minéralisation qui aboutit à la production de CO₂ et/ou CH₄, de l'eau et une nouvelle biomasse ; La minéralisation peut être considérée comme le stade ultime de la bioassimilation. (**Morgan, 2014**).

Parmi les plastiques biodégradable la famille des polyesters aliphatique ou bien les polyhydroxyalcanoates (PHAs), découvert en 1925 par un microbiologiste français, Maurice Lemoigne, les PHAs sont des polymères issus de ressources renouvelables, obtenus par fermentation bactériennes. (**Stéphane et al., 2019**). Il présente deux grand avantages la biodégradabilité et la biocompatibilité qui les rend très compétitifs (**Deroiné et al., 2015**).

Les PHA sont accumulés sous forme des granules dans le cytoplasme des bactéries où ils constituent une réserve de carbone et d'énergie. La nature et la quantité des PHAs accumulés dépend de la souche bactérienne et des substrats carbonés disponibles dans son environnement, il y a des bactéries qui peuvent accumulées jusqu'à 80% de leur poids sec. (**Neha, 2019**). Plus de 140 PHAs ont été identifiées (exemple : PHV, PHB, PHBV...). (**Sanae, 2015**). La Biosynthèse et la biodégradation des PHAs dans l'environnement (voir l'annexe 01 figure 2)

Le PHBV a été synthétisé pour la première fois en 1983 par la société Imperial Chemical Industries (ICI), il a été commercialisé sous le nom commerciale Biopol. (**Boudali et Sellam, 2015**), il est constitué à la fois d'un monomère d'acide hydroxybutyrique (HB) et d'un monomère d'acide valérique (HV). (**Kennouche, 2016**)

Les propriétés du PHBV à une relation avec le pourcentage de hydroxyvalerate (HV) ; l'augmentation de la teneur de (HV) provoque une forte modification des caractéristiques physiques : une diminution de la température de transition vitreuse (T_g) et la température de fusion (T_m) et aussi la cristallinité et la perméabilité à l'eau, et une augmentation de la résistance au choc. (**Kennouche, 2016**).

Les bioplastiques permettent de limiter considérablement l'impact environnemental de ce matériau, tant en terme de préservation des écosystèmes naturels que d'émissions de gaz à effet de serre et de préservation des ressources fossiles.

CHAPITRE I :

MATERIELS

ET

METHODES

1.Objectifs du travail

L'objectif de notre travail consiste d'une part à isoler des souches bactériennes à proximité des films de PHBV et PVC enfouit dans le sol ou émerger dans l'eau et d'autre part faire le criblage et l'identification des souches capables de dégrader le PHBV. Les films de PVC ont été utilisés pour comparer la différence de charge microbienne entre un plastique biodégradable (PHBV) et un plastique non biodégradable (PVC).

2. Durée et lieu de travail

Cette étude a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie, science des sols et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUN-TIARET.

3.Matériel et produits

Le tableau ci-dessous montre tous les matériels et produits utilisés dans notre travail.

Tableau n°1 : Matériels et produits utilisés

Verreries et autres	Anse de platine Becher Boîtes de Pétri en verre et en plastique Burette Dessiccateur Erlenmeyer Eprouvette stérile Embouts stériles Micropipettes Pipette Pasteur Spatule stérile Tubes à essai Verre de montre
----------------------------	---

Produits	Chloroforme Eau distillée stérile PHBV PVC Tétrahydrofurane. Fuchsine Éthanol Lugol Alcool
Appareils	Microscope optique Autoclave Four Pasteur Balance analytique Etuve pH mètre Thermomètre Agitateur magnétique thermique Spectrophotomètre UV-Visible
Milieux de culture	Gélose nutritive Milieu synthétique Mannitol- Mobilité King A, King B Milieu Cétrimide Milieu Citrate Simmons Galeries API

3.1. Polymères

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

Le copolymère Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBV est un polyester microbien non toxique, il est produit naturellement par certaines bactéries ou bien synthétiser chimiquement. Actuellement le PHBV à un intérêt important du point de vue industriel (**Gelinas, 2013**). Il représente 1% de la production mondiale du

plastique . Le PHBV utilisé dans cette étude se présente sous forme des granules de couleur beige, contenant 8 mol % de l'hydroxyvalérate (HV), commercialisé par Aldrich (Germany). Les différentes caractéristiques de ce polymère sont représentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Principales caractéristiques physico-chimiques du PHBV

Propriétés	Valeur
Point de fusion (°C)	170-176°C
Température de transition vitreuse (Tg)	5°C
Densité	1,25
Solubilité dans l'eau à 20°C	Insoluble
Solubilité dans les solvants	Chloroforme, dichlorométhane

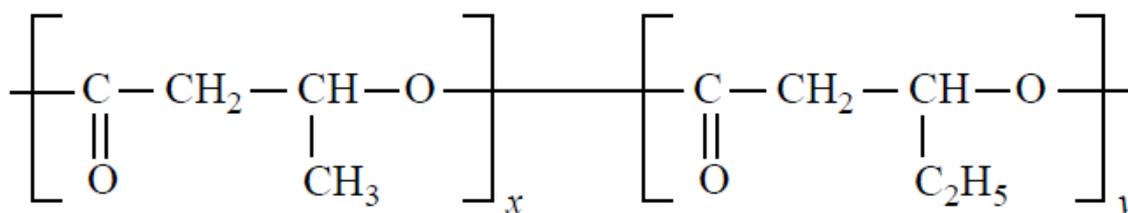


Figure 3 : Structure chimique du PHBV

3.1.2. Polychlorure de vinyle (PVC)

Le PVC fait partie de la famille des polymères thermoplastiques. Il est obtenu par polymérisation radicalaire du chlorure de vinyle. Dans le PVC, le chlore représente 57% du poids de la résine du polymère pure. (Cantor *et al*,2011). Le poly (chlorure de vinyle) est le troisième polymère de commodité le plus utilisé au monde après le polyéthylène et le polypropylène.

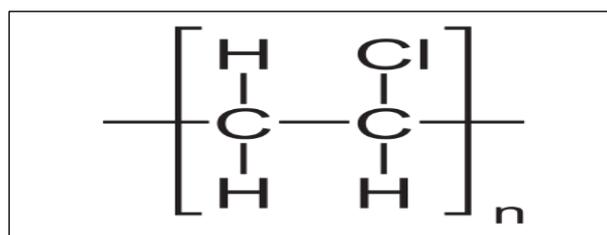


Figure 4 : Structure chimique du PVC

4. Protocole expérimentale

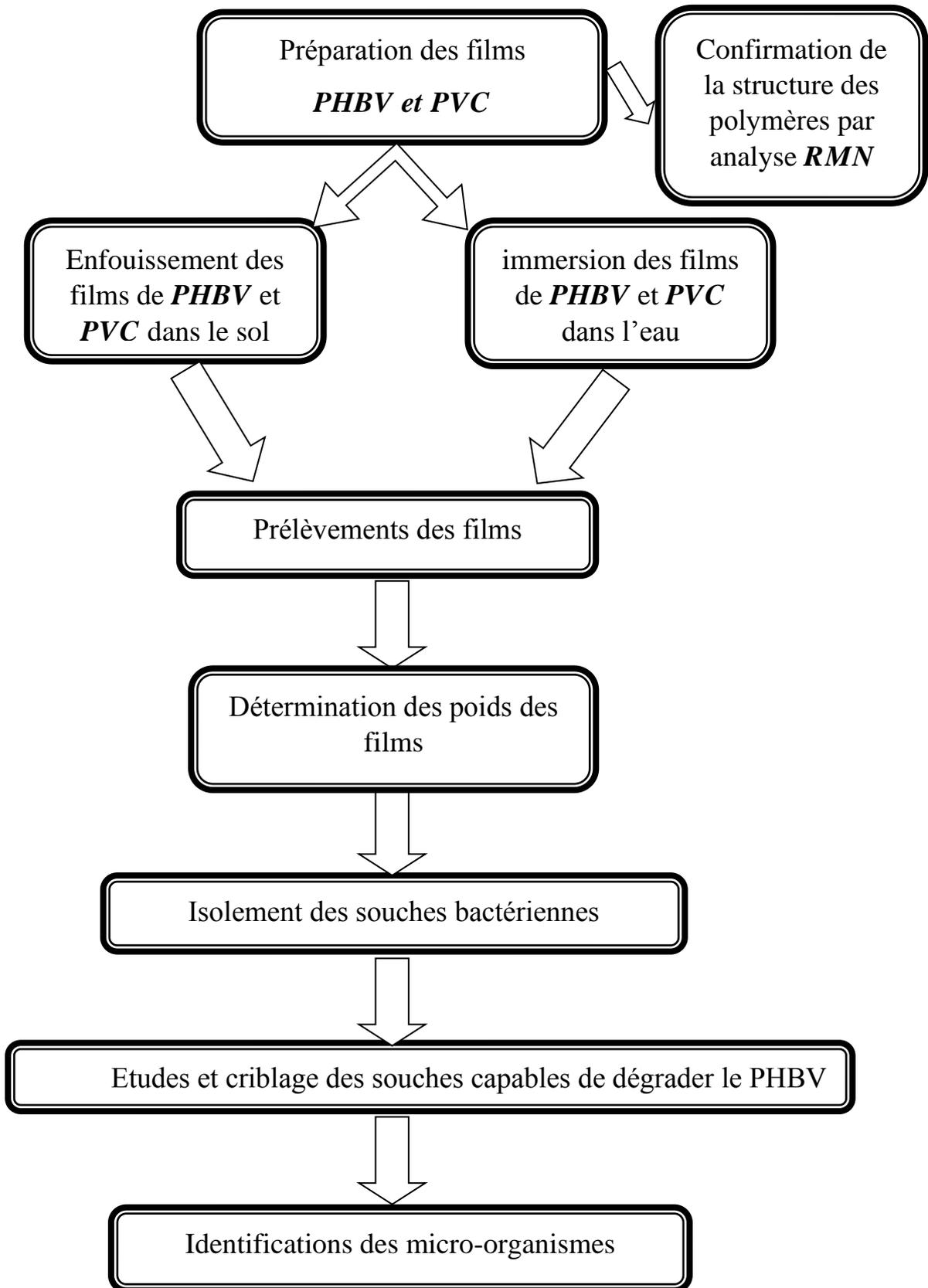


Figure 5 : Protocol Expérimental

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 (0.3 g) de PHBV a été diluée dans (30ml) de chloroforme, la solution obtenue est recouverte par papier aluminium pour minimiser l'évaporation du solvant puis homogénéisée sous agitation magnétique dans un bécher. (**Altaee et al, 2006**). La solution obtenue est versée dans des boîtes de Pétri couvertes par un papier d'aluminium perforée et laissées 24 h pour l'évaporation du solvant.



Figure 6 : Film de PHBV

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. 0.3 g de PVC en poudre a été dilué dans 10 ml de Tétrahydrofurane (THF) le mélange a été mis dans un bécher recouvert de papier aluminium et soumis sous une agitation (**Mariana et al, 2011**). La solution obtenue est versée dans des boîtes de Pétri couvertes par un papier d'aluminium perforée et laissées 24h pour l'évaporation du solvant.



Figure 7 : Film de PVC

5.2. Analyse RMN des polymères

Pour prouver la pureté des deux polymères (PHBV et PVC), une analyse de la structure chimique par RMN a été réalisée au centre de recherche et d'analyse physico-chimiques *CRAPC (Bousmail, Tipasa)*.

RMN signifie Résonance magnétique nucléaire ; Cette méthode permet à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Elle s'applique à différents noyaux d'atomes ayant des propriétés magnétiques ; il est possible d'utiliser la RMN proton (^1H -RMN), celle du carbone (^{13}C -RMN) ou celle du phosphore (^{31}P -AMN). (**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 multinoyaux 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 dutetramethylsilane (TMS) utilise comme référence interne ($\delta = 0$).

Pour effectuer cette analyse, les deux polymères ont été dilués à raison de 1 à 10 mg d'échantillon sec dans un volume de 1 ml de solvant deutéré. Le chloroforme deutéré (CDCl_3) a été utilisé pour l'analyse du polymère PHBV et DMSO deutéré (diméthylsulfoxyde deutéré) pour le PVC. (Les Spectres voir l'annexe 02).

5.3. Eude de la biodégradation

Afin de faire une estimation de la biodégradation d'un bio polymère des films de PHBV ont été enfouis dans le sol ou émerger dans l'eau. Pour comparer le changement des films d'un polymère biodégradable (PHBV) et d'un polymère connu non biodégradable ; des films de PVC ont été aussi étudié en parallèle par la même méthode.

5.3.1. Enfouissement dans le sol

La zone d'étude se situe à la faculté SNV Tiaret. Le sol choisi pour étudier la biodégradation doit être fertile. Les films de PHBV et de PVC ont été enfouis dans le sol à une profondeur de 20 cm et à une distance entre eux de 5cm.



Figure 8 : Zone d'enfouissement

5.3.2. Immersion dans l'eau

Un film de PHBV et un film de PVC ont été mis dans une cage métallique, qui a été ensuite émergé dans une eau stagnante à la faculté SNV TIARET.

Les films ont été prélevé du sol ou de l'eau après 40 jours pour une étude ultérieure.



Figure 9 : Système de protection des films à émerger dans l'eau

5.4. Étude des paramètres physico-chimique du sol

5.4.1. Humidité

L'humidité d'un sol en particulier va déterminer les caractéristiques de diffusion ou de stockage de l'eau dans ce sol.

Par la méthode gravimétrique l'humidité du sol qui entoure le film a été déterminé. Pour cela un échantillon représentatif a été prélevé puis séché dans un four à 105°C pendant 24h ; le poids du sol a été déterminé avant et après le séchage.

Pour calculer la quantité exacte d'eau présente dans le sol on applique la loi ci-dessous selon **Lezam et Zerka, (2015)**.

$$H (\%) = \frac{PF - PS}{PS} \times 100$$

H : Humidité.

PF : Poids frais

Ps : poids sec.

5.4.2. pH du sol

Le pH du sol a été déterminé par la méthode électro-métrique à l'aide d'un pH-mètre Sur une suspension aqueuse de sol dont le rapport eau distillée / sol est de (un volume de sol pour cinq volumes d'eau distillée). (Lezam et Zerka, 2015).

Préparation de la solution :

- Sécher l'échantillon du sol à l'air libre et tamiser après le séchage.
- Mélanger l'échantillon du sol avec 5 volumes d'eau distillé.
- Mélanger la solution sur un agitateur magnétique afin de disloquer les agrégats.
- Laisser la solution se reposée jusqu'à avoir un surnageant.
- Mesurer le pH en utilisant le pH mètre calibré. Pour cela plonger l'électrode dans le surnageant. La lecture de pH se fait après la stabilisation de la valeur.

5.4.3. Température

A l'aide d'un thermomètre on mesure la température du sol et l'eau.

5.5. Taux de biodégradation

Pour déterminer le taux de biodégradation, les films de PHBV et de PVC ont été retiré du sol ou de l'eau, rincé avec l'eau distillée pour éliminer toutes les particules résiduelles, puis laissé à une température ambiante pendant 24h.

Avant de mesurer le poids les films sont placés dans un dessiccateur pendant 1h jusqu'à atteindre le poids constant.

Le pourcentage de dégradation a été calculé en fonction de la perte de poids en utilisant l'équation suivante (Yew et al, 2006) :

$$\text{Dégradation \%} = [(W1 - W2) / W1] \times 100$$

W1 : Poids initiale du film.

W2 : Poids de film après la biodégradation.

5.6. Détermination de la charge microbienne

Préparation des suspensions dilutions

Pour le sol les prélèvements ont été effectués à partir du sol qui se trouve sur la surface des films, et pour les prélèvements d'eau l'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'un flacon stérile à proximité des films.

- Déposer sur un portoir une série de (6) tubes stériles et numérotés de (01) à (06) et Chaque tube contient (9ml) d'eau distillée stérile.
- La préparation de la solution mère (SM): Peser (10g) de sol tamisé ou (10ml) d'eau puis homogénéiser avec 90 ml d'eau distillé stérile, le mélange est soumis à une agitation puis laissé décanter c'est la dilution 1/10.
- Transférer (1ml) à partir de la (SM) et verser dans le (1^{er}) tube contenant déjà (9ml) d'eau distillé stérile, il s'agit la suspension-dilution (10^{-2}); agiter parfaitement et recommencer l'opération pour le reste des tubes jusqu'à avoir la suspension dilution (10^{-7})



Figure 10 : Les dilutions

La technique de dénombrement se fait par numération classique sur milieu solide. Un volume de (0.1ml) des différentes dilutions a été étalé à l'aide d'un râteau sur la surface d'un milieu gélosé (gélose nutritive) à raison de deux boites par dilution.

Les boites de Pétriensemencées sont incubées à 30°C. Le nombre de colonies apparu correspond au nombre des bactéries dans le volume analysé. On prend en considération les boites de 30 à 300 colonies.

Le nombre total des bactéries est calculé par le nombre d'UFC (Colony Forming Unit) multiplié par le volumeensemencé et l'ensemble est divisé par la dilution dans laquelle le nombre d'UFC est calculé.

Ou bien le calcul se fait par l'utilisation de la formule suivante:

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d} \times \frac{1}{V}$$

ΣC: Somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de 2 dilutions successives.

V: Volume de l'inoculum ensemencé en ml.

n1: Nombre de boîtes retenues dans la première dilution

n2: Nombre de boîtes retenues dans la deuxième dilution

d: Première dilution retenue

5.7. Isolement et purification des souches

Après numération, les colonies bien isolées sont purifiées par repiquage successif sur gélose nutritive stérile. Les souches sélectionnées sont ensuite conservées sur gélose en tube incliné à une température de 4°C.

5.8. Criblage des souches capables de dégrader le PHBV

Les souches sélectionnées vont subir un criblage sur la base de leurs capacités de dégrader le PHBV sur milieu synthétique par la technique des zones claires décrite par (**Augusta et al, 1993**).

Le milieu synthétique utilisé pour tester les bactéries isolées et purifiées, contient (par litre) les sels minéraux suivant: KH₂PO₄, 0.7 g; K₂HPO₄, 0.7 g; MgSO₄. 7H₂O, 0.7 g; NH₄NO₃, 1.0 g; NaCl, 0.005 g; FeSO₄. 7H₂O, 0.002g; ZnSO₄. 7H₂O, 0.002g; MnSO₄, 0.001 g; agar-agar, 20 g et 2ml de la solution trace élément (voir l'annexe 03) la composition selon (**Drews, 1973**). Le pH a été ajusté à 7.0

Préparation des boîtes de Pétri

Les boîtes de Pétri sont remplies de deux couches de milieu solide. La couche inférieure contient (15 ml) du milieu synthétique décrit auparavant, La couche supérieure contenait (10 ml) de la suspension de polymère. Le polymère ou le PHBV était la seule source de carbone pour le cycle de vie des micro-organismes.

Suspension du polymère : le milieu de la suspension polymère a été préparé par un mélange de 3 g de PHBV en poudre avec 14 g d'agar-agar dilué dans 1 litre d'eau distillée.

Inoculation des boîtes préparées

Les souches à tester ont été ensemencé sur la gélose à deux couches par la technique de spot.

Mesure de la zone claire de dégradation

Les zones de dégradation du polymère par les micro-organismes testés capables de métaboliser le PHBV, apparait claire sur la surface de la gélose. La mesure du diamètre de dégradation se fait avec un pied à coulisse au moins une fois par jour. Des zones distinctes pourraient être estimées en fractions de millimètres.

5.9. Identification des souches capables de dégrader le PHBV

Les souches marquées comme étant capables de dégrader le PHBV vont subir une série des tests d'identification classique basé sur l'aspect macroscopique et microscopique, certains tests biochimiques et galeries API.

5.9.1. Etude macroscopique

L'observation macroscopique permet de décrire les colonies bactériennes sur gélose pour révéler ; la forme, la taille, et la couleur des colonies.

5.9.2. Etude microscopique

Une observation microscopique des bactéries à l'état frais, pour voir leur mobilité a été réalisé.

Une coloration de Gram a été effectuée pour chaque souche afin de vérifier la pureté des isolats et ainsi la taille, la forme, le mode de regroupement, type de Gram et une éventuelle possession d'une spore.

5.9.3. Test biochimique

Les réactions biochimiques sont très importantes dans l'identification des isolats bactériens ; cette identification basée sur la présence de certains enzymes produits par les bactéries. (Mihaela et al., 2019).

5.9.3.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, elle décompose l'eau oxygénée en eau et oxygène, La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé.

La technique consiste à mettre sur une lame une colonie émulsionnée dans une goutte d'eau oxygénée 10 volumes. . (Leyral et Vierling., 2007).



5.9.3.2. Test d'oxydase

L'oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. On dépose sur une lame un disque "Ox" qui sera imbibé avec une goutte d'eau distillée, puis prélever une quantité de culture de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque. Pour une oxydase positive, on observe une couleur violette sur le disque, qui vire après au noir. (Joffin et Leyral , 2006) .

5.9.3.3. Mannitol - mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement se fait par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se manifeste par un virage du milieu au jaune après 24h d'incubation à 30°C. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement. (Gerhardt et al., 1994).

5.9.3.4. Milieux sélectifs

Le King A et King B sont deux milieux sélectifs, destinés à l'isolement et la différenciation des *Pseudomonas* fluorescents (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) grâce à la production de pigments spécifiques. . (Guergouri, 2010) .

5.9.3.5. Galeries API

Les galeries API ou également appelées galeries de tests biochimiques miniaturisés se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat déshydratés défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment ; les réactions produites pendant la période d'incubation de 24 heures à 30°C se traduisent par des virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique. (Aissaoui, 2013).

Il y a plusieurs types des galeries API on a comme des exemples :

API 20 N est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *lavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.).

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*.

API 20 Strep est un système standardisé, Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Le système API 20 A permet de l'identification biochimique des bactéries anaérobies.

CHAPITRE II

RESULTAT

ET

DISCUSSION

1. Etude de la biodégradation des PHBV

Pour réduire l'impact environnemental négatif du plastique pétrochimique ; il faut absolument investir dans la création des nouveaux matériaux inoffensifs pour l'écosystème, dans l'idéal, du plastique qui seraient biodégradables en conditions naturelles, dans les sols et les milieux aquatiques (mers et rivières).

Pour cela, les polymères biodégradables essayent de prendre sa place dans le marchés dans un avenir proche, il y aura une production abondante des bio polymères, ce qui nécessite la présence d'une base des données des microorganismes capables de dégrader les différents types des polymères le plus rapidement possible. Le processus de biodégradation est une activité biologique des organismes vivants pour décomposer la structure complexe des biopolymers, exemple le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) en produits non toxiques et de poids moléculaire inférieur. La dégradation de PHBV dans le milieu naturel est influencée par la composition du film préparé, les caractéristiques physicochimiques du milieu et aussi la charge microbienne.

En face de cette problématique, notre travail a été réalisé. Pour cela une étude de la biodégradation des films de PHBV et de PVC enfouit dans le sol ou émergé dans l'eau a été effectué, ainsi la charge microbienne à proximité de ces films a été déterminé.

A cause de la pandémie du COVID- 19 qui a touché le monde entier, quelques étapes seulement ont été réalisé par contre la plupart ont été traité et discuté dans ce document sur la base des recherches déjà effectuées.

1.1. Taux de biodégradation des films de PHBV et PVC

La méthode de la mesure de perte de poids des films enfouit dans le sol ou émerger dans l'eau est fréquemment utilisée par plusieurs chercheurs pour évaluer le taux de biodégradation.

Une étude réalisé par **Volova et al., (2010)** sur la biodégradation des polyhydroxyalkanoates (PHAs) dans les eaux côtières tropicales en mer de Chine méridionale pendant une durée d'immersion dans l'eau de 160 jours. L'étude a été organisé en suivant les changements des propriétés du milieu et des films de PHA chaque 20 jour.

Au cours des 80 premiers jours, il a été remarqué que la masse des échantillons était stable, la dégradation est survenue entre les 80 et les 160 jours d'émergence.

On peut dire que, les premiers jours d'émergence du polymère, les micro-organismes se fixe à la surface des films, puis c'est une phase d'adaptation à la composition monomérique.

La biodégradation des thermoplastiques comme le polychlorure de vinyle (PVC) dans le milieu naturel est très difficile et nécessite des centaines d'années, ainsi que la biodégradation ne fonctionne que sur les produits ou bien les substances a base biologique. (Bemmami et Tchouar, 2017).

Une ancienne étude publiée en 1993 par Mergaert *et al*, indique qu'une large gamme des micro-organismes capables de dégrader le P(3HB) et son copolymère PHBV avec une teneur de 10% (HV) dans cinq différents sols dans des conditions de laboratoire (*in-vitro*).

La surface des deux échantillons de polymères dans le sol est devenue mate initialement puis progressivement plus rugueux avec le temps d'incubation. L'estimation de la dégradation est donnée par la perte de poids.

La figure N° 11 donne le taux de perte de poids de P (3HB) et P (3HB-co-10% 3HV) dans différents sols à différentes températures.

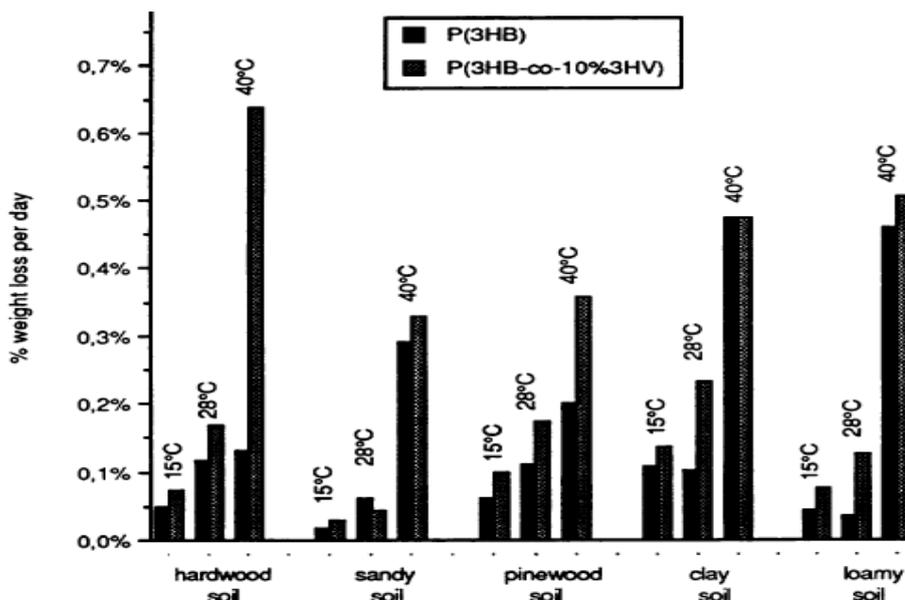


Figure N 11 : Taux de perte de poids des éprouvettes de P (3HB) et P (3HB-co-10% 3HV) incubées dans différents sols à différentes températures.

Cette figure montre que, tous les échantillons de P(3HB) et P (3HB-co-10% 3HV) subissent une biodégradation, mais la vitesse de la perte de poids est variable selon la température d'incubation, le type de sol et la composition des bioplastiques. Les meilleurs taux de perte de poids des échantillons a été marqué à des températures incubation de 40°C.

Selon la littérature la biodégradation d'un polymère est provoquée essentiellement par les micro-organismes ; mais d'autre part il y a l'intervention des paramètres abiotiques tels que l'humidité, la température, présence ou l'absence d'oxygène, le pH, la salinité et la présence des différents nutriments, ils sont responsables de la dégradation thermique, hydrolyse chimique, photo-dégradation... (**van der Zee, 2005**).

La température peut contrôler le taux de dégradation de PHBV directement car elle l'influence les micro-organismes qui dégrade le PHBV, spécifiquement les enzymes sécrétées par ces micro-organismes.

1.2. Aspect visuelle des films

L'observation visuelles des films avant et après l'enfouissement dans le sol ou émergement dans l'eau peut être aussi un critère d'évaluation de la biodégradation.

Dans cette étude l'observation des films a été réalisé après seulement 40 jours d'exposition à l'attaque biologique dans des conditions environnementales.

Après le temps d'enfouissement de 40 jours pour le film de PHBV, il été remarqué une diminution de l'épaisseur par rapport à l'épaisseur initiale et ainsi des érosions remarquables, qui signifie la biodégradation. Et pour les films émerger dans l'eau presque aucune remarque.

Ces observations sont réalisées dans une durée de temps très courte pour une évaluation significative de la biodégradation. Une période plus longue sera meilleure pour avoir plus d'information sur le changement des films soit dans le sol ou dans l'eau.

<p>Sol</p>	<p>PHBV avant</p> 	<p>PHBV après</p> 
<p>Eau</p>		
<p>Sol</p>	<p>PVC avant</p> 	

Tableau 3 : Films de PHBV avant et après l'enfouissement et émergement dans l'eau

La dégradation de Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) PHBV dans le sol a été étudiée par (Shah *et al.*, (2010)). Il a étudié le comportement et les caractéristiques des micro-organismes qui se trouvent à la surface de film après 120 jours d'enfouissement dans le sol.

La figure N° 12 présente des dommages excessifs qui indiquent la biodégradation de film de PHBV selon **Shah *et al.*, (2010)**, et la figure N° 13 montre la biodégradation des films de PHA après émergence dans l'eau selon **Volova *et al.*, (2010)**.

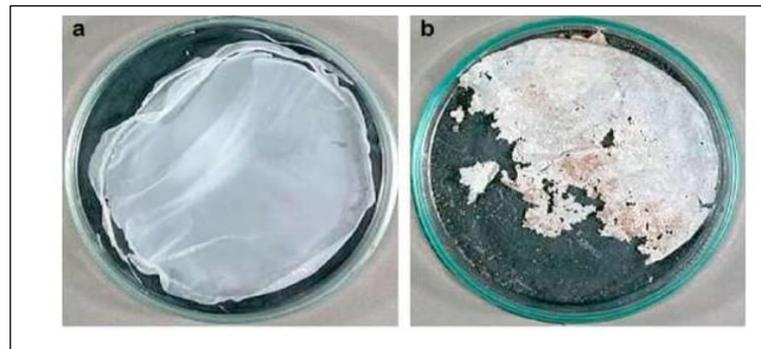


Figure N° 12 : Dégradation du film de PHBV. (a) avant l'enfouissement dans le sol, (b) après 120 jours d'enfouissement dans sol.

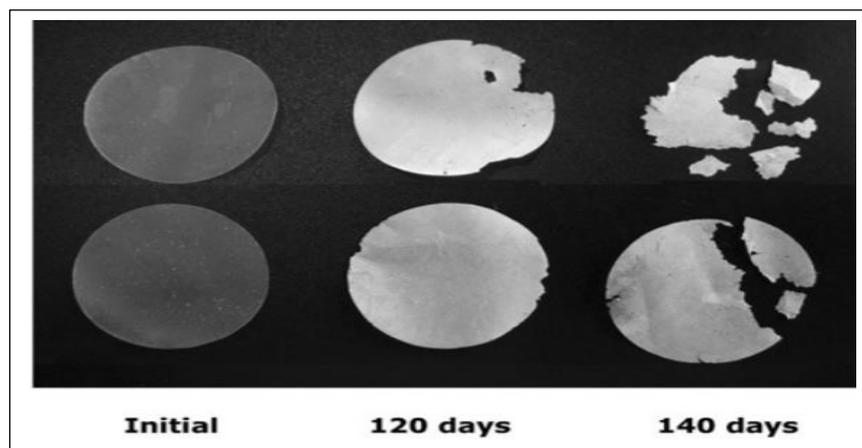


Figure N° 13 : Films de PHA après différentes périodes (jours) d'exposition marine

La dégradation bactérienne des films de poly (3-hydroxybutyrate) et de son copolymère poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). D'après la figure N° 14 le changement morphologique est clair avant et après contacte des films avec la souche *Nocardiosis aegyptia*. (**Ghanem *et al.*, 2005**).

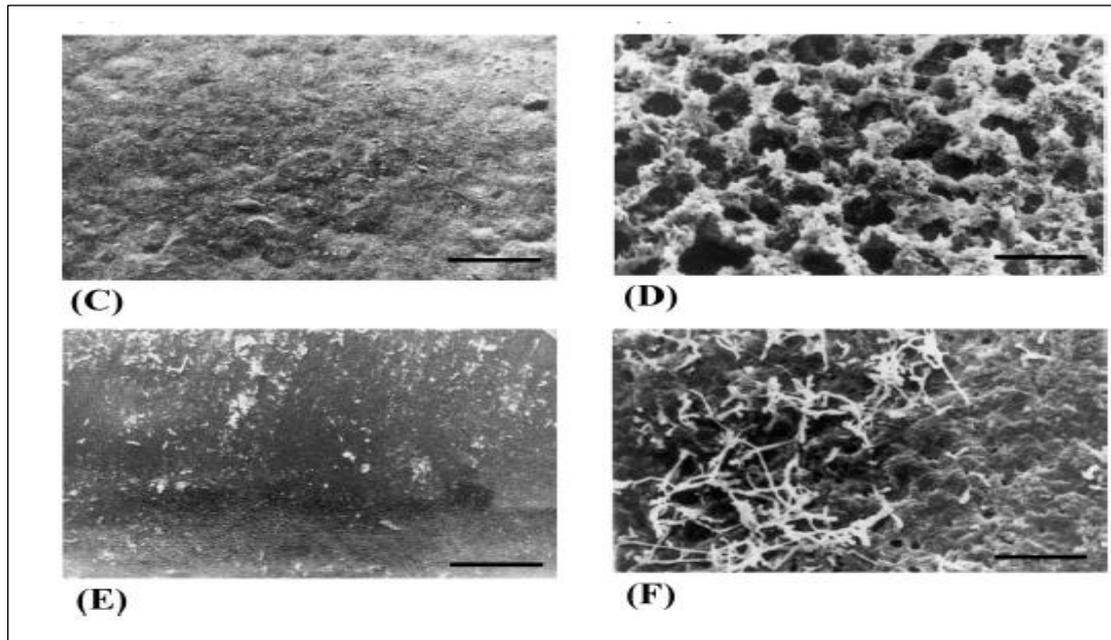


Figure N° 14 : (C) PHB-co-10%HV, (E) PHB-co-20%HV avant l'exposition à la dégradation bactérienne. (D) PHB-co-10% HV, (F) PHB-co-20% HV après l'exposition de surfaces à *N. aegyptia* pendant 25 jours. (10 micromètre).

Les micro-organismes peuvent sécréter des enzymes extracellulaires pour solubiliser la surface des films de PHBV, les produits de dégradation solubles sont ensuite absorbés par la paroi cellulaire et métabolisés. (Hermida *et al.*, 2009).

2. Les souches bactériennes qui dégradent les PHAs

La biodégradation environnementale des polymères 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 des micro-organismes pouvant dégrader le plastique sont nombreuses.

Plusieurs micro-organismes isolés à partir des différents habitats biologiques (sol, eaux douces ou marines, boues...) ont pu être identifiés pour leurs capacités de dégrader les polymères naturels. Les techniques d'identification ainsi que les critères de classification mis à la disposition des microbiologistes évoluent sans cesse.

Des nombreuses études ont été menées sur la biodégradation des PHBV en milieu terrestre et aquatique et des nombreux micro-organismes ont été caractérisés comme étant capables de dégrader le PHBV.

Selon une étude réalisée par Khan *et al.*, (2002), qui a montré qu'il y a une série de souches bactériennes qui dégradent le PHB et le PHBV dans le sol, parmi ces

souches, celles du genre *Bacillus*, *Streptomyces* et les espèces *Acidovorax facilis* et *Variovorax paradoxes*. D'autres bactéries ont été isolées à partir des eaux usées des usines de traitement sont identifiées également comme étant capables de dégrader les PHAs notamment les *Protéobactéries* et surtout les espèces qui appartiennent aux genres *Acidovorax*, *Comamonas*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* (**Abou-Zeid et al., 2001**).

La communauté microbienne, d'une autre zone d'étude de la dégradation des PHAs dans le sol était dominée surtout par les genres bactériens *Burkholderia*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Mycobacterium* (**Boyandin et al., 2013**).

L'étude menée par **Volova et al., (2010)** sur la biodégradation des PHA dans les eaux côtières tropicales de Chine, a montré par l'analyse des micro-organismes qui ont formé des biofilms sur des échantillons de PHA incubés dans l'eau de mer, une grande variété de bactéries hétérotrophes et des microflore fongiques. Cependant, seules quelques espèces se sont révélées avoir une activité PHA-dépolymérase et de pouvoir croître en utilisant le PHA comme seule source de carbone et d'énergie. Cette étude a dévoilé par la technique des zones claires et sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S que les souches d'*Enterobacter sp.* (4 souches), *Bacillus sp.* et *Gracilibacillus sp.* sont capables d'utiliser le PHA comme seule source de carbone.



Figure N° 15 : Formation des zones claires sur milieu synthétique par l'activité de l'enzyme dépolymérase des bactéries dégradant le PHA.

Shah et al., (2007), ont réalisé aussi une étude sur la capacité de certains microorganismes isolés à partir des boues d'épuration de produire une PHA-

dépolymérase par la méthode des zones claires. Ces microorganismes ont été identifiées il s'agit de ; *Micrococcus sp. AF2*, *Bacillus sp. AF3*, et *Bacillus sp. AF10*.

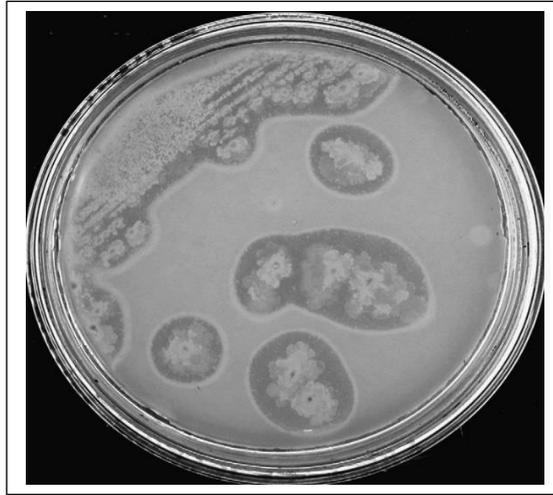


Figure N° 16 : Colonies microbiennes forment des zones claires sur une plaque de gélose minimale.

(**Ghanem et al, 2005**) ont isolé et identifié la souche *Nocardopsis aegyptia* à partir de l'eau de mer. Cette bactérie a été caractérisée comme étant capable d'assimiler le copolymère PHBV. Il a été aussi remarqué que la dégradation de PHBV à raison de 20% d'HB est plus rapide que le PHBV à 10% d'HB.

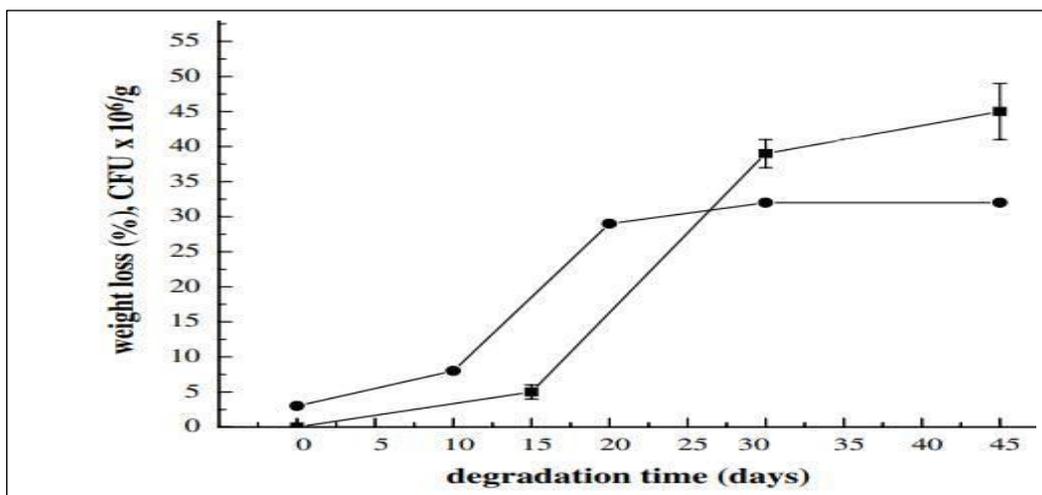


Figure N° 17 : Perte de poids relative des échantillons de PHBV (■) et croissance microbienne (●) en fonction du temps de dégradation.

La courbe N° 17 montre que le taux de biodégradation de film de PHBV est marqué par la perte de poids et aussi par la croissance microbienne de la souche *Streptomyces*.

omiyaensis SSM 5670 en présence du PHBV. Cela indique que la bactérie *S. omiyaensis* utilise le copolymère comme source de carbone pour sa croissance et son métabolisme. **(Hermida et al., 2009).**

En parallèle **(Leathers et al, 2000)** confirme que la souche *Pseudoalteromonas sp. NRRL B-30083* capable de dégrader efficacement le PHBV. Cette bactérie mobile à Gram négatif, a été isolé en tant qu'organisme prédominant dégradant le PHBV. Elle est ainsi capable de produire des zones claires distinctes sur un milieu solide contenant du PHBV comme unique source de carbone.

Akbar et al., (2013) ont isolé une souche bactérienne à partir d'un échantillon de boue d'épuration capable de dégrader le PHBV. Après une identification phénotypique et séquençage du gène ARNr 16S il s'agit de la souche *Streptomyces sp. AF-111*

La souche *AF-111* est une bactérie filamenteuse aérobie à Gram positif qui produit des hyphes végétatifs bien développés (entre 0,5 et 2,0 μ de diamètre). La couleur de la colonie est grise avec des mycéliums aériens sur la gélose nutritive. Elle peut croître à différentes températures (30–65 °C) et pH (4-9), mais la température et optimale est de 45 °C et le pH optimale de 7.0.

Une étude réalisée par **Feng et al., (2004)** a montré que plusieurs types de PHBV par des différents teneur en unités HV peuvent être dégradés par *R. pickettii T1* et *Acidovorax sp. TP4*.

Une autre recherche réalisée par **Wang et al.,(2012)** montre que la souche *Acidovorax sp. HB01* capable de dégrader le PHBV. La souche *HB01* est une bactérie bacillaire à Gram positif, non mobile et à catalase positive. Elle était isolé d'un échantillon de boue activée,

Mergaert et al, (1993) ont réalisé une étude *in-vitro* sur la biodégradation du PHB et du PHBV dans cinq sols différents. Dans cette étude, 295 souches microbiennes dominantes sont capables de dégrader le P (3HB) et le copolymère de poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate), après identification, il a été trouvé 105 bactéries à Gram négatif, appartenant principalement à *Acidovorax facilis* et *Variovorax paradoxus*, 36 souches du genre *Bacillus*, 68 souches de *Streptomyces* et 86 souches de moisissure, appartenant à *Aspergillus fumigatus* et aux espèces au genre *Penicillium*.

Par rapport à toutes ces études on peut dire que le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) peut être dégradés par l'action d'une large gamme des micro-organismes dans différentes niches écologiques et sous différentes conditions.

Les microbes capables de synthétiser une PHA-dépolymérase peuvent utiliser ce polymère comme seule source de carbone et là on parle d'une biodégradation. (**Volova et al., 2013**).

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) peuvent être dégradés par de nombreux micro-organismes à l'aide de PHA dépolymérases intra ou extracellulaires. Les PHA dépolymérases sont très diverses dans la séquence et la spécificité du substrat.

Les dépolymérases intracellulaires hydrolysent un réservoir de carbone endogène, les granules de PHA natif, composé du polymère avec une couche superficielle des protéines et des phospholipides. Les PHA dépolymérases extracellulaires dégradent les granules extracellulaires dénaturés, partiellement cristallins et dépourvus de couche superficielle. Ainsi, selon leur substrat et leur état physique, les PHA-dépolymérases sont généralement regroupées en quatre familles : les dépolymérases PHA dégradant les granules intracellulaires natifs (dépolymérases PHAMCL et dépolymérases PHASCL) et les PHA dépolymérases dégradant les granules PHA extracellulaires dénaturés (dépolymérases dPHAMCL et dépolymères dPHASCL). (**Avella et al., 2009**).

L'activité de l'enzyme PHA-dépolymérase sur un film de PHA est affecté par plusieurs facteurs environnementaux. (**Vigneswari et al., 2015**).

CONCLUSION

et

perspectives

La production de plastique augmente chaque année en raison de leur utilisation intense dans différents domaines, le plastique est considéré comme un élément de base dans plusieurs champs d'application. La production énorme de cette matière dans ces dernières années provoque un effet indésirable sur l'environnement présenter dans le rejet aléatoire sur la terre dans les mers et les océans, ce qui menace la vie des animaux et aussi déforme l'aspect esthétique de l'environnement.

Dans ce scénario catastrophique il faut obligatoirement s'orienter vers d'autres types des plastiques biosourcés et biodégradables. Actuellement il y' a plusieurs types des bioplastiques produits à partir des diverses sources. Notre travail a eu pour objectif d'étudier la biodégradabilité d'un biopolymères issus de ressources renouvelables il s'agit du poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) qui est considéré comme un membre de la famille des PHAs.

Le PHBV est un copolymère composé de deux polymère le PHB et le PHV avec des proportions différentes, synthétisé par voie naturel par les bactéries, ou bien par voie industrielle, il possède des avantages intéressants comme la biodégradabilité et la biocompatibilité. Ce biopolymère se dégrade dans différents environnements sous l'action de différents micro-organismes comme les bactéries, algues et champignons, ces derniers possèdent un pack enzymatique pour dégrader le PHBV et l'utiliser comme une source de carbone et d'énergie.

D'après notre recherche on peut dire qu'il y' a plusieurs chercheurs dans le monde qui ont travaillé sur l'isolement et l'identification par des méthodes phénotypiques et génotypiques des souches bactériennes capables de dégrader les PHAs dans différents habitats ; sol, boues d'épuration, mers..., parmi elles *Pseudoalteromonas sp. NRRL B-3008* ; isolée d'une eau marine tropicale, la souche *Bacillus sp. AF3* isolée des boues d'épuration et *Variovorax paradoxus*, *Comamonas testosteron* isolées du sol, ces microorganismes ont été reconnu comme étant capable de dégrader le PHBV.

Ce travail peut être amélioré :

1. fait un enfouissement dans différentes types des sols dans notre pays. (in situ).
2. isoler et identifier le maximum des bactéries capables de dégrader le PHBV .
3. évaluer la charge microbienne de chaque sol.
4. classer les souches bactériennes à partir de leur dominance ou bien leur présence sur la surface le film .

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abou-Zeid D. M, Müller, R. J et Deckwer W. D.,2001.** Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *Journal of biotechnology*, 86(2), 113-126.
2. **Advisors A, de Wit W, Hamilton A, Scheer R, Stakes T et Allan S., 2019.** Pollution plastique : à qui la faute ? Identification des défaillances systémiques et présentation du scénario zéro plastique dans la nature en 2030. *Rapport WWF*. ISBN 978-2-940529-93-3
3. **Aissaoui N., 2013.** Étude de molécules antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrêmophile B1 isolée d'une sebkha d'EL Goléa (Algérie). Thèses de magister, Université de Tlemcen - Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers.
4. **Akbar S, Hasan F, Nadhman A, Khan S et Shah A. A., 2013.** Production and Purification of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Degrading Enzyme from *Streptomyces* sp. AF-111. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(4), 1109-1116.
5. **Altaee N, El-Hiti G. A, Fahdil A, Sudesh K et Yousif E., 2016.** Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *Springer Plus*, 5(1), 1-12.
6. **Amirouche C. H., 2018.** Etude des mélanges PHBV/PBS et des mélanges hybrides PHBV/PBS/sépiolite : Préparation, Caractérisation physico-mécanique et Durabilité. Thèse de doctorat, l'Université Bretagne Sud.
7. **Anais G., 2017.** Compréhension des mécanismes de biodétérioration des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement : étude expérimentale et modélisation. Thèse de doctorat, l'Université Paris-Est.
8. **Augusta J, Miiller R.J, Widdecke H., 1993.** A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Applied Microbiology biotechnology*
9. **Avella. M, Martucelli. E, Raimo. M., 2009.** spingner, examen des propreites des melanges et composites à base de copolymere de poly (3-hydroxy) butyrate (PHB) et de Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). *journal of science des matériaux*, _
10. **BEMMAMI K, TCHOUAR A.,2017.** **Conception** et Réalisation d'une Unité de Recyclage –Plastique. Mémoire de master, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen Faculté de Technologie

11. **Benmesli S., 2016.** Effet de la modification chimique du Caoutchouc Naturel sur les propriétés du Caoutchouc Naturel Thermoplastique. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas – Sétif-1-, Faculté de Technologie.
12. **Bewa H. (2005).** Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables note de synthèse I. Direction des Energies Renouvelables, des Réseaux et des Marchés Énergétiques. ADME.
13. **Boudali E. D et Sellam O., 2015.** Etude de la biodégradation de nanobiocomposite PHBV/ZnO dans un milieu compost. Mémoires de Master, Université A. MIRA – BEJAIA, Faculté de Technologie.
14. **Cantor K, Watts P et Kutz, M, 2011.,** *Plastics Materials. Applied Plastics Engineering Handbook: Processing and Materials.*
15. **Da Silva, M. A., Vieira, M. G. A., Maçumoto, A. C. G., et Beppu, M. M., 2011.** Polyvinylchloride (PVC) and natural rubber films plasticized with a natural polymeric plasticizer obtained through polyesterification of rice fatty acid. *Polymer Testing*, 30(5), 478-484.
16. **Delarras C., 2007.** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.* Paris : Lavoisier.
17. **Deroiné M, César G, Le Duigou A, Davies P et Bruzard S., 2015.** Natural degradation and biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in liquid and solid marine environments. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 493-505.
18. **Drews G. (1973).** *Mikrobiologisches Praktikum.* Springer, Berlin Heidelberg New York.
19. **Feng L, Wang Y, Inagawa Y, Kasuya K, Saito T, Doi Y et Inoue Y., 2004.** Enzymatic degradation behavior of comonomer compositionally fractionated bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerases isolated from *Ralstonia pickettii T1* and *Acidovorax sp. TP4*. *Polymer degradation and stability*, 84(1), 95-104.
20. **Gerhardt P, Murray R. G. E, Wood W. A and Krieg N.R., 1994.** *Methods for General and Molecular Bacteriology.* Washington DC, ASM, USA.
21. **Geyer R, Jambeck J. R et Law K. L., 2017.** Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3(7), e1700782.

22. **Ghanem N.B, Mabrouk M.E, Sabry S.A, El-Badan D.E. (2005).** Degradation of polyesters by a novel marine *Nocardiopsis aegyptia* sp. nov.: application of Plackett-Burman experimental design for the improvement of PHB depolymerase activity. *J Gen Appl Microbiol.*51(3):151-158.
23. **Guergouri I., 2010.**Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Thèses de Magistère, Université Mentouri de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
24. **Hermid A, Elida B, Yashchuk O, Miyazaki S. S., 2009.** Changes in the mechanical properties of compression moulded samples of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degraded by *Streptomyces omiyaensis* SSM 5670. *Polymer degradation and stability.* 94.2: 267-271.
25. **IRSST Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail,2011.** Méthodes de laboratoire, Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate.
26. **Joffin J.N and Leyral G.,2006.** Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et *CRDP d'Aquitaine*, France.
27. **Kennouche S., 2016.**Etude de la Morphologie de Nanobiocomposites de Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) (PHBV)/Nanotubes d'Halloysite et evaluation de leurs Performances. Thèse de doctorat, Université de Montpellier en cotutelle avec l'Université de Bejaia (Algérie).
28. **Khan S.T, Horiba Y, Yamamoto M, Hiraishi A., 2002.** Members of the family *Comamonadaceae* as primary poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Appl Environ Microbiol.* ;68(7) :3206-3214.
29. la production mondiale de plastique, www.planetoscope.com.
30. **Laurent G.,2013.** Plastiques biosourcés : étude de leur performance environnementale comparativement aux plastiques pétrochimiques. Université de Sherbrooke.

31. **Leathers T.D, Govind, N.S et Greene R.V.,2000.** Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a Tropical Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. NRRL B-30083. *Journal of Polymers and the Environment* 8, 119–124.
32. **Leyral G and Vierling E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques . *Wolters Kluwer*, France.
33. **Lezam S, Zerka N., 2015.** **Biodégradation** dans le sol de sacs oxobiodégradable à différents taux de stabilisant. Mémoire de Master, Université A. MIRA - Béjaïa -Faculté des Sciences Exactes.
34. **Maes E., 2009.** Résonance magnétique nucléaire. Université des Sciences et Technologie de Lille F-59655 Villeneuve d'Ascq.
35. **Mergaert J, Webb A, Anderson C, Wouters A et Swings J., 1993.** Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(10), 3233-3238.
36. **Mihaela D, Axel B, Monica L., 2019.** Manuel de microbiologie travaux pratiques - partie générale médecine générale, Edition française.
37. **Morgan D.,2014.** Étude du vieillissement de biopolymers en milieu marin. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Sud .
38. **Neha S., 2019.** **Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries.** *Academ J Polym Sci.*
39. **Saadi Z. (2008).** Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous-produit de dégradation. Etude de l'écotoxicité de ces polymères. *Thèse doctorat Univ du Maine- U.F.R. sciences et techniques.*
40. **Sanae E., 2015.** **Développement** des méthodes d'extraction des bioplastiques issues des boues papetières par les liquides ioniques. Rapport présenté à l'Université du Québec à Trois-Rivières.
41. **Shah A. A, Hasan F et Hameed A., 2010.** Degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a newly isolated *Actinomadura*

- sp.* AF-555, from soil. *International Biodeterioration et Biodegradation*, 64(4), 281-285.
42. **Shah A. A., Hasan F, Hameed A et Ahmed S., 2007.** Isolation and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading bacteria and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Bacillus sp.* AF3. *International biodeterioration et biodegradation*, 60(2), 109-115.
43. **Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., et Ahmed, S., 2007.** Isolation and characterisation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading actinomycetes and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Streptovorticillium kashmirensis* AF1. *Annals of microbiology*, 57(4), 583-588.
44. **Stéphane B, Pierre L, Magali L, Tatiana T., 2019.** Production « à façon » de polyhydroxyalcanoates : vers des polymères biodégradables aux propriétés contrôlées. Conference Paper.
45. **Traore B., 2018.** Elaboration et caractérisation d'une structure composite (sable et déchets plastiques recyclés) : amélioration de la résistance par des charges en argiles. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.
46. **Van der Zee, M., 2005.** Biodegradability of polymers: mechanisms and evaluation methods. In *Handbook of biodegradable polymers*. Rapra Technology.
47. **Vigneswari, S., Lee, T. S., Bhubalan, K., et Amirul, A. A., 2015.** Extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase by *Acidovorax sp.* DP5. *Enzyme research*, 2015.
48. **Wang Z, Gao J, Li L et Jiang H., 2012.** Purification and characterization of an extracellular poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) depolymerase from *Acidovorax sp.* HB01. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 2395-2402.
49. **Yew SB, Tang H, Sudesh K., 2006.** Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyrate films containing titanium dioxide. *Polym Degrad Stabil* 91:1800–1807

ANNEXES

Annexe 01

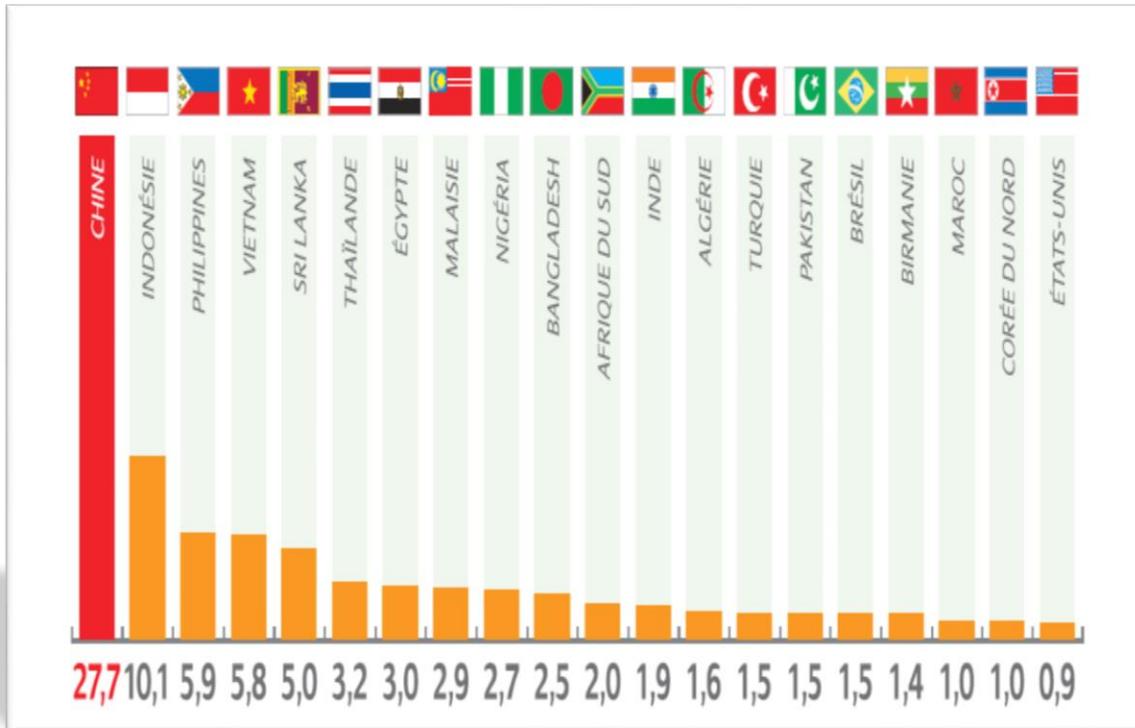


Figure 1 : Principaux pays émetteurs de déchets plastiques dans les océans en (%).

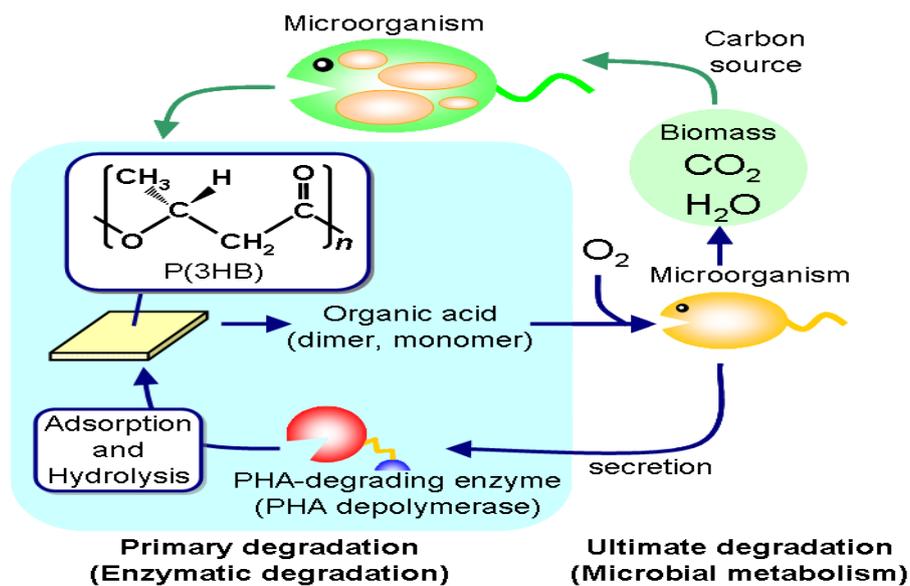
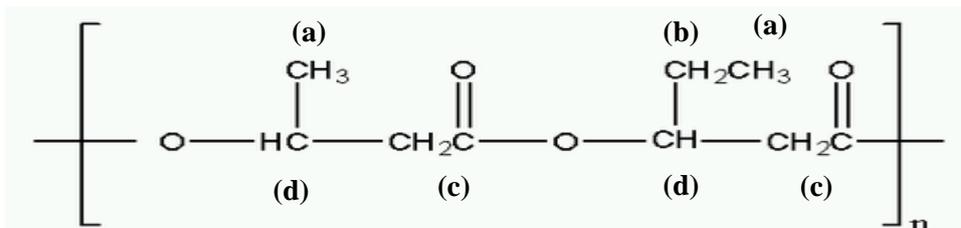


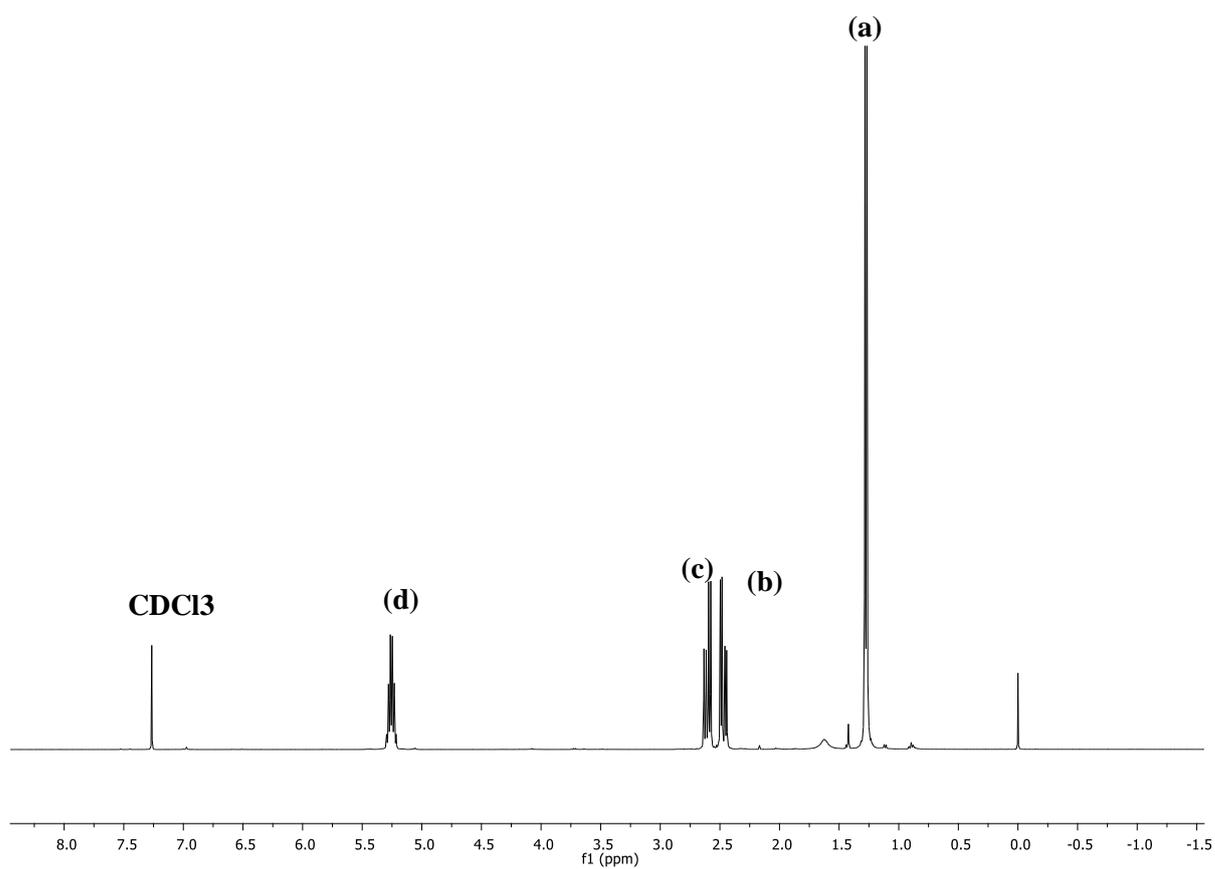
Figure 2 : Biosynthèse et biodégradation des PHAs dans l'environnement.

Annexe 02

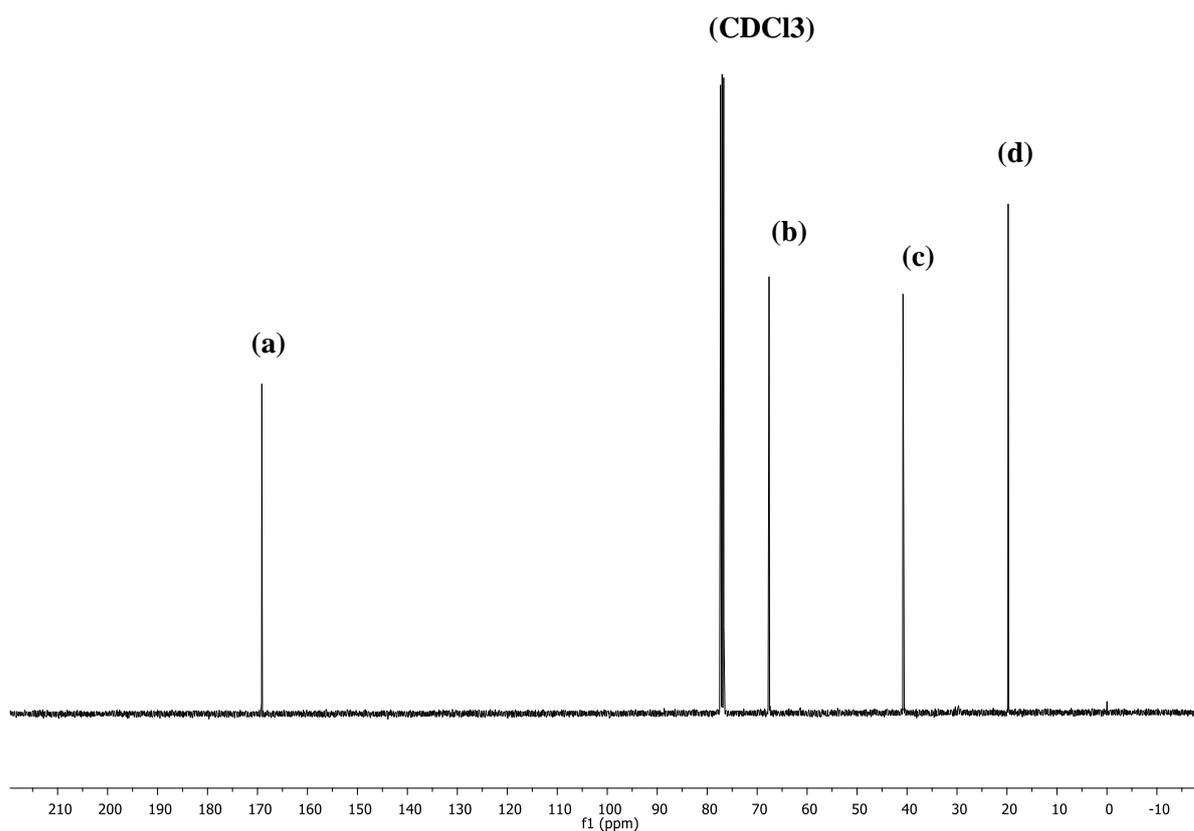
Spectres RMN du PHBV



Structure chimique du PHBV et la position des signaux proton (**a**, **b**, **c**, **d**)



Spectre RMN ^1H du PHBV solubilisé dans le CDCl_3 .

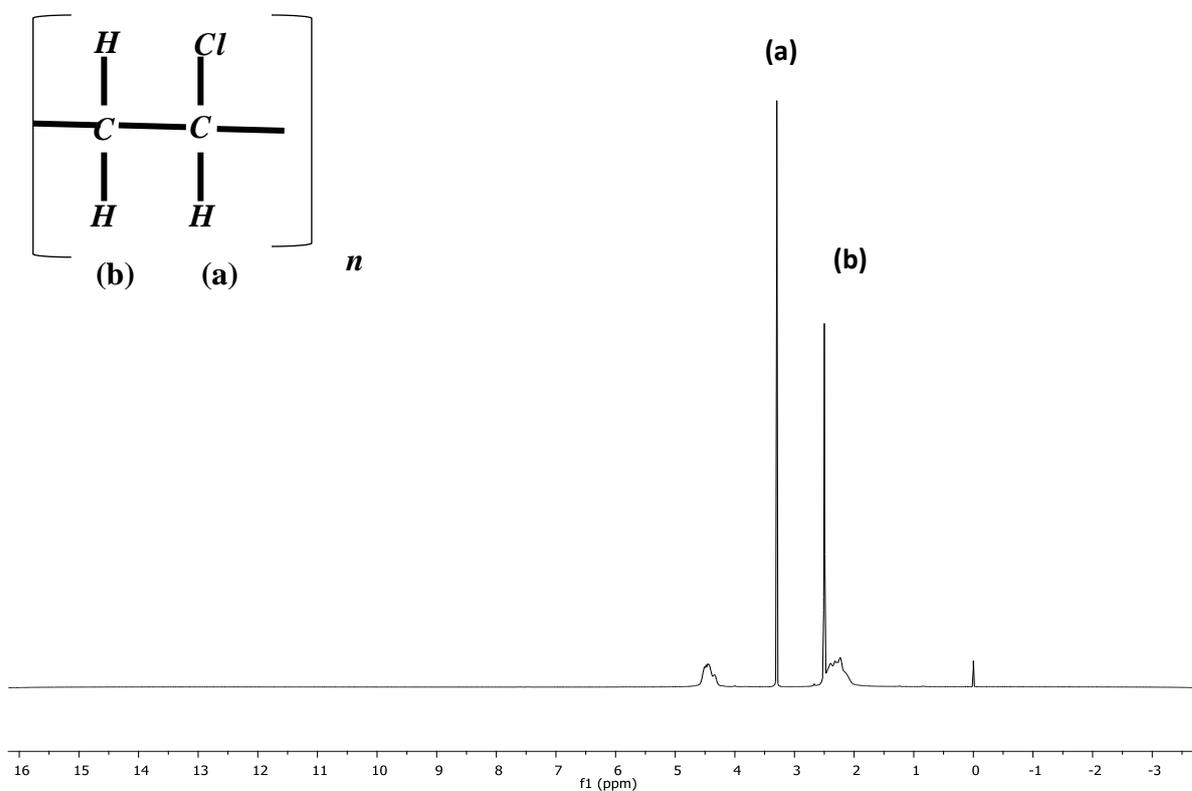
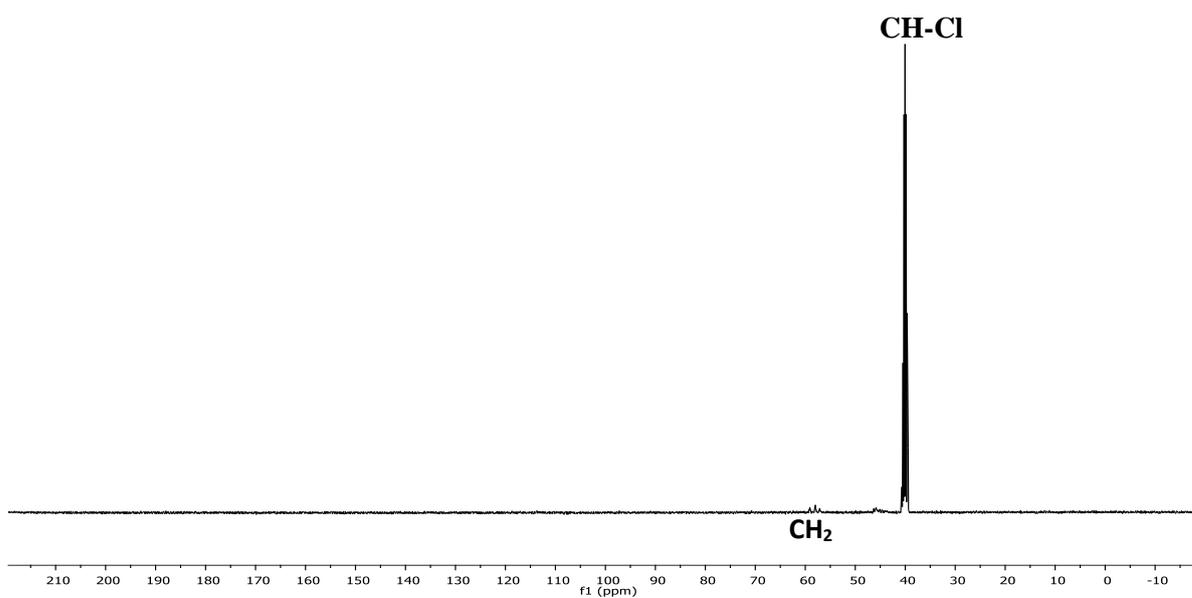


Spectre RMN ^{13}C du PHBV solubilisé dans le CDCl_3 .

Tableau : 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

1. Spectres RMN du PVC

Spectre RMN ^1H du PVC solubilisé dans le DMSO deutéré.Spectre RMN ^{13}C du PVC.

Annexe 03

- *Solution Traces éléments*

La composition de la solution traces éléments selon (**Drews et al, 1973**) qui entre dans la composition du milieu de synthétique utilisé dans le criblage de la biodégradation du PHBV est composé (par litre) :

Éthylènediamine tétra-acétate de fer	800mg;
SnC12·2H 0	0,5 mg
Mn C12·4H20	10 mg
H3 B0	3 mg
Co C12 • 6H20	4 mg
KBr	2 mg
Cu S04	1 mg
KJ	2mg
Na2Mo04 · 2H2 O	3 mg
BaC12	0,5 mg
Zn C12	2 mg
Li Cl	0,5 mg
Eau distillée	1000 ml

Annexe 04

- *Coloration de Gram*

La coloration de Gram est une technique mise au point par le médecin danois Gram en 1884, c'est une méthode importante très utilisée en microbiologie pour différencier entre deux grand groupe bactériens selon la composition chimique de la paroi: les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les étapes de la coloration est comme suit :

Une lame propre est utilisée. La lame est identifiée à l'aide d'un crayon de papier

1. Un frottis mince est confectionné sur la lame en verre. Il est séché à l'air libre
2. Lorsque la lame est complètement séchée, faire la fixation, en tenant la lame contre l'incinérateur ;
3. Le Violet de Gentiane est mis sur le frottis pendant 30 à 40 secondes
4. Le surplus de la solution de violet de Gentiane est versé et la lame est rincée avec un jet d'eau faible. L'excès d'eau est égoutté à l'aide d'un papier buvard
5. La Solution de Lugol est mise pendant 30 à 40 secondes ;
6. La solution de Lugol est versée sur la lame puis rincée avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
7. La solution de décolorant alcool est versé goutte à goutte sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;
8. La lame est rincée immédiatement avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau;
9. La solution de safranine (ou la fuchsine basique) est mise sur le frottis pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;
10. La safranine est versée et la lame est rincée en la tenant sous un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau. Prudemment, la lame est séchée avec d'un papier buvard.

Les bactéries **Gram positives** sont coloré en **Violet** et la bactéries Gram négatives sont coloré en **Rose**.

Résumé

Les plastiques pétrochimiques synthétisés massivement depuis une cinquantaine d'années, mettront des décennies, voire des siècles pour se dégrader, c'est une véritable « bombe à retardement ». Les plastiques accumulés auront alors toutes les facilités pour se répandre très largement et rapidement non seulement dans notre environnement mais aussi dans tous les organismes vivants, y compris le nôtre, avec des effets potentiellement redoutables très mal évalués à l'heure actuelle. Le Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) représente une alternative intéressante.

Notre étude a pour objectif, d'isoler les micro-organismes capables de dégrader le PHBV dans différents milieux (eau et sol), le PVC a été utilisé comme témoin.

Les résultats des recherches effectuées sur la même thématique, montrent que les PHAs et particulièrement le PHBV sont biodégradables dans la nature par les micro-organismes.

Les bactéries identifiées ont été dominées surtout par les espèces des genres *Bacillus*, *Streptomyces*, *Acidovorax*, *Variovorax*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Mycobacterium*, *Comamonas*, *Aeromonas* et *Pseudomonas*.

Par contre le PVC qui appartient aux thermoplastiques est reconnue comme non biodégradable.

Mots clés : Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), Le polychlorure de vinyle (PVC), biodégradation, microorganismes.

Abstract :

Petrochemical plastics synthesized massively since fifty years and it will take decades or even centuries to fade, it is a real " time bomb". The accumulated plastics will then have all the facilities to spread : widely and fast , not only in our environment but also in all the living organisms including our own , with potentially dreaded effects that are highly undervalued today . Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) represents an interesting alternative.

Our study's goal , is to isolate the microorganisms that has the ability of degrading PHBV in different spaces (water and soil) and PVC was used as a witness . The results of researches on the same theme show that , PHAs and particularly PHBV , are biodegradable in the nature by microorganisms . The bacteria identified were dominated mainly by the species of sorts Bacillus , Streptomyces , Acidovorax , Variovorax , Burkholderia , Cupriavidus , Mycobacterium , Comamonas , Aeromonas and Pseudomonas .

On the other side , PVC which belongs to thermoplastics is recognized as non-biodegradable .

Keywords : Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) , Polyvinylchloride (PVC) , Biodegradation , Microorganisms

