

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

- LARBI DENIA
- ZOUBIDA HAKIMA
- MEGHNEM YAKOUTA

Thème

Identification des micro-organismes intervenant dans la biodégradation du poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) dans le sol.

Soutenu le :

Jury :

Grade

Président : Dr. YEZLI W

« MCA »

Encadrant : Dr. MEDJBER N

« MCB »

Examinatrice : Dr. BOUBAKEUR B

« MCB »

Année universitaire 2020-2021

Résumé

Les plastiques biosourcés produits à partir de ressources renouvelables constituent aujourd'hui un enjeu majeur, parmi ces plastiques le poly (hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) qui est un biopolymère renouvelable biodégradable et non toxique, il peut constituer une solution alternative prometteuse pour remplacer les matériaux conventionnels synthétisés à base de pétrole.

Notre étude a pour objectif d'isoler et d'identifier les micro-organismes qui peuvent dégrader le PHBV dans le sol, le polychlorure de vinyle (PVC) a été utilisé comme témoin.

Le PHBV a subi une biodégradation presque totale après une année d'enfouissement, en revanche aucun changement visuel n'a été remarqué pour le PVC.

Dix souches bactériennes et trois espèces fongiques ont été isolées à partir du sol et identifiées, il s'agit des espèces du genre *Bacillus* et *Staphylococcus* pour la microflore bactérienne, et pour les champignons, deux souches du genre *Penicillium* et une souche du genre *Rhizopus*. Après une identification probabiliste par la matrice de **Michel Cavalla**, les cinq souches sélectionnées du genre *Bacillus* reconnu par leur capacité de dégrader le PHBV dans le sol sont (*B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis* et *B. macerans*).

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

Abstract

Biobased plastics produced from renewable resources today constitute a major issue, among these plastics, poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) which is a biodegradable and non-toxic renewable polymer; it can constitute a promising alternative solution to replace conventional materials synthesized from petroleum.

Our study aims to isolate and identify the microorganisms that can degrade PHBV in soil; PVC was used as a control.

PHBV underwent almost complete biodegradation after a year of burial. On the other hand, no visual change was noticed for the polyvinyl chloride (PVC).

Ten bacterial strains and three fungal species were isolated from the soil and identified, these are species of the genus *Bacillus* and *Staphylococcus* for the bacterial microflora, and for fungi, two strains of genus *Penicillium* and one strain of genus *Rhizopus*. Following a probabilistic identification by the **Michel Cavalla** matrix, the five selected strains of the genus *Bacillus* recognized by their ability to degrade PHBV in the soil are (*B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis* et *B. macerans*).

Key words: Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), Polyvinyl chloride (PVC), microorganisms, Biodegradation.

ملخص:

تعتبر المواد البلاستيكية المستخلصة من مصادر متجددة قضية رئيسية اليوم ، من بين هذه المواد البلاستيكية بولي (3- هيدروكسي بوتيرات - كو-3- هيدروكسي فاليرات) (PHBV) وهو بوليمر حيوي متجدد قابل للتحلل الحيوي وغير سام ، يمكن أن يشكل حلا بديلا واعدلا لاستبدال المواد التقليدية المصنعة من البترول.

تهدف دراستنا إلى عزل وتحديد الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تحلل PHBV في التربة ، وقد تم استخدام بولي فينيل كلوريد (PVC) كعنصر تحكم .

تعرض PHBV لتحلل شبه كامل، بعد عام من الدفن في التربة، من ناحية أخرى، لم يلاحظ أي تغيير بصري لـ

PVC.

تم عزل عشر سلالات بكتيرية وثلاثة أنواع من الفطريات من التربة وتم التعرف عليها وهي نوعان من جنس *Bacillus* و *Staphylococcus* للميكروفلورا الجرثومية ، وبالنسبة للفطريات سلالتان من جنس *Penicillium* وسلالة من جنس *Rhizopus*. بعد تحديد احتمالي بواسطة مصفوفة ميشيل كافالا فإن السلالات الخمس المختارة من جنس *Bacillus* المعترف به بواسطة PHBV في التربة هي

(*B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. lichemiformis* et *B. macerans*) .

الكلمات المفتاحية:

بولي (3- هيدروكسي بوتيرات - كو-3- هيدروكسي فاليرات) (PHBV) ، بولي فينيل كلوريد (PVC) ، الكائنات الحية الدقيقة ، التحليل البيولوجي .

Remerciements



En premier lieu ; nous remercions **ALLAH** le tout puissant, le miséricordieux, qui nous a donné le courage, la santé et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nos vifs remerciements pour Dr. **MEDJBER.N** d'avoir accepté de diriger ce modeste travail et pour sa patience, présence et ses précieux conseils et ainsi sa gentillesse et son soutien

Nos sincères remerciements aux membres de jury Dr **YEZLI Wassim** et Dr **BOUBAKEUR Badra** pour avoir accepté de corriger et juger notre travail

Un grand merci pour Mr. **ALINEHARI** le chef de spécialité biotechnologie microbienne pour sa disponibilité et sa gentillesse, et tout l'ensemble des enseignants qui ont participés à notre formation de master.

Nos remerciements vont également à tous les techniciens de laboratoire, ainsi qu'à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

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
pendant la durée de mes études*

A mes frères Mohamed, Sofiane, Youcef

A mes sœurs et à tous mes amis

A tout la promo de biotechnologie microbienne 2020/2021

Denia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Mes très chers parents qui m'ont soutenue durant tout le parcours scolaire et universitaire. Que Dieu tout leur procure bonne santé et long vie.

Mes très Chers frères Belkacem, Mohamed

Mes chers sœur Fatima, Ratil

Mon oncle Djilali

Mes camarades de promotion Biotechnologie microbienne

Hakima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents qui m'encourage et me donne de la volonté pour avancer, je vous dédie ce travail sans vous je ne serais pas arrivé jusqu'à là.

A mes très chers sœurs Fatima et Fouzia

A mes frères Djilali et Adda je vous souhait tous le bonheur du monde

Tous mes cousins ainsi que ma belle-famille (khalti kheira, Nour El houda,

Hadj Ahmed, Abd al Raouf, Abd al Samed).

A mes chers amis Denia, Hakima

A tous mes autres amis

Sans oublier tout ma promotion 2020/2021

Yakouta

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....01

PARTIE EXPERIMENTAL

CHAPITRE 01 : MATERIEL ET METHODES

1. L'objectif de travail	06
2. Durée et lieu de travail.....	06
3. Matériel 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. Méthodes.....	10
5.1. Etude de la biodégradation	10
5.1.1. Prélèvement du sol.....	10
5.2. Etude des paramètres physico-chimiques.....	10
5.2.1. L'humidité.....	10
5.2.2. pH du sol.....	11
5.2.3. Température.....	11
5.3. Détermination de la charge microbienne	11
5.4. Isolement et purification des souches	13
5.5. Criblage des micro-organismes capables de dégrader le PHBV	13
5.5.1. Préparation des boites de pétri afin de faire le criblage.....	13
5.5.2. Emulsion du polymère.....	13
5.5.3. Ensemencement des boites de préparées.....	14
5.5.4. Lecture des résultats.....	14
5.6. Identification des micro-organismes capables de dégrader le PHBV	14
5.6.1. Etude macroscopique.....	14
5.6.2. Etude microscopique.....	14

5.6.3.	Tests biochimiques.....	15
5.6.3.1.	Recherche de catalase.....	15
5.6.3.2.	Test oxydase.....	15
5.6.3.3.	Mannitol-mobilité.....	15
5.6.3.4.	Galleries API.....	16

CHAPITRE 02 : RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Etude de la biodégradation du PHBV	19
1.1.	Aspect visuelles des films	19
1.2.	Paramètres physico-chimiques du sol	20
1.2.1.	Température	20
1.2.2.	pH	21
1.2.3.	l'humidité.....	21
2.	Détermination de la charge microbienne	21
3.	Identification des micro-organismes	22
3.1.	Identification des souches bactériennes	22
3.1.1.	Aspect macroscopique et microscopique	22
3.1.2.	Tests biochimiques	23
3.2.	Identification des souches fongiques	26
4.	Micro-organismes qui dégradent le PHBV	27
	CONCLUSION	32
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34
	ANNEXE	38

LISTE DES ABREVIATIONS

HB : Hydroxybutyrate

HV: Hydroxyvalérate

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

PHB: Poly3-hydroxyvalérate

PHA : Polyhydroxyalcanoates

PLA : poly (acide lactique)

PVC: polychlorure de vinyle

PE : Polyéthylènes

PP : polypropylène

PC : Polycarbonates

ICI: Société Imperial Chemical Industries

Tg: Transition de vitreuse

Tm: Température de fusion

UV: Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de PHBV	08
Figure 2 : Structure chimique de PVC	08
Figure 3 : Protocole expérimentale	09
Figure 4 : Zone de prélèvement	10
Figure 5 : Boîtes pétri contenant le milieu de culture	12
Figure 6 : Mannitol-Mobilité avant l'ensemencement	16
Figure 7 : Résultats de test mannitol-mobilité	24
Figure 8 : Probabilité des souches bactériennes	25

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Matériels et produits utilisés.....	06
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques de PHBV	07
Tableau 3 : Code des souches bactériennes et fongiques	14
Tableau 4 : Les films avant et après d'enfouissement.....	19
Tableau 5 : Les résultats d'analyse physico-chimiques et la charge microbiennes du sol.....	22
Tableau 6 : Aspect macroscopique et microscopique des souches bactériennes	23
Tableau 7 : Résultats des tests biochimiques.....	24
Tableau 8 : Résultats de test Api 20 E.....	25
Tableau 9 : Aspect macroscopique et microscopique des champignons.....	26
Tableau 10 : La croissance des espèces fongiques sur le milieu synthétique.....	28
Tableau 11 : La croissance des espèces bactériennes sur le milieu synthétique	28
Tableau 12 : Aspect microscopique des souches bactériennes après la coloration de Gram	40
Tableau 13 : Tableau de lecture de la Galerie Api 20 E.....	41
Tableau 14 : Résultats des Galeries Api 20 E	42

INTRODUCTION

Introduction

Au cours des 60 dernières années, les matériaux polymères, notamment le plastique, sont devenus les matériaux les plus attractifs (**Siracusa, 2019**), grâce à leur faible coût d'élaboration, leur polyvalence et leur durabilité. Le plastique est défini comme matière synthétique constituée de macromolécules obtenues par polymérisation ou polycondensation et qui peut être moulée ou modelée (**Gélinas, 2013**), qui sont largement utilisés dans différentes applications allant des bouteilles d'eau, des vêtements, des emballages alimentaires, matériels médicaux, produits électroniques, matériaux de construction, etc.

Les productions plastiques ont été multipliées par 20 depuis 1964, dans le monde, environ 311 millions de tonnes de plastique ont été produits en 2014 et devraient doubler dans environ 20 ans et peut-être quadrupler d'ici 2050 (**Okunola et al., 2019**).

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

Les thermodurcissables, ou duromères, prennent forme lorsqu'ils sont refroidis, mais à l'inverse des thermoplastiques, ne peuvent être remis en forme une seconde fois, l'opération étant irréversible. Ces duromères finissent par atteindre leur température de décomposition plutôt que de ramollir sous l'effet de la chaleur (**Gélinas, 2013**).

Les thermoplastiques sont des polymères solubles, fusibles et recyclables, ils représentent le plus grand tonnage en termes de production à cause de leur facilité de mise en œuvre et des faibles coûts. Ce sont principalement les plastiques traditionnels (le polychlorure de vinyle PVC, le polyéthylène PE, le polypropylène PP, le polyamide PA, les polycarbonates PC, etc.), (**Ben meziane et Djemaoune, 2014**).

Les élastomères sont des polymères qui ont des caractéristiques spécifiques, parmi elles ; une grande élasticité et un grand pouvoir amortissant. Ils peuvent être d'origine synthétique ou naturelle, le plus connu de ces polymères est le caoutchouc qui est utilisé dans la fabrication des pneumatiques (**Jérémie, 2009**).

La plupart des plastiques ne sont pas biodégradables, par exemple une bouteille de plastique peut persister dans la nature pendant 450 ans avant d'être entièrement dégradé (**Jérémie, 2009**). De nombreuses années d'élimination du plastique dans l'environnement conduit à divers problèmes. La Pollution de l'environnement par les déchets plastiques est maintenant largement reconnue comme un enjeu environnemental (**Okunola et al., 2019**).

Introduction

D'après les recherches disponibles actuellement, les océans contiennent aujourd'hui plus de 150 millions de tonnes de déchets plastiques, et les prévisions tablent sur les stocks de 250 millions de tonnes en 2025 (**Stéphane et al., 2019**).

Afin de palier à ces problèmes de pollution environnementale, plusieurs méthodes existent, tel que le recyclage des déchets plastiques. Cette méthode est un procédé de valorisation et réutilisation des polymères pour minimiser les déchets dans l'environnement. Puis le tri des déchets ils sont incinérés pour la reproduction de plastique (**Geyer et al., 2017**).

Une autre méthode a été développée par les scientifiques pour combattre la pollution, c'est la production des bioplastiques. Le suivi de la biodégradation pour résoudre les problèmes d'élimination de ces biomatériaux a été aussi étudié (**Nishida et Tokiwa, 1993**).

Les bioplastiques englobent toute une famille de polymères qui sont bio-sources comme les PHA (polyhydroxyalcanoates) (**Hijazi, 2014**).

La biodégradation est définie comme 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 (**Gu JD, 2003**) La biodégradation se décompose en trois étapes successives et /ou concomitantes :

La fragmentation ou la bio-détérioration des matériaux biodégradables avec combinaison entre les facteurs abiotiques (pH, température, humidité, aération, UV ...), dont les décomposeurs (vers de terre, insectes...) et aussi par l'action des 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**).

La bio-assimilation est définie comme le phénomène par lequel la (micro) faune et /ou (flore), constituants élémentaires de la biomasse, utilise un matériau comme nutriment. Les molécules ou les fragments de molécules sont incorporés par les voies métaboliques des micro-organismes.

Introduction

La minéralisation au cours de laquelle les composés assimilés sont minéralisés ; ils sont transformés par les micro-organismes en eau et en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies ou en eau et méthane dans des conditions anaérobies (**Saadi, 2008**).

Les bioplastiques ou biopolymères sont produits au départ de ressources renouvelables (amidon, sucres) soit via une voie chimique ou biotechnologique et ils sont biodégradables. Deux exemples bien connus sont le poly (acide lactique) ou PLA et les polyhydroxyalcanoates ou PHA (**Saadi, 2008**).

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) découverts par un microbiologiste français Maurice Lemoigne en 1927 (**Kennouche, 2016**). Ces polymères sont des polyesters naturels stockés par une large gamme de micro-organismes généralement dans des conditions de croissance déséquilibrées (**Bonartsev et al., 2007**). Ils s'accumulent dans le cytoplasme de certaines bactéries placées en condition de fermentation en proportion qui peut parfois atteindre 80% de leur masse sèche.

Les propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité des PHAs trouvent des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'emballage, du textile, de l'agriculture, de la pharmacie, de l'électronique, de la médecine, de l'automobile... etc., malgré le coût de production qui reste encore élevé (**Hijazi, 2014**). Les polyhydroxyalcanoates regroupent plusieurs polymères notamment le PHB (poly-hydroxybutyrate), le PHBH, (poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) et le PHBV (poly-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (**Stéphane et al., 2019**).

Le poly(hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) a été synthétisé pour la première fois en 1983 par la société Imperial Chemical Industries (ICI), il a été commercialisé sous le nom Biopol (**Ben meziane et Djemoune, 2014**), il est constitué à la fois d'un monomère d'acide hydroxybutyrique et d'un monomère d'acide valérique, les propriétés du PHBV sont modulables en fonction de la teneur en HV, une augmentation de la teneur en HV induit également une diminution de la température de fusion (T_m), de la température de transition vitreuse (T_g), de la cristallinité, de la perméabilité à l'eau, et une augmentation de la résistance au choc (**Kennouche, 2016**).

Le poly (hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), fait l'objet d'un grand intérêt de la part des chercheurs et des industriels pour plusieurs raisons dont notamment

Introduction

son origine naturelle, sa biodégradabilité, sa biocompatibilité et sa thermo plasticité. Ces diverses propriétés rendent ce biomatériau prometteur pour les industriels.

Notre travail a pour objectif d'évaluer la flore microbienne qui intervient dans la biodégradation des films de PHBV après un enfouissement dans le sol pendant une période d'une année.

CHAPITRE 01

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

1. L'objectif de travail

L'objectif de notre travail consiste à isoler et identifier les micro-organismes capables de dégrader le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) dans le sol. Les films de PVC sont utilisés comme témoin pour comparer la différence de la biodégradation entre un plastique biodégradable (PHBV) et un plastique non biodégradable (PVC).

2. Durée et lieu de travail

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie, de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUN-TIARET. Cette étude a été étendue sur la période entre le 21/03/2021 jusqu'au 21/04/2021.

3. Matériel et produits

Le tableau suivant montre tous les matériels et les produits utilisés dans notre travail.

Tableau 1 : Matériel et produits utilisés

Appareils	Microscope optique Autoclave Four pasteur Balance analytique Etuve pH mètre Thermomètre Agitateur magnétique thermique Bain-marie Bec bunsen Bandelettes de pH
Verreries et Autres	Boîtes de Pétri en verre et en plastiques Bêchers flacons Erlenmeyer Eprouvette Pipettes graduées Pipettes pasteur Seringues Spatule stérile Tubes à essai Verre de montre Anse de platine Lames lamelle Papier Joseph Aluminium

Produits	Chloroforme Eau distillée Fuschine Ethanol Lugol Alcool L'eau oxygénée Disques d'oxydase Solution NAOH L'huile d'immersion
Milieux de Culture	Milieu synthétique Mannitol-mobilité Emulsion de polymère Gélose nutritive Milieu PDA Galeries API

3.1. Polymères

3.1.1. Poly (3-hydroxybutyrate –co-3-hydroxyvalérate) PHBV

Le PHBV est un copolymère thermoplastique composé d'unité d'hydroxybutyrate (HB) et d'hydroxyvalérate (HV) relié par des liaisons esters, appartient à la famille des PHAs (**Luzier, 1992**). La structure chimique est illustrée dans la figure 1. C'est un polymère non toxique, biodégradable et biocompatible, caractérisé par son haut degré de cristallinité et résiste aux rayons ultraviolets.

Actuellement le PHBV à un intérêt important de point de vue industriel en raison de son potentiel biotechnologique et son application dans divers domaine (médicaux, agricoles et emballage) (**Rivera-Briso et Serrano-Aroca, 2018**).

Le PHBV utilisé dans cette étude, contient 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-chimique du PHBV

Propriétés	Valeurs
Point de fusion (°C)	165°C
Température de transition vitreuse (Tg)	8°C
Densité	1.25g/cm ³
Solubilité dans l'eau à 20°C	Insoluble
Solubilité dans les solvants	Chloroforme, dichlorométhane
Limite d'élasticité	39MPa
Module d'Young	2,8-3,5MPa
Allongement à la rupture	2%

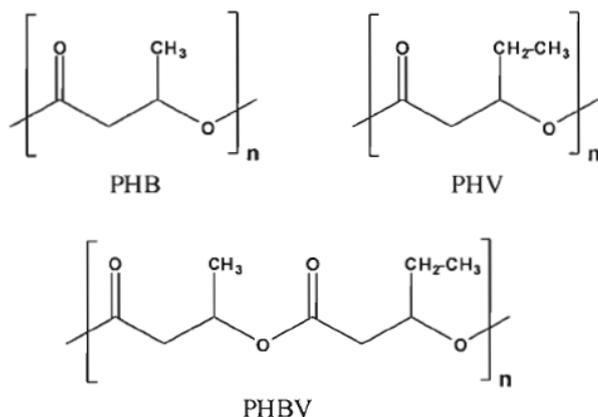


Figure 1: Structure chimique du PHBV

3.1.2. Polychlorure de vinyle (PVC)

Le PVC est un polymère thermoplastique linéaire, il est synthétisé par polymérisation radicalaire du chlorure de vinyle, lui-même produit à partir d'éthylène et de chlore, c'est le troisième polymère de commodité le plus utilisé au monde après le polyéthylène et le polypropylène, cette place s'explique par le fait que la souplesse du PVC peut être adaptée à volonté par ajout de plastifiants. Le PVC est résistant aux chocs, à l'abrasion et à la corrosion et possède des propriétés d'isolant électrique, il présente également un bon comportement au fluage et au vieillissement à l'extérieur (**Royaux, 2017**). Le PVC utilisé dans cette étude a été fourni par le laboratoire de chimie, faculté des sciences appliquées de l'université IBN KHALDOUN-TIARET.

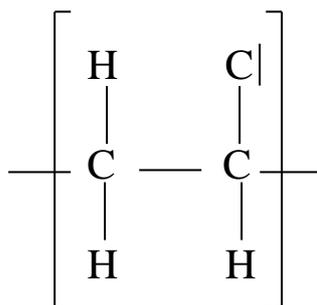


Figure 2 : Structure chimique du PVC

4. Protocole expérimentale

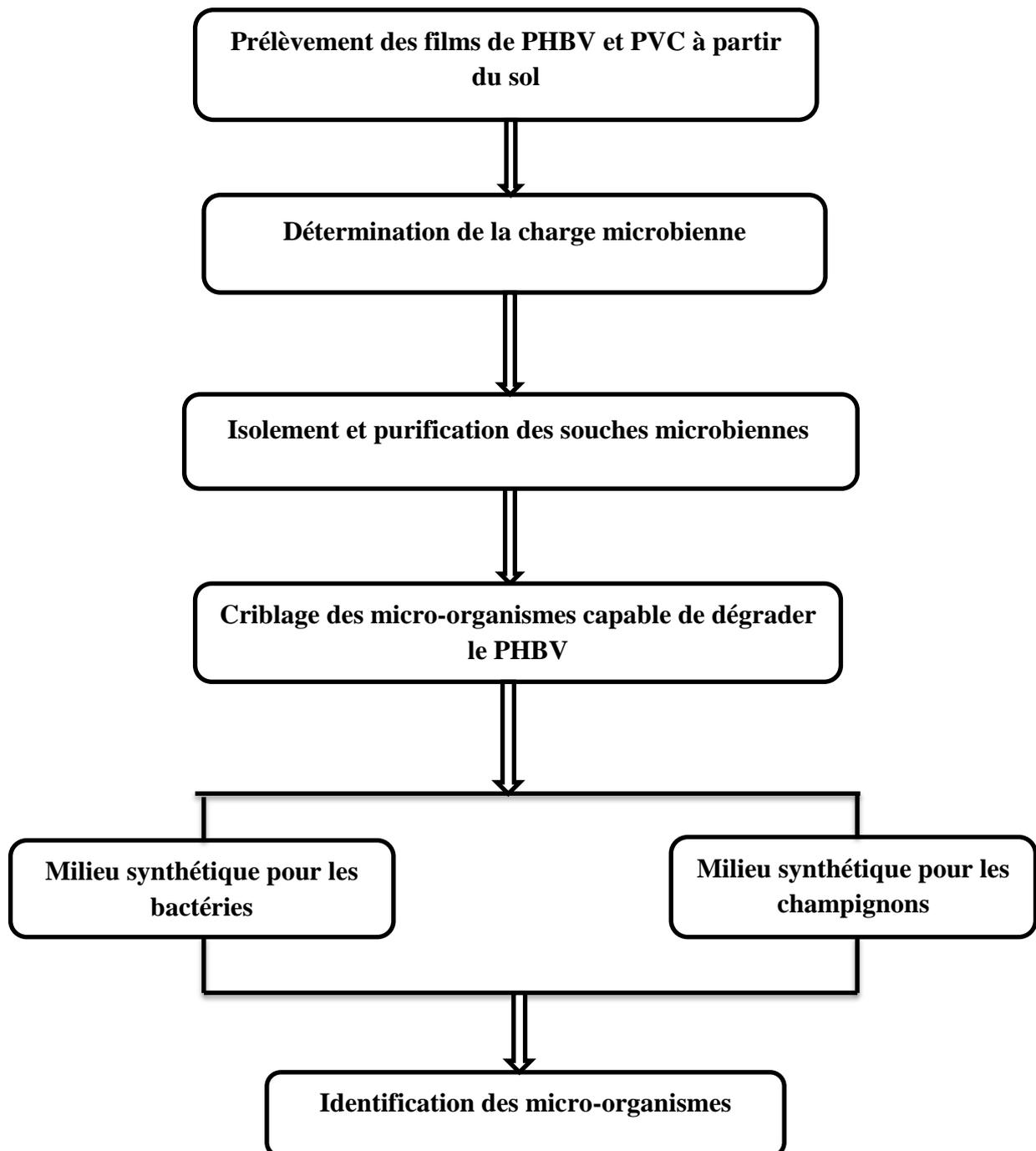


Figure 3 : Protocole Expérimental

5. Méthodes**5.1. Etude de la biodégradation**

Les films de PHBV et de PVC ont été enfouis dans un sol fertile en février 2020. En mois de mars 2021 ces films avec le sol adjacent ont été prélevé dans le but d'isoler et d'évaluer les micro-organismes qui interviennent dans la biodégradation du PHBV.

Une comparaison visuelle du changement des films de PHBV et de PVC après une année d'enfouissement a été aussi étudiée.

5.1.1. Prélèvements du sol

La zone de prélèvement se situe à la faculté SNV Tiaret. Les films de PHBV et de PVC ont été enfouis dans le sol à une profondeur de 20cm. L'échantillonnage a été réalisé dans des boites de Pétri stériles et transporté au laboratoire pour la préparation des solutions mères et l'isolement des microorganismes capables de dégrader le PHBV.



Figure 4: Zone de prélèvement

5.2. Etude des paramètres physico-chimiques**5.2.1. L'humidité**

L'humidité d'un sol permet de déterminer les caractéristiques de diffusion ou de stockage de l'eau dans le sol, la méthode gravimétrique a été adopté dans ce travail. Le sol qui entoure les films a été prélevé afin d'estimer le taux d'humidité de la zone d'enfouissement.

La méthode consiste à sécher l'échantillon du sol 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 la loi ci-dessous a été appliqué (Izam et Zerka, 2015) :

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

H : humidité.

PF : poids frais.

PS : poids sec.

5.2.2. 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 est de 1 volume de sol pour 5 volumes d'eau distillée (Lezam et Zerka, 2015).

Mode opératoire

Un échantillon de 5 g de sol a été séché à l'air libre puis placé dans un bécher dont on ajoute 25ml d'eau distillé. Une agitation pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique a été effectuée, la solution a été laissée pendant 15 minutes au repos, puis la lecture de pH se fait à l'aide d'un pH mètre.

5.2.3. Température

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

5.3. Détermination de la charge microbienne

Préparation des suspensions et des dilutions

Le prélèvement a été effectué à partir du sol qui entoure la surface des films à l'aide d'une spatule stérile.

Dans un portoir déposer une série de (4) tubes à essai stériles et étiquetés ensuite remplir les tubes avec (9ml) d'eau distillée stérile.

Pour la préparation de la solution mère (SM) : peser (10g) de sol puis homogénéiser avec 90 ml d'eau distillée stérile, le mélange soumis à une agitation puis laissé décanter c'est la dilution 1/10 puis transférer (1ml) à partir de la solution mère et verser dans le (1^{er}) tube contenant déjà (9ml) d'eau distillée stérile, il s'agit de la suspension-dilution (10^{-2}) ; agiter parfaitement et recommencer l'opération pour le reste des tubes jusqu'à avoir la suspension dilution (10^{-5}).

Préparation des boîtes de Pétri

Pour l'isolement des bactéries ; 8 boîtes ont été utilisées, 4 boîtes ont été remplies par la gélose nutritive et le reste des boîtes ont été remplies par deux couches ; la première couche

il s'agit de la gélose nutritive et la deuxième couche c'est une émulsion de polymère (PHBV) (voir la section 5.5 concernant la préparation de l'émulsion polymère).

Le milieu PDA avec une couche d'émulsion polymère a été utilisé pour la recherche des champignons.



Figure 5 : Boîtes de Pétri contenant le milieu de culture

La technique de dénombrement par numération sur un milieu solide a été utilisée dans ce travail. Pour cela, un volume de 0,1 ml des dilutions ont été étalé à l'aide d'un râteau sur la surface de la gélose nutritive et milieu PDA à raison de deux boîtes par dilution.

Après ensemencement les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 24h, le nombre de colonies apparues correspond au nombre de microorganismes dans le volume analysé. On prend en considération les boîtes de 30 à 300 colonies (**Mihaela et al., 2019**).

Le nombre totale des microorganismes est calculé par le nombre d'UFC (colony forming unit) divisé par le volume ensemencé et l'ensemble est divisé par la dilution choisie ou bien il est calculé 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 boites retenues de 2 dilutions successives.

V : Volume de l'inoculum ensemencé en ml

n1 : nombre de boites retenues dans la première dilution

n2 : nombre de boites retenues dans la deuxième dilution

d : première dilution retenue

5.4. Isolement et purification des souches

Après le dénombrement, certaines colonies sont sélectionnées puis repiqués successivement sur gélose nutritive ou milieu PDA pour assurer une bonne purification des souches.

Les cultures pures sont conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C. Ces isolats vont servir au processus d'identification ultérieur (**Arifuzzaman et al., 2010**).

5.5. Criblage des microorganismes capables de dégrader le PHBV

Afin de sélectionner les microorganismes (bactéries et mycètes) capables de dégrader le PHBV, un milieu synthétique spécifique pour les bactéries et un autre spécifique pour les champignons en présence de PHBV comme seule source de carbone sont préparées (**Augusta et al., 1993**).

La composition des milieux synthétiques utilisés pour tester les micro-organismes est détaillée dans l'annexe n°1

5.5.1. Préparation des boites de Pétri afin de faire le criblage

Les boites de Pétri sont remplis de deux couches de milieu solide. La couche inférieure contient le milieu synthétique et une couche supérieure contient l'émulsion de polymère comme seule source de carbone pour le cycle de vie des micro-organismes. Après l'addition des sels minéraux à un litre d'eau distillée, 20g/l d'agar-agar et 1.5g de PHBV, et 1g l'extrait de levure ont été ajouté à chaque milieu synthétique, le mélange est porté à ébullition sous l'agitation. Le pH du milieu a été ajusté à 7 par une solution de NaOH.

5.5.2. Emulsion du polymère

Le milieu de la suspension polymère a été préparé par un mélange de 0.75g de PHBV en poudre dilué dans 45ml de chloroforme dans un bicher couvert par l'aluminium puis mélangé avec 250ml d'eau distillée ensuite 10g d'agar-agar a été ajouté pour la solidification de milieu (**Nishida et Tokiwa, 1993**).

5.5.3. Ensemencement des boîtes préparées

Les bactéries et les mycètes à tester ont été ensemencés sur la gélose à deux couches par la technique de strie.

5.5.4. Lecture des résultats

Les micro-organismes testés capables de métaboliser et de dégrader le PHBV donnent une croissance visible sur les milieux synthétiques, ce qui confirme ainsi leurs capacités d'utiliser le PHBV comme seule source de carbone.

5.6. Identification des micro-organismes capables de dégrader le PHBV

Après la purification et criblage, dix souches bactériennes et trois souches de champignons ont été retenues. Les isolats sélectionnés sont capables de dégrader le PHBV, ces derniers vont subir des tests d'identification basée sur l'aspect macroscopique et microscopique, certains tests biochimique et galeries API. Le tableau suivant montre les codes des souches retenues pour l'identification.

Tableau 3 : Code des souches bactériennes et fongiques

Les souches bactériennes	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	P1	P3	P4
Les souches fongiques	P2	P5	P6							

5.6.1. Etude macroscopique

L'observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies sur milieu solide pour révéler ; la forme, la taille et la couleur.

5.6.2. Eude microscopique

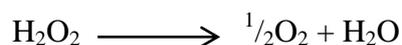
L'observation microscopique au grossissement (Gx100) permet de classer les bactéries selon leur type de Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (Joffin et Leyral, 1996).

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 ensuite le fixer sur une lame pour l'observer directement sous microscope optique (**Benabdallah et Boulaioun, 2013**).

5.6.3. Tests biochimiques

5.6.3.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé comme sous-produit du processus métaboliques, elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon la réaction suivante (**Meziani, 2012**):



Le test consiste à déposer sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence d'eau oxygénée à 10 volumes, une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène.

5.6.3.2. Test 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. (**Singleton et Sainsbury, 1984**).

Le test consiste à mettre dans un verre de montre propre la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur stérile boutonnée immergé dans l'eau distillé stérile ensuite on met le disque oxydase, si une coloration bleu foncé à violet apparaisse dans un délai de 30sec, cela signifie un test positif.

5.6.3.3. Mannitol- mobilité

C'est un milieu qui permet l'étude de la fermentation du mannitol (caractère biochimique) et la mobilité de la souche (caractère morphologique). Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives, l'ensemencement du milieu ce fait par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile à bout fermée puis incubé à 30°C pendant 24h.

La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol, l'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune), 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 (**Boussena, 2020**).



Figure 6 : Mannitol-Mobilité avant l'ensemencement

5.6.3.4. Galeries API

L'étude des caractères biochimiques est basée sur l'utilisation des galeries API qui permettront de réaliser des tests biochimiques spécifiques pour chaque bactérie isolée.

Api 20 E est un système standardisé comprenant 21 tests biochimiques pour l'identification des enterobacteriaceae et autres bacilles, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests, les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de 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 ou d'un logiciel d'identification, le test oxydase doit être réalisé les instructions du fabricant, il constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche de résultats (**Bekada, 2019**).

Technique

- Répartir de l'eau distillée stérile dans les alvéoles du support de la galerie pour créer une atmosphère humide
- Préparer la suspension bactérienne : une colonie bien homogénéisée dans un tube à essai qui contient 5 ml d'eau distillée.
- Inoculer la galerie : la suspension bactérienne à analyser, souvent obtenue suite à une purification des colonies bactériennes sur gélose nutritif, est versée dans chacun des tubules de la galerie. Pour les substrats dont le nom est encadré, il convient de remplir la cupule l'objectif est de réaliser des tests en aérobiose (riche en oxygène), les substrats dont le nom est souligné, il convient de remplir la cupule avec de l'huile de paraffine. Cette huile empêche le contact avec l'oxygène
- Renfermer la boîte d'incubation, coder, et placer à 30° C pendant 24h.

CHAPITRE 02

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. Etude de la biodégradation du PHBV

Le plastique est considéré comme l'un des polluants les plus importants de l'environnement. Pour résoudre ce problème de maîtrise des déchets plastiques et leur pollution, l'une des solutions consiste en la mise au point, de plastiques biodégradables.

Dans notre travail la biodégradation de deux polymères le Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ou PHBV et le Polychlorure de vinyle (PVC) a été étudié après une année d'enfouissement dans le sol.

Des films de PHBV et de PVC ont été préparés par la technique conventionnelle de moulage par dissolution dans le chloroforme (pour le PHBV) et Tétrahydrofurane (pour PVC).

Ces films ont été enfouis dans le sol, les prélèvements ont été réalisés après une année.

L'identification de certains micro-organismes capables de dégrader ce plastique a été réalisée.

1.1. Aspect visuelle des films

L'observation visuelle des films est un critère d'évaluation de la biodégradation.

L'examen des films de PHBV après 40 jours réalisé l'année dernière a montré une diminution de l'épaisseur et des érosions remarquables.

Par contre après une année d'enfouissement et exposition à l'attaque biologique dans les conditions environnementales, des petits morceaux seulement des films de PHBV ont été récupérés, la biodégradation de PHBV était presque terminée. Pour les films de PVC, aucun changement n'a été remarqué.

Tableau 4 : les films de PHBV et PVC avant et après enfouissement

	PHBV	PVC
Avant		

Après 40 jours		
Après une année		

Une étude réalisée par **Margareat et al., en 1993** sur la dégradation de P(3HB) et son copolymère PHBV avec une teneur de 10% (3HV) dans cinq sols différents à des conditions de laboratoire (*in-vitro*) indique que l'estimation de la dégradation est donnée par la perte de poids et le changement de la surface des échantillons.

L'étude de la biodégradation de PHBV après 45 jours d'enfouissement dans le sol par **Kuntanoo et al., 2013** indique un balayage des changements d'apparence des films de PHBV avant et après la dégradation, ces films subissent des changements structurales et morphologiques au cours des 30 premiers jours d'enfouissement.

La biodégradation des thermoplastiques notamment le polychlorure de vinyle (PVC) requiert généralement beaucoup de temps (entre 200 et 1000 ans) pour leur totale biodégradation, car il est extrêmement persistant en présence de conditions environnementales normales (**Betancourt, 2008**).

1.2. Paramètres physico-chimiques du sol

1.2.1. Température

La température du sol a une grande influence sur les processus enzymatiques et sur la mobilité des chaînes chimiques du polymère. Dans des températures moyennes le contact entre le polymère et l'enzyme sécrétée par le microorganisme est facilité, favorisant ainsi le clivage des liaisons chimiques. (**Siracusa, 2019**). La température du sol a été mesurée au moment de prélèvement et qui correspond approximativement à 8°C.

Sachant que les films de PHBV ont été enfouis pendant une année dans un sol fertile situé dans la région de Tiaret qui est connue par son climat méditerranéen chaud avec été sec, ce qui favorise une bonne biodégradation des films.

1.2.2. pH

Un sol acide a un effet négatif sur le développement des bactéries avec conséquence diminution de la minéralisation et de la biodégradation (**Siracusa, 2019**). Dans des conditions de pH plus élevé la perte de poids des films est plus lente en raison de la présence des groupes esters hautement ramifiés et un grand nombre de carbonates tertiaires (**Ida Idayu et al., 2006**). Le pH du sol que nous avons étudié était de 7.

Plusieurs travaux suggèrent d'utiliser un milieu à pH neutre pour la survie et le développement des microorganismes.

1.2.3. L'humidité

L'humidité du sol de la zone d'enfouissement a été calculée, elle correspond à environ 17,64%. L'eau dans le sol est importante car elle induit les réactions d'hydrolyse enzymatiques et le clivage des liaisons chimiques du polymère, de plus, elle facilite la lixiviation des additifs présents dans les polymères, augmentant ainsi la fragilité. Une humidité suffisante est nécessaire pour le développement et l'activité des microorganismes. (**Siracusa, 2019**).

2. Détermination de la charge microbienne

La concentration des micro-organismes dans le sol du site enfouissement a été déterminée par la technique classique de dénombrement après culture sur milieu solide. Les températures et les valeurs de pH influencent la densité de la population et l'activité des micro-organismes dans le sol (**Kliem et al., 2020**). La charge microbienne de l'échantillon que nous avons étudié était de $5,2 \times 10^6$ UFC/ ml.

La population microbienne du sol constitue le maillon final de la « chaîne trophique » du sol par laquelle transite le carbone et les éléments nutritifs des matières organiques avant de redevenir disponibles pour les plantes ; elle remplit donc une fonction essentielle et obligatoire dans le « recyclage » des matières organiques, (**Chantigny et Angers, 2005**). Dans le sol le PHBV est considéré comme un substrat carboné qui va être dans un premier temps, dépolymérisé (les chaînes de polymère brisées sous l'impact d'enzymes dépolymérisantes des micro-organismes). Dans un deuxième temps, des produits de biodégradation du polymère (tétra-, di- et monomères

d'hydroxyacides) pourraient être utilisés, ce qui aboutit à une perte de masse des films puis une dégradation totale (Volova *et al.*, 2010).

Au cours de la croissance, les micro-organismes interagissent les uns avec les autres dans le cycle des nutriments, tel que le carbone, le soufre, l'azote, le phosphore, le fer et le manganèse, dans ces cycles biogéochimiques les éléments sont oxydés et réduits par des micro-organismes pour répondre à leurs besoins métaboliques. Sans les cycles biogéochimique, la vie sur terre cesserait d'exister (Prescott *et al.*, 2002).

Le tableau N°5 regroupe les résultats d'analyses physicochimiques et la charge microbienne du sol du site d'enfouissement.

Tableau 5 : Résultats d'analyse physico-chimiques et la charge microbienne du sol.

Paramètre	Température	L'humidité	pH	Charge microbienne
Résultat d'analyse du sol	8°C	17,64 %	7	5,2 x 10 ⁶ UFC/ml

3. Identification des micro-organismes

3.1. Identification des souches bactériennes

3.1.1. Aspect macroscopique et microscopique

Dans ce travail, 10 souches bactériennes ont été sélectionnés.

Le milieu GN (gélose nutritive) a été utilisé pour l'isolement et la purification des bactéries

On se basant sur l'observation macroscopique des colonies et microscopique après une coloration de Gram, nous permet de constater que tous les isolats était Gram positif. Les souches (S2, S3, S4, S5, S6, S7, P1, P3, P4) avaient une forme rectangulaire ou légèrement arrondie au niveau des bords, par contre l'espèce S1 était de forme sphérique. Toutes les espèces étudiées possèdent une catalase.

La présence d'une endospore a été remarquée chez les isolats (S2, S3, S4, S5, S6, S7, P1, P3, P4).

Tableau 6 : Aspect macroscopique et microscopique des souches bactériennes

Code des souches	Aspect macroscopique		Aspect microscopique			Spore
	Forme	Couleur	Gram	Forme	Mode de Regroupement	
S1	Circulaire	Blanche	+	Cocci	En amas	Absence
S2	Circulaire	Beige	+	Grand Bacille	En amas	Spore centrale non déformante
S3	Circulaire	Beige	+	Petit Bacille	Isolé	Spore centrale non déformante
S4	Irrégulière	Blanche	+	Petit Bacille	Isolé	Spore déformante
S5	Circulaire	Blanche	+	Petit Bacille	En amas	Spore centrale non déformante
S6	Irrégulière	Beige	+	Grand Bacille	Isolé	Spore centrale non déformante
S7	Circulaire	Beige	+	Petit Bacille	En amas	Spore centrale non déformante
P1	Irrégulière	Beige	+	Grand Bacille	En chainettes	Spore centrale non déformante
P3	Irrégulière	Beige	+	Grand Bacille	Isolé	Spore centrale non déformante
P4	Circulaire	Beige	+	Grand Bacille	En chainettes	Spore centrale non déformante

On se reposant sur le type de Gram positif, la forme bacillaire, la possession d'une catalase et sur le critère taxonomique clé, qui est l'endospore visualisée grâce à sa réfringence à la lumière, l'appartenance des souches (S2, S3, S4, S5, S6, S7, P1, P3, P4) au genre *Bacillus* a été confirmée. Ces quatre critères recherchés, sont suffisant selon **Gordon et al., (1973)** pour affirmer l'appartenance au genre *Bacillus*.

La forme Cocci de la souche S1 et le mode de regroupement en grappe de raisin, une mobilité négative et la possession d'une catalase, ainsi absence d'oxydase peut nous orienter vers le genre *Staphylococcus* saprophyte du sol.

3.1.2. Tests biochimiques

Afin d'avoir une identification approximative des différentes souches bactériennes isolées à partir du sol et qui sont capables de dégrader le PHBV, certains tests biochimiques ont été effectués. Les tableaux N° (7 et 8) regroupent les tests et les résultats obtenus pour chaque souche.

Pour la lecture des résultats de la galerie API 20 E après incubation pendant 24h et sans oublier la lecture immédiatement après 10 min des tests qui nécessitent l'addition des réactifs, il convient d'observer si la réaction est positive ou négative séparément pour chacun des tests, un changement de couleur du milieu dans le tube, signifie généralement que le test est positif (**Boussena, 2020**). Dans ce travail cinq souches seulement ont été choisi pour l'identification par la galerie Api 20E.

Un tableau des caractères à vérifier pour chaque milieu est fourni par le fabricant afin de permettre l'interprétation des résultats (voir l'annexe n°3).

Tableau 7 : Résultats des tests biochimiques

Code des souches	Test catalase	Test oxydase	Mannitol mobilité	
S1	+	-	Mannitol +	Mobilité -
S2	+	-	Mannitol +	Mobilité +
S3	+	-	Mannitol -	Mobilité +
S4	+	-	Mannitol +	Mobilité +
S5	+	-	Mannitol +	Mobilité +
S6	+	-	Mannitol +	Mobilité +
S7	+	-	Mannitol +	Mobilité +
P1	+	-	Mannitol +	Mobilité +
P3	+	-	Mannitol +	Mobilité +
P4	+	-	Mannitol +	Mobilité +

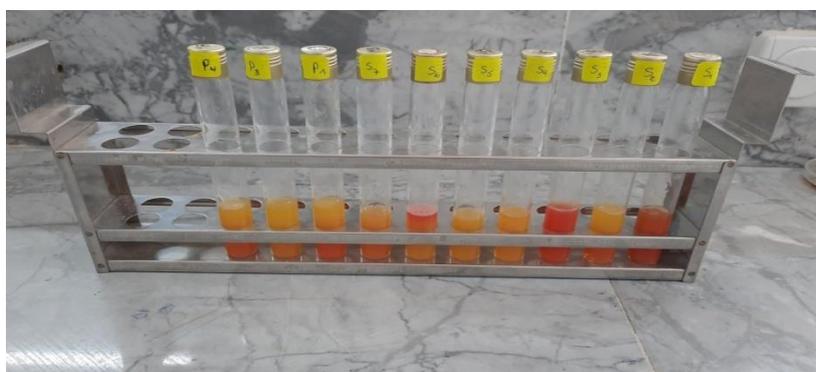


Figure 7: Résultats de test mannitol mobilité

Tableau 8 : résultats de test Api 20 E

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L'identification probabiliste des cinq souches sélectionnées, on utilisant la matrice d'identification des *Bacillus* avec la galerie API 20E établie par Michel Cavalla en 2003 rajoutés à ceux de la mobilité, de l'oxydase, et de la fermentation du mannitol nous a permis de différencier 5 profils biochimiques. Les pourcentages relatifs d'identification obtenus pour chaque profil sont représentés dans la figure N°9.

Les souches S2 et P1 correspondent au profil de *Bacillus polymyxa* à raison de 57%, la souche S3 se rapproche plus au moins à l'espèce *B. laterosporus* à raison de 48%, par contre la souche S4 appartient au profil de l'espèce *B. licheniformis* avec une probabilité élevée de 96% et en fin l'isolat S7 coïncide avec *B. macerans* à 56%.

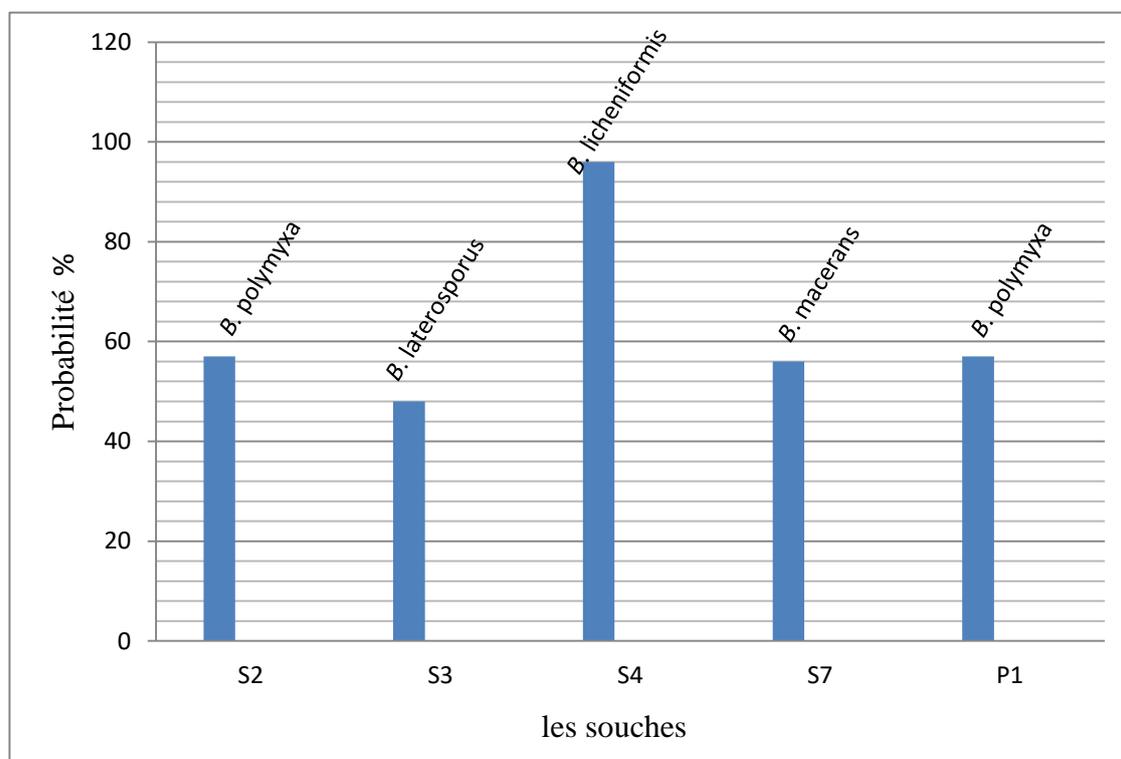


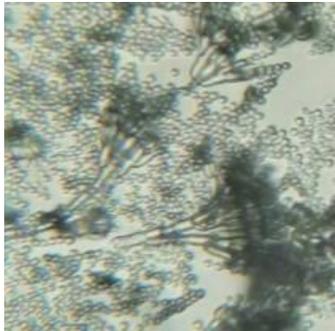
Figure 8 : Probabilité d'identification des souches bactériennes

3.2. Identification des souches fongiques

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes. La technique du ruban adhésif a été utilisée dans notre travail.

Le tableau N° 9 montre l'aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol.

Tableau 9 : Aspect macroscopique et microscopique des champignons

Code des souches fongiques	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
P2		
P5		
P6		

L'aspect microscopique des champignons étudiés montre que l'espèce P2 appartient au genre *Rhizopus*, qui sont des champignons filamenteux dont les colonies sont généralement, floconneuses, de couleur blanche au départ, devenant gris brunâtre à gris noirâtre, ils se développent rapidement aux bonnes températures.

Du point de vue microscopique, ils sont caractérisés par la présence de stolons, de rhizoïdes et de sporangiophores, les stolons sont bien ou peu développés, les sporangiophores apparaissent généralement solitaires ou par groupes de deux à dix à partir de stolons et parfois d'hyphes (Zheng et al., 2007).

Par contre les souches P5 et P6 sont plus proches du genre *Penicillium*, avec des colonies plates, formées de courts filaments aérien, blancs au départ, après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte qui varie du vert bleu ou vert-jaune avec un contour blanc, cette couleur permet une première orientation dans l'identification des espèces de *Penicillium* (Chermette et Bussieras, 1993).

Pour l'aspect microscopique, les *Penicilliums* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, qui porte des conidiophores lisses ou granuleux peuvent être isolés, ou groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés.

4. Microorganismes qui dégradent le PHBV

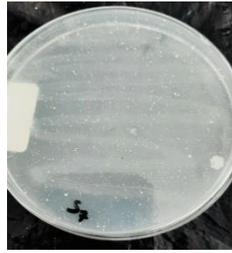
Pour étudier la capacité des microorganismes à dégrader le PHBV, les différentes souches bactériennes et fongiques ont étéensemencés sur des milieux synthétiques. La croissance des souches étudiées sur ces milieux dévoile que ces dernières utilisent le PHBV comme seule source de carbone.

Les tableaux N° 10 et 11 montrent la croissance des souches sur les milieux synthétiques en présence de PHBV.

Tableau 10 : La croissance des espèces fongiques sur le milieu synthétique

	P2	P5	P6
Les espèces fongiques sur le milieu synthétique avec couche de l'émulsion polymère			

Tableau 11 : La croissance des espèces bactériennes sur milieu synthétique

	Souche S1	Souches S2 et S3	Souches S4 et S5
Les bactéries sur milieu synthétique en présence de PHBV			
			
	Souche P4		
			

Les micro-organismes étudiés considèrent le PHBV comme nutriment et comme seule source de carbone dans le milieu synthétique par sécrétion des enzymes qui dégradent le PHBV (**Luzier, 1992**).

Dans ce travail il a été remarqué que la communauté bactérienne dans le site d'enfouissement était dominée par les espèces sporulantes du genre *Bacillus*, par contre les espèces du genre *Penicillium* étaient les plus répondu pour les champignons.

Nishida et Tokiwa (1992), ont réalisé une étude sur dix échantillons de sol prélevés à partir de différents environnement, puis ils ont testés la biodégradation dans des plaques contenant le PHB, les résultats après 1-13 jours ont montré la formation des colonies sur ces plaques de gélose, des zones claires sont formées autour de chaque colonie montre un micro-organisme capable de dépolymériser le PHB.

Selon **Shah et al., (2007)**, qui ont étudié la dégradation du PHBV par *Streptovercillium Kashmirense* AF1 sur milieu gélosé en présence du polymère, il a été remarqué une augmentation de la formation des zones claires qui pourrait s'expliquer par la libération de depolymérase PHBV extracellulaires par *Streptovercillium Kashmirense* AF1 jusqu'à une période de 3 à 4 semaines.

Une étude *in-vitro* réalisée par **Mergaert et al., (1993)** sur la biodégradation du PHB et du PHBV dans cinq sols différents, montre qu'après isolement et identification des microorganismes, il a été trouvé 295 souches microbiennes dominantes capables de dégrader le p(3HB) et le copolymère poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), dont 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 du genre *Penicillium*.

Une étude réalisée par **Boyandin et al., en 2013**, montre que les bactéries du sol dégradant les PHAs sont principalement des espèces du genre *Bacillus*.

D'autres méthodes réalisées par plusieurs auteurs montrent qu'il existe de variétés de microorganismes qui dégradent les PHAs, représentés dans divers genres : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Syntrophomonas*, *Ilyobacter* (**Volova et al., 2015**).

Les champignons aussi sont considérés comme des espèces capables de dégrader les PHAs (*Ascomycètes*, *Basidimycètes*, *Deutéromycètes*, *Zygomycètes*, *Mixomycètes*, *Mastigomycètes*, *Penicillium* et *Fusarium*). Le genre typique des micromycètes qui dégradent les PHAs dans le sol et le plus efficace c'est le genre *Penicillium*.

CONCLUSION

Conclusion

Le plastique est considéré comme l'élément de base dans plusieurs champs d'applications destinées aux consommateurs et à l'industrie, il est principalement un polymère synthétique à base de pétrole extrêmement résistant aux attaques microbiennes. La pollution environnementale due à l'accumulation de ces polymères sous forme de déchets plastiques pose un problème écologique important.

Une approche de diminuer les déchets consiste à remplacer les matériaux conventionnels par des matériaux biodégradables. Plusieurs types de biomatériaux produit à partir de divers sources, en particulier le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), qui est un polymère microbien, avec d'excellentes propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité font de lui un candidat potentiel pour remplacer les polymères dérivés du pétrole. Ces polyesters peuvent être digérés par des micro-organismes comme les bactéries, les champignons ou les algues, qui possèdent naturellement le pack enzymatique nécessaire pour les dégrader et les utiliser comme source de carbone.

Des études portant sur la dégradation des polymères par les micro-organismes sont devenues essentielles dans la mise au point et la synthèse de nouveaux matériaux biodégradables. Plusieurs chercheurs travaillent sur l'isolement et l'identification des micro-organismes capables de dégrader les PHAs dans différents habitats : sol, mère, boue d'épuration...

Dans notre travail, dix souches bactériennes et trois espèces fongiques ont été isolés à partir du sol et identifiés, il s'agit d'une dominance des espèces du genre *Bacillus* puis *Staphylococcus* pour la microflore bactérienne, en ce qui concerne les champignons, deux souches du genre *Aspergillus* et une souche du genre *Rhizopus* ont été isolés. Après une identification probabiliste par galerie API 20^E, les cinq souches sélectionnées du genre *Bacillus* qui peuvent dégrader le PHBV dans le sol sont (*B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis* et *B. macerans*).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Anais G., (2017).** Compréhension des mécanismes de biodétériorisation des matériaux cimentaires dans les réseaux d'assainissement : étude expérimentale et modélisation. Thèse de doctorat, l'Université Paris-Est.
2. **Arifuzzaman M, Khatun M.R, Rahman H., (2010).** Isolation and screening of actinomycetes from sundarbans soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*. 9(29), 4615-4619.
3. **Augusta J, Miiller R.J, Widdecke H., (1993).** A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Applied Microbiology biotechnology*. 674-678p.
4. **Bekada D, (2019).** Intérêt des tests microbiologiques dans le cas de la Gastrite B, maladie de Crohn et Rectocolite Hémorragique. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella- Oran.
5. **Ben meziane H, Djemoune L., (2014).** Etude des composites à base de poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalérate) (PHBV) / Alfa et Cellulose. Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira- Bejaia. Facultés de technologie. 83p
6. **Benabdallah A, Boulaioun F. (2013).** Contribution à l'étude de la biodégradation de la colle à base d'amidon.
7. **Betancourt A.O, (2008).** Analyse, extraction et purification de poly-3-hydroxybutyrate présent dans la biomasse. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise. Université du Québec à Montréal, 154p.
8. **Bonarstev A.P, Myshkina V.L, Nikolaeva D.A, Furina E.K, Makhina T.A, Livshits V.A, Boskhomdzhiev A.P, Ivanov E.A, Iordanskii A.L, and Bonartsev G.A., (2007).** Biosynthesis, Biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers – natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. 295-307p
9. **Boussena S, (2020).** Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie, Université Des Frères Mentouri. 61p
10. **Boyandin A.N, Prudnikova S.V, Karpov V.A, Ivonin V.N, ĐO N.L, Nguyen T.H, Volova T.G., (2013).** Microbial degradation of polyhydroxyalcanoates in tropical soils. *International Biodegradation & Biodegradation*, 83, 77-84.

Références bibliographiques

11. **Chantigny M et Angers D., (2005).** Activité microbiologique et qualité des sols : quoi de neuf sous nos pieds ? Colloque en agroenvironnement .Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec. 10p.
12. **Chermette R, Bussieras J. (1993).** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
13. **Gélinas L., (2013).** Plastiques biosourcés : Etude de leur performance environnementale comparativement aux plastiques pétrochimiques. Université de Sherbrooke. 111p
14. **Geyer R, Jambeck J.R & Law K. L., (2017).** Production, use, and fate of all plastics ever made. Science advances. 3(7), e1700782.
15. **Gordon, R .E, Haynes, w. C. and H.N Pang, C. (1973):** The genus *Bacillus* Agricultural Handbook n °427. Washington.
16. **GU JD, (2003).** “Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials” recent research advances.
17. **Hijazi N., (2014).** Développement de composites nanostructurés à base de biopolysteres et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO₂ supercritique. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. 204p
18. **Ida Idayu M, Lee Kar J, (2006).** Comparing the degradation of poly-β-(hydroxybutyrate-hydroxyvalérate) (PHBV) and PHBV/ Cellulose. *Malaysian Polymer Journal* (MPJ), Vol 1, NO 1, p 39-46.
19. **Jérémie A., (2009).** Etude comparative du comportement de composites à matrice thermoplastiques ou thermodurcissable. Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Rouen, Ecole doctorale SPMII. 220p
20. **Joffin J.N. et Leyral G. (1996).** Microbiologie technique, centre Régional de documentation pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp. 219-223.
21. **Kennouche S., (2016).** Etude de la Morphologie de Nanobiocomposites de Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV)/Nanotubes d'Halloysite et évaluation de leurs Performances. Thèse de doctorat, Université de Montpellier en cotutelle avec l'Université de Bejaia (Algérie). 249p

Références bibliographiques

22. **Kliem S, Kreutsbruck M and Bonten C., (2020).** Review on the Biological Degradation of Polymers in Various Environments, 18p.
23. **Kuntanoo K, Promkotra S, and kaewkannetra P., (2013).** Biodegradation of Polyhydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate (PHBV) Blended with Natural Rubber in Soil Environment. World Academy of Science, Engineering and Technology vol: 7, P 1799-1803.
24. **Lezam S, Zerka N., (2015).** Biodégradation dans le sol de sacs oxobiodégradable à différents taux de stabilisant. Mémoire de Master, Université A. MIRA-Bejaïa-Faculté des Sciences Exactes. 60p
25. **Luzier W.D, (1992).** Materials derived from biomass / biodegradable materials. The National Academy of Sciences. Vol. 89, pp.839-842.
26. **Margareat J, Webb A, Anderson C, Wouters A & Swings J., (1993).** Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. App. Environ. Microbial, 59(10), 3233-3238.
27. **Meziani M, (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : cas des Entérobactéries et Pseudomonas. Mémoire de Master, Université Mentouri Constantine. 96p.
28. **Mihaela D, axel B, Monica L, (2019).** Manuel de microbiologie travaux pratiques-partie générale médecine générale, Edition française.
29. **Nishida H and Tokiwa Y, (1993).** Distribution of poly (β -hydroxybutyrate) and poly (ϵ -caprolactone) Aerobic Degrading Microorganisms in Different Environments. Journal of Environmental polymer Degradation, Vol. 1, no. 3.
30. **Okunola A.A, Kehinde I.O, Oluwaseum A and Olufiropo E.A., (2019).** Public and Environmental Health Effects of plastic wastes disposal: A Review. Journal of Toxicology and Risk Assessment.
31. **Prescott, M.L. Harley and Klein, (2002).** VIII Ecology and symbiosis. In microbiology. Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies, pp596-697.
32. **Rivera-Briso A.L, Serrano-Aroca A., (2018).** Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications
33. **Royaux A, (2017).** Compréhension des mécanismes de perte de plastifiant et d'exsudation des PVC plastifiés. Thèse de Doctorat Université Paris-Seine. 206p.

Références bibliographiques

34. **Saadi Z., (2008).** Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous-produits de dégradation-Etude de l'écotoxicité de ces polymères. Thèse de doctorat, Université du Maine-U.F.R. Sciences et techniques. 193p
35. **Shah A.A, Hasan F, Hameed A, Ahmed S., (2007).** Isolation and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading actinomycetes and purification of PHBV depolymerase from a newly isolated *Streptoverticillium Kashmirensis* AF1. *Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan, annals of microbiology*, 57(4) p583-588.
36. **Singleton, P, Sainsbury, D. (1984).** *Abreges de bactériologie*. Ed Masson paris. 151p.
37. **Siracusa V., (2019).** *Microbial Degradation of Synthetic Biopolymers Waste*. Polymers. 18p
38. **Stéphane B, Nathalie G, Jean-François G., (2019).** *Les bioplastiques biodégradables et compostables*. Rapport d'information, 44p
39. **Volova T.G, Boyandin A.N and Prudnikova S.V., (2015).** Biodegradation of polyhydroxyalcanoates in natural soils. *Journal of Siberian Federal University*, p152-167.
40. **Volova T.G, Boyandin A.N, Vasiliev, Karpov V.A, Prudnikova S.V, Mishukova O.V, Boyarskikh U.A, Filipenko M.L, Rudnev V.P, Xuân B.B, Dũng V.V, Gitelson I.I., (2010).** Biodegradation of polyhydroxyalcanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer degradation and stability*, p2350-2359.
41. **Zheng R, Chen G, Huang H, Liu X., (2007).** A monograph of *Rhizopus*, *Chinese Academy of Sciences, china, Sydowia* 59, P273-372.

ANNEXE

Annexe 1

Milieux de culture

- **Composition de la gélose nutritive (GN)**

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

pH=7.8-7.4

- **Gélose dextrose à la pomme de terre (PDA Potato Dextrose Agar).**

Extrait de pomme de terre	4g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH=5,6

- **Composition de Mannitol-mobilité**

Peptone de caséine.....	10g
Mannitol	7,5g
Nitrate de potassium.....	1g
Rouge de phénol.....	0.04g
Agar.....	3.5g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7,6

Annexe

Milieus synthétiques

- **Solution sels minéraux pour les bactéries**

Pour 1 litre, sont mélangés :

NH ₄ NO ₃	1,0g
KH ₂ PO ₄	0,7g
K ₂ HPO ₄	0,7g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,7g
NaCl.....	0,005g
FeSO ₄ , 7HO ₂	0,002g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,02g
MnSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0.001g
PHBV.....	1,5g
Agar-agar.....	20g
Extrait de levure.....	1g
Eau.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH.

- **Solution sels minéraux pour champignons**

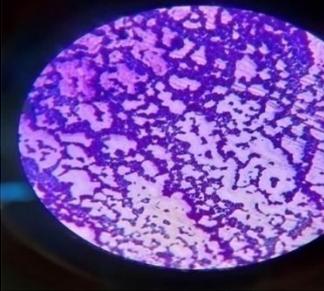
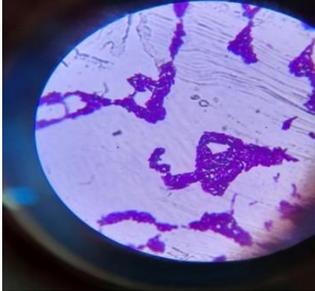
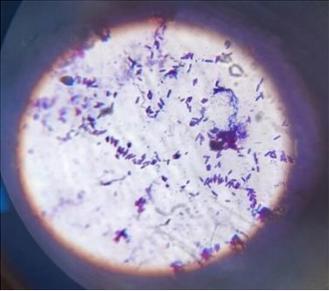
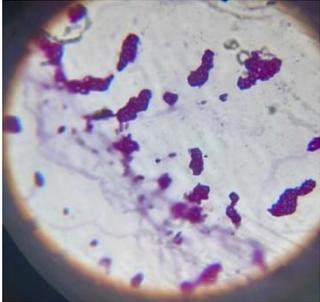
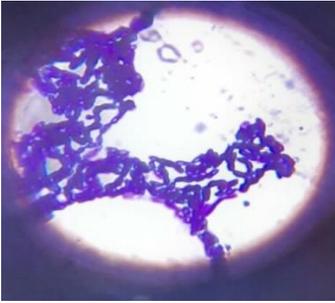
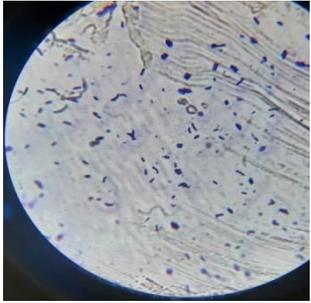
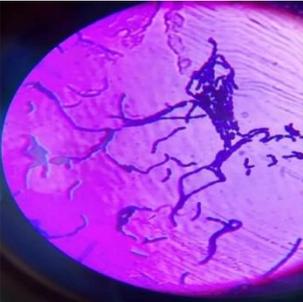
Pour 1 litre, Sont mélangés :

NaNO ₃	2,0g
KH ₂ PO ₄	0,7g
K ₂ HPO ₄	0,3g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5g
KCl.....	0,5g
FeSO ₄ , 7 HO ₂	0,01g
PHBV.....	1,5g
Agar-agar.....	20g
Extrait de levure.....	1g
Eau.....	1000ml

Le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH

Annexe 2

Tableau 01: Aspect microscopique des souches bactériennes après la coloration de Gram (Gx100)

 <p>La souche S1</p>	 <p>La souche S2</p>	 <p>La souche S3</p>
 <p>La souche S4</p>	 <p>La souche S5</p>	 <p>La souche S6</p>
 <p>La souche S7</p>	 <p>La souche P1</p>	 <p>La souche P3</p>
 <p>La souche P4</p>		

Annexe 3

Tableau 02 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU a ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annexe 4

Tableau 12 : Résultats des Galeries Api 20 E

S2	 A microplate with 12 wells. The first 10 wells contain a color gradient from yellow to orange. The 11th well is red. The 12th well is white. To the right of the 12th well are 10 blue wells.
S3	 A microplate with 12 wells. The first 10 wells contain a color gradient from yellow to orange. The 11th well is red. The 12th well is white. To the right of the 12th well are 10 blue wells.
S4	 A microplate with 12 wells. The first 10 wells contain a color gradient from yellow to orange. The 11th well is red. The 12th well is white. To the right of the 12th well are 10 green wells.
S7	 A microplate with 12 wells. The first 10 wells contain a color gradient from yellow to orange. The 11th well is red. The 12th well is white. To the right of the 12th well are 10 green wells.
P1	 A microplate with 12 wells. The first 10 wells contain a color gradient from yellow to orange. The 11th well is red. The 12th well is white. To the right of the 12th well are 10 green wells.

Annexe 5

Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries Gram+ et Gram - sur la base de différence de composition chimique et d'ultrastructure des parois cellulaires.

Technique

La coloration différentielle de Gram s'effectue en trois phases :

1. Préparation et fixation des frottis (à partir d'une colonie sur le milieu solide) :

- Déposer une goutte d'eau distillé stérile sur une lame de verre ;
- Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une Pipette pasteur boutonnée ;
- Déposer soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau et laisser sécher ;
- Les cellules sont fixées à l'alcool flambé (passage rapide ou dessus d'une flamme) ;
- La lame est déposée sur un portoir pour la coloration.

2. Coloration

- Recouvrir la lame par le violet de Gentiane pendant 1min. Eliminer l'excès par l'eau courante.
- Ajouter du Lugol (mordant) et appliquer pendant 1min, jeter l'excès par l'eau courante.
- Décoloré à l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau distillée.
- Recolorer à la fuchsine (safranine) pendant 1 min, rinçage à l'eau puis séchage.

3. Observation au microscope a immersion

L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion et au plus fort grossissement ($G \times 100$) en lumière blanche (lumière maximale).

Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.