

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ABDERRAHMANE MIRA DE BÉJAÏA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Caractérisation de souches d'actinobactéries dégradant le polyéthylène

Réalisé par

M. BENNAI Sofiane

M. BOULAKROUNE Mounir

Soutenu le 13/07/2022 devant le jury composé de :

	Nom & Prénom	Grade	Établissement
Président	M. KECHA Mouloud	Pr	Université de Bejaia
Examineur	Mme. ARKOUB DJOUdi Warda	MCA	Université de Bejaia
Encadrant	Mme. DJINNI Ibtissem	MCA	Université de Bejaia
Invité	Mlle. BELABBAS Hanane		Université de Bejaia

Dédicaces

A NOS CHÈRES PARENTS

A nos frères, nos sœurs et nos familles

Aucune dédicace ne saurait exprimer notre respect, notre amour éternel et notre considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour notre instruction et notre bien-être. Nous vous remercions pour tout le soutien et l'amour que vous nous avez portez depuis notre enfance et nous espérons que votre bénédiction nous accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien qu'on ne vous en acquittera jamais assez. Puisse ALLAH, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais on ne vous déçoive.

M. BENNAI Sofiane

M. BOULAKROUNE Mounir

Remerciements

Nous tenons à la fin de ce travail à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la santé et de nous avoir permis de mener à terme ce projet. En premier lieu, nous tenons à remercier nos encadrants, Dr. DJINNI Ibtissem et M^{lle} BELABBAS Hanane, pour leur disponibilité, leur suivi, leur patience et leur précieux conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à remercier les membres du jury Pr. KECHA Mouloud et Mme. ARKOUB DJOUDI Warda d'avoir consacré une partie de leur temps à examiner ce mémoire, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et pour leur contribution à l'enrichir.

Enfin, nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce projet, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidés, conseillés et soutenus à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
Partie 1 Plastique et pollution	3
1. Définition du plastique.....	3
2. Classification des polymères	3
2.1. Selon leur origine	3
2.2. Selon leur architecture.....	3
2.3. Selon le comportement mécanique et thermique	4
2.4. Selon la structure.....	5
3. Types de Polyéthylène	5
4. Polyéthylène à basse densité (PEBD).....	7
4.1. Propriétés.....	7
4.2. Applications	7
5. La biodégradation des polymères	8
5.1. Définition	8
5.2. Etapes de la biodégradation.....	9
6. Microorganismes dégradant le plastique	10
7. Impacte du plastique	11
8. Le plastique en Algérie	12
Partie 2 Actinobactéries	13
1. Définition et caractéristiques	13
2. Ecologie	13
3. Taxonomie et classification des actinobactéries	13
4. Importance des actinobactéries	14
5. Exemple d'actinobactéries dégradant le plastique	15
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Matériel	16
1. Matériel analytique	16
2. Matériel polymère.....	16

3.	Matériel biologique.....	16
3.1.	Souches d'actinobactéries.....	16
3.2.	Germes cibles.....	17
II.	Méthodes.....	17
	Repiquage des souches d'actinobactéries.....	17
1.	Etude des caractères morphologiques des souches.....	17
1.1.	Caractères macro-morphologiques.....	17
1.2.	Caractères micro-morphologiques.....	17
2.	Caractères physiologiques.....	18
2.1.	Dégradation des sucres.....	18
2.2.	Utilisation des acides aminés.....	18
2.3.	Croissance à différentes valeurs de pH.....	18
2.4.	Croissance à différentes valeurs de la température.....	18
2.5.	Croissance en présence de NaCl.....	19
2.6.	Sensibilité aux antibiotiques.....	19
2.7.	Resistance ou sensibilité aux métaux lourds.....	19
2.8.	Dégradation des sels de sodium.....	19
3.	Mise en évidence de l'activité antagoniste.....	19
4.	Etude du potentiel de dégradation du polyéthylène basse densité.....	20
4.1.	Préparation de la suspension sporale.....	20
4.2.	Préparation des films de PEBD.....	20
4.3.	Mise en évidence de la dégradation des films de PEBD sur milieu solide.....	21
4.4.	Mise en évidence de la dégradation des films de PEBD sur milieu liquide.....	22
4.5.	Caractérisation des films de PEBD.....	23
4.6.	Evaluation de la perte de masse.....	23
4.7.	Détermination de la valeur du pH.....	23
Chapitre III : Résultats et discussion		
1.	Etude des caractères morphologiques des souches étudiées.....	24
1.1.	Caractères macro-morphologiques.....	24
1.2.	Caractères micro-morphologiques.....	27
2.	Caractères physiologiques et biochimiques.....	28
2.1.	Dégradation des sources de carbone.....	28
2.2.	Utilisation des acides aminés.....	29

2.3.	Croissance à différentes valeurs de pH	30
2.4.	Croissance à différentes valeurs de température	31
2.5.	Croissance en présence de NaCl	32
2.6.	Resistance ou sensibilité aux métaux lourds	32
2.7.	Dégradation des sels de sodium	33
2.8.	Sensibilité aux antibiotiques.....	35
3.	Mise en évidence de l'activité antagoniste	35
4.	Etude du potentiel de dégradation du polyéthylène par les isolats d'actinobactéries.....	37
4.1.	Mesure de la perte de masse des éprouvettes	37
4.1.1.	Sur milieu solide	38
4.1.2.	Sur milieu liquide.....	39
4.2.	Mesure du pH	43
CONCLUSION		45

Références

Annexe I

Annexe II

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Tableau I: Propriétés du polyéthylène basse densité.....	7
Tableau II: Exemples de microorganismes dégradant différents types de plastique.....	10
Tableau III: Exemple d'actinobactéries dégradant le plastique	14
Tableau IV: Poids des éprouvettes utilisées pour chaque souche milieu solide.....	20
Tableau V: Poids des éprouvettes utilisées pour chaque souche milieu liquide.....	21
Tableau VI: Caractéristiques culturales des trois isolats sur différents milieux ISP.	24
Tableau VII: Résultats des tests physiologiques et biochimiques des souches MS1, MS15 et MS155	32
Tableau VIII: Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches MS1, MS15 et MS155.	34

Liste des figures

Figure 1: Production mondiale de plastique en millions de tonnes.....	11
Figure 2: Applications biotechnologiques des actinobactéries.....	13
Figure 3: photographie des éprouvettes de polymères PEBD (A): pour milieux liquide 2,5x2,5 cm (B): pour milieux solide 5x5 cm.....	15
Figure 4: Photographie de lieux d'isolement des souches (A): décharge publique de Bejaia à Boulimate. (B): rivage de Sidi Ali Lebher.....	16
Figure 5: Films noir et transparent en immersion dans la gélose	20
Figure 6: Exemple films noir et transparent en immersion dans le milieu liquide MSM. 22	
Figure 7: Aspect macromorphologique des 3 isolats sur différents milieux ISP après 14 jours d'incubation à 28°C.....	25
Figure 8: Observation au microscope optique de la souche MS1 (Gx4), (Gx10) et (Gx40) cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Gausse.	26
Figure 9: Observation au microscope optique de la souche MS15 (Gx4), (Gx10) et (Gx40) cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu ISP4.....	26
Figure 10: Observation au microscope optique de la souche MS155 (Gx4), (Gx10) et (Gx40) cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Gausse.....	27
Figure 11: Photographies de l'aspect morphologique des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu ISP9 contenant différents sources de carbone à 1%.....	28
Figure 12: Photographies de l'aspect morphologique des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu ISP9 contenant différentes acides aminés.	28
Figure 13: Photographies des cultures de la souche MS1 sur milieu Gausse à différents pH.	29
Figure 14: Photographies des cultures de la souche MS15 sur milieu Gauss à différents pH.	29

Figure 15: Photographies des cultures de la souche MS155 sur milieu Gausse à différents pH.	30
Figure 16: Photographie de la souche MS155 sur milieu Gauss à 4°C.....	30
Figure 17: Photographies des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu Gausse contenant différentes concentrations de NaCl.....	31
Figure 18: Photographies des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu Gausse contenant différents métaux lourds.....	32
Figure 19: (A): Souche MS15 en présence de l'acétate de sodium. (B): Souche MS155 en présence de l'oxalate de sodium.	32
Figure 20 : Activité antagoniste des souches MS1, MS15 et MS155 isolées à l'égard des germes cibles.	35
Figure 21: Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat MS15 et MS155 à l'égard de <i>Aspergillus niger</i>	36
Figure 22: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu solide MSM agar après 30 jours d'incubation .	37
Figure 23: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence de la souche MS1 sur milieu solide MSM après 30 jours d'incubation.	38
Figure 24: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence de la souche MS15 sur milieu solide MSM après 30 jours d'incubation.	39
Figure 25: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence de la souche MS155 sur milieu solide MSM après 30 jours d'incubation.	39
Figure 26: Variation des valeurs du pH de milieux MSM de la souche MS1, en fonction du temps d'incubation.	42
Figure 27: Variation des valeurs du pH de milieux MSM de la souche MS15, en fonction du temps d'incubation.	43

Figure 28: Variation des valeurs du pH de milieux MSM de la souche MS155, en fonction du temps d'incubation. 43

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plastiques, sont devenus des objets d'usage courant. Mais ils sont maintenant reconnus comme une source de pollution pour l'environnement. Ils affectent l'ensemble de la planète jusqu'aux régions les plus reculées (Académie des sciences, 2021).

De nombreux progrès restent à faire pour réduire la pollution de l'environnement par les déchets des plastiques, même s'ils ont été collectés au maximum chez les utilisateurs. En 2016, l'Europe a produit environ 60 millions de tonnes de plastiques, dont 40% ont été utilisés comme emballages (Revue de l'Institut Veolia, 2019).

Les plastiques constituent une menace sérieuse pour notre environnement et il est impératif de les éliminer de l'environnement. Les plastiques qui sont dégradés par les micro organismes sont connus comme plastiques biodégradables et les micro-organismes peuvent les dégrader en H₂O et CO₂ (Nakajima-Kambe et al., 2009).

Sa production a commencé dans les années cinquante et n'a cessé d'augmenter durant le dernier siècle pour atteindre plus de 350 millions de tonnes en 2017 (Plastics Europe, 2018).

Bien que le recyclage des polymères usés soit significativement amélioré afin de réduire leur volume dans les décharges (Hakkarainen et Albertsson, 2004), cette technique reste inadéquate pour certains déchets tels que les sachets, les films de paillage agricole ou les emballages alimentaires, pour lesquels le polyéthylène à basse densité est le polymère de base. Ce dernier est l'un des thermoplastiques les plus utilisés dû à ses bonnes propriétés à l'état solide, son inertie chimique et son faible coût (Orhan et Buyukgungor, 2000).

La biodégradation du polyéthylène à basse densité par des micro-organismes semble être le meilleur choix pour lutter contre son accumulation dans la nature (Negi et al., 2009).

Malgré le fait que ces plastiques représentent des produits chimiques non naturels, plusieurs microorganismes capables de métaboliser ces polymères ont été identifiés ces dernières années. Dont des bactéries et des champignons, sont connus pour dégrader les plastiques à base de pétrole (Jumaah, 2017).

Il est indiqué que de nombreuses espèces de bactéries telles que *Pseudomonas Fluorescens* et *P. aeruginosa* montrent une grande capacité à dégrader le polyéthylène en milieu aquatique (Hussein et al., 2015).

Le polyéthylène basse densité (PEBD) est un thermoplastique fabriqué à partir du monomère éthylène. C'était la première qualité de polyéthylène, produite en 1933 par Imperial Chemical Industries en utilisant un procédé à haute pression par polymérisation radicalaire. Sa fabrication utilise la même méthode aujourd'hui. Malgré la concurrence des polymères plus modernes, le PEBD continue d'être une qualité plastique importante (Dennis Malpass, 2010).

L'identification et la caractérisation des enzymes microbiennes et de leurs mécanismes moléculaires ont été considérées comme critiques afin de développer un processus biotechnologique pour la remédiation des plastiques (Danso et al., 2019).

Les enzymes sécrétées par les micro-organismes pour la biodégradation des plastiques sont principalement la lipase, la protéinase k et la déshydrogénase (Bahl et al. 2020).

Cette étude s'inscrit dans cette problématique pour investiguer les souches d'actinobactéries provenant de sites contaminés par du plastique et mettre en évidence le potentiel de dégradation du PEBD.

Pour cela, cette recherche est divisée en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique, abordant en premier lieu le plastique, son utilisation et impact ainsi que sa biodégradation, les leur écologie, leur taxonomie et importance et quelques exemples d'actinobacteries dégradant le plastique.

Le deuxième chapitre est consacré à l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de cette problématique regroupant le matériel et les différents procédés méthodologiques mis en œuvre pour la caractérisation des souches d'actinobactéries, dégradant le polyéthylène PEBD provenant d'un site pollué en plastique, l'étude morphologique, antagoniste et les caractères physiologiques et biochimiques des isolats obtenus, l'étude de leur capacité à dégrader le PEBD sur milieux solide et liquide.

Enfin, le chapitre trois présente les résultats obtenus et leur discussion, suivis d'une conclusion.

Chapitre I

Revue bibliographique

Partie 1 Plastique et pollution

1. Définition du plastique

Les polymères plastiques sont des matériaux synthétiques constitués de macromolécules (molécules de polymère). Les polymères synthétiques sont composés d'unités structurales, assemblées entre elles par réaction chimique - les monomères. Le plastique est formé par la réaction de polymérisation (initiée par la chaleur, la pression et/ou des catalyseurs) qui consistent à lier plusieurs petites molécules sous forme de chaîne, afin de former une macromolécule (polymère). Les molécules sont alors simplement disposées consécutivement. Si la matière première est constituée de molécules identiques, le produit obtenu est appelé homopolymère, tandis que s'il est constitué de différentes molécules, il est connu comme un copolymère ou hétéro polymère (Debeaufort et al., 2022).

Les matières plastiques d'origine minérale représentent aujourd'hui environ 90% de la production : charbon 20%, pétrole 65%, gaz naturel 10%, autres 5% (Charvolin, 2013).

2. Classification des polymères

2.1. Selon leur origine

Les polymères peuvent être classés en trois catégories :

- **Les polymères naturels**, sont issus des règnes végétal ou animal. Dans cette catégorie, la famille des polysaccharides (cellulose, amidon...), des protéines (laine, soie...) et le caoutchouc naturel, etc. peuvent être mentionnés.
- **Les polymères artificiels**, sont obtenus par modification chimique de polymères naturels de façon à transformer certaines de leurs propriétés. Les esters cellulosiques (nitrocellulose, acétate de cellulose...) ont toujours connu une certaine importance économique.
- **Les polymères synthétiques**, totalement issus de l'Homme, sont obtenus par polymérisation de monomères (Fontanille et Gnanou, 2005).

2.2. Selon leur architecture

Selon leur architecture, les polymères peuvent encore être classés en trois catégories :

Polymères monodimensionnels pour lesquels chaque chaîne macromoléculaire est constituée d'un nombre élevé mais fini d'unités monomères. De tels systèmes correspondent à la polymérisation de monomères bivalents et une macromolécule linéaire

peut être très schématiquement représentée par un trait continu divisé en intervalles figurant chacun une unité monomère.

- **Polymères bidimensionnels** dont certains peuvent être produits par la nature (carbone graphite, kératine...). Dans le domaine des polymères synthétiques ce sont encore des curiosités de laboratoire. Ils se présentent sous la forme de feuillets bidimensionnelles, d'épaisseur comparable à celle des molécules simples.
- **Polymères tridimensionnels**, naturels (lignine...) ou bien résultant de la polymérisation de monomères dont la valence moyenne est supérieure à deux. Ils peuvent aussi être obtenus par la réticulation (formation d'un réseau tridimensionnel ou polymère réticulé), par voie physique ou chimique, de polymères monodimensionnels. Leur dimension moléculaire peut être considérée comme infinie puisque toutes les unités monomères constitutives d'un objet sont liées de façon covalente pour former une seule macromolécule (Fontanille et Gnanou, 2005).

2.3. Selon le comportement mécanique et thermique

Selon leur comportement thermomécanique, trois grandes classes de polymères sont distinguées : les thermoplastiques, les thermodurcissables, et les élastomères (Kausch et al., 2002).

- **Les thermoplastiques**

Les matériaux thermoplastiques ou thermoplastes sont des solides généralement solubles, formés de chaînes distinctes bien compactées, liées entre elles par des seules liaisons secondaires (forces de van der Waals ou dipolaires, liaisons d'hydrogène, etc.) et mis en forme (même de façon répétitive) par chauffage et refroidissement (Kausch *et al.*, 2002).

Un thermoplastique est un polymère linéaire ou ramifié pouvant être ramolli par chauffage et durci par refroidissement dans un intervalle de température spécifique. Ces polymères peuvent cristalliser thermoplastes amorphes ou thermoplastes semicristallins comme le polyéthylène (PE), le poly chlorure de vinyle (PVC) ou le polystyrène (PS) sont mis en forme par diverses techniques comme l'injection, l'injection-soufflage, l'extrusion ou le rotomoulage (Berthelot, 2013).

- **Les polymères thermodurcissables**

Les thermodurcissables sont jusqu'à présent les plus utilisées dans l'industrie des composites à matrice organique du fait de leurs propriétés mécaniques et de leur stabilité une fois transformés. Contrairement aux thermoplastiques, un thermodurcissable durcit au cours de la polymérisation lors de la montée en température en formant un réseau

tridimensionnel de monomères liés par liaisons covalentes. La transformation est unique et donne lieu à une pièce définitive (Christophe, 2011).

- **Les élastomères**

Les élastomères sont des polymères de haute masse moléculaire et à chaînes quasiment linéaires. Les macromolécules (ensembles de monomères), entrelacées comme un tas de vers particulièrement longs, forment occasionnellement des ponts entre elles. Un élastomère est donc un polymère dit « élastique » : il supporte de très grandes déformations, presque totalement réversibles. Le terme élastomère désigne ainsi tous les caoutchoucs synthétiques, c'est-à-dire les substances macromoléculaires possédant l'élasticité dite caoutchouteuse (Pic, 2009).

2.4.Selon la structure

Les polymères peuvent présenter des architectures extrêmement variables. Ils peuvent être linéaires, ramifiés ou réticulés. Le plus souvent, ils sont amorphes, parfois ils peuvent être, au moins partiellement, cristallisés (Weiss, 2009).

3. Types de Polyéthylène

Les types de polyéthylène (PE) sont principalement classés en fonction de leur densité. (Vasile et al., 2005).

Low-Density Polyethylene (LDPE)

Le LDPE est un matériau semi-rigide et translucide et a été le premier des polyéthylènes à être développé. Ses qualités incluent la ténacité, la flexibilité, la résistance aux produits chimiques et aux intempéries et une faible absorption d'eau.

High-Density Polyethylene (HDPE) Resins

Les résines PEHD offrent ténacité (résistance à la température jusqu'à -60°C), rigidité et résistance pour les applications de moulage par soufflage de produits extrudés et de films et d'articles moulés par injection. Elles possèdent de nombreuses applications dans les produits de soins personnels, ménagers, industriels et de bouteilles.

High-Density Polyethylene (HDPE)

Le PEHD est plus rigide et plus dur que les matériaux de densité inférieure avec un poids moléculaire inférieur à 300 000 g/mol. Il a également une résistance à la traction élevée, quatre fois supérieure à celle du LDPE et une résistance à la compression élevée.

Medium-Density Polyethylene (MDPE)

Le PEHD a une bonne résistance aux chocs et aux chutes. Il est utilisé pour les tuyaux et raccords de gaz, les sacs, les films rétractables, les films d'emballage, les sacs de transport et les fermetures à vis. Le MDPE a un poids moléculaire moyen compris entre 200 et 300 kg/mol.

Linear Polyethylenes (LLDPE)

Le PEBDL est fabriqué par une variété de procédés : phase gazeuse, solution, boue ou conversion à haute pression. Il est largement utilisé pour tous les types de réservoirs, fûts, conteneurs, trémies, bacs, etc. Sa densité est de 0,920 g/cm³.

Very Low-Density Polyethylene (VLDPE) Resins

Le VLDPE est extrêmement flexible en offrant une résistance améliorée à la déchirure, aux chocs et à la perforation. Ils sont utilisés pour les tuyaux et les tubes, les sacs de glace et d'aliments surgelés, les emballages alimentaires et les films étirables.

Ultra Low-Density Polyethylene (ULDPE) Resins

Les résines ULDPE offrent une plus grande flexibilité à basse température et une résistance aux fissures flexibles idéales pour contenir des liquides qui se déplacent librement dans un emballage et offrent d'excellentes propriétés optiques.

Crosslinked Polyethylene (XPE)

XPE est unique dans la famille, les chaînes moléculaires du produit final sont liées entre elles dans un réseau tridimensionnel. Ces propriétés le rendent idéal pour les conteneurs à haute performance, tels que les réservoirs pour produits chimiques agressifs.

Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE)

L'UHMWPE est un homopolymère linéaire. Structurellement, il est similaire au HDPE, différant par la longueur moyenne de ses chaînes. Le poids moléculaire moyen est 10 à 100 fois supérieur à celui des grades standard de PEHD (supérieur à $3,1 \times 10^6$ g/mol). Il présente la meilleure résistance à l'usure par glissement et la meilleure résistance aux chocs de tous les polymères, remplaçant régulièrement l'acier.

4. Polyéthylène à basse densité (PEBD)

4.1. Propriétés

Le polyéthylène basse densité est un solide incomplètement cristallin dont le degré de cristallinité est compris entre 50 et 60 %, ce qui lui confère plusieurs propriétés telles que l'opacité, la résistance à la traction, la résistance à la déchirure, la rigidité et la résistance chimique, la flexibilité même à basse température. Chimiquement, le PEBD ne réagit pas à la température ambiante, mais il est lentement attaqué par les agents oxydants forts et certains solvants le ramollissant ou le font gonfler. Il peut être utilisé à des températures allant jusqu'à 95 C pendant de courtes périodes et à 80 C en continu. (Kumar et Raut, 2015).

En général, le PEBD présente une bonne résistance chimique (Zaibet, 2016), il est :

- Très résistant aux acides faibles.
- Résistant aux acides forts non oxydants.
- Très résistant aux bases fortes et faibles.
- Résistant aux solvants organiques au dessous de 80°C

Le tableau I rapporte les propriétés du polyéthylène basse densité.

Tableau I: Propriétés du polyéthylène basse densité (Kumar et Raut, 2015).

Propriétés	Valeur	Intervalle
Densité, g/cc	0,91	0.910–0.925 g/cc
Dureté, shore D	44	41–46 Shore D
Résistance à la traction, rendement MPa	10	4–16 MPa: ASTM D638
Résistance à la traction, ultimate MPa	25	7–40 MPa
Module d'élasticité, GPa	0,2	0.07–0.3 GPa; in tension; ASTM D638
Module de flexion, GPa	0,4	0–0.7 GPa: ASTM D790
Coefficient de dilatation thermique, linéaire pm/m-C	30	20–40mm/m 1C; ASTM D696
Point de fusion, °C	115	

4.2. Applications

Les propriétés spécifiques du PEBD lui ont offert des domaines d'application très vastes et très variés, il peut être utilisé comme films pour emballage, casier à bouteilles et caisses de manutention, sacs à grande contenance, films pour bâtiment, objet domestiques: seaux, cuvettes, bassines, bacs..., jouets miniatures, pèles et seaux de plage. Attaches, fermetures, sacs, cabas,... etc, des pièces industrielles diverses: mécaniques, électriques...etc et articles ménagers : recouvrement des câbles «tuyaux» et du matériel d'hôpital: poches de perfusion,...(Zaibet, 2016)

5. La biodégradation des polymères

5.1. Définition

La biodégradation est définie comme toute modification physique ou chimique du polymère résultant de facteurs environnementaux tels que la lumière, la chaleur, l'humidité, les conditions chimiques ou l'activité biologique. Induisant des modifications des propriétés des polymères (détérioration de la fonctionnalité) dues à des réactions chimiques, physiques ou biologiques entraînant une scission de liaison et des transformations chimiques ultérieures (formation d'homogénéités structurales). La dégradation s'est traduite par des modifications des propriétés des matériaux telles que les caractéristiques mécaniques, optiques ou électriques, par des craquelures, des fissures, une érosion, une décoloration, une séparation de phase ou un délaminage. Les micro-organismes tels que les bactéries et les champignons sont impliqués dans la dégradation des plastiques naturels et synthétiques. La biodégradation est régie par différents facteurs qui comprennent les caractéristiques du polymère, le type d'organisme et la nature du prétraitement, les caractéristiques du polymère telles que sa mobilité, sa tacticité, sa cristallinité, son poids moléculaire, le type de groupes fonctionnels et de substituants présents dans sa structure, et les plastifiants ou additifs ajoutés au polymère jouent tous un rôle important dans sa dégradation. Lorsque l'O₂ est disponible, les micro-organismes aérobies sont principalement responsables de la destruction des matériaux complexes, avec la biomasse microbienne, le CO₂ et le H₂O comme produits finaux. En revanche, dans des conditions anoxiques, les micro-organismes anaérobies sont responsables de la détérioration du polymère avec comme principaux produits la biomasse microbienne, le CO₂, le CH₄ et l'H₂O (Shah et al., 2008).

Les enzymes sécrétées par les micro-organismes pour la biodégradation des plastiques sont principalement la lipase, la protéinase k et la déshydrogénase (Bahl et al., 2020).

5.2. Etapes de la biodégradation

L'objectif final de la biodégradation est de transformer des substrats organiques en produits minéraux en faisant intervenir plusieurs enzymes exprimées soit par un micro-organisme unique soit par un groupe de micro-organismes (consortium) (Ouazzani, 2002).

➤ **La Biodétérioration** est une dégradation au niveau de la surface qui modifie les propriétés mécaniques, physiques et chimiques du matériau. Cette étape se produit lorsque le matériau est exposé à des facteurs abiotiques dans l'environnement extérieur et permet une dégradation supplémentaire en affaiblissant la structure du matériau. Certains facteurs abiotiques qui influencent ces changements initiaux sont la compression (mécanique), la lumière, la température et les produits chimiques dans l'environnement. La biodétérioration est principalement le résultat de l'activité de micro-organismes se développant à la surface ou/et à l'intérieur d'un matériau donné. Les micro-organismes impliqués dans la biodétérioration sont très diverses et appartiennent aux groupes de bactéries, protozoaires, algues, champignons et lichens. Ils peuvent former des consortiums avec une organisation structurée appelés biofilms (Lucas et al., 2008).

➤ **La Biofragmentation** d'un polymère est le processus lytique dans lequel les liaisons au sein d'un polymère sont clivées générant des oligomères et des monomères à sa place. Les micro-organismes utilisent différents modes opératoires pour cliver les polymères. Ils sécrètent des enzymes spécifiques ou génèrent des radicaux libres (Lucas et al., 2008).

➤ **La bioassimilation** les produits issus de la biofragmentation sont ensuite intégrés dans les cellules microbiennes. Certains des produits de la fragmentation sont facilement transportés à l'intérieur de la cellule par les transporteurs membranaires. Cependant, d'autres doivent encore subir des réactions de biotransformation pour donner des produits qui peuvent ensuite être transportés à l'intérieur de la cellule. Une fois à l'intérieur de la cellule, les produits entrent dans les voies cataboliques qui conduisent soit à la production d'adénosine triphosphate (ATP) soit à des éléments de la structure cellulaire (Lucas et al., 2008).

➤ **La minéralisation** Lorsque les fragments oligomères formés sont suffisamment petits, ils sont transportés à l'intérieur des cellules où ils se minéralisent. Il y a alors formation de gaz (CO_2 , CH_4 , N_2 , H_2), d'eau, de sels, de minéraux et de la biomasse (Bastioli, 2014).

6. Microorganismes dégradant le plastique

Le rôle des micro-organismes est très important pour la dégradation du plastique. Le tableau II ci-dessous présente la liste des micro-organismes et leurs efficacités de dégradation du plastique (Raziyafathima et al., 2016).

Tableau II: Exemples de microorganismes dégradant différents types de plastique (Raziyafathima et al., 2016).

Microorganisme	Type de plastique	Source des microorganisme	efficacité de la dégradation
<i>Bacillus cereus</i>	Polyéthylène	Sol de décharge	7,2 - 2.4%
<i>Pseudomonas putida</i>	Couverture du lait	Terre de jardin	75.3%
<i>Streptomyces sp</i>	LDPE	Ordures	46.7%
<i>Pseudomonas sp</i>	Polyéthylène naturel et synthétique	Décharge d'ordures ménagères	31.4% et 16.3%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Polyéthylène basse densité	Sol de la décharge de plastique	73.38%
<i>Aspergillus glaucus</i>	Sacs en polyéthylène et gobelets en plastique	Sol de la rhizosphère des mangroves	28.80%
<i>Bacillus cereus</i>	LDPE	Compost municipale	17.036%
<i>Micrococcus luteus</i>	Gobelet en plastique	Sol des forêts	38%
<i>Masoniella sp</i>	Gobelet en plastique	Sol des forêts	27.4
<i>Streptomyces KU8</i>	Polyéthylène basse densité	Sols pollués	46.16%

7. Impacte du plastique

Le plastique est devenu un élément indispensable de notre vie quotidienne. Ces propriétés telles que sa légèreté et sa résistance à la dégradation chimique et physique en font un matériel prisé pour tout type d'utilisation (construction, automobile, emballage...) (Brusselman, 2021). Sa production a commencé dans les années cinquante et n'a cessé d'augmenter durant le dernier siècle pour atteindre plus de 350 millions de tonnes en 2017 (Plastics Europe, 2018). La figure 1 illustre l'évolution de la production mondiale de plastique de 1959 à 2020 et ne projection jusqu'en 2030.

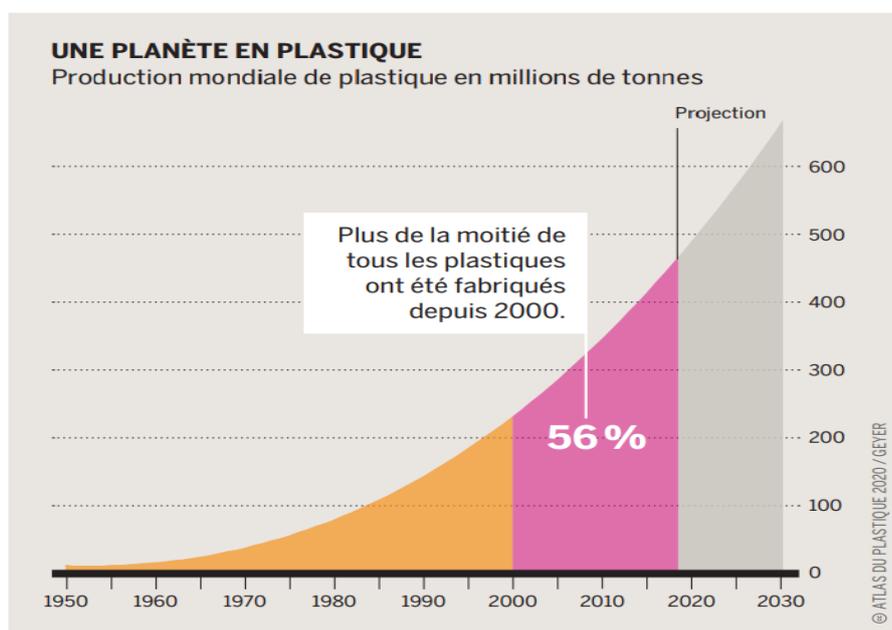


Figure 1: Production mondiale de plastique en millions de tonnes (Atlas plastique 2020).

Entre 1950 et 2017, 9,2 milliards de tonnes de plastique ont été produites au total, ce qui fait plus d'une tonne par personne vivant actuellement sur la planète. Il s'agit principalement de produits à usage unique et d'emballages. 10 % seulement ont été recyclés. De nombreuses substances chimiques présentes dans le plastique ont un effet potentiellement grave et à long terme sur la santé humaine (Atlas plastique, 2020).

Six principaux types de plastiques dominent les marchés d'aujourd'hui : le polyéthylène (PE, faible densité), le polypropylène (PP), le polychlorure de vinyle (PVC), le polystyrène (PS, et EPS expansé), le polyuréthane (PUR) et le polyéthylène téréphtalate (PET) (Simon, Schulte, 2017).

Pour la santé humaine, ce sont les plus petites particules (micro et nanoparticules suffisamment petites pour être ingérées), qui sont les plus préoccupantes. Les particules de plastique peuvent être ingérées de plusieurs manières : par voie orale via l'eau, par la consommation de produits marins contenant des microplastiques, par la peau via les cosmétiques, ou par inhalation de particules dans l'air (Ritchie et-Roser, 2018).

5000 milliards de morceaux de plastique flottent déjà dans nos océans et d'ici 2050, toutes les espèces d'oiseaux marins mangeront du plastique régulièrement. Environ 700 espèces d'animaux marins ont déjà ingéré du plastique ou ont été piégés dedans. Les estimations sur la durée de vie du plastique vont de 450 ans à l'infini (National Geographic, 2021).

8. Le plastique en Algérie

En termes de consommation de cette matière, une augmentation de 11 % par an a été enregistrée durant ces dix dernières années, passant d'un usage de 10 kg par habitant en 2007 à 23 kg en 2017, avec une estimation de 25,8 kg en 2020, 60 % de cette consommation est consacrée aux emballages, 20% au secteur du bâtiment et de la construction et le reste à d'autres industries.

Sur les 13.1 Millions de tonnes de déchets générés chaque année (2018), 2.1 millions de tonnes contiennent des résines plastiques, selon les chiffres de l'AND (Agence Nationale des Déchets) cette quantité est en légère diminution comparée aux chiffres obtenus en 2014. Ce qui peut être expliqué par le développement progressif de la filière de récupération et de recyclage des déchets plastiques. Une étude sur les taux de valorisation des déchets tous types confondus a fait ressortir que le taux de valorisation des matières plastiques est de l'ordre de 15%.

Avec 8.14%, le PEBD représente le taux le plus élevé dans la catégorie des déchets plastiques générés. Sur le littoral Algérien, plus de 341 sacs en plastique ont été recensés sur un linéaire de 100 m des différentes plages. Les ménages génèrent annuellement environ 23 milliards de sacs plastiques tous types confondus, soit environ 557 sacs par habitant par année.

Le PET représente 3.57% de la quantité annuelle globale des déchets générés, ce qui équivaut à 15.59 milliards de bouteilles d'eau et de boisson de capacité de 1.5L. Un Algérien consomme en moyenne 15 kg de PET soit 363 bouteilles de 1.5L par an (AND 2020).

Partie 2 Actinobactéries

1. Définition et caractéristiques

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses à Gram positif, le plus souvent aérobies, anaérobies facultatives ou anaérobies, et appartiennent au phylum *Actinobacteria* et à l'ordre *Actinomycetales*. La teneur en G + C de leur ADN est très élevée - environ 70 %. Ils sont également connus sous le nom de actinomycètes, dérivé de deux mots grecs *aktis* signifiant "foudre" et *mykes* signifiant "champignon" et a été classé à l'origine comme un groupe intermédiaire entre les champignons et les bactéries (Hazarika et Thakur, 2020).

2. Ecologie

Les actinobactéries existent dans des habitats naturels et artificiels. La plupart des actinobactéries sont des saprophytes, ou des organismes vivant dans le sol ; certaines forment des associations mutualistes ou parasitaires avec des plantes et des animaux. L'adaptation des actinobactéries à un large éventail d'environnements écologiques, dont le sol, l'eau douce et l'eau salée, a accru leur diversité. La densité et la diversité des populations d'actinobactéries dépendent de leur habitat et des conditions climatiques qui les influencent. (Hazarika et Thakur, 2020).

3. Taxonomie et classification des actinobactéries

L'embranchement des actinobactéries est bien établi par l'analyse des gènes d'ARNr 16S et 23S (Ludwig et al., 2012).

Les actinobactéries représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 lignées majeures actuellement reconnues dans le domaine *Bacteria* comprenant 5 sous-classes, 6 ordres et 14 sous-ordres (Barka et al., 2015).

L'ordre des *Actinomycetales* appartient à la classe *Actinobacteria* qui est maintenant limitée aux membres de la famille *Actinomycetaceae*. Par conséquent, alors que 43 familles du phylum *Actinobacteria* sont classées dans la classe *Actinobacteria*, les 5 autres classes ne constituent que 10 familles (Mohammadipanah et Dehhaghi, 2017).

4. Importance des actinobactéries

Les actinobactéries sont bien connues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications importantes dans divers domaines. Ils sont également une source prometteuse de large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle (laccases, tyrosinases, cellulases...etc). Une grande fraction d'antibiotiques sur le marché provient d'actinobactéries. Ils produisent des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement du cancer et les immuno-modulateurs qui améliorent la réponse immunitaire. Ils ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aromatiques et aliphatiques (Djinni et al., 2019).

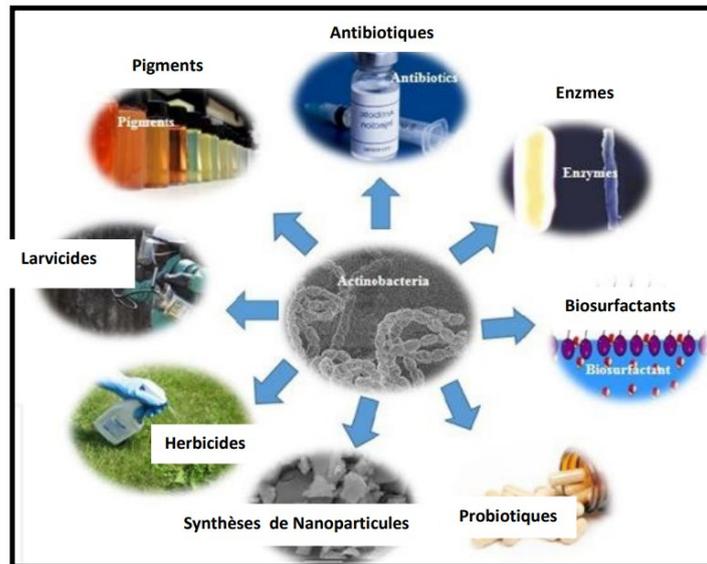


Figure 2: Applications biotechnologiques des actinobactéries (Harir, 2018).

5. Exemple d'actinobactéries dégradant le plastique

La biodégradation des plastiques implique l'excrétion d'enzymes extracellulaires par le micro-organisme, la fixation d'enzymes à la surface du plastique, l'hydrolyse en intermédiaires polymères courts, qui sont finalement assimilés par les cellules microbiennes comme source de carbone pour libérer du CO₂. Malgré le fait que ces plastiques représentent des produits chimiques non naturels, plusieurs micro-organismes capables de métaboliser ces polymères ont été identifiés ces dernières années (Mohan et al., 2020). (Tableau III).

Tableau III: Exemple d'actinobactéries dégradant le plastique (Butbunchu et al., 2019).

Family	Genus	Species/strain	Isolation method	Enzyme type	References
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora echinospora</i> B12-1	Plate count and clear zone	–	Sukkhum et al., 2009b
		<i>Micromonospora viridifaciens</i> B7-3	Plate count and clear zone	–	Sukkhum et al., 2009b
<i>Pseudonocardia</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis</i> sp. HT-32	Plate count and clear zone	Protease	Pranamuda et al., 1997
		<i>Amycolatopsis</i> 3118	Plate count and clear zone	Protease	Ikura and Kudo, 1999
		<i>Amycolatopsis</i> sp. KT-s-9	Plate count and clear zone	Protease	Tokiwa et al., 1999
		<i>Amycolatopsis mediterranei</i> ATCC 27649	–	–	Pranamuda and Tokiwa, 1999
		<i>Amycolatopsis</i> sp. 41	Plate count and clear zone	Protease	Pranamuda et al., 2001
		<i>Amycolatopsis</i> sp. K104-1	Plate count and clear zone	Serine protease	Nakamura et al., 2001
		<i>Amycolatopsis orientalis</i> ssp. <i>orientalis</i>	–	Serine protease	Li et al., 2008
		<i>Amycolatopsis thailandensis</i> CMU-PLA07 ^T	Plate count and clear zone	–	Chomchoei et al., 2011
		<i>Amycolatopsis oliviviridis</i> SCM_MK2-4	Plate count and clear zone	Protease, esterase and lipase	Penkhrue et al., 2015, 2018
	<i>Saccharothrix</i>	<i>Saccharothrix (Lentzea) waywayandensis</i>	–	Protease	Jarerat and Tokiwa, 2003; Nair et al., 2012
	<i>Kibdelosporangium</i>	<i>Kibdelosporangium andum</i>	–	Protease	Jarerat et al., 2003
	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardiaalni</i> AS4.1531 ^T	–	–	Konkit et al., 2012
		<i>Pseudonocardia</i> sp. RM423	Clear zone	–	Apinya et al., 2015
	<i>Streptoalloteichus</i>	<i>Streptoalloteichus</i> sp.	Plate count and clear zone	–	Jarerat et al., 2002
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp. APL3	Plate count and clear zone	Serine hydrolase	Sriyapai et al., 2018
		<i>Streptomyces</i> sp. K KU215	Plate count and clear zone	–	Yottakot and Leelavatcharamas, 2019
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Thermopolyspora</i>	<i>Thermopolyspora</i>	Molecular technique	–	Sangwan and Wu, 2008
		<i>Thermopolyspora flexuosa</i> FTPLA	Plate count and TGGE method	–	Husárová et al., 2014
	<i>Nonomuraea</i>	<i>Nonomuraea terminata</i> L44-1	Plate count and clear zone	–	Sukkhum et al., 2009b
		<i>Nonomuraea fastidiosa</i> T9-1	Plate count and clear zone	–	Sukkhum et al., 2009b
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Thermomonospora</i>	<i>Thermomonospora</i>	Molecular technique	–	Sangwan and Wu, 2008
		<i>Thermobifida alba</i> AHK119	–	Cutinase	Hu et al., 2010; Kitadokoro et al., 2019
	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura keratinilytica</i> T16-1	Plate count and clear zone	Serine protease	Sukkhum et al., 2009b
		<i>Actinomadura</i> sp. TF1	Plate count and clear zone	Serine hydrolase	Sriyapai et al., 2018

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia, pendant la période allant du 01/04/2022 au 30/06/2022.

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est rapporté en annexe I.

2. Matériel polymère

Au cours de cette étude, le polymère étudié est le polyéthylène basse densité (PEBD) comprenant deux types de films plastiques: transparent et noir. L'étude est menée sur les sacs plastiques en raison de leur vaste utilisation et sont une source de pollution considérable pour l'environnement. (Figure 3)

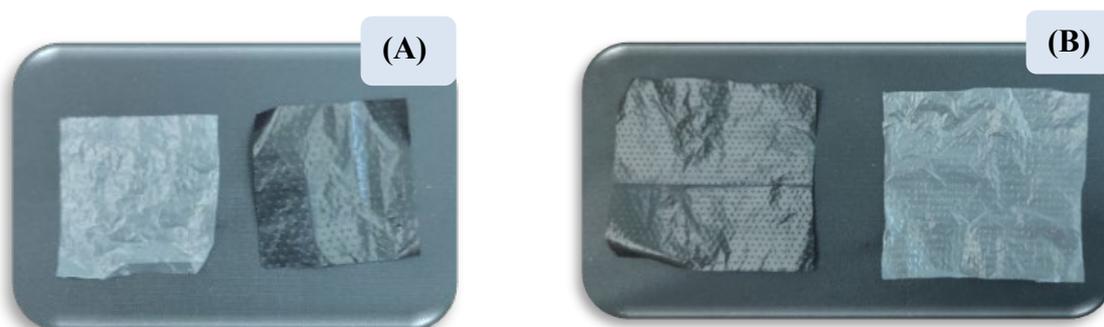


Figure 3: photographie des éprouvettes de polymères PEBD (A): pour milieux liquide 2,5x2,5 cm (B): pour milieux solide 5x5 cm.

3. Matériel biologique

3.1. Souches d'actinobactéries

Les souches d'actinobactéries nommées MS1, MS15 et MS155 ont été isolées par M^{lle} BELABBAS Hanane doctorante au sein du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA).

Les souches MS15 et MS155 ont été obtenues à partir d'un échantillon de sol prélevé au niveau de la décharge publique de Bejaia à Boulimate, tandis que l'isolat MS1 a été obtenu à partir de bouteilles en plastiques, collectées sur le rivage de Sidi Ali Lebher. (Figure 4)



Figure 4: Photographie de lieux d'isolement des souches (A): décharge publique de Bejaia à Boulimate. (B): rivage de Sidi Ali Lebher.

3.2. Germes cibles

Bactéries: *E. coli* ATCC, *S. aureus* ATCC, *V. cholerae* ATCC, SARM ATCC, *Bacillus subtilis* ATCC, *S. Typhi* ATCC, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Bacillus cereus* ATCC, *Klebsiella pneumoniae* ATCC

Moisissures: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp.

II. Méthodes

Repiquage des souches d'actinobactéries

Les trois isolats étudiés sont repiqués à partir de boîtes conservées à 4°C sur le milieu Gausse et incubées à 28°C pendant 7 jours, (La MS1 et MS155 repiqué sur milieu Gausse et la MS15 sur ISP4).

1. Etude des caractères morphologiques des souches

1.1. Caractères macro-morphologiques

Cette étude consiste à déterminer l'aspect des colonies, la couleur du mycélium aérien (MA) et celui du substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles sur différents milieux International *Streptomyces* Project (ISP): ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 (Shirling et Gottlieb, 1966) dont les compositions sont détaillées en annexe II. Les boîtes sont incubées à 28°C et des observations sont effectuées après 3, 7, 14, 21 et 30 jours.

1.2. Caractères micro-morphologiques

Cette étude est essentielle pour la reconnaissance des genres, elle consiste à observer la sporulation caractéristique des souches étudiées et la fragmentation ou non des hyphes végétatifs et aériens. Elle est réalisée à l'aide d'un microscope optique (Euromex iSCOPE). Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri (aux grossissements x4,

x10 et x40) et ce, pour étudier les structures en place sans les altérer (mycélia et fructifications).

2. Caractères physiologiques

L'étude physiologique des actinobactéries consiste en des tests de dégradation de différents composés (glucides, lipides, protéines, polymères complexes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents chimiques), la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc.

Une série de tests physiologiques a été réalisée pour la différenciation des espèces d'actinobactéries. Les tests effectués sont cités ci-dessous et les méthodes ainsi que la composition des milieux de culture utilisés sont détaillés en annexe N°(II).

2.1. Dégradation des sucres

Les tests ont été réalisés sur le milieu ISP9 (milieu de base) et les sucres sont ajoutés stérilement au milieu de culture à raison de 1% (m/v).

Les sucres testés sont: glucose, galactose, fructose, mannose, cellobiose, sucrose, xylose, lactose, rhamnose, melibiose, arabinose et tryptose.

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours. Les lectures se font par comparaison de la croissance à un témoin négatif ne contenant pas de sucres (milieu ISP9 dépourvu de source de carbone) et un témoin positif contenant du glucose (ISP9 + glucose).

2.2. Utilisation des acides aminés

Le milieu utilisé est le milieu ISP9 additionné de 1g/L d'acide aminé. Les acides aminés testés sont : arginine, alanine, acide glutamique, lysine, L-histidine et serine.

Les boîtes sont incubées à 28°C et la lecture est réalisée à partir du 3^{ème} jour.

2.3. Croissance à différentes valeurs de pH

Les souches étudiées ont étéensemencées sur milieu Gause préparé avec différentes valeurs de pH (3,2; 5,2; 7,2; 9,2 et 11,2). Les boîtes ont été incubées à 28°C et la croissance est observée après 3, 7, 14, 21 et 30 jours d'incubation.

2.4. Croissance à différentes valeurs de la température

Ce test consiste à évaluer la capacité des actinobactéries à se développer à différentes températures. Les souches ont étéensemencées sur milieu Gause puis incubées à différentes températures (4, 28, 37 et 50°C). La croissance est estimée après 3, 7, 14 et 21 jours d'incubation.

2.5. Croissance en présence de NaCl

Les trois souches ont étéensemencées sur le milieu Gausse avec différentes concentrations de NaCl (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 2 et 2,5 M). Les boites sont incubées à 28°C et la croissance est suivie pendant une période de 30 jours.

2.6. Sensibilité aux antibiotiques

Pour mettre en évidence la sensibilité des isolats aux antibiotiques, MS1 et MS155 ont étéensemencées par écouvillonnage sur le milieu Gausse, et la MS15 sur le milieu ISP4 (Annexe II).

Des disques d'antibiotiques sont par la suite déposés à la surface. Les molécules testées sont: Triméthoprim, Sulfaméthoxazole (1,25/1,23ug), Acide oxalinique (10ug), Cefotaxime (30ug) et Amoxicilline (25ug).

Les boites sont incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours et le diamètre de la zone d'inhibition est observée et noté. La lecture des résultats est faite en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques d'antibiotique exprimé en millimètre.

2.7. Résistance ou sensibilité aux métaux lourds

Afin de mettre en évidence la résistance ou la sensibilité des souches d'actinobactéries isolées aux métaux lourds, des milieux Gausse additionnés de métaux lourds : zinc (Zn), cuivre (Cu), fer (Fe), chrome (Cr), cadmium (Cd), plomb (Pb), argent (Ag) et le mélange des sept métaux ont été préparés.

La résistance ou la sensibilité des souches est traduite par la croissance ou l'absence de cette dernière sur les milieux précédents après incubation à 28°C pendant 7 jours.

2.8. Dégradation des sels de sodium

Ce test consiste à apprécier la croissance des 3 souches en présence des sels de sodium comme seule source de carbone. Les sels de sodium testés sont : acétate de sodium et oxalate de sodium. Après ensemencement des boites et incubation à 28°C pendant 7 jours, la dégradation de ces sels est notée positivement après virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du jaune au rouge-rose (Gordon et al, 1974).

3. Mise en évidence de l'activité antagoniste

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des souches d'actinobactéries étudiées a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar à

l'encontre de germes cibles afin de connaître leur potentiel de production de métabolites secondaires bioactifs.

Test des cylindres d'agar

Pour chaque germe cible, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 24 heures. 3 à 4 colonies sont prélevées avec une pipette Pasteur stérile et introduites dans des tubes contenant 5mL d'eau physiologique stérile, la charge cellulaire a été par la suite ajustée par dilution de façon à obtenir une concentration de 10^7 UFC/ml. Après agitation rigoureuse au vortex, la suspension a étéensemencée par écouvillonnage sur le milieu Muller-Hinton (MH) (Annexe II).

Les souches d'actinobactéries sontensemencées en stries serrées sur le milieu Gauss et incubées à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont ensuite prélevés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablementensemencé par écouvillonnage avec les germes cibles cités précédemment. Les boîtes portant les cylindres d'agar sont placées à 4°C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion de(s) substance(s) bioactive(s) éventuellement produite(s) tout en inhibant momentanément la croissance des microorganismes cibles, puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et exprimés en millimètres.

4. Etude du potentiel de dégradation du polyéthylène basse densité

4.1.Préparation de la suspension sporale

Les boîtes de Pétri, contenant le milieu ISP4 pour MS15 et Gausse pour MS1,MS155, sontensemencées à partir des isolats d'actinobactéries. Après incubation pendant une à deux semaines à 28°C jusqu'à sporulation maximale, 10mL d'eau physiologique stérile sont déposés sur chaque boîte de Pétri. Les surfaces des boîtes sont grattées à l'aide d'un râteau. Les suspensions sont placées ensuite dans des tubes à essai stériles et agitées au vortex. A l'aide d'un spectrophotomètre, un nombre de 10^7 UFC/ml a été retenu pour le test de dégradation (Djinni et al., 2019).

4.2.Préparation des films de PEBD

Des films de PEBD de couleurs noir et transparent sont découpés sous forme d'éprouvettes (25x25 mm pour le milieu liquide et 50x50 mm pour le milieu solide), pesés, stérilisés par immersion dans de l'éthanol à 70%, rincés avec de l'eau distillée puis séchés dans un dessiccateur pendant 48h.

4.3.Mise en évidence de la dégradation des films de PEBD sur milieu solide

A fin de mettre en évidence le potentiel de dégradation des films de PEBD des trois souches étudiées, le milieu gélosé en surfusion est coulé dans des boites de Pétri (3 répétitions pour chaque isolat), les films noir et transparent de PEBD sont par la suite prélevés stérilement puis mis en immersion dans la gélose avant sa solidification (équivalent d'un film par boîte) tel que pour chaque souche le film possède un certain poids comme il est illustré dans le tableau suivant (Tableau IV). Après solidification, 1mL de suspension de spores est étalé en surface du milieu, un témoin négatif pour chaque isolat a été également préparé qui consiste en l'ensemencement des souches sur milieu dépourvu de source de carbone. Les boites sont ensuite mises à incuber pendant 30 jours à 28°C (Figure 5).

Tableau IV: Poids des éprouvettes utilisées pour chaque souche milieu solide.

m0		Noirs (mg)	Transparent (mg)
MS1	1	25,9	17,9
	2	26,8	19,7
	3	26,8	20,6
MS15	1	29,5	14,9
	2	29,1	15,1
	3	28,9	18,4
MS155	1	26,1	15,6
	2	25,6	13,9
	3	26,2	18
Témoin	1	26,5	ND

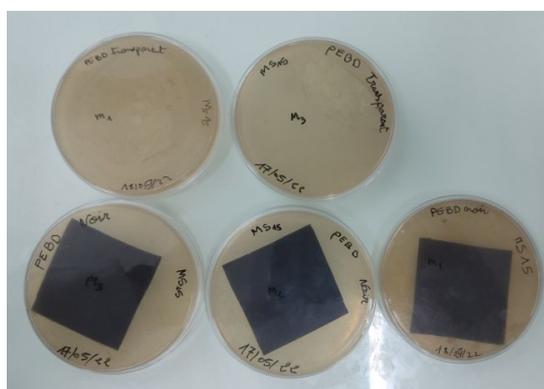


Figure 5: Films noir et transparent en immersion dans la gélose

4.4. Mise en évidence de la dégradation des films de PEBD sur milieu liquide

La dégradation des films de PEBD a également été mise en évidence sur milieu liquide. Le milieu MSM dépourvu de source de carbone, remplacée par les films de PEBD noir et transparent, tout en respectant le poids des éprouvettes comme présenté en tableau V, a été utilisé. 2 flacons de 500mL contenant 250mL de milieu ont été ensemencés pour chacun des isolats par 1mL de suspension de spores (10^7 UFC/ml) (Figure 6), puis mis en incubation à 28°C pendant 30 jours sous agitation permanente à 150 rpm. Deux témoins positifs ont été également réalisés (milieu MSM+ éprouvettes en polyéthylène).

Tableau V: Poids des éprouvettes utilisées pour chaque souche milieu liquide.

m0		Noirs (mg)	Transparent (mg)
MS1	1	7,9	5,3
	2	8,3	5,4
	3	8,4	5,5
	4	8,2	5,4
	5	8	5,4
MS15	1	6,7	4,4
	2	6,7	4,4
	3	6,7	4,4
	4	6,7	4,3
	5	6,8	4,4
MS155	1	6,5	4,2
	2	6,7	4,2
	3	6,6	4,2
	4	6,5	4,3
	5	6,7	4,3
Témoin	1	7,3	4
	2	7,3	4
	3	7,3	4,1
	4	7,3	4
	5	7,2	4

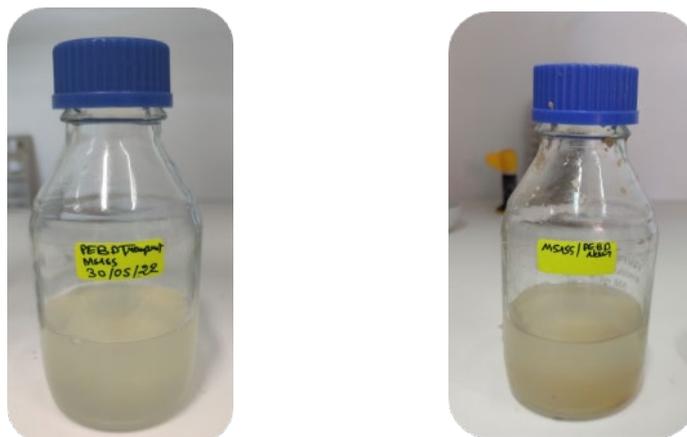


Figure 6: Exemple films noir et transparent en immersion dans le milieu liquide MSM.

4.5. Caractérisation des films de PEBD

Des prélèvements hebdomadaires pendant 30 jours sont effectués pour le test de dégradation des films sur milieu liquide. Les films ainsi récupérés ont fait objet d'une évaluation de la perte de masse ainsi que le relevé de la valeur du pH du milieu de culture. Cette caractérisation est réalisée après 30 jours d'incubation pour le test sur milieu solide.

4.6. Evaluation de la perte de masse

La perte de masse est utilisée comme critère de biodégradation du polymère. Cette méthode est basée sur le calcul de la différence de masse avant et après que les films de PEBD soient soumis aux tests de biodégradation. Dans ce cas, la valeur obtenue de la perte de masse est la moyenne de trois mesures.

La perte de masse est calculée selon la relation suivante (Bootklad, 2013).

$$P\% = \frac{m_0 - m}{m_0} * 100$$

P% : pourcentage de la perte de masse.

m_0 : masse de l'échantillon avant dégradation (g).

m : masse de l'échantillon après dégradation (g)

4.7. Détermination de la valeur du pH

La mesure de pH est réalisée avec un pH-mètre tout en introduisant la sonde à l'intérieur du produit à analyser et lire la valeur du pH. A chaque détermination du pH, il faut retirer la sonde, la rincer avec l'eau distillée et la sécher.

Chapitre III

Résultats et discussion

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions de l'étude des souches MS1, MS15 et MS155, l'étude des caractères morphologique, physiologique et biochimiques, de leurs activités antagonistes vis-à-vis de germes pathogènes. Par ailleurs, il sera également question de l'étude de la résistance ou sensibilité aux antibiotiques. Enfin, l'étude du potentiel de dégradation du polyéthylène sur milieux liquide et solide.

1. Etude des caractères morphologiques des souches étudiées

1.1. Caractères macro-morphologiques

Les propriétés culturales des souches étudiées et cultivées sur différents milieux de culture ISP (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 et ISP7), sont rapportées après 14 jours d'incubation à 28°C et sont présentées dans le tableau VI et la figure 7.

La souche MS15 a présenté une très bonne croissance sur tous les milieux utilisés, contrairement à l'isolat MS1 qui a montré une croissance moyenne sur le milieu ISP3 et le développement du mycélium aérien seulement sur milieu ISP1 ainsi qu'une très bonne croissance sur le reste des milieux. La souche MS155, quant à elle, a présenté un très bon développement sur les milieux ISP3, ISP4, ISP5, une croissance relativement bonne sur ISP7, et moyenne sur ISP1 avec, en revanche, la formation du mycélium aérien seulement sur le milieu ISP2.

L'appréciation de la couleur des mycélia aérien et du substrat a permis d'observer une différence selon le milieu de culture utilisé. En effet, le mycélium du substrat (MS) a présente une couleur beige globalement sur tous les milieux, tandis que celle du mycélium aérien, elle varie entre blanc, blanc cassé et vert verdâtre. Par ailleurs, l'absence de la production de pigments diffusibles est remarquée sur tous les milieux.

Tableau VI: Caractéristiques culturelles des trois isolats sur différents milieux ISP.

Souche	Temps d'incubation	Milieux	Croissance	Mycélium aérien		Mycélium du substrat		Pigment	Aspect
				-	ND	+			
MS1	14 Jours	ISP 1	+/-	-	ND	+	Jaune claire	-	ND
		ISP 2	+++	+	Blanc cassé	+	Beige	-	Craie/craqueler
		ISP 3	+	+	ND	+	Beige	-	ND
		ISP 4	+++	+	Blanc	+	Beige	-	Craie
		ISP 5	+++	+	Blanc cassé	+	Beige	-	Craie
		ISP 7	+++	+	Blanc cassé	+	Beige	-	Craie
MS15		ISP 1	+++	+	Blanc cassé	+	Jaune claire	-	Craie
		ISP 2	+++	+	Blanc	+	Beige	-	Craie/craqueler
		ISP 3	+++	+	Verdâtre	+	Beige	-	Craie
		ISP 4	+++	+	Blanc cassé	+	Beige	-	Craie
		ISP 5	+++	+	Verdâtre	+	Beige	-	Craie
		ISP 7	+++	+	Beige	+	Beige	-	Craie
MS155		ISP 1	+	+	Blanc cassé	+	Jaune claire	-	ND
		ISP 2	+/-	-	ND	+	Beige	-	ND
		ISP 3	+++	+	Beige	+	Beige	-	Craie
		ISP 4	+++	+	Blanc cassé	+	Beige	-	Craie
		ISP 5	+++	+	Beige	+	Beige	-	Craie
		ISP 7	++	+	Beige	+	Beige	-	Craie
<p>Note: +++ Très bonne croissance ++ Bonne croissance + Croissance moyenne - Aucune croissance ND Non déterminer +/- Développement du mycélium du substrat (MS) uniquement</p>									

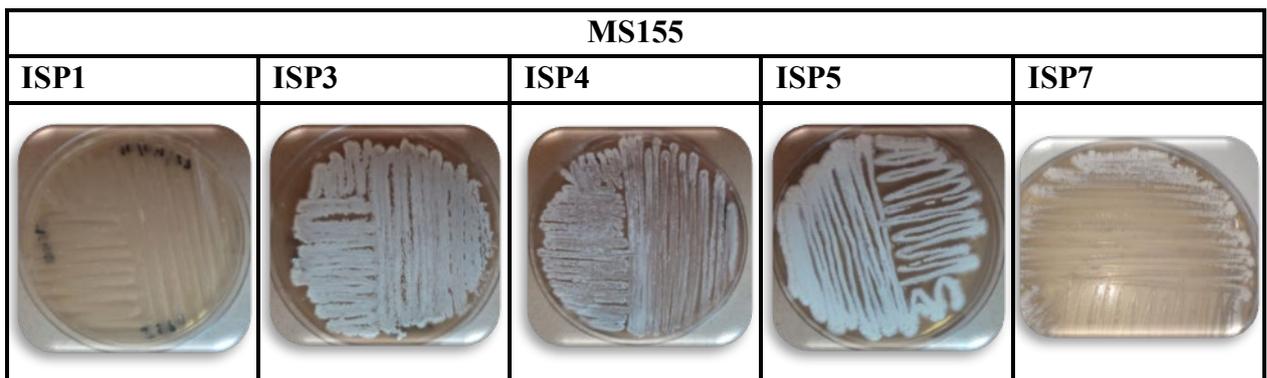
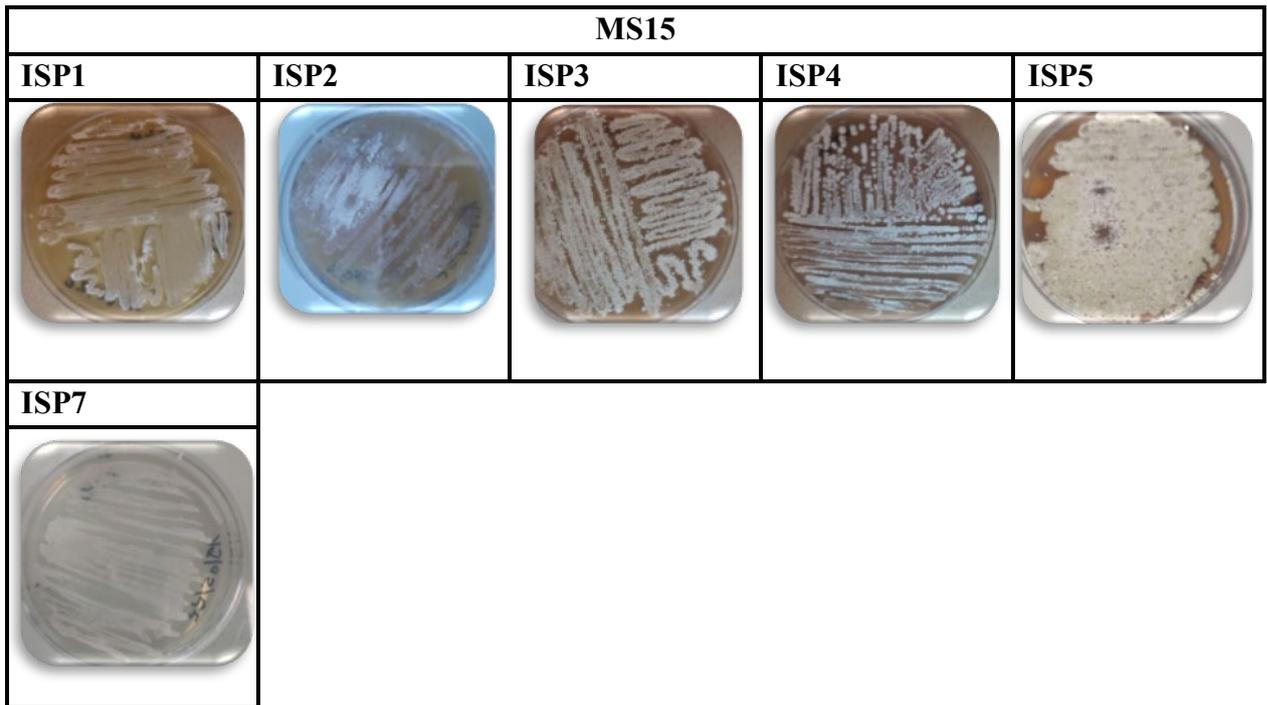
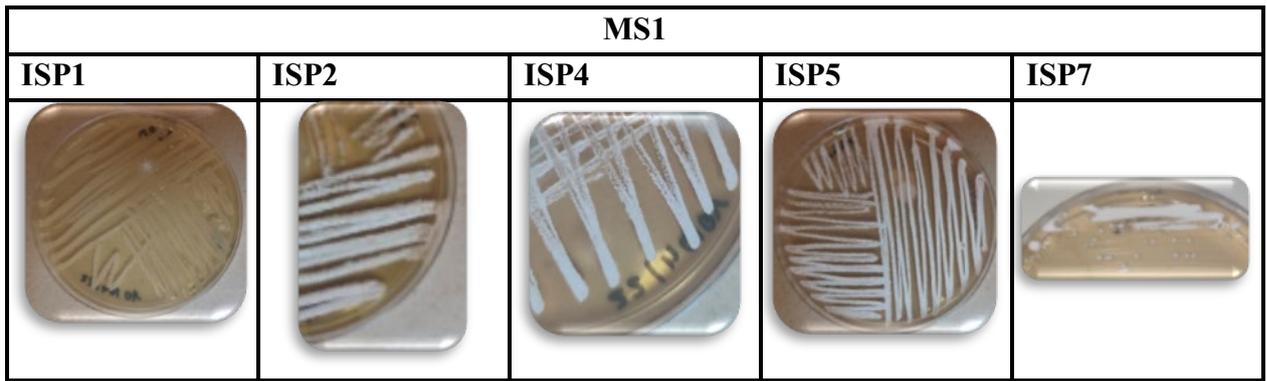


Figure 7: Aspect macromorphologique des 3 isolats sur différents milieux ISP après 14 jours d'incubation à 28°C.

1.2. Caractères micro-morphologiques

Après 14 jours d'incubation, des observations au microscope optique ont été réalisées sur le milieu ISP4 pour la MS15 et Gausse pour MS1 et MS155.

L'observation du mycélium aérien des trois souches a permis la mise en évidence d'hyphes fins, ramifiés et non cloisonnés ainsi que l'absence de formations caractéristiques telles que les sclérotés et les synnematas comme illustrés dans les figures 8, 9 et 10 ci-dessous.

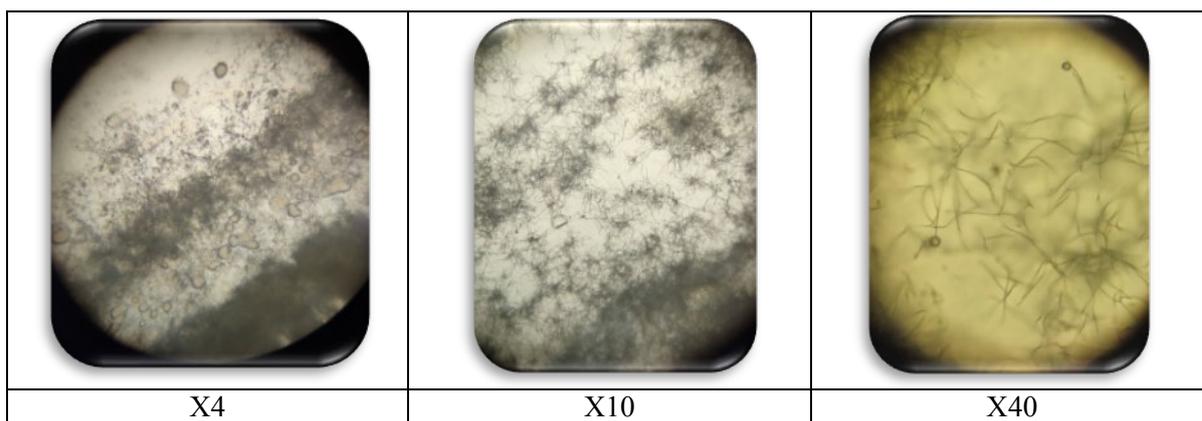


Figure 8: Observation au microscope optique de la souche MS1 (Gx4), (Gx10) et (Gx40) cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Gausse.

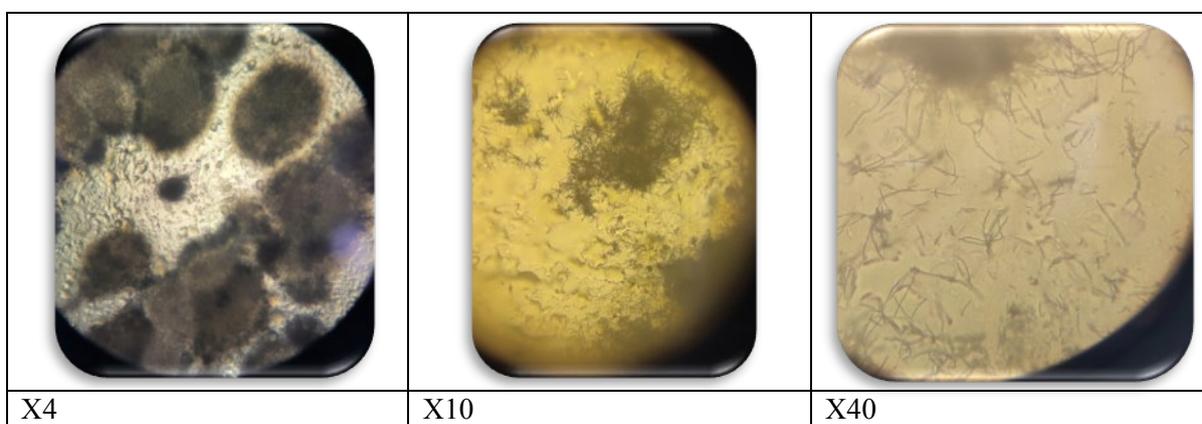


Figure 9: Observation au microscope optique de la souche MS15 (Gx4), (Gx10) et (Gx40) cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu ISP4.



Figure 10: Observation au microscope optique de la souche MS155 (Gx4), (Gx10) et (Gx40) cultivée pendant 14 jours à 28°C sur milieu Gauss.

D'après les caractéristiques culturales, macro et micro morphologiques observées pour les trois souches MS1, MS15 et MS155, il nous a été possible de les rattacher au genre *Streptomyces*.

2. Caractères physiologiques et biochimiques

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques des souches MS1, MS15 et MS155 sont réunis dans le tableau VII. Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour l'identification des souches au niveau espèce.

2.1. Dégradation des sources de carbone

D'après les résultats regroupés dans le tableau VII, les souches MS15 et MS155 possèdent la capacité de métaboliser toutes les sources de carbone dans lesquelles elles ont été cultivées, tandis que la souche MS1 dégrade tous les sucres à l'exception du mannose et du tryptose (Figure 11) et (Tableau VII).

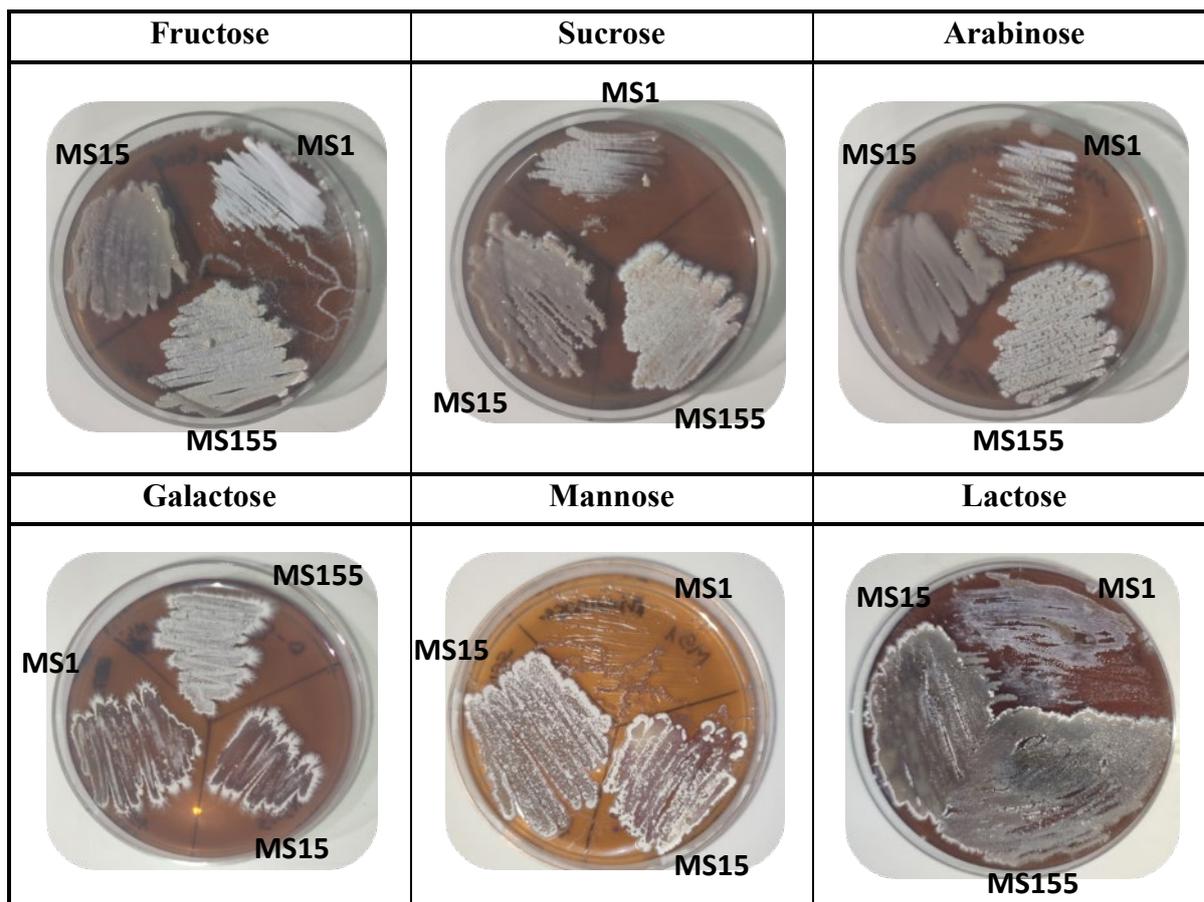


Figure 11: Photographies de l'aspect morphologique des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu ISP9 contenant différentes sources de carbone à 1%.

2.2. Utilisation des acides aminés

A la lumière des résultats obtenus, il est constaté que les trois isolats utilisent tous les acides aminés étudiés à savoir : A-glutamique, alanine, arginine, lysine et L-histidine à l'exception de la serine où aucune croissance n'a été observée (Figure 12).

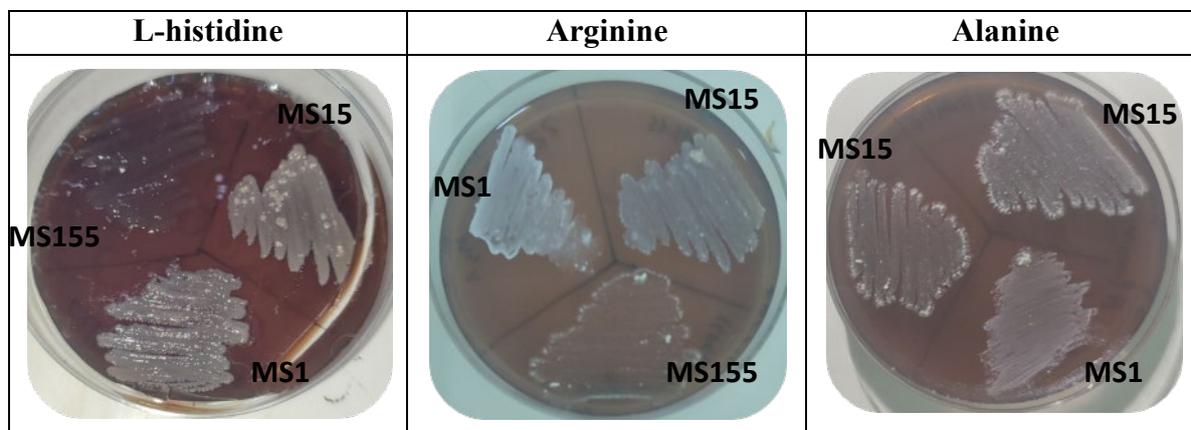


Figure 12: Photographies de l'aspect morphologique des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu ISP9 contenant différents acides aminés.

2.3. Croissance à différentes valeurs de pH

La souche MS1 présente une très bonne croissance à pH 3; 7; 9 et 11 et une croissance moyenne à pH 5 (Figure 13). La souche MS15, en revanche, possède une très bonne croissance à pH 5 et 7 et une bonne croissance à pH 3 et 11 (Figure 14). L'isolat MS155 présente un très bon développement aux valeurs de pH acide et neutre et une croissance plus faible aux pH 9 et 11 (Figure 15) et (Tableau VII).

Ces résultats indiquent que les trois souches étudiées possèdent un large éventail de tolérance aux valeurs de pH acide et basique.

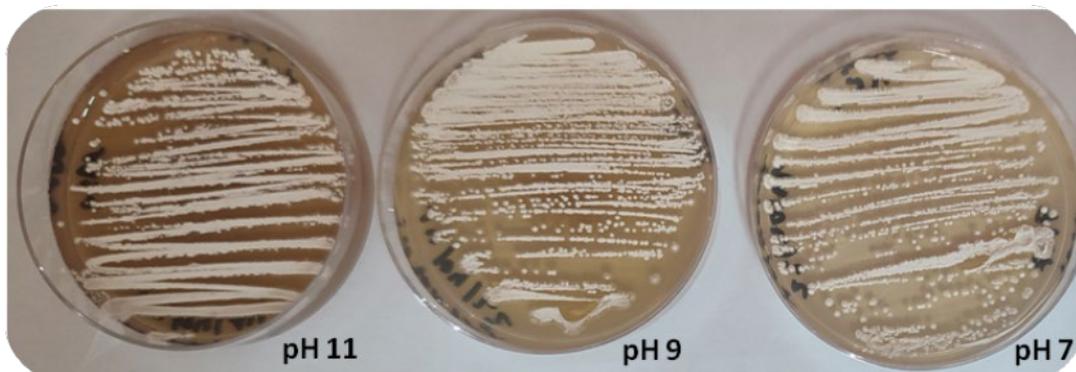


Figure 13: Photographies des cultures de la souche MS1 sur milieu Gause à différents pH.

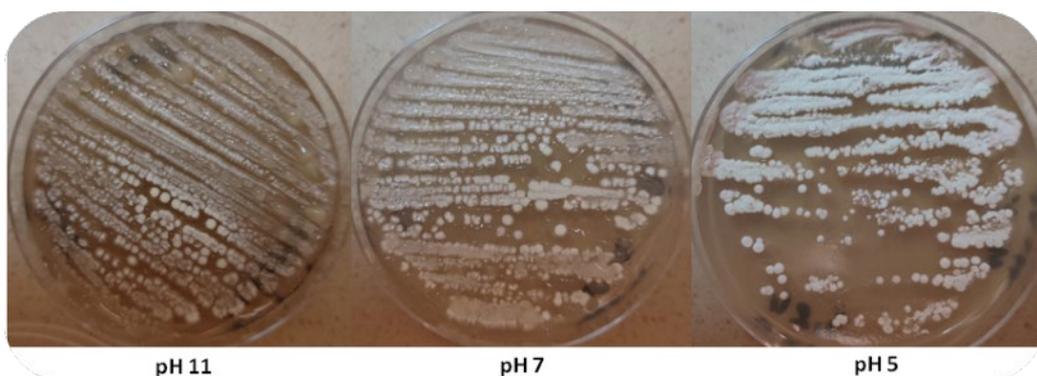


Figure 14: Photographies des cultures de la souche MS15 sur milieu Gauss à différents pH.

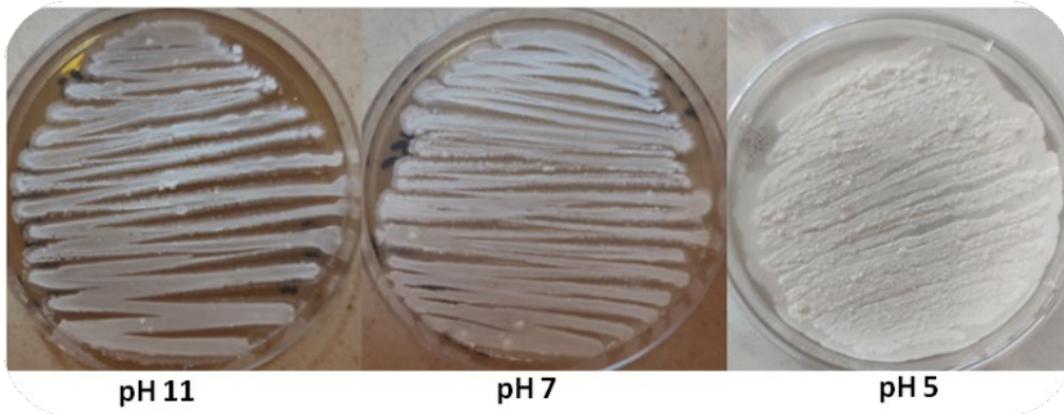


Figure 15: Photographies des cultures de la souche MS155 sur milieu Gauss à différents pH.

2.4. Croissance à différentes valeurs de température

Les résultats obtenus montrent que les souches MS1, MS15 et MS155 présentent un très bon développement à 28°C avec une très bonne croissance de la MS155 à 4°C. Cependant aucune croissance n'a été observée à 4°C, 37°C et à 50°C pour les souches MS1 et MS15.



Figure 16: Photographie de la souche MS155 sur milieu Gauss à 4°C.

2.5. Croissance en présence de NaCl

La souche MS1 ne semble pas tolérer de grandes concentrations de NaCl. En effet, elle présente une très bonne croissance de 0,2 à 0,6M. Les souches MS15 et MS155 tolèrent de plus grandes concentrations de 0,2 à 1,6 M pour MS15 et de 0,2 à 1,4 M pour MS155 (Figure 17).

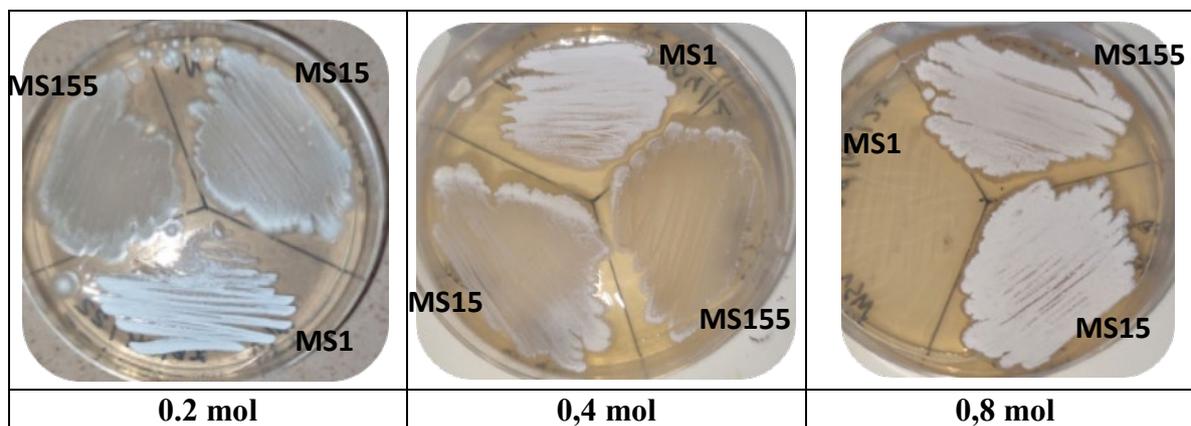


Figure 17: Photographies des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu Gausse contenant différentes concentrations de NaCl.

2.6. Résistance ou sensibilité aux métaux lourds

Les résultats obtenus montrent que la souche MS1 possède une bonne croissance en présence de plomb et d'argent ce qui témoigne de sa résistance à ces métaux et un faible développement en présence de Zinc, toutefois, aucune croissance n'a été observée en présence de Fe, Cd, Cr, Cu et du mélange de métaux ce qui démontre sa sensibilité envers ces ions métalliques.

La souche MS15 présente une très bonne croissance en présence de Pb, Zn et Fe alors qu'aucune croissance n'a été observée en présence d'Ag, Cd, Cr, Cu et du mélange de métaux.

La souche MS155 présente une très bonne croissance en présence de Pb, Zn, Fe et une bonne croissance en présence de Ag mais aucune croissance n'a été observée en présence de Cd, Cr, Cu et du mélange des métaux lourds (Figure18) et (Tableau VII).

Ces résultats suggèrent la possibilité d'utiliser ces isolats dans la bioremédiation des sols pollués.

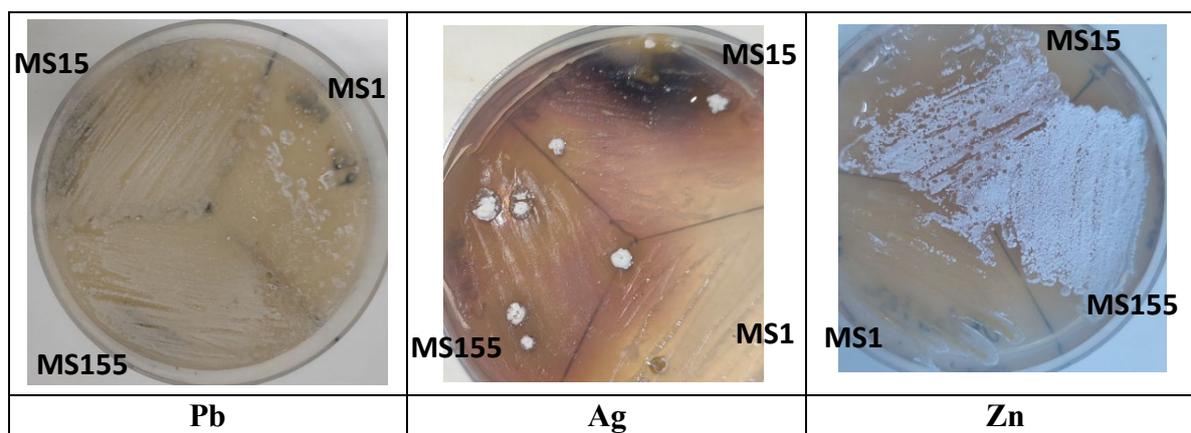


Figure 18: Photographies des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu Gauss contenant différents métaux lourds.

2.7. Dégradation des sels de sodium

Les isolats MS1, MS15 et MS155 dégradent tous l'acétate de sodium, par contre l'oxalate de sodium est dégradé uniquement par la MS155 (Figure 19)

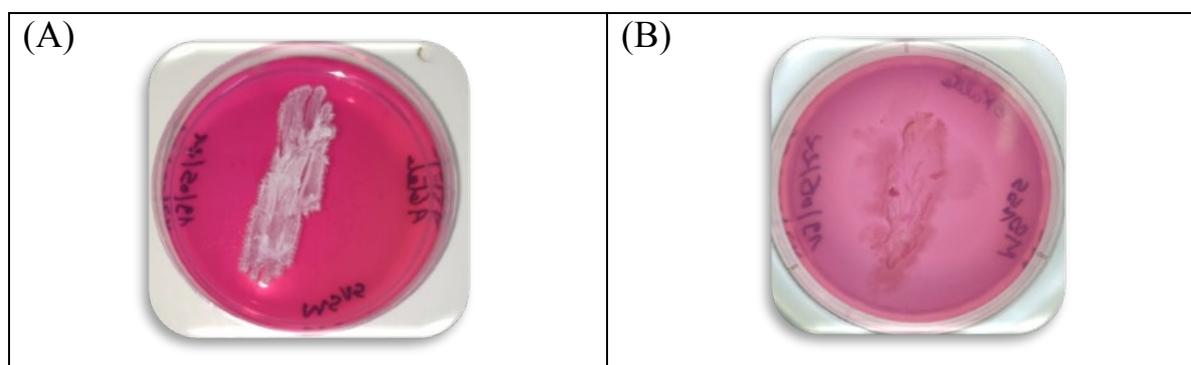


Figure 19: (A): Souche MS15 en présence de l'acétate de sodium. (B): Souche MS155 en présence de l'oxalate de sodium.

Tableau VII: Résultats des tests physiologiques et biochimiques des souches MS1, MS15 et MS155

Dégradation des sucres sur ISP9			
	MS1	MS15	MS155
Témoin	-	-	-
Xylose	+	+++	+++
Fructose	+++	+++	+++

Sucrose	+++	+++	+++
Galactose	+++	+++	+++
Mannose	-	+++	+++
Tryptose	-	+++	+
Arabinose	++	+++	+++
Glucose (témoin+)	++	+++	+++
Mellobiose	++	+	+
Cellobiose	+	++	++
Lactose	+++	+++	+++
Rhamnose	++	+++	+++
Utilisation des acides aminés ISP9			
A-glutamique	+	+++	+
Alanine	+	+++	++
Arginine	+++	+++	+++
Lysine	++	++	++
L-histidine	+++	+++	++
Serine	-	-	-
Croissance à différentes valeurs de pH sur Gausse			
3,2	+++	++	+++
5,2	+	+++	+++
7,2	+++	+++	+++
9,2	+++	+	+
11,2	+++	++	++
Croissance à différentes valeurs de température (°C) sur Gausse			
4	-	-	+++
28	+++	+++	+++
37	-	-	-
50	-	-	-
Croissance en présence de NaCl (M) sur Gausse			
0,2	+++	++	+
0,4	+++	+++	+++
0,6	++	+++	+++
0,8	-	+++	+++
1	-	++	++
1,2	-	+	+
1,4	-	+	+
1,6	-	+	-
2	-	-	-
2,5	-	-	-
Resistance ou sensibilité aux métaux lourds			

Ag	++	-	++
Zn	+	+++	+++
Pb	++	+++	+++
Fe	-	+++	+++
Cd	-	-	-
Cr	-	-	-
Cu	-	-	-
Mélange	-	-	-
Dégradation des sels de sodium			
Acétate	+	+	+
Oxalate	-	-	+
Note : +++ Très bonne croissance ++ Bonne croissance + Croissance moyenne - Aucune croissance			

2.8.Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques des souches MS1, MS15 et MS155 sont réunis dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques des souches MS1, MS15 et MS155.

	MS1	MS15		MS155	
		Jour 1	Jour 7	Jour 1	Jour 7
Triméthoprim, Sulfaméthoxazole (1,25/1,23µg)	ND	35mm	0mm	42mm	15mm
Acide oxalinique (10µg)		0mm	0mm	0mm	0mm
Cefotaxime (30µg)		Pas de croissance	30mm	Pas de croissance	32mm
Amoxicilline (25µg)		0mm	0mm	0mm	0mm
ND : Non déterminé					

3. Mise en évidence de l'activité antagoniste

Le pouvoir antimicrobien des souches d'actinobactéries étudiées est déterminé par la méthode des cylindres d'agar à l'encontre de 14 microorganismes pathogènes : 11 bactéries parmi elles, des souches multirésistantes telles que le SARM et *A. baumannii*. L'activité est exprimée en termes de diamètres des zones d'inhibition rapportés en millimètre. Nous remarquons que cette activité varie selon les souches testées et les germes

cibles. Certaines ont présenté un effet antagoniste important, d'autres nulles et certaines ont présenté plutôt des activités bactériostatiques (Figure 20 et 21).

En effet, l'isolat MS155 a présenté une activité antimicrobienne relativement faible aussi bien à l'égard de bactéries Gram négatif, avec des diamètres d'inhibition allant de 7 mm à l'encontre de *E. coli* à 10 mm à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa*, qu'à l'égard de bactéries à Gram positif (*S. aureus* 8 mm de diamètre). Par ailleurs, une importante activité antifongique est observée exclusivement à l'égard de *A. niger* avec 26 mm de diamètre.

D'autre part, les souches MS15 et MS1 ont enregistré un potentiel antimicrobien plus restreint, notamment à l'encontre de *S. aureus* et *K. pneumoniae* pour la première et *S. Typhi* et *K. pneumoniae* pour la seconde avec 8 mm de diamètre de zones d'inhibition. Les deux isolats ont présenté, d'autre part, une activité antifongique non négligeable à l'égard de *A. niger* avec des inhibitions de 23 mm et 14 mm pour MS15 et MS1, respectivement.

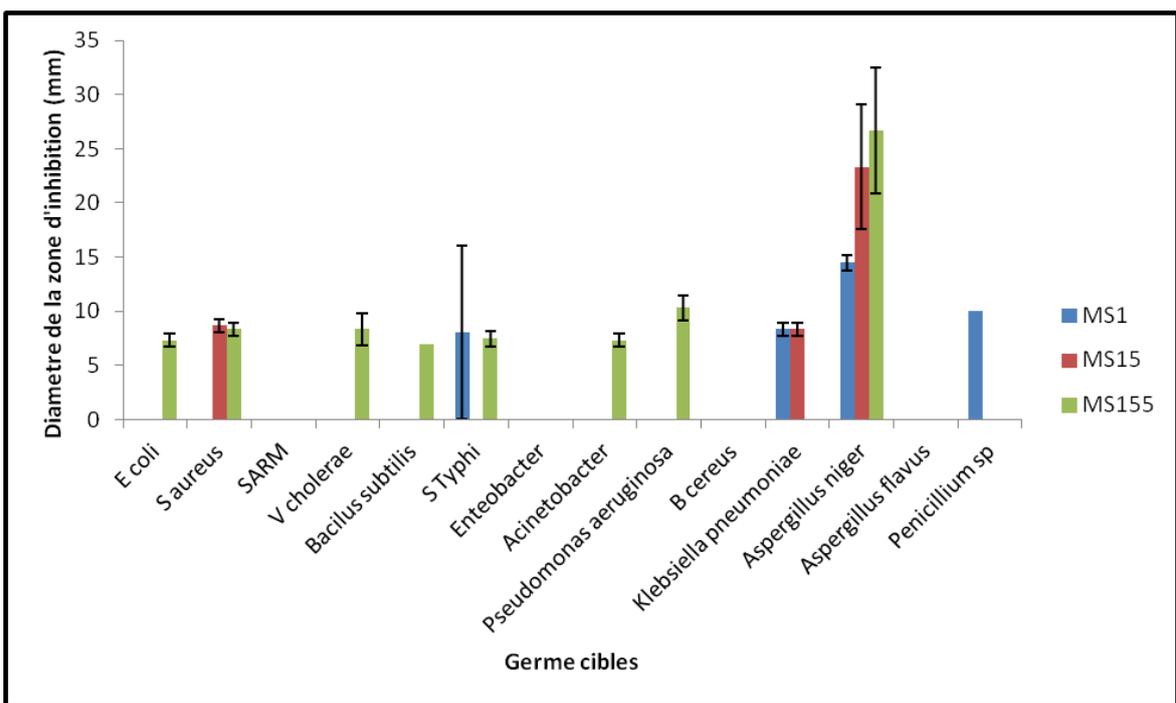


Figure 20 : Activité antagoniste des souches MS1, MS15 et MS155 isolées à l'égard des germes cibles.

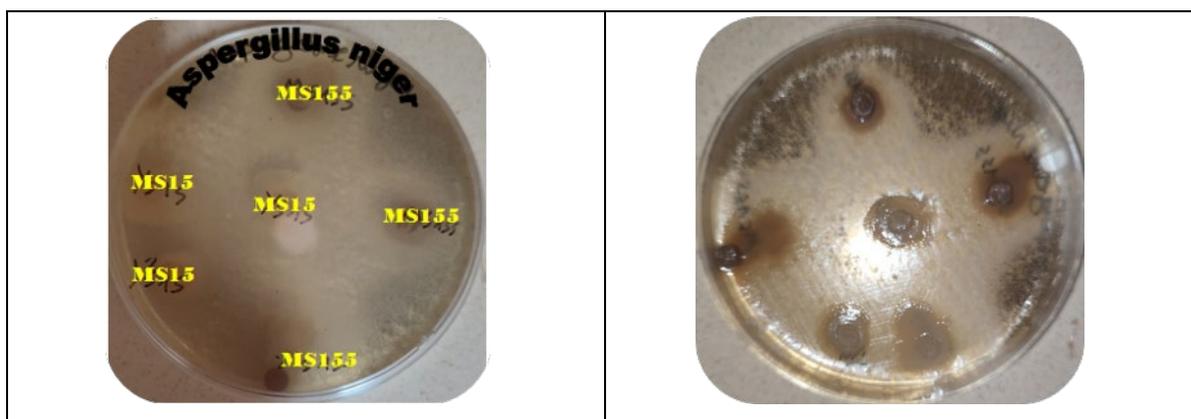


Figure 21: Photographies illustrant l'activité antagoniste de l'isolat MS15 et MS155 à l'égard de *Aspergillus niger*.

4. Etude du potentiel de dégradation du polyéthylène par les isolats d'actinobactéries

La mise en évidence du potentiel de dégradation du PEBD des 3 isolats passe par l'évaluation de la perte de masse en calculant le pourcentage de dégradation.

4.1. Mesure de la perte de masse des éprouvettes

La perte de masse est basée sur le calcul de la différence de masse de chaque échantillon (éprouvettes) avant et après qu'il s soient soumis aux tests de biodégradation et de calculer le pourcentage de dégradation conformément à l'équation suivante :

$$P\% = (m_0 - m / m_0) * 100$$

La différence de masse s'explique par l'action des isolats produisant des enzymes qui introduisent des groupes polaires à la surface du PEBD et engendrent l'hydrolyse de la surface du polymère. La modification enzymatique de la surface est possible avec plusieurs hydrolases, telles que les lipases, les carboxylestérases, les cutinases et les protéases (Kawai et al., 2019). Un certain nombre de lipases, estérases et cutinases des espèces fongiques et actinobactéries hydrolysent le PET amorphe et modifient la surface des films de PEBD et fibres (Wei et al., 2017). Cette étude est confirmée par des investigations en cours sur le potentiel enzymatique des trois souches étudiées (résultats non publiés) où ces dernières ont présenté des activités enzymatiques très diversifiées.

Les éprouvettes ont été pesées après chaque semaine jusqu'au 30^{ème} jour du test de la biodégradation. Les résultats de la perte de masse ainsi que le pourcentage de dégradation des éprouvettes des PEBD noir et transparent sur milieux liquide et solide sont rapportés dans les figures 17, 18, 19 et 20.

4.1.1. Sur milieu solide

Afin de mettre en évidence le potentiel de dégradation des éprouvettes de PEBD noir et transparent des 3 isolats étudiés, des cultures sur milieu solide en présence de PEBD noir et transparent comme seule source de carbone ont été réalisées. L'évolution de la dégradation est rapportée dans la figure 22. D'après les résultats obtenus, il a été constaté que la souche MS1 a enregistré le plus grand pourcentage de perte de masse du PEBD noir (2,98%) suivie de la souche MS15 et MS155 avec des valeurs de 0,89% et 0,5% respectivement. Pour le PEBD transparent, il a été constaté que la souche MS155 a le meilleur pourcentage de dégradation (1,28%) suivie de la MS1(0,87%), tandis qu'aucune dégradation des éprouvettes n'a été observé pour l'isolat MS15.

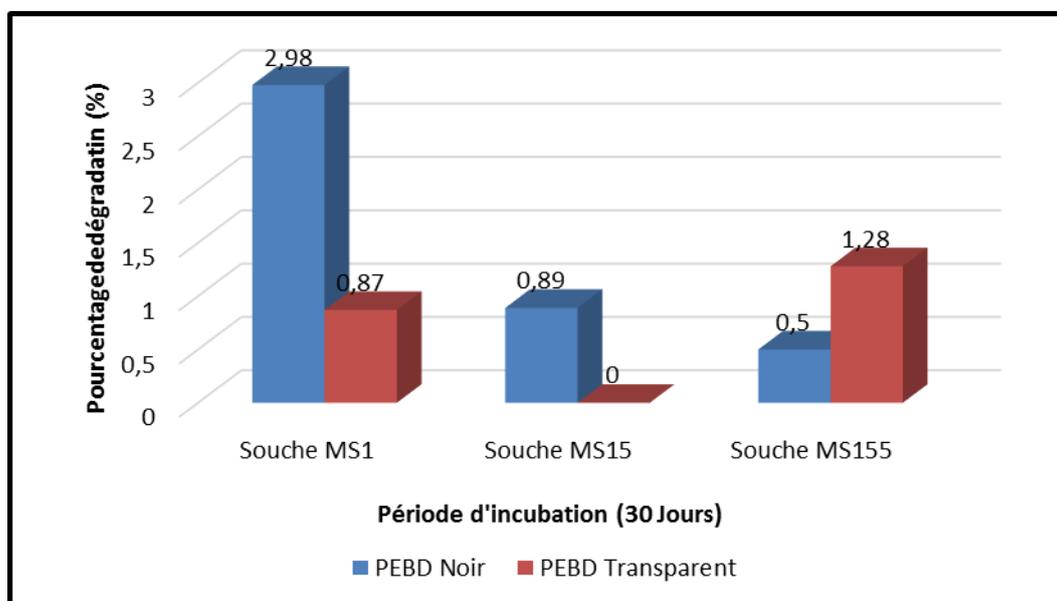


Figure 22: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence des souches MS1, MS15 et MS155 sur milieu solide MSM agar après 30 jours d'incubation .

4.1.2. Sur milieu liquide

Afin de simuler le processus de biodégradation dans l'environnement aquatique naturel, une culture sur milieu liquide en présence de PEBD noir et transparent comme seule source de carbone a également été réalisée afin de mettre en évidence le potentiel de dégradation de ces polymères en présence des 3 isolats.

L'évolution de la dégradation des éprouvettes de PEBD noir et transparent sur milieu liquide en présence des 3 isolats est suivie chaque semaine pendant 30 jour est rapportée dans les figures 23, 24 et 25.

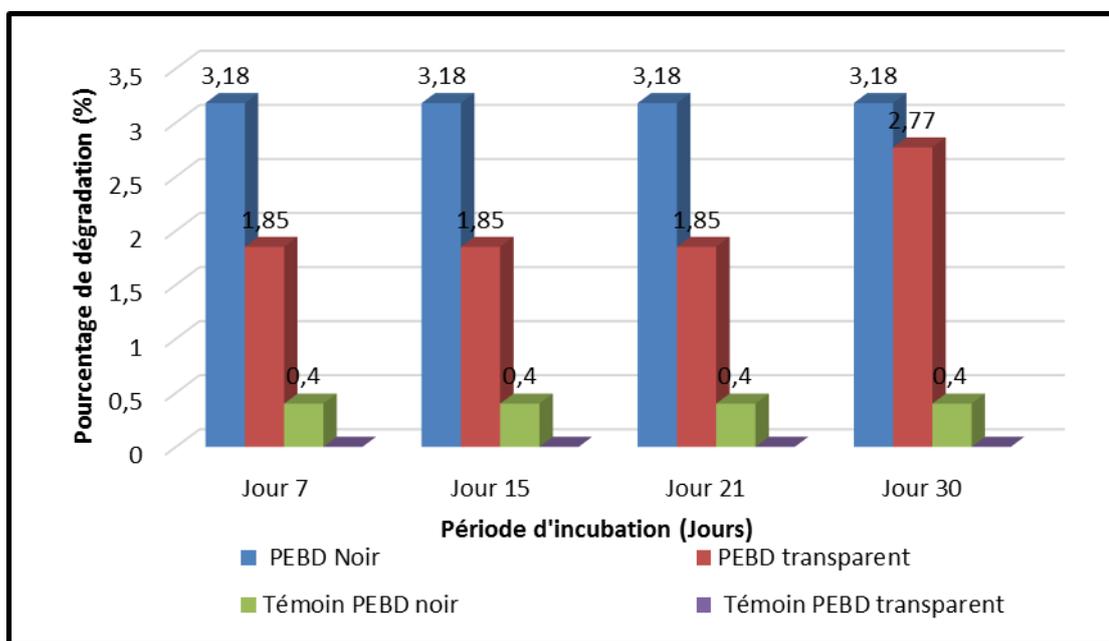


Figure 23: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence de la souche MS1 sur milieu solide MSM après 30 jours d'incubation.

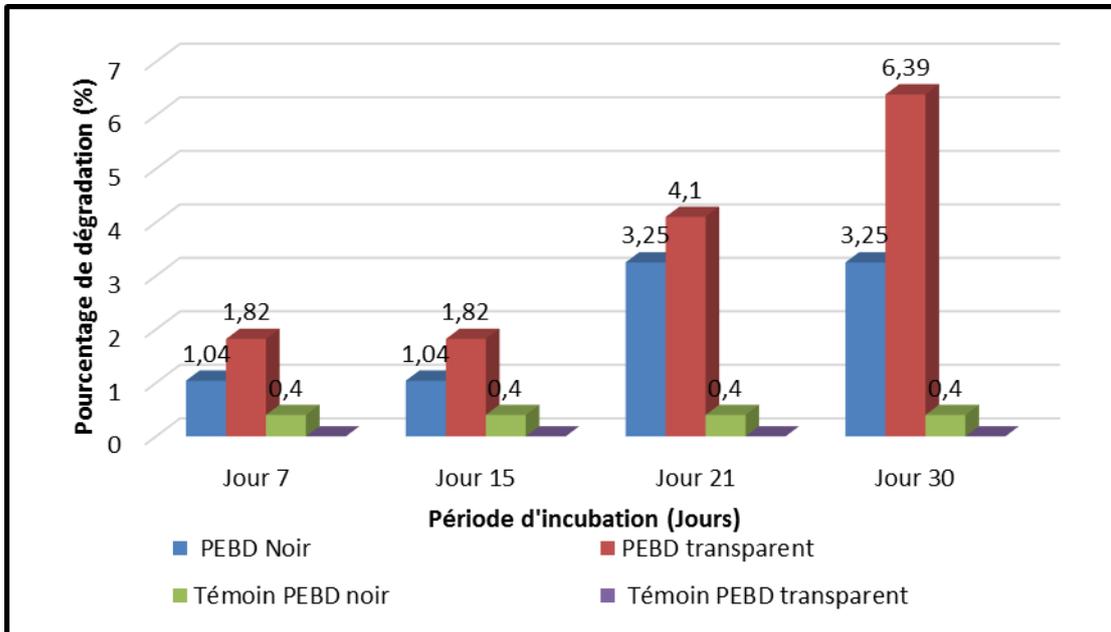


Figure 24: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence de la souche MS15 sur milieu solide MSM après 30 jours d'incubation.

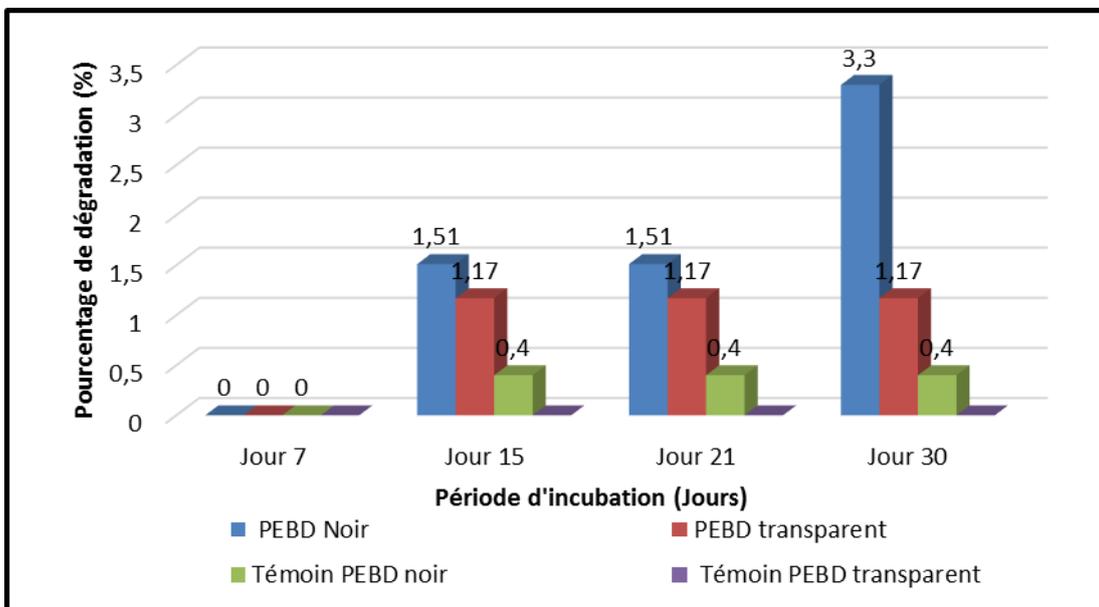


Figure 25: Pourcentage de dégradation des PEBD noir et transparent en présence de la souche MS155 sur milieu solide MSM après 30 jours d'incubation.

D'après les résultats obtenus, il a été remarqué que les 3 souches MS1, MS15 et MS155 ont montré leur capacité à réduire la masse des éprouvettes de PEBD noir et transparent.

En effet, sur milieu solide, l'isolat MS1 a exposé le plus fort pourcentage de perte de masse de 2,98% alors que pour le milieu liquide la MS1 arrive jusqu'à 3,18% pour le PEBD noir, et la MS15 sur milieu solide affiche un pourcentage de 0% et sur milieux liquide donne une valeur de 6,39%.

Alors, il a été constaté que la dégradation est meilleur sur milieux liquide que sur milieu solide.

En outre sur milieu liquide les souches MS1, MS15 et MS155 dégrade le PEBD noir de manière presque égale avec des pourcentages de perte de masse maximales de 3,18%, 3,25% et 3,3% respectivement et la souche MS15 a le meilleur taux de dégradation du PEBD transparent avec 6,39%.

La biodégradabilité la plus élevée est observée pour le PEBD transparent après exposition à la souche MS15 durant 30 jours d'incubation. Ce rendement est considéré comme très prometteur et encourageant sachant qu'aucun prétraitement n'a été réalisé sur les éprouvettes avant leur mise en contact avec la souche.

En effet, MS15 a une capacité de décomposition du PEBD transparent de 6,39 % ce qui donne 0,21 %/J, même s'il n'est pas prétraité et optimisé pour la biodégradation. La biodégradation des matières plastiques se produit à la surface et la procédure de prétraitement affecte l'activité de biodégradation par jour. La plupart des procédures de prétraitement nécessitent une exposition prolongée aux ultraviolets et à une température élevée d'environ 50 à 80 °C, ce qui entraîne l'affaiblissement de la structure plastique. Ce taux est comparable à celui des travaux de Jeon et al. (2021) en utilisant la souche *Lysinibacillus* species JJY0216 qui a démontré une aptitude de dégrader le PEBD avec un pourcentage de 9% après 28 jours d'incubation.

L'étude de la biodégradation des polymères plastiques par les microorganismes à travers l'identification de bactéries ou moisissures a suscité beaucoup d'attention mais n'a pas atteint le stade de l'industrialisation. Cependant, le processus de biodégradation des micro-organismes a beaucoup de potentiel pour réduire la pollution environnementale causée par l'incinération ou l'enfouissement des déchets plastiques dérivés du pétrole.

Afin de faire une percée, il est nécessaire de trouver ou d'améliorer des micro-organismes capables de décomposer efficacement le plastique non traité et pouvant être décomposés en peu de temps avec une grande efficacité. MS15 semble être une souche d'actinobactérie capable de dégrader le polyéthylène basse densité, qui n'a pas nécessité de processus de prétraitement. De plus, les résultats de cette étude peuvent être utilisés comme base pour d'autres recherches, telles que l'identification des mécanismes de dégradation du PEBD et la caractérisation enzymatique spécifique de la dégradation du plastique.

4.2. Mesure du pH

En parallèle de la perte de masse, le pH du milieu MSM a été mesuré afin d'évaluer la croissance des souches, après 7, 15, 21 et 30 jours d'incubation, et les résultats sont rapportés dans les figures 26, 27 et 28.

D'après les résultats obtenus, il a été constaté que le pH du PEBD noir et transparent de la MS1 est resté stable avec de légère diminution et augmentation.

La MS15, le pH des deux milieux en présence de PEBD noir et transparent a diminué pour afficher une valeur de 6,75.

La MS155, le pH du milieu PEBD noir a eu une légère augmentation au 15^{ème} jour puis une diminution jusqu'à atteindre 6,8 au 30^{ème} jour, et le milieu du PEBD transparent a diminué pour afficher une valeur de 6,68.

En général, il a été remarqué de légères augmentation et diminution dans tous les milieux tout au long de la période d'incubation.

La diminution du pH pourrait être expliquée par l'utilisation des nutriments du milieu et la production d'acides organiques à partir de l'assimilation de la source de carbone (PEBD).

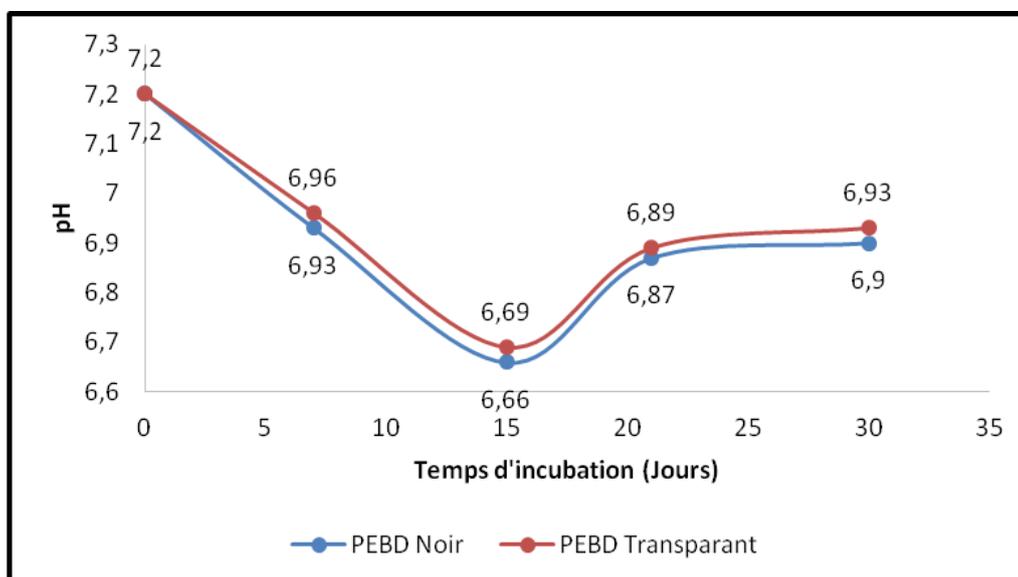


Figure 26: Variation des valeurs du pH de milieux MSM de la souche MS1, en fonction du temps d'incubation.

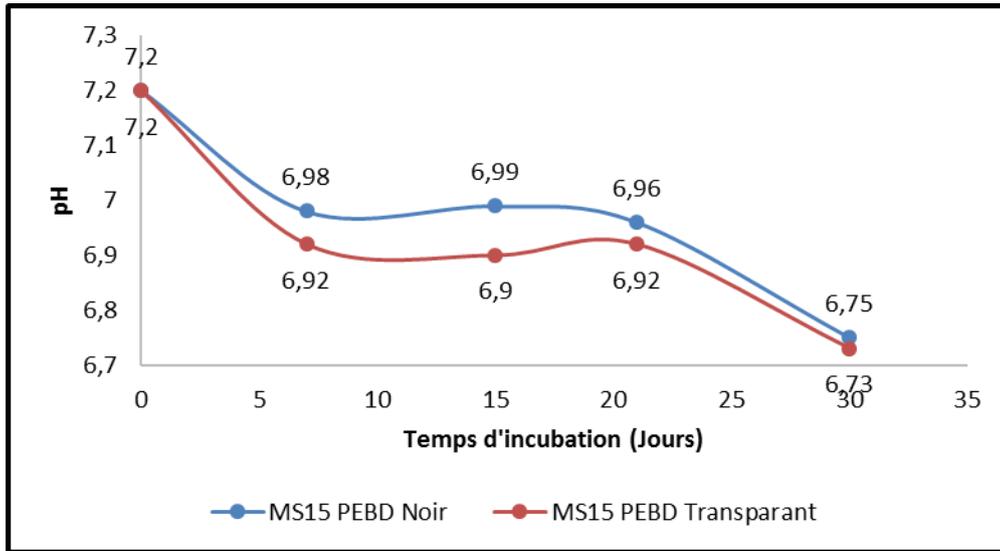


Figure 28: Variation des valeurs du pH de milieu MSM de la souche MS15, en fonction du temps d'incubation.

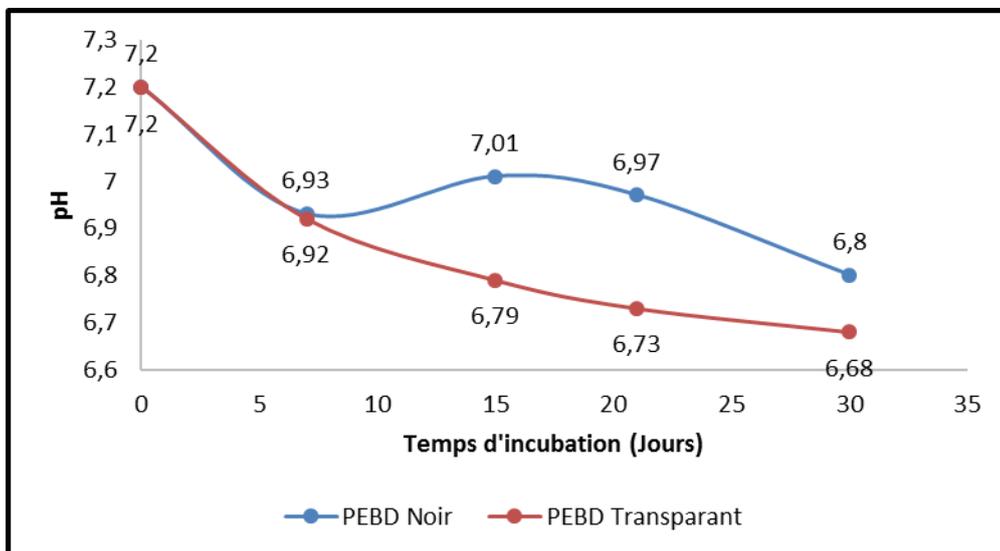


Figure 27: Variation des valeurs du pH de milieu MSM de la souche MS155, en fonction du temps d'incubation.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ces dernières années, l'utilisation du polyéthylène à basse densité a augmenté d'une manière considérable dans divers domaines de notre vie quotidienne ce qui le rend un des grands facteurs de pollution. Face à ce problème la biodégradation du PEBD est devenue importante.

L'objectif de ce présent travail est la caractérisation de souches d'actinobactéries dégradant le polyéthylène à basse densité et la mise en évidence de leurs potentiels de dégradation de deux variétés de polyéthylène (PEBD noir et transparent).

Afin d'atteindre cet objectif, différents points ont été traités et détaillés :

- L'étude des propriétés culturales des souches isolées sur différents milieux a permis d'observer leurs croissances, leurs aspects, les couleurs des mycéliums du substrat et aérien, la production de pigments diffusibles, ainsi que la sporulation et la fragmentation ou non des hyphes végétatifs et aériens, où des différences ont été constatées.
- L'étude des caractères physiologiques et biochimiques des isolats a montré leur capacité à dégrader différentes sources de carbone, l'utilisation d'acides aminés variés, à croître à différentes valeurs de pH, de température, de NaCl et dégradation des sels de sodium, ainsi que leur résistance aux antibiotiques et métaux lourds (zinc (Zn), cuivre (Cu), fer (Fe), chrome (Cr), cadmium (Cd), plomb (Pb), argent (Ag)).
- L'évaluation de leur potentiel antagoniste a mis en évidence une activité antifongique significative à l'encontre de *A. niger*.
- L'étude du potentiel de dégradation des 3 isolats, sur milieux solide et liquide, en présence d'éprouvettes de PEBD noir et transparent comme seules sources de carbone pendant une période de 30 jours à 28°C.
- L'évaluation de la dégradation du PEBD à travers la mesure de la perte de masse et le calcul du pourcentage de dégradation démontre que sur milieu solide la meilleure souche pour dégrader le PEBD noir est la MS1 (2,98%) et pour le PEBD transparent c'est la MS15 (1,28%) alors que sur le milieu liquide, pour PEBD noir, les 3 souches ont présenté un pourcentage de dégradation de 3%, et le PEBD

transparent la meilleur souche avec un potentiel de dégradation assez intéressant est la MS15 qui affiche une valeur de 6,39% avec 0,21%/J

Les résultats obtenus dans cette étude sont intéressants. Cependant, des études approfondies doivent compléter ce travail à savoir :

- La mesure du degré de dégradation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et observations au microscope électronique à balayage des éprouvettes afin de constater les effets engendrés.
- Exposition du PEBD aux 3 isolats pour une durée plus longue.
- Varier les paramètres culturels comme la température et le pH, dans le but de modéliser et d'optimiser la dégradation du PEBD par ces souches.
- Etudier la dégradation d'autres polymères plastiques tels que le polystyrène et le polypropylène.
- La co-culture entre les 3 souches

Cependant, l'idéal reste de minimiser l'utilisation du plastique à travers la sensibilisation des pouvoirs publics et les associations de consommateurs.

Référence

- 1) Bahl, S., Dolma, J., Jyot Singh, J., & Sehgal, S. (2020). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*.
- 2) Barka, EA, Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., ... van Wezel, GP (2015). Taxonomie, physiologie et produits naturels des actinobactéries. *Revue de microbiologie et de biologie moléculaire*, 80(1), 1–43.
- 3) Bastioli, C. (2014). *Handbook of Biodegradable Polymers*, 2nd edition. Smithers Rapra.
- 4) Berthelot, J.-M. (2013). *Mécanique des Matériaux et Structures Composites*. Le Mans, France.
- 5) Böll foundation, H. (2020). *Atlas du plastique 2020 : faits et chiffres sur le monde des polymères synthétiques*.
- 6) Brusselman, A. (2021). Suivi de la dégradation de plastiques biodégradables en fonction de paramètres abiotiques ainsi que de la dynamique des biofilms bactériens en milieu marin. Mémoire de fin d'études. Université de Liège.
- 7) Butbunchu, N., Pathom-Aree, W. (2019). Actinobacteria as Promising Candidate for Polylactic Acid Type Bioplastic Degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- 8) Charvolin, J.-L. (2013). *Conception des pièces plastiques injectées*. Tec & Doc.
- 9) Danso, D., Chow, J., Streit, W. R. (2019). Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*
- 10) Debeaufort, F., Galić, K., Kurek, M., Benbettaieb, N., et amp; Ščetar, M. (2022). *Matériaux et procédés d'emballage pour les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques*. Iste editions.
- 11) Djinni, I., Defant, A., Djoudi, W., Chaabane Chaouch, F., Souagui, S., Kecha, M., & Mancini, I. (2019). Modeling improved production of the chemotherapeutic polypeptide actinomycin D by a novel *Streptomyces* sp. strain from a Saharan soil. *Heliyon*, 5(5), e01695.
- 12) Fontanille, M., Gnanou, Y., & Six, J.-L. (2021). *Chimie et physico-chimie des polymères: / master, écoles d'ingénieurs*. Dunod
- 13) Hakkarainen, M., Albertsson, A. C. (2004). Environmental degradation of polyethylene *Adv. Polym. Sci.* , 169: 177– 199.

Références

- 14) Harir, M. (2018). Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'Actinobactériés isolées des sols arides et semi arides d'Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella.
- 15) Hazarika, S.N., Thakur, D. (2020). Actinobactéries. Microbes bénéfiques en agro-écologie, 443–476.
- 16) Hussein, A.A., Khudhair, S.H., Al-Mayaly, I.K., (2015). Optimum conditions for LDPE strips biodegradation by local bacterial isolates. *J. Int. Environmental Application & Science* 10(4), 399-407
- 17) Jeon, J.-M., Park, S.-J., Choi, T.-R., Park, J.-H., Yang, Y.-H., & Yoon, J.-J. (2021). Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 191, 109662. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2021
- 18) Jumaah, O. S. (2017). Screening of plastic degrading bacteria from dumped soil area. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* 11, 93–98. doi: 10.9790/2402-1105029398
- 19) Kausch, H.-H., Heymans, N., Plummer, C. J., et al.; Decroly, P. (2002). *Matériaux polymères: Propriétés mécaniques et physiques. Principes de Mise en oeuvre.* Presses polytechniques et universitaires romandes.
- 20) Kawai, F., Oda M., Tamashiro T., Waku T., Tanaka N., Yamamoto, M., Tanokura, M. (2014). A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied microbiology and biotechnology*. Vol. 98 n°24. 10053–10064.
- 21) Kumar Sen, S., & Raut, S. (2015). Dégradation microbienne du polyéthylène basse densité (PEBD) : une revue. *Journal de génie chimique environnemental*, 3(1), 462–473.
- 22) Le plastique en 10 chiffres. National Geographic. (2021, March 26). Retrieved May 21, 2022, from <https://www.nationalgeographic.fr/le-plastique-en-10-chiffres>
- 23) Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J.-E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442.
- 24) Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P. et Whitman, W.B. (2012). Feuille de route du phylum des Actinobactéries. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 1–28.

Références

- 25) Malpass, D. (2010). Introduction au polyéthylène industriel: propriétés, catalyseurs et procédés . John Wiley et fils. pp. 1–. ISBN 978-0-470-62598-9.
- 26) Mohammadipanah, F., & Dehghani, M. (2017). Classification et taxonomie des actinobactéries. *Biologie et biotechnologie des actinobactéries*, 51–77.
- 27) Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- 28) Negi H., Kapri A., Zaidi M.G.H., Satlewal A., Goel R. (2009). Comparative in vitro biodegradation studies of epoxy and its silicone blend by selected microbial consortia. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63 (5): 553-558.
- 29) Orhan, Y., Buyukgungor, H., (2000). Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45: 49-55.
- 30) Paris, C. (2011). Étude et Modélisation de la Polymérisation Dynamique de Composites à Matrice Thermodurcissable. Thèse de doctorat. Université Toulouse.
- 31) Pic, A. (2009). Les matériaux élastomériques. *L'Orthodontie Française*, 80(1), 55–68.
- 32) Rapport de l'Académie des sciences. (2021, mars). Les plastiques dans l'environnement. https://www.academie-sciences.fr/pdf/rapport/20210316_plastiques_environnement.pdf
- 33) Rapport de l'Agence Nationale des Déchets, (2019), Les déchets plastique en Algérie regard croisé sur les plastique a usage unique, <https://and.dz/site/wp-content/uploads/RapportPlastique.pdf>
- 34) Raziya fathima M, Praseetha P K*, Rimal Isaac R S. (2016). Microbial Degradation of Plastic Waste. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological*. 4(2):231-242.
- 35) Revue de l'Institut Veolia, Facts reports (2019).
- 36) Ritchie, H., Roser, M. (2018). "La pollution plastique". Publié en ligne sur OurWorldInData.org. Extrait de : 'https://ourworldindata.org/plastic-pollution'
- 37) Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265.
- 38) Simon, N., & Schulte, M. L. (2017). Stopping global plastic pollution: The case for an international convention. Arnold Group, Großbeeren.

Références

- 39) Vasile, C., & Pascu, M. (2005). Practical guide to polyethylene. Rapra Technology.
- 40) Wei R., Zimmermann W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? Microbial Biotechnology. Vol.10 n ° 6. 1308–1322.
- 41) Weiss P. (2009). La chimie des polymères. Support de Cours, Université Médicale Virtuelle Francophone. 17 p.
- 42) Zaïbet, W. (2016). Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de *Daucus aureus* (Desf) et de *Reutera lutea* (Desf.) Maire, et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD). Thèse de doctorat. Université Ferhat ABBAS-setif-1.

Annexe I**Matériel utilisé**

Anse de platine	Etuve bactériologique à 28 C°, 37C°, 40C°, 50C°
Autoclave	Filtre à seringue 0,45 µm
Bain-Marie	Flacons
Balance analytique	Micropipettes de 100 µL et 1000 µL.
Barreaux magnétiques	Microscope optique «Euromex iSCOPE»
Bec bunsen	pH mètre
Béchers	Pipette Pasteur
Boite de Pétri de 57 mm	Plaque agitatrice
Boite de Pétri de 99 mm	Seringue
Dessiccateur	Shaker à 150 rpm
Ecouvillons	Spatules
Embouts stériles	Tube à essais
Entonnoir	Vortex
Eprouvette	
Erlenmeyers	

Annexe II

Milieux d'identification

Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International Streptomyces Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

Milieu ISP1

Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p :1000 ml. pH 7,2

Milieu ISP2

Glucose: 4g ; extrait de levure: 4g ; extrait de malt: 10g ; au distillée q.s.p. 1000 ml; agar : 20g. pH 7,2.

Milieu ISP3

Farine d'avoine: 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000ml. pH 7,2.

* Solution saline standard: $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1g ; $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 0,1g ; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.1g ; eau distillée q.s.p. 100 ml.

Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1 g ; NaCl: 1 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2 g ; CaCO_3 : 2g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH7,2.

Milieu ISP5

Glycérol: 10 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; L-asparagine: 1 g ; agar: 18 g ; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL pH 7,2.

Milieu ISP7

Glycérol: 15 g ; L-tyrosine: 0,5 g ; L-asparagine: 1 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5g ; NaCl: 0,5 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL ; agar: 18 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

Etude physiologique

Dégradation des glucides et dérivés

Milieu Gausse

Amidon: 10g ; KNO₃: 1g ; MgSO₄·7H₂O: 0,5 g ; NaCl: 0.5g ; FeSO₄·7H₂O: 0,01g ; agar: 18g ; KH₂PO₄: 0,5g.

Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH₄)₂SO₄ : 2,64g ; KH₂PO₄ : 2,38g ; K₂HPO₄ : 5,65g; MgSO₄·7H₂O : 1g; Solution saline* : 1 ml; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g; pH : 6,8-7.

Solution saline: CuSO₄·5H₂O: 0,64g; FeSO₄·7H₂O: 0,11 g; MnCl₂·4H₂O: 0,79 g; ZnSO₄·7H₂O: 0.15g; eau distillée : 1000 ml.

Dégradation des sels de sodium (Gordon et al., 1974)

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate): 2g, NaCl: 2g ; MgSO₄·7H₂O: 0,2g ; (NH₄)₂HPO₄: 1g ; KH₂PO₄ : 0,5g ; agar: 15g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04% : 20 ml, pH 6,8.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

Gélose Mueller Hinton

Mueller Hinton: 38g ; eau distillée 1000 ml

Dégradation du polyéthylène

Milieu MSM

MgCl₂: 0,7g ; CaCl₂: 0,02g ; NH₄NO₃: 1g ; K₂HPO₄: 1g ; KH₂PO₄: 1g ; FeCl₃: 0,2g ; PEG: 10g ; Agar: 18g, pH: 7,2

Résumé

L'objectif de ce présent travail est la caractérisation et la sélection de souches d'actinobactéries capables de dégrader le polyéthylène à basse densité. A cet effet, trois souches, isolées à partir de deux sites, la décharge publique de Bejaia à Boulimate, et des bouteilles en plastiques, collectées sur le rivage de Sidi Ali Lebher.

Les isolats présentent différentes caractéristiques culturelles sur les différents milieux ISP. Les tests physiologique et biochimiques montrent leur capacité à dégrader différentes sources de carbone, l'utilisation d'acides aminés variés, à croître à différentes valeurs de pH, de température, de NaCl et dégradation des sels de sodium, ainsi que leur résistance aux antibiotiques et métaux lourds (zinc (Zn), cuivre (Cu), fer (Fe), chrome (Cr), cadmium (Cd), plomb (Pb), argent (Ag)).

L'évaluation de leur potentiel antagoniste a mis en évidence une activité antifongique significative à l'encontre de *A. niger*.

Les 3 isolats ont été testés pour leur potentiel à dégrader le PEBD sur milieux MSM solide et liquide dont la source de carbone a été remplacée par une éprouvette de PEBD noir et transparent. Les éprouvettes ont été caractérisées par leur perte de masse après 30 jours d'incubation. MS1, MS15 et MS155 ont présenté des pourcentages de dégradation intéressants, et cela sans prétraitement, sur milieu liquide, pour le PEBD noir entre (3,18% et 3,3%) et pour le PEBD transparent entre (1,17 et 6,39%) MS15 à présenter le meilleur résultat avec 6,39% alors que les pH des milieux de culture ont montré des valeurs relativement constantes.

Mots clés : Plastique, polyéthylène à basse densité, actinobactéries, biodégradation.

Abstract

The objective of this present work is the characterization and selection of strains of actinobacteria capable of degrading low density polyethylene. To this end, three strains, isolated from two sites, the Bejaia public dump in Boulimate, and plastic bottles, collected on the shore of Sidi Ali Lebher.

The isolates show different cultural characteristics on the different ISP media. Physiological and biochemical tests show their ability to degrade various carbon sources, the use of various amino acids, to grow at different values of pH, temperature, NaCl and degradation of sodium salts, as well as their resistance to antibiotics. and heavy metals (zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe), chromium (Cr), cadmium (Cd), lead (Pb), silver (Ag)).

Evaluation of their antagonistic potential revealed significant antifungal activity against *A. niger*.

The 3 isolates were tested for their potential to degrade LDPE on solid and liquid MSM media in which the carbon source was replaced by a black and transparent LDPE specimen. The specimens were characterized by their loss of mass after 30 days of incubation. MS1, MS15 and MS155 presented interesting percentages of degradation, and this without pretreatment, on liquid medium, for black LDPE between (3,18% and 3,3%) and for transparent LDPE between (1.17 and 6,39%) MS15 to present the best result with 6,39% while the pH of the culture media showed relatively constant values.

Key words: plastic, low density polyethylene, actinobacteria, biodegradation.