

N° d'ordre : /FSI 2020

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITEM'HAMED BOUGARA - BOUMERDES
Faculté des sciences de l'ingénieur
Département de génie des procédés



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Spécialité : Génie des procédés

Option: Génie des polymères

Thème

**Préparation du poly (hydroxyalcanoate) (PHA)
par voie bactérienne à partir de micro-
organismes de borbier**

Soutenu le : /11/2020

Réalisé par :

-CHOUIK Nour el Imane

&

-EL DJOUZI Asma

Encadré par :

Dr. TIMHADJELT Lamia

Co-encadré par :

Mme. MIMOUNI

Devant le jury:

Mr AKSAS Hammouche

MCA

UMBB President

Mme BELLOUL Nabila

MCB

UMBB Examineur

Melle TIMHADJELT Lamia

MCB

UMBB Encadreur

Année Universitaire 2019 - 2020

"La remise des diplômes n'est qu'un concept. Dans la vraie vie, tu es diplômé tous les jours. La graduation est un processus qui se poursuit jusqu'au dernier jour de votre vie. Si vous pouvez comprendre cela, cela fera une différence " – Arie Pencovici.

Remerciements

Nous remercions DIEU le tout puissant pour nous avoir donné la santé, le courage et la force pour achever ce travail.

Le présent travail a été réalisé dans le Centre de Recherche et de Développement SONATRACH (C.R.D.) de Boumerdes en collaboration avec la faculté des Sciences de l'Ingénieur (F.S.I – UMBB). Il a été dirigé par Mlle TIMHADJELT Lamia, Maître de conférence à F.S -UMBB, et co-encadré par Mme MIMOUNI, Ingénieur au C.R.D (Boumerdes) ainsi que Mme BELLOUL Nabila, Maître de conférence à F.S.I –UMBB.

Nous remercions énormément notre promotrice Mme « TIMAHDJALT Lamia » ; pour avoir accepté de diriger ce travail et pour toute l'aide et le soutien qu'elle nous a apporté, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi que pour les conseils et astuces qui ont permis de nous faciliter le travail. Merci pour votre gentillesse. Merci pour tout.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à notre co-promotrice Mme « Mimouni », Ingénieur au CRD qui a su nous guider et nous aider dans ce travail avec beaucoup de tact, qu'elle puisse trouver ici notre estime et notre profond respect.

Nous tenons à remercier Mme « BELLOUL Nabila » notre enseignante pendant ce cursus dont on a tant appris avec elle, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour toute l'aide qu'elle nous a apporté.

Nos remerciements s'adressent également, à tous les membres de jury : le président Mr. AKSAS H. et l'examinatrice Mme BELLOUL N. d'avoir accepté d'être membre de ce jury et d'avoir accepté d'examiner ce mémoire en dépit de vos multiples engagements.

Notre grande reconnaissance va à nos enseignants de l'option génie des polymères, transmetteurs du savoir, qui ont été consciencieux, justes et loyaux envers nous. Qu'ils trouvent le courage et la patience de pouvoir continuer honorablement leur dur et noble métier. Nous remercier également nos enseignants des différentes phases d'enseignement.

Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel à la réalisation de ce travail, spécialement, à tous les ingénieurs et techniciens du laboratoire environnement du centre de recherche et développement SONATRACH « CRD »

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi c'est tout simplement que je dédie ce mémoire

A MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie, Papa, Mama, pour tout le soutien et l'amour et le soutien que vous m'apportez depuis mon enfance et j'espère que vous bénédiction me compagne toujours.

Puisse dieu, le très haut, vous accorder la santé, le bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A MES CHERS FRERE ET SŒUR

Mon grand frère SALIM et NADIA que j'les aime profondément.

En témoignage de mon affectation fraternelle, de ma profonde tendresse, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A MA GRAND MERE « YEMMA »

Qui ma accompagné de ses prières, sa douceur, puisse dieu lui prêter longue vie et bcp de santé et de bonheur.

A MES CHERS ONCLE, TANTES, LEURS EPOUX ET EPOUSES

A MES CHERS COUSINS ET COUSINES

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A MA CHERE BINOME « ASMA » QUE J'AIME TROP

A MES DEUX SŒURS DU CŒUR « AHLAM ET NIHAD »

A MES AMIS DE TOUJOURS : ZINEB et son petit Djawad, MERIEME, AMIRA, NARI.

A tous les enseignants et à tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin de la réalisation de ce travail.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

CHOUIK NOUR EL IMANE

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents que nulle dédicace ne peut exprimer mon sincère sentiment, pour leur patience illimitée leur encouragement continu, leur aide et je leur témoigne mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

A mes chers frères et sœur

A ma grand-mère qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé dans la vie.

A MES CHERS ONCLE, TANTES, LEURS EPOUX ET EPOUSES

A MES CHERS COUSINS ET COUSINES

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A MA CHERE BINOME « NOOR» QUE J'AIME TROP

A TOUS MES AMIS

En souvenirs de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

À mes professeurs, qui sont digne d'enseigner et de transmettre leurs savoirs et connaissances,

Aux membres de jury qui m'ont donné la chance d'exposer mon projet d'étude.

EL DJOUZI ASMA.

Résumé

Depuis plusieurs décennies, le développement de plastiques biosourcés biodégradables présente un intérêt considérable compte tenu des problèmes et des effets nocifs que présentent les plastiques conventionnels vis-à-vis l'environnement.

Dans cette optique, le poly (3-hydroxyalcanoate) (PHA), un thermoplastique biodégradable et biocompatible, a attiré une attention particulière du point de vue industriel. Les méthodes courantes pour la production de ce polymère au niveau commercial utilisent le plus souvent des cultures pures de microorganismes exigeant des sources pures de carbone et des procédures complexes et coûteuses de bio-réaction. Par conséquent, des recherches ont été entreprises pour développer des processus de production plus rentable. Ceci permettrait de produire ces biopolymères biodégradables en utilisant des rejets comme substrat de base et donc de réduire les coûts d'obtention du PHA. Ces procédés basés sur des cultures microbiennes obtenues des déchets du pétrole (bourbiers). En effet, on a pu séparer des bactéries d'un échantillon de borbier analysé. Le sujet promet donc beaucoup de travail en perspective vu que le travail réalisé n'a pas pu être finalisé pour raison de la pandémie.

Ainsi, notre but est de valoriser les déchets d'un borbier (les microorganismes) pour l'élaboration d'un biopolymère (PHA) biodégradable, moins couteux respectueux de l'environnement et présentant beaucoup d'autres propriétés pour des applications très intéressantes.

Mots clés: *poly (3-hydroxyalcanoate), biopolymère bactérien, borbier, bactéries, valorisation.*

Abstract

For several decades, the development of biobased biodegradable plastics has been of considerable interest given the problems and harmful effects that conventional plastics have on the environment.

In this perspective, poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA), a biodegradable and biocompatible thermoplastic, has attracted particular attention from an industrial point of view. Current methods for the production of this polymer at the commercial level most often use pure cultures of microorganisms requiring pure sources of carbon and complex and costly bio-reaction procedures. Therefore, research has been undertaken to develop more cost-effective production processes. This would make it possible to produce these biodegradable biopolymers using rejects as a basic substrate and therefore reduce the costs of obtaining the PHA. These processes are based on microbial cultures obtained from petroleum waste (quagmire). In fact, in the present work, bacteria were able to be separated from an analysed quagmire sample. The subject therefore promises a lot of work in perspective as the work done could not be finalized due to the pandemic.

Thus, our goal is to recover the waste from a quagmire (microorganisms) for the development of a biodegradable biopolymer (PHA), less expensive, respectful of the environment and having many other properties for very interesting applications.

Key words: *poly (3-hydroxyalkanoate), bacterial biopolymer, quagmire, bacteria, recovery.*

الملخص:

لعدة عقود، كان تطوير المواد البلاستيكية القابلة للتحلل الحيوي موضع اهتمام كبير نظرًا للمشاكل والآثار الضارة التي تسببها المواد البلاستيكية التقليدية على البيئة.

مع وضع هذا في الاعتبار، جذب (PHA) poly (3-hydroxyalkanoate) وهو مادة بلاستيكية حرارية قابلة للتحلل الحيوي ومتوافق حيويًا، اهتمامًا خاصًا من وجهة نظر صناعية. غالبًا ما تستخدم الطرق الحالية لإنتاج هذا البوليمر تجاريًا الوسائط المغذية للكائنات الحية الدقيقة التي تتطلب مصادر نقية للكربون وإجراءات تفاعل حيوي معقدة ومكلفة. لذلك، تم إجراء بحث لتطوير عمليات إنتاج أكثر ربحية. هذا من شأنه أن يجعل من الممكن إنتاج هذه البوليمرات الحيوية القابلة للتحلل باستخدام المواد المرفوضة كركيزة أساسية وبالتالي تقليل تكاليف الحصول على PHA. تعتمد هذه العمليات على الثقافات الميكروبية التي تم الحصول عليها من نفايات البترول (bourbier). في الواقع، تم فصل البكتيريا من عينة مستنقع تم تحليله. لذا فإن هذا الموضوع يعد بالكثير من العمل في المنظور حيث لم يتم الانتهاء من العمل المنجز بسبب الوباء.

وبالتالي، فإن هدفنا هو استعادة النفايات من المستنقع (الكائنات الحية الدقيقة) لتطوير بوليمر حيوي قابل للتحلل الحيوي (PHA)، أقل تكلفة ويحترم البيئة وله العديد من الخصائص الأخرى لتطبيقات مثيرة للاهتمام للغاية.

الكلمات المفتاحية: بولي (3-هيدروكسي ألكانوات)، بوليمر حيوي بكتيري، مستنقع، بكتيريا، استرجاع.

Sommaire

SOMMAIRE	I
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I :	5
LA BIOTECHNOLOGIE POUR OBTENIR DES BIOPOLYMERES BACTERIENS	5
I. LABIOTECHNOLOGIE, VOIE INNOVANTE	6
I.1 Généralités sur la biotechnologie	6
I.2 Diversité et valorisation des micro-organismes	7
I.2.1 Les micro-organismes	7
I.2.2 Les bactéries	7
I.2.2.1 Présentation et constitution des bactéries	7
I.2.2.2 Evolution des bactéries	8
I.2.3 Les sources des micro-organismes	9
I.2.3.1 Les micro-organismes marins	9
I.2.3.2 Les bactéries issues du sol	10
I.2.3.3 Des micro-organismes issus de boues activées	10
I.2.3.4 Les micro-organismes issus des bourbiers	10
I.2.4 Applications des microorganismes	11
I.2.4.1 Application dans la dépollution	11
I.2.4.2 Application dans l'élaboration des biopolymèresbactériens	11
I.2.4.2.1 Applications des microorganismes issus des boues activées	11
I.2.4.2.2 Application des microorganismes marins	12
II. VALORISATION DES MICRO-ORGANISMES DE BOURBIER	13
II.1 Le forage et les fluides de forage	13
II.1.1 Le forage pétrolier	13
II.1.2 Les fluides du forage	14
II.1.2.1 Définition	14
II.1.2.2 Types des fluides (boues) de forage	14
II.1.2.2.1 Boues à base d'eau	15
II.1.2.2.2 Boues à base d'eau et de polymère	15
II.1.2.2.3 Boue à base d'eau et d'argile	15

II.1.2.2.4	Boues à base d'huile	15
II.1.2.3	Compositions des fluides de forage	16
II.2	Les bourbiers de forage	17
II.2.1	Définition des bourbiers	17
II.2.2	Influence des bourbiers sur l'environnement	17
II.2.3	Pollution des sols par les métaux lourds	18
II.2.3.1	Toxicité des métaux lourds	18
II.2.3.2	Effet des métaux lourds sur l'environnement et sur l'homme	18
II.2.4	Traitement de bourbiers	19
II.2.5	Application des microorganismes issus de bourbier	20
II.2.5.1	Production des biosurfactants	20
II.2.5.2	Bioremédiation	20
II.2.5.3	Dégradation des hydrocarbures	21
II.2.5.4	Production des biopolymères	21
III.	LES BIOPOLYMERES BACTERIENS	22
III.1	Les biopolymères	22
III.2	- Les biopolymères bactériens	23
III.2.1	Généralités	23
III.2.2	Les avantages dans la production des biopolymères bactériens	24
III.2.3	Quelques exemples de biopolymères bactériens	24
CHAPITRE II :		26
LES POLY(HYDROXYALCANOATES) (PHA)		26
I.	DESCRIPTION DES POLY(HYDROXYALCANOATES) (PHAS)	27
I.1	Définition des poly(hydroxyalcanoates)	27
I.2	Découverte des PHA	28
I.3	Structure et classification des PHAs	29
II.	PROPRIETES DES PHA	31
II.1	Propriétés physico-chimiques	31
II.2	Propriétés thermoplastique	31
II.3	Propriétés thermiques	31
II.4	Les propriétés mécaniques	32
II.5	La biodégradabilité	33
II.5.1	Dégradation intracellulaire	33
II.5.2	Dégradation extracellulaire	34

II.6	La biocompatibilité	35
II.7	Les propriétés barrières	36
III.	APPLICATIONS DES PHAS	36
III.1	Application des PHA dans le domaine médical	36
III.2	D'autres applications des PHAs	37
III.3	Les PHAs les plus dominants et leur implication sur le marché	37
IV.	PRODUCTION DES PHAS	38
IV.1	Production des PHAs par fermentation bactériennes	38
IV.1.1	Méthodes de détection des bactéries productrices de PHA	38
IV.1.2	Processus de production par fermentation bactérienne	39
IV.1.3	Condition de culture	41
IV.1.4	Procédés d'extraction des PHAs	42
IV.2	Biosynthèse des PHAs	43
IV.2.1	Implication des enzymes dans la production des PHAs	43
IV.2.2	Processus de biosynthèse des PHAs	45
V.	CYCLE DE VIE DES PHA	48
VI.	METHODES D'ANALYSE DES PHAS	50
	PARTIE PRATIQUE	52
	CHAPITRE III :	53
	MATERIELS ET METHODES	53
I.	MATERIELS	55
I.1	Matériels non biologiques	55
I.2	Matériels biologiques	55
I.2.1	Le bourbier	55
I.2.1.1	Situation géographique de HMD	56
I.2.1.2	Données climatiques	56
II.	METHODES	57
II.1	Echantillonnage de Bourbier	57
II.1.1	Mode opératoire de l'échantillonnage	57

II.1.2 CONDITIONS D'ECHANTILLONNAGE	57
II.2 Analyse physico-chimique	58
II.2.1 Dosages des hydrocarbures	58
II.2.1.1 Teneur en matière sèche et teneur en eau	58
II.2.2 Dosage des indicateurs de pollution organique	59
II.2.2.1 Mesure du pH	59
II.2.2.2 Détermination de la demande chimique en oxygène DCO	60
II.2.2.3 Evaluation de Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours	61
II.2.2.4 Détermination du Carbone organique total	63
II.2.2.5 Détermination des matières en suspension	65
II.2.2.6 Dosage de nitrate	66
II.2.2.7 Dosage de nitrite	67
II.2.2.8 Dosage de phosphore	67
II.2.3 Dosage des minéraux	67
II.2.3.1 Dosage des métaux lourds	67
II.2.3.2 Dosage du mercure total	69
II.3 Analyses microbiologiques du sol	72
II.3.1 Matériels	72
II.3.2 Dilution décimale	72
II.3.3 Isolement des bactéries	72
II.3.4 Dénombrement des bactéries	73
II.3.5 Purification des isolats	74
II.3.6 Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées	74
II.3.7 Etude des caractères morphologiques	74
II.3.7.1 Aspect macroscopique	74
II.3.7.2 Aspect microscopique	75
CHAPITRE IV :	76
RESULTATS ET DISCUSSIONS	76
I. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES	77
I.1 Les analyses de dosage des hydrocarbures	77
I.1.1 Teneur en matière sèche et en eau	77
I.2 Dosage des minéraux	78
I.2.1 Dosage de mercure total	78
I.2.2 Dosage des métaux lourds	78
I.3 Dosage d'indicateurs de pollution organique	78
I.3.1 Mesure de pH des bourbiers	78
I.3.2 Evaluation de la biodégradabilité de la matière organique présente	79
I.3.3 Dosage des paramètres de la pollution organique	79
I.3.4 Dosage de carbone organique total	80
II. CARACTERISATIONS MICROBIOLOGIQUES DU SOL	80

II.1	Dénombrement des bactéries	81
II.2	Etude des caractères morphologiques	81
II.2.1	Aspect macro et microscopique	81
	CONCLUSION GENERALE	82
	ANNEXES	84
	BIBLIOGRAPHIE	93

Liste des figures

Figure I.1 : Constitution de la bactérie.

Figure I.2 : Sonde de forage HMD

Figure I.3 : Bourbiers de HMD

Figure I.4 : Schéma représentatif des impacts des bourbiers sur l'environnement

Figure I.5 : Classification des polymères biodégradables selon leurs sources

Figure II.1: Image de microscopie électronique de la souche bactérienne *Ferrobacillusferrooxidans* en phase d'accumulation intracellulaire de P(3HB). Barre d'échelle=500nm.

Figure II.2 : Structure générale des poly (3-hydroxyalcanoates)

Figure II.3 : Propriétés mécaniques des PHAs

Figure II.4: Dégradation intracellulaire du PHB

Figure II.5: Récapitulatif des étapes effectuées dans le cadre du criblage moléculaire par PCR

Figure II.6 : Les différentes étapes de la production de PHA bactérien

Figure II.7 : Production de PHA par catalyse avec l'enzyme PHAc

Figure II.8 : *Alcaligeneseutrophus*

Figure II.9 : Biosynthèse du PHB et du PHBV dans l'*Alcaligeneseutrophus*

Figure II.10 : Schéma représentatif du cycle de vie des PHAs

Figure III.1 : Echantillon utilisé au cours de nos expériences : échantillon de sol du bourbier (mélange de différents bourbiers)

Figure III.2 : Situation géographique de HMD

Figure III.3 : Schéma représentatif des points de prélèvement à partir des bourbiers.

Figure III.4 : PH-mètre

Figure III.5 : Dispositif d'agitation pendant cinq jours

Figure III.6 : Les réactifs LCK 380/381

Figure III.7 : Thermostat

Figure III.8 Spectrophotomètre

Figure III.9 : Les étapes d'analyse par ICP-MS

Figure III.10 : Schéma représentatifs du principe de fonctionnement de l'analyseur de Hg.

Figure III.11 : Analyseur de laboratoire (mercuryvapor)

Figure III.12: dilution décimale sous hotte

Figure III.13 : l'ensemencement sur des boites pétrie de la GN

Figure III.14 : Schéma de dilution décimale, l'isolement et le dénombrement des bactéries.

Figure IV.1: la formulation des colonies visibles à l'œil

Figure IV.2 : photos des bactéries sous le microscope

Figure A.1 : Schéma représentatif des points de prélèvement.

Figure A.2 : Dispositif d'agitation pour l'essai de lixiviation

Figure A.1 : Autre appareillage utilisé : étuve et dessiccateur

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Structures bactériennes et leurs rôles

Tableau I.2 : Composition des fluides de forages

Tableau I.3 : propriétés spécifiques des biopolymères et applications attendues

Tableau II.1: Structure générale et classification de poly (3-hydroxyalcanoate)

Tableau II.2 : Propriétés physiques et mécaniques du PHB et ses copolymères.

Tableau II.3 : Production de PHAs sous différentes conditions de culture

Tableau II.4 : Composition des poly (3- hydroxyalcanoate) accumulés dans des bactéries.
Le nombre de carbone (C) change selon le substrat utilisé

Tableau II.5 : Production de poly (3- hydroxyalcanoate) dans deux souches d'*Alcaligenes eutrophus* (ATCC 17699 et NCIB 11599) en fonction du substrat.

Tableau II.6 : Composition et poids moléculaire des PHAs produits par différentes bactéries

Tableau III.1 : Données climatiques HMD

Tableau III.3: Les différentes méthodes d'analyses sur le borbier sec.

Liste des abréviations

PHA : poly (hydroxyalcanoate)

PHB : poly (hydroxybutyrate)

P (HB, HV) : poly (hydroxybutyrate -hydroxyvalérate)

P (3HB-co-3HV): poly (3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalérate)

EPS : Exopolysaccharides

OCDE : L'Organisation de Coopération et de Développement Economique

CMC : Carboxyle Méthyle cellulose.

XVII^e siècle : 17^e siècle

PMMA : Polyméthacrylate de méthyle

PHAscl : PHA à (short chain length) chaînes latérales courtes

PHAmcl : PHA (medium chain length) chaînes latérales moyennes

PHAlcl : PHA (long chain length) chaînes latérales longue

THF : Tétrahydrofurane

GN : gélose nutritif

PCR : Réaction en Chaîne de Polymérase

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPL : Chromatographie en Phase Liquide

FTIR : Spectrométrie infra rouge a transformée de fourrier

RMN : Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

MALDIMS : Spectroscopie de masse en tandem

SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique

DSC : Analyse par calorimétrie différentielle à balayage

TGA : Analyse thermogravimétrie

COT: Carbone organique total.

DCO: Demande chimique en oxygène.

DBO5: Demande biologique en oxygène.

HMD: Hassi Massoud.

Hg: Mercure.

ISO: Organisation internationale de normalisation.

NF: Norme Française.

OMS: Organisation internationale de normalisation.

TE: Teneur en eau.

TMS: Teneur en matière sèche.

TC: Carbone total.

TIC: Carbone inorganique total.

Introduction Générale

Au cours des dernières années, les biopolymères ou plastiques biosourcés se sont développés rapidement grâce à la hausse des prix du pétrole et sa raréfaction ainsi qu'à de nombreux problèmes environnementaux liés à la pollution plastique. De plus en plus, la réduction des émissions de dioxyde de carbone est devenue une autre raison de la promotion des plastiques biosourcés.

D'une manière générale, les biopolymères comprennent les plastiques à base d'amidon, les protéines (protéines de soja), la cellulose et les plastiques mélangés à la cellulose, la chitine. Ils peuvent également être mélangés ou renforcés avec des plastiques conventionnels tels que le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP) et alcool polyvinylique (PVA). Cependant, ces biopolymères ne sont que partiellement biodégradables. Les plastiques résiduels à base de pétrole restent en morceaux dans l'environnement, créant la pollution.

Cependant, ces bioplastiques présentent des propriétés thermiques et mécaniques médiocres par rapport aux plastiques conventionnels et insuffisantes vis à vis de certaines applications. C'est ainsi que, pour remédier à ces inconvénients, beaucoup de recherches se focalisent sur l'amélioration de ces bioplastiques avec des propriétés similaires aux plastiques conventionnels.

Ces dernières années, un type spécifique des biopolymères a connu une réelle avancée, ce sont les biopolymères bactériens. Des bactéries sont employées pour fabriquer des biopolymères à partir de sources renouvelables, comme l'amidon, la cellulose, les acides gras ainsi que toutes les bactéries qui peuvent consommer pour la croissance. C'est ainsi, que différents polymères bactériens ont été élaborés avec succès. On peut en citer quelques-uns : les acides hydroxycarboxyliques avec de nombreuses variations structurales, acide lactique, acide succinique, acide (R)-3-hydroxypropionyle, bioéthylène produit par déshydratation de bioéthanol, de 1,3-propanediol et de cis-3,5-cyclohexadiène-1,2-diols provenant de bactéries transformation du benzène et d'autres produits chimiques. Ils peuvent être produits par des voies microbiennes à des fins de polymérisation.

D'un autre côté, l'utilisation des bactéries pour l'élaboration des biopolymères bactériens, constitue en elle-même une valorisation de certains milieux pollués comme les borbiers qui s'inscrivent dans le sujet de notre travail.

Introduction général

Dans notre présent travail, nous focalisons notre recherche sur l'élaboration des polyhydroxalcanoates (PHAs) comme polymères bactériens. Le choix de ce polymère revient à son grande importance via ses nombreuses propriétés intéressantes qui trouve ainsi une plus large application dans différents domaine, notamment dans le domaine médical.

En fait, les acides poly (R)-hydroxalcanoïques (PHA) sont un groupe de composés de stockage de carbone et d'énergie qui s'accumulent pendant la croissance déséquilibrée par de nombreuses bactéries, c'est-à-dire en présence d'un excès d'une source de carbone et si la croissance est limitée par un autre nutriment (l'azote). Les PHAs sont déposés au niveau intracellulaire sous forme de corps d'inclusion «granules». Le nombre élevé de monomères et leur composition variable entraînent une énorme variation des caractéristiques physiques et chimiques des différents PHAs. Cependant, seuls le PHB a été commercialisé (Biopol®).

Le présent travail, consiste en une synthèse bibliographique, avec l'incapacité de terminer le travail en une application pratique complète dans les conditions de la pandémie avec le confinement mondial au moment de la réalisation de ce travail. L'objectif de cette étude consiste donc à explorer deux voies de recherche. En premier lieu, il s'agit d'explorer le domaine biotechnologique et la séparation d'une bactérie des bourbiers pétroliers du site de Hassi Messaoud, une partie qui a été entamée expérimentalement mais qu'on n'a pas pu finaliser. Puis, la possibilité de l'application des bactéries, normalement séparées, dans la préparation de biopolymères bactériens d'intérêt, les PHAs d'où l'orientation de la bibliographie sur les deux axes de biotechnologie d'un côté et des PHAs de l'autre.

Ainsi, ce mémoire Commence par une introduction générale soulignant le sujet et le but de ce travail.

L'essentiel du travail de ce mémoire est présenté sous quatre grands chapitres, les deux premiers faisant partie d'une longue synthèse bibliographique, les deux derniers sera rapporté l'essentiel de la partie pratique réalisée avant interruption du travail pratique suite à la pandémie :

Le premier chapitre faisant partie de partie revue bibliographique, se divise selon les axes de recherche abordés et qui sont essentiels à la compréhension de notre sujet, en trois parties :

Introduction général

- La partie I : aborde la biotechnologie pour l'élaboration des biopolymères bactériens. Dans cette partie, nous parlerons de la biotechnologie et son importance, les micro-organismes dont les bactéries ainsi que leurs différentes sources. Puis nous entamerons leur valorisation et leur application, notamment dans le domaine qui nous intéresse, l'élaboration des biopolymères bactériens.
- La partie II : où nous étalerons, la source des bactéries qu'on veut valoriser, les borbiers pétroliers et qui fait partie de notre sujet. Dans cette partie on donne un aperçu sur les borbiers de forage pétroliers, leur présentation, leurs contenu leur devenir et leur traitement. Nous aborderons par la suite, les micro-organismes, leur séparation et leur application, notamment dans les biopolymères bactériens.
- La partie III : Enfin, dans cette partie, nous parlerons des biopolymères bactériens, leur présentation et leur intérêt et leurs applications, en général, en passons par les biopolymères.

Nous entamerons après le deuxième chapitre des polymères bactériens qui nous intéressent : les PHAs. Dans ce chapitre, nous étalerons tous ce qui concerne ce polymère très important. Nous commençons par une description générale dans une première partie puis nous continuons par l'étude de ses propriétés, puis les applications qui serasuivie par la partie la plus intéressante qui est leur préparation et enfin nous abordons leur cycle de vie et les méthodes d'analyse.

Viendra ensuite la partie pratique qui inclue deux chapitres : D'abord le troisième chapitre, où sera rapporté l'expérimental réalisé avec le matériel et les méthodes utilisés qui concerne surtout la partie biologique de notre travail, stoppée au niveau des séparations des bactéries séparées des borbiers. Suivra après le quatrième chapitre où nous tentons de discuter les résultats trouvés.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale de tout ce qu'on a vu avec des perspectives pour des recherches à venir.

Revue bibliographique

Chapitre I :
La biotechnologie pour obtenir des
biopolymères bactériens

Chapitre I : La biotechnologie pour obtenir des biopolymères bactériens

I. La biotechnologie, voie innovante

On va développer dans ce qui va suivre les aspects de la biotechnologie, d'abord l'extraction et l'exploitation des éléments de la biotechnologie, à savoir, les micro-organismes. Nous aborderons ensuite les biopolymères bactériens, en général, qui se préparent par cette voie innovante.

I.1 Généralités sur la biotechnologie

Le terme de biotechnologie a été employé pour la première fois en 1919. La Biotechnologie est un carrefour entre le vivant et la technologie. L'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) définit les biotechnologies comme étant l'application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services.

Qu'elles soient classiques (fermentation, génie enzymatique) ou de nouvelle génération (génie génétique, nanotechnologies, génomique), les biotechnologies sont intégrées de plus en plus dans des procédés industriels de transformation de la matière ou de synthèse de nouveaux produits (1).

En effet, cette biotechnologie des «extrêmophiles» a pour objectif de rechercher et d'exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires. La recherche des bactéries des milieux atypiques a déjà prouvé son potentiel notamment avec la découverte d'enzymes thermostables (comme les polymérases issues de bactéries hyper-thermophiles) mais également avec les biopolymères marins (2).

Ces dernières années, l'application de la biotechnologie dans les polymères a connu une réelle avancée avec l'apparition et le développement des biopolymères bactériens qui connaissent de plus en plus d'intérêt.

On va commencer dans la partie suivante, par présenter et développer les éléments de la biotechnologie, à savoir, les micro-organismes, en particulier les bactéries, élément de notre intérêt.

I.2 Diversité et valorisation des micro-organismes

I.2.1 Les micro-organismes

Les micro-organismes (du grec *micro*, petit et *bios*, vie) sont des êtres vivants invisibles à l'œil nu. Ils regroupent virus, bactéries, protistes, algues et champignons microscopiques. Ils représentent la biomasse la plus importante de la Terre (1). Parmi les micro-organismes les plus utilisés dans la biotechnologie pour élaboration des biopolymères bactériens on trouve les bactéries.

I.2.2 Les bactéries

I.2.2.1 Présentation et constitution des bactéries

Les bactéries sont la forme de vie la plus dominante sur Terre depuis 3500 millions d'années. Elles constituent également le type cellulaire le plus abondant de la planète y compris du corps humain. Une bactérie est un microorganisme unicellulaire qui ne possède ni noyau ni d'autres organites liés à la membrane. Les bactéries s'adaptent bien à leur environnement en se présentant sous de nombreuses formes. Cependant, elles possèdent quelques similitudes dans leur anatomie (*figure I.1*).

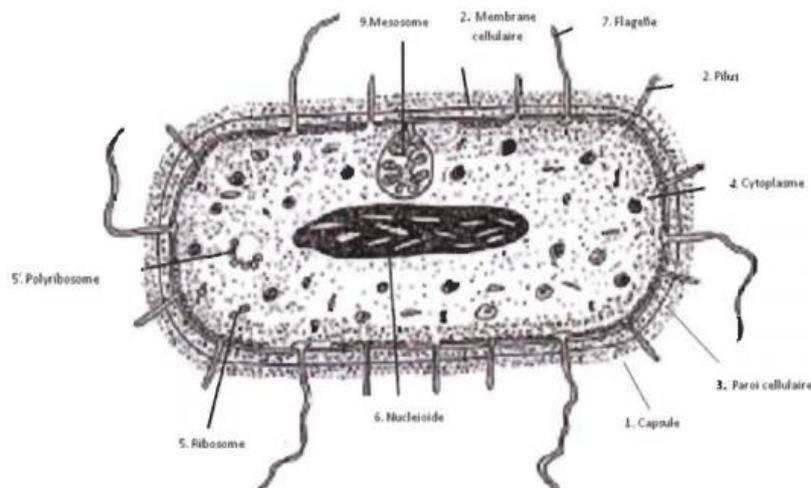


Figure I.1 : Constitution de la bactérie

Les structures organisationnelles communes à la majorité des bactéries sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau I.1 : Structures bactériennes et leur rôles (3).

Structures bactériennes	Définition/rôle
1) Capsule	Une couche protectrice, souvent gluante, contenant souvent des sucres (polysaccharides), qui aide à protéger la bactérie. Ceci rend également les bactéries virulentes.
2) Paroi cellulaire	Elle est généralement constituée de peptidoglycane, un composé protéique et sucré qui donne à la cellule une certaine rigidité et protection contre le stress extracellulaire.
3) Membrane cellulaire	La membrane plasmique de la bactérie agit en coordonnant le passage des molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.
4) Cytoplasme	Il sert de support par lequel les molécules sont transportées, et il permet de maintenir les conditions (telles que la température et le pH) optimales pour la cellule.
5) Ribosomes	Machines moléculaires faites d'ARN et de protéines responsables de la synthèse des protéines de la bactérie.
6) Nucléoïde	C'est la région où se trouve l'ADN de la bactérie. Il n'est pas entouré d'une membrane.
7) Flagellum	C'est un prolongement cytoplasmique. Il assure la mobilité de la cellule bactérienne.
8) Pilus	Cet appendice se situe à la surface de la paroi de nombreuses bactéries. Certains sont essentiels dans la conjugaison bactérienne.
9) Mésosome	Ce sont des invaginations de la membrane plasmique en forme de vésicule, de tube ou de lamelle. Son rôle n'est pas encore bien défini.

Les organismes supérieurs, dont l'Homme et son environnement, sont colonisés par ces bactéries. Certaines d'entre elles sont indispensables à l'Homme. Alors que d'autres lui sont pathogènes (3).

1.2.2.2 Evolution des bactéries

Le nombre élevé des bactéries se traduit en une grande diversité de la vie microbienne. La pluralité bactérienne est le principal réservoir restant de la diversité biologique inconnue sur la terre. Cette diversité provient de leur évolution et mutations au cours du temps.

Avec l'avancée de la technologie et les techniques d'analyses, il est maintenant possible de les caractériser par la séquence complète du génome d'une souche afin d'étudier les gènes, ou d'examiner l'information génétique et les mutations. Ces méthodes sont sous-jacentes à une nouvelle discipline scientifique connue sous le nom de la génomique qui permet une meilleure connaissance de la bactérie. En outre, une meilleure compréhension de la génomique nous permet de prédire le potentiel génétique des microorganismes pour des applications biotechnologiques et leur adaptation aux changements environnementaux (3).

I.2.3 Les sources des micro-organismes

Les micro-organismes, en général, peuvent être issus ou extraits de différents milieux. Ainsi on peut les trouver dans les milieux marins, les sols pollués et tout récemment de nouvelles recherches tentent d'exploiter les micro-organismes, plus précisément les bactéries, des bourniers pour la préparation des biopolymères.

I.2.3.1 Les micro-organismes marins

Les micro-organismes marins (bactéries et micro-algues) représentent la plus grande part de vie dans les océans mais on estime que 99% d'entre eux sont encore à découvrir. Or, les avancées dans le domaine de la biologie moléculaire et de la microbiologie rendent désormais possibles l'étude et l'utilisation de ces micro-organismes marins. Négligés jusqu'à présent, ces organismes pourraient donc bien être le principal gisement de nouvelles molécules dans les prochaines décennies. En effet, La biodiversité marine est naturellement source de diversité de structures chimiques (4)

La diversité des milieux marins se reflète dans la diversité des organismes et de leurs métabolites. L'exploration des écosystèmes atypiques a permis la découverte de micro-organismes qui se sont rapidement affichés comme les acteurs principaux de la vie sur des milieux peu propices. Ces micro-organismes ont, au cours de l'évolution, développé des moyens d'adaptations très variés afin de survivre et de proliférer dans des niches écologiques variées (2). D'après le travail de Florance Brian-Jaisson (2014) (5), un grand nombre de genres bactériens ont été identifiés dans les biofilms marins. Beaucoup de travaux ont porté sur les bactéries récupérées à partir de sédiments ou de roches mais les études portant sur des bactéries isolées de surfaces artificielles immergées sont plus rares (5). Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies. La recherche des bactéries des milieux atypiques a déjà prouvé son potentiel notamment avec la découverte d'enzymes thermostables (comme les polymérase issues de bactéries hyper-thermophiles) mais également avec les biopolymères marins (2).

1.2.3.2 Les bactéries issues du sol

La biodiversité des bactéries du sol, d'abord recensée à partir de la microflore cultivable, est aujourd'hui caractérisée par des approches de communautés microbiennes reposant sur l'extraction d'ADN et analyse du gène codant l'ARN ribosomal 16S (métagénomique). Les sols abritent majoritairement des *Proteobacteria*, *Acidobacteria* et *Actinobacteria*. Les bactéries du sol ont plusieurs rôles environnementaux majeurs :

- ***Dans la formation des sols*** : Les cyanobactéries, sont les premiers colonisateurs qui permettent l'accumulation de nutriments dans les sols.
- ***Dans les cycles nutritifs*** : Elles sont impliquées dans la décomposition de la matière organique (même des biopolymères complexes comme la cellulose ou la lignine) avec libération des nutriments pour les plantes.
- ***En association symbiotique avec les plantes***: Certaines bactéries (les *Rhizobium*) peuvent aider à fixer l'azote au niveau des racines des légumineuses, favorisant la croissance des plantes dans les sols pauvres en azote (6).

1.2.3.3 Des micro-organismes issus de boues activées

Les boues activées sont généralement riches en bactéries. Elles sont souvent mélangées à des cultures bactériennes pour des applications dans la production des biopolymères bactériens comme le PHA. De nombreux travailleurs ont montré que les boues activées ont la capacité de produire des bioplastiques (7).

1.2.3.4 Les micro-organismes issus des bourbiers

Cette source de micro-organismes, plus précisément les bactéries, est considérée comme une source de valorisation récente, très innovante et prometteuse pour de nouvelles perspectives d'applications, notamment dans les biopolymères, et elle fait partie du sujet de notre travail. C'est ainsi qu'on verra ci-dessous avec plus de détail cette source potentielle de micro-organismes, sa présentation et son application.

I.2.4 Applications des microorganismes

I.2.4.1 Application dans la dépollution

Il s'agit en fait de la dépollution pétrolière par la bioremédiation et la dégradation des hydrocarbures.

Le traitement biologique des sols consiste à utiliser des organismes pour transformer des substances chimiques toxiques en substances non toxiques (8). De plus, les sols étant rarement stériles, la microflore en place lorsqu'elle rencontre une pollution pétrolière va chercher à métaboliser les polluants pour se maintenir en vie. Ces micro-organismes «hydrocarbonoclastes» sont les principaux agents d'atténuation naturelle des hydrocarbures. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique (9). On va les aborder avec plus de détail dans l'application des microorganismes issus de borbiers.

I.2.4.2 Application dans l'élaboration des biopolymères bactériens

I.2.4.2.1 Applications des microorganismes issus des boues activées

Ce type de micro-organismes a trouvé beaucoup d'application surtout ces dernières années dans les biopolymères notamment les PHAs. En effet, d'après le travail de Song Yan (7), l'accumulation des PHAs à plus forte concentration a été observée avec une variété de micro-organismes tels que Clostridium, Syntrophomonas, Pseudomonas et Alcaligene. Il a été aussi trouvé que l'Alcaligenesutrophus produit des PHAs à chaînes courtes et que certaines cyanobactéries produisent PHB à un niveau inférieur.

Song Yan (2007) (7) a rapporté que la *P. resinovarans*, cultivée sur hexanoate, accumule des PHAs de C₄, C₆, C₈ et C₁₀ monomères. Un certain nombre de bactéries peuvent même accumuler des copolymères PHAs contenant à la fois des chaînes courtes ou moyennes. Cependant, l'*A. eutrophus* est le micro-organisme le plus utilisé sous de rudes conditions car il produit PHB et P (HB-HV) au taux le plus élevé. Il peut accumuler environ 80% de son poids sec.

En général, la nature et la proportion des polymères produits sont influencées par la source de carbone utilisée. Aussi, la bactérie *Azotobacter vinelandii* a été utilisée comme alternative pour la production des PHBs. En effet, il a été aussi rapporté qu'elle peut produire une grande quantité de PHB sur une variété de sources de sucre, sans nécessiter

des conditions de croissance limitée. Elle accumule un maximum de PHB sans besoin d'azote et d'excès de carbone (le glucose). D'autres études ont montré aussi que des souches de *Rhizobium* sont capables d'accumuler du PHB à un niveau significatif (7).

1.2.4.2.2 Application des microorganismes marins

Les bactéries issues des milieux marins ont trouvé beaucoup d'applications à travers les différentes recherches effectuées. En effet, il a été trouvé que Les cyanobactéries sont un type de bactérie marine très répandu. Elles produisent leur propre nourriture en utilisant l'azote au lieu du dioxyde de carbone. Elles jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. Elles convertissent l'azote en une forme que d'autres organismes marins peuvent utiliser. Les bactéries marines aident également à nettoyer l'océan. Certaines aident à décomposer les animaux marins morts. D'autres peuvent même aider à décomposer le pétrole après un déversement. Cependant, l'application qui attire l'intérêt des chercheurs ces dernières années c'est l'application dans les biopolymères bactériens. En effet, Les polysaccharides bactériens d'origine marine sont probablement source potentielle de découvertes de nouvelles molécules dans les années à venir en particulier pour des applications dans le domaine de la cosmétique (4).

Plusieurs travaux ont été effectués dans ce domaine. C'est ainsi que Elefthérios Chalkiadakis(2013) (10), a pu identifier et séparer des bactéries des milieux marins de la Nouvelle-Calédonie pour la production de biopolymères bactériens tel que les polyhydroxalcanoates (PHA) et les exopolysaccharides (EPS) qui ont un intérêt majeur dans différents domaines. Ceci a été possible à partir de la classification de ces bactéries par des analyses phylogénétiques. En plus, l'étude de Caroline Jain-beuguel (2018) (11) a permis de rapporter la présence de trois nouveaux genres bactériens capables de produire des PHAs : *Alteromonas*, *Rheinheimera* et *Rugirai* (11).

- **Projet de BIOCOMBA**

Ce projet s'inscrit dans une double valorisation : les bactéries des milieux marins et les substrats récupérés des déchets alimentaires dans la filière végétale (fruits et légumes). Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet montrent qu'il est possible d'obtenir du PHA. En effet, ces substrats sont intégrés dans le procédé de production de PHA réalisé par fermentation bactérienne utilisant des souches marines isolées à partir de différents mollusques (palourdes, coques, seiches,...) au large des côtes bretonnes. L'étude a été bien

suivie via différentes techniques qualitatives et quantitatives. Le protocole mis en place permet de caractériser de façon normée l'efficacité d'un couple substrat/bactérie vis-à-vis de la production de PHA. L'étude a été menée avec l'objectif d'être transposable en conditions industrielles, et de permettre la caractérisation en ligne de l'avancement de la production de PHA lors de fermentations en bioréacteur. La fluorescence est alors détectée par couplage entre des techniques microscopiques et spectrométriques et permet de conduire à une évaluation qualitative et semi-quantitative de la teneur en PHA dans le milieu de culture ainsi qu'au suivi de la biosynthèse (12).

Concernant les applications des micro-organismes issus des bourbiers vont être abordée avec plus de détail dans le volet suivant consacré à cette source pétrolière qui est sujet de notre intérêt.

II. Valorisation des micro-organismes de bourbier

En Algérie, plus précisément à Hassi Messaoud, se trouve l'industrie pétrolière la plus développée en Afrique. Le pétrole est extrait par l'opération du forage qui cause beaucoup des problèmes environnementaux qui contribuent à la dégradation de quelque écosystème naturel (13). La valorisation des bactéries des bourbiers connaît de plus en plus d'intérêt, surtout dans les pays pétroliers comme l'Algérie. Cette valorisation a trouvé certaines applications très intéressantes mais le plus marquant c'est qu'elle commence de susciter un intérêt particulier dans l'élaboration des biopolymères, sujet de notre étude.

Les bourbiers sont le produit des activités industrielles et pétrolières. Pour comprendre ces processus compliqués et diversifiés, il faut introduire un aperçu général sur les forages pétroliers et les différentes phases de réalisation de ces projets, ainsi que les fluides de forage et les produits utilisés (13).

II.1 Le forage et les fluides de forage

II.1.1 Le forage pétrolier

On appelle "forage pétrolier" l'ensemble des opérations permettant d'atteindre les roches poreuses et perméables du sous-sol, susceptibles de contenir des hydrocarbures liquides ou gazeux. L'implantation d'un forage pétrolier est décidée à la suite des études géologiques et géophysiques effectuées sur un bassin sédimentaire. Ceci nous permet de faire une idée

de la constitution de sous-sol et des possibilités de gisements, sans pour autant préciser la présence d'hydrocarbures. L'opération de forage peut alors confirmer les hypothèses faites et mettre en évidence la nature des fluides contenus dans les roches (14) (13).

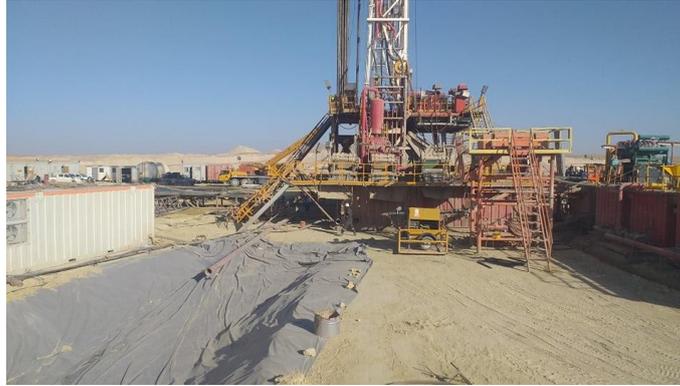


Figure I.2 : Sonde de forage HMD

II.1.2 Les fluides du forage

II.1.2.1 Définition

Le fluide ou boue de forage, est un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel), contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciments, ...) (15) et contenait donc une certaine proportion d'argile (16).

Le rôle principal des boues de forage est de remonter les déblais du fond du puits à la surface. La consistance de la boue doit être suffisante pour empêcher une sédimentation de ces déblais dans le courant ascensionnel. Cette consistance ne doit pas dépasser certaines limites qui deviendraient incompatibles avec la puissance des installations de pompage. Aussi, les déblais et les particules solides dispersés doivent rester parfaitement en suspension. Ceci implique certaines propriétés rhéologiques qui, toutefois, ne doivent pas entraver la remise en circulation ni gêner les manœuvres ou avoir d'influences néfastes au cours de celles-ci (17).

II.1.2.2 Types des fluides (boues) de forage

Plusieurs classifications des types de boue peuvent être adoptées. Il est cependant habituel de présenter les boues en fonction de la phase continue.

II.1.2.2.1 Boues à base d'eau

Ce sont des boues dont la phase continue est l'eau, éventuellement chargée en Nacy. Pendant le forage, des matériaux de formations peuvent être incorporés dans la boue et peuvent ainsi changer sa composition et ses propriétés. Elles sont essentiellement : les boues douces et bentonitiques. Les boues salées dont la teneur en NaCl sont élevées, sont constituées d'eau, de sel (NaCl), de colloïdes minéraux, de colloïdes organiques (amidon), d'un fluidifiant minéral ou organique (chaux, soude) (15) (13).

II.1.2.2.2 Boues à base d'eau et de polymère

Ce type de boue a été récemment introduit. L'argile est remplacée par un «biopolymère» provenant de l'action de bactéries sur des carbohydrates. L'addition à la suspension de chlorure chromique provoque une réticulation des chaînes de polymère. Les caractéristiques du fluide obtenu peuvent être ajustées, pour l'utilisation comme boue de forage, grâce à des matériaux tels que carboxyméthyl cellulose, amidon, lignosulfonate de ferrocrome, bentonite, alourdissant (16).

II.1.2.2.3 Boue à base d'eau et d'argile

Elle est constituée d'eau et d'argile. Le plus souvent, pour la préparation de la boue, on utilise une bentonite dite «activée» avec une proportion importante en bentonite sodique.

Dans certaines conditions particulières, les caractéristiques rhéologiques peuvent être ajustées par l'utilisation d'un réducteur de viscosité, minéral ou organique. Depuis quelques années, le réducteur de filtrat, tel que l'amidon ou un dérivé de la cellulose (le plus souvent, la carboxyméthyl cellulose), dont le rôle est de minimiser la filtration de l'eau de la boue dans les terrains traversés, a été souvent utilisé (16).

II.1.2.2.4 Boues à base d'huile

C'est la plus utilisée mais la plus polluante. L'origine de l'utilisation de l'huile dans les fluides de forage remonte aux premiers forages effectués à Oklahoma City (1934-1937) au cours desquels on a constaté une amélioration des performances de forage après ajout de l'huile brute (18) (13) (15).

La phase de ces fluides est une huile minérale (pétrole brut, gaz oïl, etc.) et la phase dispersée (discontinue) est l'eau. Ils sont appelés boue de forage à émulsion inverse au-dessous desquels on a des boues à huile (19).

II.1.2.3 Compositions des fluides de forage

Les différentes compositions des fluides de forage sont résumées dans le **tableau I.2** :

Tableau I.2: Composition des fluides de forages (20).

Composition des fluides d forage	
Les colloïdes argileux	les bentonites ; les attapulgites
Les colloïdes organiques	l'amidon ; CMC (carboxyle Méthyle cellulose.)
Fluidifiants et défloculants	les polyphosphates de sodium ; les tanins ; les lingosulfonates les lignines ; les tourbes, acides humique et lignites.
Les additifs minéraux	soude caustique(NaOH) ; Le carbone de soude(Na ₂ CO ₃) le bicarbonate de sodium (NaHCO ₃) le gybse (CaSO ₄ hydraté) ; la chaux éteinte (Ca(OH) ₂) le chlorure de sodium (NaCl) ; le chlorure de calcium (CaCl ₂)
Les produits organiques	les anti—ferments ; les anti-mousses ; les agents de décoincement les antifrictions et extrême-pression ; les anti-corrosions les anti-bourrant et accélérateurs de vitesse d'avancement.
Alourdissants	la braytine ou sulfate de baryum (BaSO ₄ , densité : 4,3) carbonate de calcium (CaCO ₃ , densité : 2,7). la galène ou sulfure de plomb (PbS, densité : 7)
Les colmatants	colmatant granulaires ; colmatant fibreux ; colmatant gonflants colmatant lamellaires ; colmatant à prise (liant hydraulique)

❖ Composants indésirables des boues

Les composants indésirables les plus présents dans les fluides de forage sont (15) :

- **Hydrocarbures:** Le fluide de forage se trouve contaminé par l'huile de la formation qui peut être un composant indésirable car il contamine les déblais.
- **Métaux lourds:** Le fluide de forage peut être contaminé par les métaux lourds comme l'arsenic, le baryum, le cadmium, le chrome, le plomb et le mercure.
- **Les sels:** La concentration des sels, comme le chlorure de sodium ou de potassium dans les fluides de forage peut aussi considérablement augmenter.

II.2 Les bourbiers de forage

II.2.1 Définition des bourbiers

Les bourbiers de forage sont des bassins réalisés avec la plateforme qui reçoit l'appareil de forage. Ces bassins vont être plastifiés pour recevoir les eaux usées et les déchets qui sortent des puits de forage surtout lorsqu'il y a utilisation de la boue à l'huile polluante. A la fin du forage, les « cuttings » contaminés sont traités par des procédés spécifiques pour les rendre inertes.



Figure I.3: Bourbier de HMD

II.2.2 Influence des bourbiers sur l'environnement

Les sites pétroliers sont des générateurs de déchets. Les résidus d'hydrocarbures sont des déchets contenant du pétrole ou ses dérivés. Ces déchets engendrent des effets très néfastes sur l'environnement et donc sur la santé des êtres humains.

Les bourbiers « cuttings » sont principalement contaminés par des hydrocarbures gazoil ou pétrole, provenant de la boue à base d'huile et des métaux lourds comme le plomb provenant principalement des additifs de la boue. Ces incidences sur l'environnement peuvent être classées en 3 catégories de pollution (18) (15):

- pollution atmosphérique
- pollution des eaux
- pollution des sols

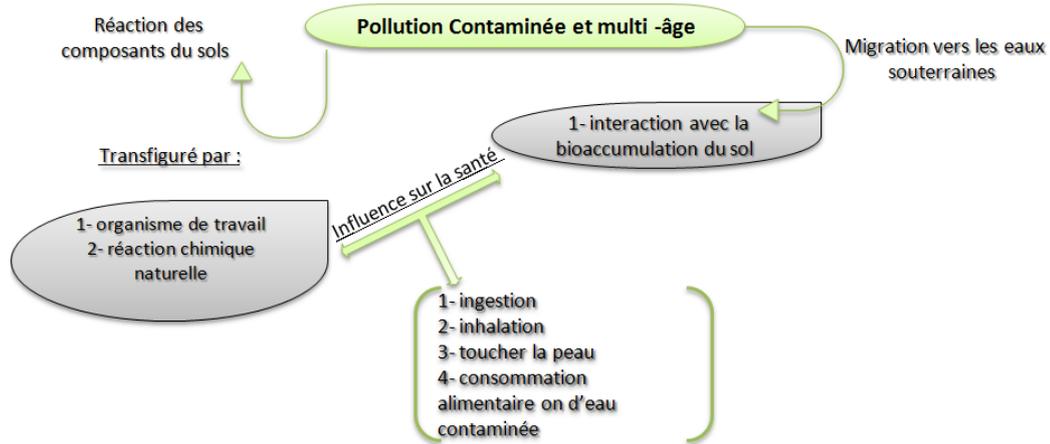


Figure I.4 : Schéma représentatif des impacts des bourbiers sur l'environnement.

II.2.3 Pollution des sols par les métaux lourds

Les sols se trouvent le plus souvent pollués par les métaux lourds qui sont indésirables.

II.2.3.1 Toxicité des métaux lourds

La toxicité des métaux lourds a conduit les pouvoirs publics à réglementer les émissions en fixant des teneurs limites. Cependant, il existe une certaine ambiguïté car une liste de métaux à surveiller varie selon les milieux considérés: émission atmosphérique, rejet dans l'eau ou la mise en décharge. La contamination par les métaux lourds est due essentiellement aux ordures ménagères (piles au cadmium, batteries au plomb, cuivre et zinc des pesticides, ...) qui représente 25% de ces émissions dans la nature. Tout élément est toxique quand il est absorbé en excès par rapport aux capacités d'assimilations de l'organisme (21).

II.2.3.2 Effet des métaux lourds sur l'environnement et sur l'homme

Les métaux lourds sont dangereux pour l'environnement et les systèmes vivants car ils ne sont pas dégradables au cours du temps. Ils ont tendance à s'accumuler dans les organismes vivants et à se concentrer au cours des transferts de matière dans les chaînes trophiques (22). Ce sont des polluants engendrés par l'activité humaine qui ont un fort impact toxicologique et à de très faible concentration. Les métaux toxiques sont nombreux, mais les plus notables sont surtout l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure. Ils ont des impacts sur les végétaux, les produits de consommation courante et sur l'homme (23).

II.2.4 Traitement de bourbiers

Bien que les sols soient contaminés par différents produits, il existe souvent des méthodes techniques et scientifiques pouvant donner des résultats fiables en matière de dépollution. Ces techniques sont applicables à plusieurs niveaux de contamination sur des terres, des sols ou nappes phréatiques en place. Chaque site mérite un traitement spécifique avec pour objectif de rendre le risque identifié acceptable et/ou restaurer une ressource (24).

Plusieurs méthodes ont été employées, parmi les plus utilisées on peut citer :

- Le traitement thermique in-situ et ex-situ (25; 26; 27)
- La méthode de stabilisation/solubilisation (28) utilisée pour le traitement des déchets radioactifs dangereux.

Cependant, le traitement, surtout des hydrocarbures, qui connaît de plus en plus d'intérêt par rapport à différents avantages est le traitement biologique.

❖ Traitement biologique

Dans un environnement favorable, tous les composés organiques sont biodégradables. Le traitement biologique repose sur le principe de la dégradation d'un hydrocarbure brut par des micro-organismes. Ceux-ci sont capables de dégrader certains constituants des pétroles, mais les taux de décomposition dans les écosystèmes naturels sont encore très mal connus. Ces dernières années, la recherche de micro-organismes utilisant des hydrocarbures s'est considérablement amplifiée avec plus ou moins de succès.

Le traitement biologique offre une bonne combinaison entre les aspects économiques et la protection de l'environnement. Ce traitement aide à la réduction du coût global du forage. Il englobe le traitement par les micro-organismes in situ ou ex situ, la phytoremédiation et le traitement en bioréacteur. La phytoremédiation consiste en l'emploi de plantes pour le traitement des sols contaminés par les métaux lourds et les hydrocarbures. Cette technique présente beaucoup d'avantages, à savoir le faible coût de traitement et la faible production de déchets et d'effluents, mais a l'inconvénient du risque de contamination de la chaîne alimentaire en plus de la longue durée du traitement. La bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures reste un moyen très efficace. C'est un procédé destructif qui évite donc le transfert de pollution et se situe parmi les traitements les plus rentables. Il n'est

applicable que pour les composés biodégradables, non inhibiteurs et non toxiques, car certains métabolites peuvent être plus dangereux (pour l'homme et les microorganismes).

II.2.5 Application des microorganismes issus de borbier

Les bactéries issues des borbiers peuvent être impliquées dans différentes applications. Parmi les plus intéressantes, on peut citer :

II.2.5.1 Production des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Beaucoup de travaux ont été réalisés pour leur production à partir des micro-organismes séparés de borbiers dont celui de M. SELMOUN et al. (2016) (29). En effet, le travail consiste à rechercher des bactéries dites «hydrocarbonoclastes», dans un sol ayant subi un grand rejet de fluides de forage pétrolier constitués principalement de pétrole brut et de métaux lourds. Il s'agit de borbiers à base d'huile, situé à l'extrême Sud du Sahara algérienne dans la wilaya de «Ain Salah». Les résultats de cette recherche ont permis d'isoler 17 bactéries, dont 6 différentes par leurs caractères macroscopiques et microscopiques. Trois de ces bactéries ont montré une grande capacité productive de «biosurfactant». Les bactéries «hydrocarbonoclastes» sont des micro-organismes qui se nourrissent typiquement d'hydrocarbures et peuvent être aussi de bonnes productrices de biomolécules appelées «biosurfactants». Ces derniers, présentent un grand nombre d'applications environnementales et industrielles. (29)

II.2.5.2 Bioremédiation

La bioremédiation, appelée aussi biodépollution (dépollution biologique), est un ensemble de techniques consistant à augmenter la biodégradation ou la biotransformation, en inoculant des microorganismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes (biostimulation) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité). Le but est de lutter contre les pollutions (30).

Cette méthode est réalisée à l'aide des micro-organismes généralement ex situ (hors site) dans des installations spécialisées qui sera suivie d'une technique de biodépollution des sols in situ (au niveau du sol contaminé) puis la biodégradation des polluants des terres

mises en andain sur le site. La biodépollution est possible pour deux types de polluants pétroliers (29):

- Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fiouls, kérosène, huiles minérales).
- Les déchets d'exploitation et de transformation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages).

II.2.5.3 Dégradation des hydrocarbures

Les micro-organismes issus de bourbiers ont trouvé aussi des applications dans la dégradation des hydrocarbures. En effet, dans un travail récent (9), par exemple, l'étude bactériologique d'un bourbier de Hassi Messaoud, a permis de sélectionner 4 bactéries parmi les 32 isolées : *Bacillus anthracis*, *Acineto bacterlwoffi*, *Micrococcus varians* et *Pseudomonas liteola* qui sont avérées résistantes à des concentrations allant jusqu'à 40% en gasoil. La culture mixte de ces bactéries choisies pour l'augmentation du bio-traitement présente un pouvoir dégradant de gasoil de 56,32%. L'utilisation du glucose dans le milieu de culture a permis d'amplifier la concentration microbienne et d'améliorer la dégradation du gasoil (9).

II.2.5.4 Production des biopolymères

Parmi les applications les plus récentes et les plus intéressantes des bactéries issues des bourbiers pétroliers sont la préparation des biopolymères. En effet, cet axe de recherche connaît de plus en plus d'intérêt ces dernières années et il n'est qu'à ses début car les applications dans ce domaine sont très rares, nouvelles, et d'un grand intérêt, et le sujet de ce mémoire s'inscrit justement dans cet axe de recherche.

Dans ce contexte, Babu Rajendran Ramaswamy et al. (2012) (31), dans leur travail de recherche, ont trouvé que le PHA, biopolymère bactérien, a été produit par la souche *P.auroginosa* EB4, isolée à partir d'un sol contaminé par l'huile de pétrole, et qu'il était un copolymère poly (3-hydroxybutrate-co-3hydroxyvalérate). En fait, une partie importante de cette étude montre que la souche bactérienne isolée et identifiée a pu produire une quantité significative de ce copolymère (P (3HB-co-3HV)) du milieu commercial. Il a été indiqué que la condition pour l'obtention d'un rendement et d'une productivité plus élevés a été optimisée à l'aide d'études de fermentation. Cette approche peut être adaptée pour des applications industrielles potentielles. Cela ouvre également de nouvelles possibilités pour

diverses applications industrielles grâce aux propriétés supérieures de ce type de copolymère obtenu (31),

III. Les biopolymères bactériens

III.1 Les biopolymères

Les biopolymères ou les plastiques organiques sont, en général, des plastiques dérivé de sources de biomasse renouvelable comme l'huile végétale, l'amidon, la cellulose, les protéines,..., contrairement aux plastiques fossiles qui sont dérivés du pétrole (32). Ils sont considérés comme une alternative à ces derniers pour contrer à divers problèmes : environnementale vu que les polymères conventionnels ne sont pas biodégradables et se retrouve donc dans la nature, économique vu le coût élevé du pétrole sans oublier la source abondante et naturelles vu la raréfaction du pétrole.

Aussi, la transition énergétique pour la croissance verte prévoit dans l'Europe, par exemple, l'interdiction pure et simple de la vaisselle jetable en plastique (gobelets, assiettes, ...), sauf s'ils sont compostables et partiellement ou totalement biosourcés (33). Il apparait donc nécessaire de développer de nouveau matériaux plastiques, généralement désignés par le terme de bioplastiques (biosourcés, biodégradables, compostables). Les bioplastique ou les biopolymères d'origine naturelle, de par leur diversité de structure, et leurs propriétés spécifiques se présentent donc comme une alternative biotechnologique intéressante permettant de répondre à une grande partie des problèmes liés à l'utilisation des produits de synthèse. Ils connaissent depuis quelques années un réel essor. Leurs utilisations en substitution ou même en mélange à d'autres polymères synthétisés à partir d'hydrocarbures offrent donc des applications intéressantes surtout dans notre quotidien (34)

Le terme bioplastique regroupe deux types de polymères distincts :

- Les polymères dits biosourcés : c'est les polymères issus de ressources renouvelables, souvent de la matière végétale, telles que le blé, le maïs ou bien la pomme de terre.
- Les polymères biodégradables : Ils peuvent être issus aussi bien de la pétrochimie que de la biomasse.

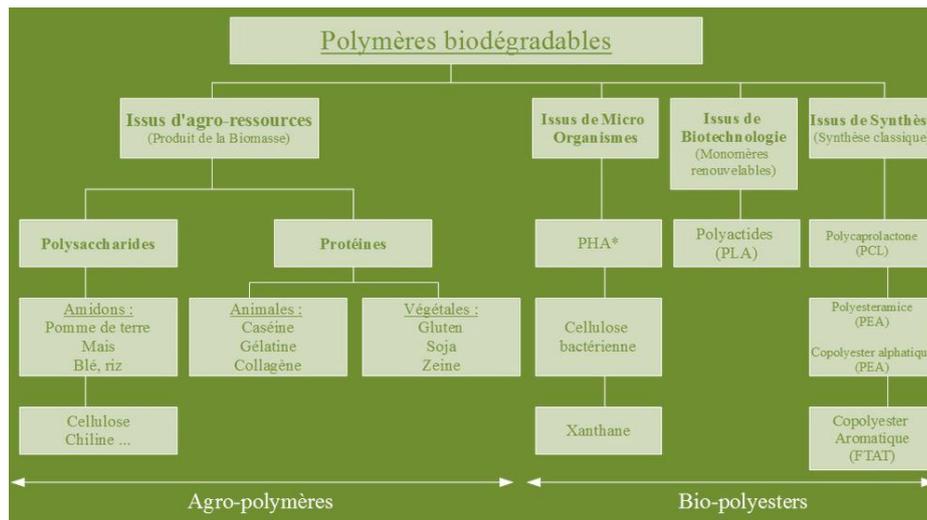


Figure I.5 : Classification des polymères biodégradables selon leur source (35)

En vue d'une utilisation optimale des biopolymères, ceux-ci doivent présenter des propriétés comme le montre le tableau suivant:

Tableau I.3: Propriétés spécifiques des biopolymères et les applications attendues (34)

<i>Biopolymères</i>	<i>Propriétés particulières</i>	<i>Applications ciblées</i>
<i>Polymères à base d'amidon</i>	Antistatiques, anti-condensations, toucher naturel	Emballages et sacs
<i>Polymères à base de cellulose</i>	Transparences, antistatiques	Emballages
<i>Polymères à base de protéine</i>	Comestible, grandes diversités chimiques des acides aminés, perméabilité sélective aux gaz.	Galéniques, emballages alimentaires.
<i>Polymères à base d'huile</i>	Siccativités	Peintures, vernis
<i>Polymères de synthèse à base d'acide lactique</i>	Anti-condensation, brillance, anti bactériens.	Emballages, textiles
<i>Polyesters bactériens (PHA)</i>	Propriétés piézoélectriques, antioxydants, insolubilité dans l'eau.	Médical, matériaux ostéosynthétique, emballage rigide.
<i>Caoutchouc</i>	Elastomère	Vulcanisation

III.2 - Les biopolymères bactériens

III.2.1 Généralités

Les biopolymères bactériens sont des biopolymères obtenus par fermentation bactérienne, donc par voie biologique. Ainsi, ils sont appelés "*biopolymères bactériens*" en référence à la source bactérienne qui synthétise les monomères indispensables à la production de ces polymères

L'étude des polymères d'origine bactérienne n'est pas une discipline récente. Les premières observations décrites des polymères bactériens furent effectuées par le savant néerlandais Antoni Van Leeuwenhoek, précurseur des disciplines qui deviendront la biologie cellulaire et la microbiologie, au XVIIe siècle (2).

III.2.2 Les avantages dans la production des biopolymères bactériens

La production de polymères par fermentation bactérienne permet d'assurer une production intensive et de qualité. De plus, les installations sont réduites. Ces paramètres garantissent une constance dans la production aussi bien concernant le rendement que la qualité (2).

Les bactéries peuvent synthétiser une large gamme de biopolymères : les PHAs bactériens et les EPS (ExoPolySaccharides), en sont un très bon exemple. Ils présentent beaucoup d'avantages et servent divers fonctions. En effet, ils ont des propriétés matérielles adaptées à de nombreuses applications industrielles et surtout médicales (36).

III.2.3 Quelques exemples de biopolymères bactériens

Avec le développement de ce nouveau type de polymères, il y a certains d'entre eux qui ont montré un grand intérêt et même ils ont occupé une grande place dans le marché à travers leurs applications très intéressantes, on peut citer les plus utilisés :

- *Le Plexiglas*

Le plexiglas est en fait un nom commercial du polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Ce plastique est très utilisé dans de nombreux domaines de par sa transparence et sa résistance aux chocs.

C'est en Allemagne qu'a été découverte une enzyme produite naturellement par des bactéries est capable de transformer des sucres ou des alcools, présents abondamment dans la nature, en méthacrylate de méthyle, le monomère du PMMA qui est ensuite facilement polymérisable.

- *Le PHB*

Le PHB ou PolyHydroxy Butyrate est un autre exemple de la synthèse de plastique par des micro-organismes. Il s'agit d'un polymère biodégradable qui, bien que n'étant pas très intéressant dans tous les domaines, peut tout à fait être utilisé pour des bouteilles ou des films plastiques.

Il est produit naturellement pas de nombreux micro-organismes mais en quantité très faible et n'est pas adapté à une industrialisation. Les chercheurs ont donc eu recours à la transgénèse : ils ont isolé les gènes d'une bactérie produisant le PHB et l'ont implanté dans une pomme de terre. Pour le moment il s'agit plus d'un exploit scientifique que d'une véritable alternative car on ne retrouve que 10 microgrammes pour 1 gramme de pomme de terre soit un rapport de $1/10^5$. Cependant, les chercheurs pensent pouvoir améliorer ce rendement et industrialiser ce procédé.

- *Le PHA*

Le PHA ou Polyhydroxy Alcanoate est un bioplastique de la famille des polyesters qui présente des caractéristiques similaires aux plastiques pétroliers de cette même famille. Encore une fois, il est produit naturellement par des bactéries en réponse à un « stress » c'est à dire à une alarme provoquée par un changement du milieu extérieur. Le PHA produit servira au besoin énergétique de la bactérie. Ce biopolymère bactérien sera présenté avec plus de détail dans le chapitre suivant. (37)

Chapitre II :

Les poly (hydroxyalcanoates) (PHA)

Chapitre II : Les poly (hydroxyalcanoates) PHA

I. Description des poly (hydroxyalcanoates) (PHAs)

I.1 Définition des poly (hydroxyalcanoates)

Les poly (hydroxyalcanoates) (PHA) sont des polymères issus de ressources renouvelables, obtenus par fermentation en présence de certaines espèces de bactéries, ils appartiennent donc à la famille des biopolymères bactériens. Ce sont des biopolyesters linéaires biodégradables et biocompatibles (38).

Les PHAs forment une famille de polyesters thermoplastiques fournissant une alternative prometteuse aux polymères issus de la pétrochimie. Lorsque les bactéries sont placées dans des conditions de carence en azote ou en phosphore, les PHAs sont accumulés (jusqu'à 80% du poids sec) sous forme de granules dans le cytoplasme de la bactérie où ils constituent une réserve de carbone et d'énergie. En effet, l'accumulation de granules intracellulaires constitue une réserve carbonée idéale du fait de la faible solubilité de ces PHAs et de leur haut poids moléculaire ; de plus, ils n'exercent qu'une très faible pression osmotique sur les parois cellulaires. La bactérie peut ensuite réutiliser cette réserve de carbone pour son métabolisme grâce à l'action de PHA dépolymérase intracellulaires. Certaines études ont également montré que la synthèse des PHAs facilite la mise en place d'autres mécanismes propres à certains types de bactéries, tels que le mécanisme de survie par sporulation qui est également déclenché durant des périodes de stress (du genre : *Bacillus* et *Azotobacter*) (2).

La nature des PHAs synthétisés dépend de la souche bactérienne productrice et des substrats carbonés disponibles dans son environnement (12). La diversité de leurs structures possibles se traduit par un large éventail de polymères ayant des propriétés mécaniques très différentes (39).

Les PHAs sont produits par plus de 300 espèces bactériennes, les plus efficaces sont : *Cupriavidus necator* (anciennement *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus* et les souches recombinantes d'*Escherichia coli* (11).

I.2 Découverte des PHA

L'intérêt des chercheurs pour la microbiologie et suite aux progrès réalisés en matière de microscopie, le bactériologiste français, Maurice Lemoigne (1883-1967), a centré ses recherches autour d'un micro-organisme, alors largement présent dans les sols, *Bacillus megaterium*. Il indique ainsi qu'en l'absence d'oxygène, cette bactérie Gram positif semble accumuler une substance particulière, sous forme d'inclusions intracellulaires (Lemoigne, 1926, 1927) (40).

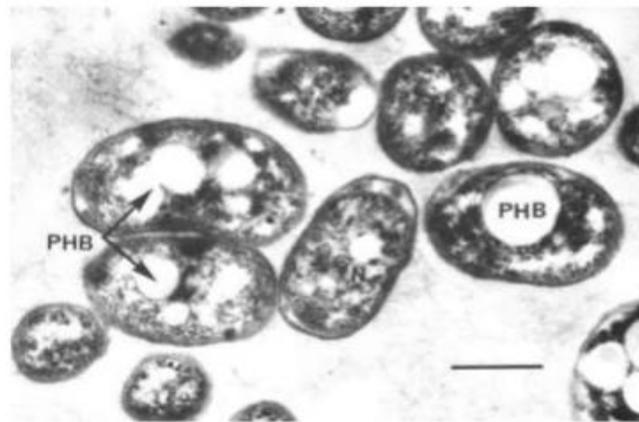


Figure II.1: Image de microscopie électronique de la souche bactérienne *Ferrobacillus ferrooxidans* en phase d'accumulation intracellulaire de P (3HB). Barre d'échelle=500nm (41).

Quarante ans plus tard, des chercheurs (41), ont mis en évidence la capacité de certaines souches à synthétiser un polymère naturel, qu'ils caractérisent de poly (3-hydroxybutyrate) ou P (3HB) (**Figure II.1**). Ceci constitue une réelle avancée à cette époque où le concept de macromolécule n'était pas encore reconnu.

Une trentaine d'années après, les avancées technologiques en matière d'analyses chimiques permettront d'identifier ce polyester cristallin comme premier composé de la famille des Poly(HydroxyAlcanoates) ou PHA. Plus tard, de nombreuses études démontrent que ces poly (hydroxyalcanoates) sont des biopolymères universels, car ils sont synthétisés par des organismes appartenant aux trois domaines du vivant (Eubacteria, Archaeobacteria et Eukaryota).

A ce jour, plus de 150 motifs différents de PHAs sont décrits dans la littérature ; synthétisés par des organismes natifs ou recombinants, faisant des PHAs la famille de biopolymères la plus vaste connue. (11)

I.3 Structure et classification des PHAs

Les PHAs sont des polyesters linéaires produits par des bactéries possédant des chaînes latérales de longueur variable. La nature de cette chaîne latérale dépend de la nature du substrat carboné et de la souche bactérienne. Dans la chaîne principale, les PHAs possèdent un carbone asymétrique de configuration (R), ce sont donc des polymères isotactiques. Cette stéréospécificité qui leur donne aussi un caractère cristallin est due à la stéréospécificité des enzymes responsables de la biosynthèse des PHAs.

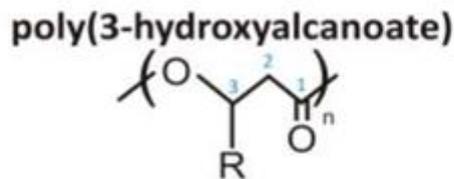


Figure II.2 : Structure générale des poly(3-hydroxyalcanoates) (11).

Selon la longueur de la chaîne latérale, trois types de PHAs peuvent être différenciés:

- Les PHAs à chaînes latérales courtes ou PHAscl (short chain length), possèdent 1 à 2 atomes de carbone dans leur chaîne latérale ($R = CH_3$ à C_2H_5) (38; 42). Ils peuvent être synthétisés par de nombreux micro-organismes, y compris *Alcaligeneslatus* et *Ralstoniaeutropha* (39).
- Les PHAs à chaînes latérales moyennes ou PHAmcl (medium chain length) comportent un groupement R constitué de 3 à 9 atomes de carbone ($R = C_3H_7$ à C_9H_{19}) (42; 38). Ils peuvent être synthétisés par *Pseudomonas oleovorans* et *Pseudomonas putida* (39).
- Les PHAs à chaînes latérales longues ou PHAlcl (long chain length) comportent un groupement R constitué de plus de 10 atomes de carbone (38; 42). Ils peuvent être synthétisés par certains micro-organismes comme *Aeromonashydrophila* et *Thiococcusfennifii* (39).

Tableau II.1: Structure générale et classification de poly (3-hydroxyalcanoate) (10)

<i>Groupe R</i>	<i>Nombre de C</i>	<i>Nom du PHA</i>	<i>Catégorie</i>
Méthyle	4	Poly-(3-hydroxybutyrate)	PHA _{scl}
Ethyle	5	Poly-(3-hydroxyvalerate)	
Propyle	6	Poly-(3-hydroxyhexanoate)	PHA _{mcl}
Butyle	7	Poly-(3-hydroxyheptanoate)	
Pentyle	8	Poly-(3-hydroxyoctanoate)	
Hexyle	9	Poly-(3-hydroxynonanoate)	
Heptyle	10	Poly-(3-hydroxydecanoate)	
Octyle	11	Poly-(3-hydroxyundecanoate)	
Nonyle	12	Poly-(3-hydroxydodecanoate)	
Decyle	13	Poly-(3-hydroxytridecanoate)	
Undecyle	14	Poly-(3-hydroxytetradecanoate)	
Dodecyle	15	Poly-(3-hydroxypentadecanoate)	
Tridecyle	16	Poly-(3-hydroxyhexadecanoate)	

Ces types de PHA, sont différents en termes non seulement de structure mais aussi de propriétés, caractéristiques et obtention.

En effet, les PHAs à chaîne courte (PHA-_{scl}) sont des matériaux thermoplastiques alors que les PHA à longueur moyenne de chaîne (PHA-_{mcl}) sont des élastomères présentant de bonnes propriétés d'élongation qui les rendent adaptés à une plus large gamme d'applications. Alors que les technologies pour produire les PHA-_{scl}, dont le plus étudié est le PHB (polyhydroxybutyrate) sont bien connues, les études sur les PHA-_{mcl} sont plus récentes. En fait, les PHA-_{mcl} ont été produits en culture pure à partir de matériaux à faible coût utilisant des espèces de *Pseudomonas* comme biocatalyseurs. Des études en culture microbienne mixte ont révélé également la possibilité d'obtenir des PHA-_{mcl} par des consortia microbiens. Cette stratégie ne nécessite pas d'opérations coûteuses de stérilisation et utilise la capacité des microorganismes à s'adapter à différents environnements et substrats. L'enrichissement d'organismes producteurs de PHA-_{mcl} et la sélection des conditions opérationnelles au stade de la production, afin de maximiser le flux de carbone vers la synthèse de PHA-_{mcl}, sont essentiels pour obtenir des procédés

efficaces. Les polyesters ainsi fabriqués sur mesure, contenant une gamme stable de PHA-scl et de PHA-mcl, ou de PHA-mcl mélangés à d'autres polymères naturels, sont des alternatives environnementales aux plastiques d'origine pétrochimique et peuvent contribuer au développement de la bioéconomie (42).

Les PHAs peuvent également être classifiés en tant que: homopolymères ou hétéropolymères selon le nombre de types de monomères hydroxycanoate (39).

II. Propriétés des PHA

II.1 Propriétés physico-chimiques

Les PHAs sont solubles dans les solvants chlorés. Plus la taille des chaînes latérales des PHAs augmente, plus leur solubilité des augmente dans d'autres solvants comme le tétrahydrofurane (THF) et l'acétone. Tous les PHAs restent insolubles dans l'eau et sont relativement résistants à la dégradation hydrolytique (38). Ils ont une faible résistance aux acides et aux bases (32).

II.2 Propriétés thermoplastique

Les PHA sont des polymères thermoplastiques et leurs propriétés en général dépendent de leur composition chimique. Ainsi, ils peuvent être ductiles ou plus ou moins élastiques. En effet, il est ainsi possible d'obtenir des PHAs aux comportements allant de celui d'un élastomère à celui d'un thermoplastique hautement cristallin.

II.3 Propriétés thermiques

Les PHA présentent des propriétés thermiques spécifiques en fonction de leur composition monomérique. D'une manière générale, plus le motif carboné est court, plus la fraction cristallisable du polymère est importante. Les températures de fusion et de transition vitreuse des PHAs se trouvent également dépendantes de cette structure chimique. Cependant, ils se caractérisent par une température de fusion élevée (autour de 175°C). Dans le cas de copolymères, la contribution de chaque unité monomérique influe sur les propriétés finales (43).

II.4 Les propriétés mécaniques

Les PHAs présentent une large gamme de propriétés mécaniques qui dépendent fortement de la structure et de la composition de chaque PHA (homo ou copolymères, longueur des acides gras hydroxylés, chaînes latérales). Par conséquent, en contrôlant la composition des monomères, on peut obtenir des plastiques «sur mesure». Le PHB par exemple, présente une faible stabilité thermique et il est fragile aux impacts mécaniques. En effet, Le PHB pur n'a eu qu'une utilisation limitée en raison de sa fragilité intrinsèque (44).

Ces limites peuvent être surmontées par l'augmentation de la proportion d'hydroxyvalérate (HV) dans le polymère. En générale, les PHAs composés de hydroxybutyrate (HB) avec des fractions plus longues en HV, hydroxyhexanoate (HHx), hydroxyoctonoate (HO), etc. sont des plastiques plus flexibles et résistants (Tableau 1). En effet, la résistance à la traction est relativement élevée (30–35 MPa) (42). Concernant les propriétés mécaniques de PHA disponibles commercialement, il en ressort qu'outre des structures monomériques proches, l'utilisation d'additifs minéraux ou chimiques (polyéthylène glycol, alkyl citrates, etc.) permet d'élargir sensiblement la gamme de propriétés mécaniques atteignables (techniques de l'ingénieur).

Tableau II.2 : Propriétés physiques et mécaniques du PHB et ses copolymères.

PHA	Température de fusion (°C)	Température transition vitreuse (°C)	Résistance à la traction (MPa)	Module de Young (GPa)	Allongement à la rupture (%)
P(3HB)	175	10	40	5,50	4,5
P(3HB ₍₇₅₎ 3HV ₍₂₅₎)	137	-6	30	0,70	50
P(3HB ₍₈₄₎ 4HB ₍₁₆₎)	152	-7	26	0,02	444
P(3HB ₍₈₈₎ 3HHx ₍₁₂₎)	127	-1	4,5	0,14	108
P(3HO ₍₇₅₎ 3HHx ₍₂₅₎)	59	-36	9	0,01	380

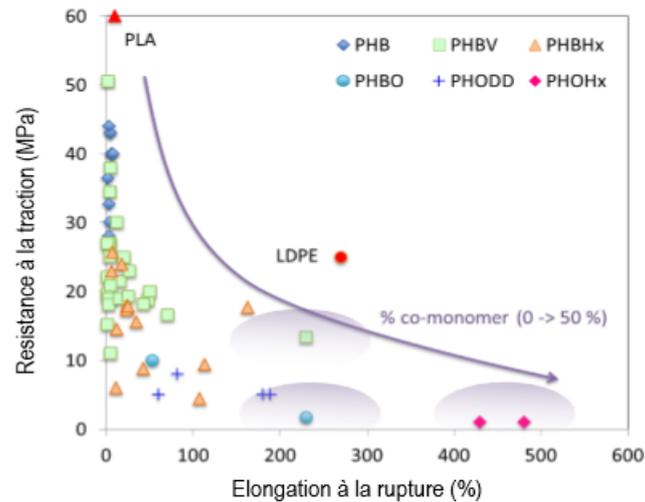


Figure II.3 : Propriétés mécaniques des PHAs (45).

II.5 La biodégradabilité

Elle est parmi les propriétés les plus importantes des PHAs. La biodégradabilité des PHAs est liée au fait que de nombreux microorganismes naturellement présents dans l'environnement sont capables de les dégrader totalement en dioxyde de carbone et en eau (10). Les PHBs, par exemple, peuvent être transformés en CH_4 et CO_2 en condition anaérobie. Les PHAs peuvent être aussi dégradés rapidement en anaérobiose, mais lentement dans les eaux usées ou les eaux de mer (7). En effet, le processus de polymérisation est un processus réversible. Sous l'action d'une PHA dépolymérase, les bactéries sont capables de dégrader le polymère afin de récupérer les métabolites et l'énergie nécessaires à leur survie lorsque les conditions de culture deviennent défavorables. Ce procédé de biodégradation est de deux types, la biodégradation intracellulaire et la biodégradation extracellulaire (10).

II.5.1 Dégradation intracellulaire

En fonction des besoins cellulaires, les PHAs peuvent être remobilisés grâce à l'intervention d'une PHA dépolymérase intracellulaire. Cette enzyme intra-cytoplasmique est située à la surface des granules de PHAs. Le cycle de dégradation combiné au cycle de synthèse du PHB représente le métabolisme complet du PHB. Lors de la dégradation, le PHB est dépolymérisé par la PHB-hydroxybutyrique. Cette dépolymérase en présence d'une hydrolase pour donner l'acide (R) qui est oxydé par la déshydrogénase pour

conduire l'acide acétoacétique qui est ensuite thioestérifié en acétoacétyl-CoA avant d'être dégradé en acétyl-CoA par la β -cétotliase est la seule enzyme à être utilisée à la fois dans la biosynthèse et la dégradation des PHAs. Elle sert de système de régulation pour les deux voies métaboliques. En présence d'oxygène, l'acétyl-CoA issu de la dégradation des PHAs peut entrer dans le cycle de l'acide citrique pour être oxydé en deux molécules de dioxyde de carbone.

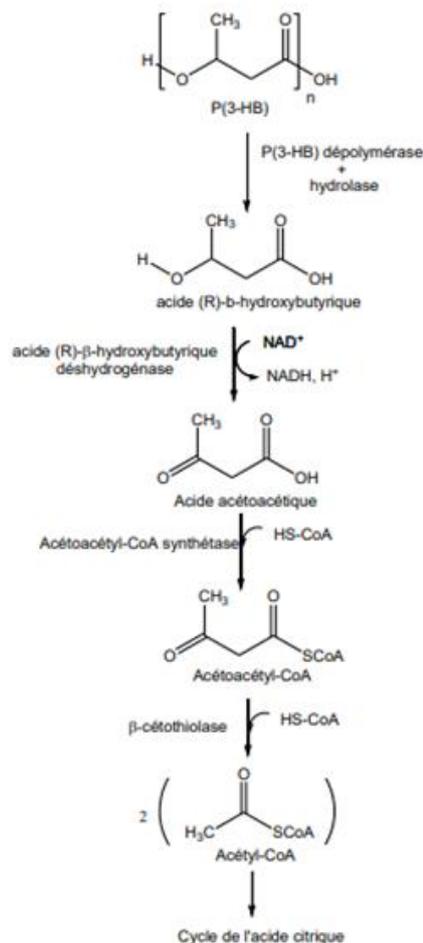


Figure II.4: Dégradation intracellulaire du PHB (38).

II.5.2 Dégradation extracellulaire

Parallèlement à la dégradation intracellulaire, certains microorganismes sécrètent dans l'environnement des PHAs-dépolymérase et hydrolases, capables de dégrader les PHAs en nutriments assimilables par de nombreux micro-organismes. L'une des propriétés très particulières des PHAs est leur biodégradabilité dans différents environnements, aérobies ou anaérobies. En milieu naturel, des micro-organismes tels que des bactéries ou des

champignons sont capables de sécréter des enzymes extracellulaires de dégradation des PHAs leur permettant d'hydrolyser le PHA solide en oligomères ou monomères solubles dans l'eau afin de les utiliser comme nutriments avec production de molécules de base telles que le CO₂, H₂O ou CH₄. La biodégradabilité des PHAs en milieu naturel a été étudiée et il en résulte que de nombreux facteurs affectent cette propriété : des facteurs environnementaux ainsi que les facteurs relatifs aux PHAs étudiés, la présence d'additifs et le type de surface du matériau. Il a été déterminé que la vitesse de biodégradation diminuait lorsque la cristallinité du polymère augmentait (38).

La biodégradation de plastique à base de PHB a été étudiée dans différents types de composts et par différentes techniques de compostage (7). Weng et al. (46), par exemple, dans leur travail sur la biodégradation de différents PHAscl par un procédé de compost intensif aérobie, ont trouvé que la vitesse de dégradation se classe dans l'ordre décroissant suivant : ***P3HB4HB > PHBHV (20%3HV) > PHBHV (3%3HV) > PHB***.

Ces résultats ont été vérifiés dans les différents environnements de biodégradation. Il est à noter que la biodégradation se fait par érosion de la surface vers le cœur, la forme et la surface du matériau sont donc deux paramètres importants. Les masses molaires des polymères évoluent peu au cours de la dégradation, on a donc une dépolymérisation des chaînes de PHAs par les enzymes et non des coupures statistiques (38).

II.6 La biocompatibilité

La biocompatibilité représente une propriété très intéressante en vue d'éventuelles applications surtout dans le domaine médicale. Elle peut être définie comme la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique. Des travaux attestent du caractère biocompatible des PHAs et plus particulièrement celle du PHB. En effet, on considère que l'unité monomérique est l'acide γ -(R)- hydroxybutyrique et que les oligomères des PHBs sont des constituants naturels du plasma humain. Les tests de biocompatibilité, in vivo, consistent à implanter les polymères, souvent sous la peau. A l'interface du biomatériau et des tissus environnants, de nombreuses réactions biologiques peuvent provoquer des réactions non désirées (inflammatoires, mutagènes, carcinogènes) dans les premières minutes de contact. Elles peuvent durer entre plusieurs jours à plusieurs années, ce qui entraîne alors de graves dommages cellulaires.

L'infiltration des tissus environnants par les macrophages, les fibroblastes et la formation d'une capsule fibreuse vascularisée autour de l'implant sont caractéristiques de la réponse tissulaire. L'endommagement que pourrait provoquer l'implant sur les tissus voisins reflète donc la biocompatibilité d'un matériau (38).

II.7 Les propriétés barrières

Les propriétés barrières ont été estimées par l'étude de la sorption à la vapeur d'eau, la perméabilité à l'eau et aux gaz.

Les résultats de la sorption de la vapeur d'eau effectuée dans les différents travaux, mettant en évidence la résistance à l'humidité. Une réduction significative de la perméabilité à l'eau a été mise en évidence avec l'augmentation du degré de cristallinité des biopolyesters.

En termes de perméation gazeuse, un comportement singulier propre aux films PHAs a été révélé montrant un intérêt potentiel pour le packaging ou les applications biomédicales (47).

III. Applications des PHAs

Dû au large éventail des propriétés des PHAs, ils trouvent des applications dans différents domaines et beaucoup d'autres restent à exploiter ou à élargir, mais le domaine qui capte le plus d'intérêt c'est domaine médical.

III.1 Application des PHA dans le domaine médical

Grâce à leurs biodégradabilité et biocompatibilité intrinsèques et ainsi qu'à la grande diversité de leurs structures, les PHAs sont des biopolymères très prometteurs pour des applications dans le domaine médical en tant que biomatériau tels que des patches cardiaques, des valves artificielles, des implants, des sutures des excipients ou dans l'enrobage de composés à libération contrôlée.

Cependant, il est à noter que l'hydrophobicité naturelle des PHAs n'est pas propice à une utilisation en l'état pour les applications médicales, et que des modifications du PHA natif sont souvent réalisées afin de les rendre solubles dans les solvants polaires. Ainsi, afin d'accroître l'hydrophilie et/ou d'améliorer la dégradation hydrolytique des PHAs, de nouvelles fonctions (époxyde, acide carboxylique, groupement hydroxyle) peuvent être

introduites notamment au niveau des doubles liaisons latérales réactives présentes sur certains PHAs. En outre, ces nouveaux groupements fonctionnels peuvent être utilisés pour greffer des molécules bioactives, ou des oligomères très intéressants pour la vectorisation et la libération contrôlée de médicaments (10).

III.2 D'autres applications des PHAs

Grâce aux à leur nombreux propriétés, notamment thermoplastiques, les PHAs trouvent des applications dans des domaines aussi variés que l'emballage, l'élaboration de matériels ménagers, l'agriculture, les textiles, etc. On retrouve aussi des PHAs dans la fabrication d'objets jetables utilisés dans notre quotidien tels que les rasoirs, les récipients de cosmétique, les bouteilles de shampoings, la vaisselle jetable (gobelet, assiettes, couverts). L'une des premières applications des PHAs a eu lieu en avril 1990 par Biopol (ICI, UK) avec l'élaboration de bouteilles de shampoing entièrement biodégradables.

III.3 Les PHAs les plus dominants et leur implication sur le marché

Vu l'importance de leurs applications, le prix relativement élevé de production des PHAs n'est plus un obstacle à leur développement commercial. À l'heure actuelle, quatre types de PHAs sont produits à grand échelle dans le monde : le poly [(R)-3-HB], le copolymère de (R)-3-HB-(R)-3-HV, le copolymère (R)-3-HB-4-HB, et le copolymère (R)-3-HB-(R)-3-HH_x (38).

Pour voir l'implication des PHAs sur le marché, un rapport mondial sur le marché des PHAs a été déposé (48). Il se concentre sur les principaux acteurs mondiaux de l'industrie avec des informations telles que les profils d'entreprise, l'image et les spécifications du produit, les revenus des ventes, le prix, la marge bénéficiaire, la part de marché et entrer en contact avec des données. En outre, les tendances de développement de l'industrie des PHAs et les canaux de vente ont été analysés. De plus, les fusions et acquisitions qui se sont produites au sein du marché au cours des dernières années et leur impact sur le développement du marché ont également été présentées. Le rapport sur le marché des PHAs est segmenté dans les catégories suivantes:

- PHA copolymérisé ; - Les services alimentaires ; - Biomédical ;
- PHA linéaire ; - Les services alimentaires; - Autres ;
- Emballage ; -Agriculture ;

IV. Production des PHAs

Trois modes de synthèse sont actuellement possibles : (1) la synthèse bactérienne, (2) la biosynthèse utilisant des organismes (bactéries et/ou plantes) génétiquement modifiés et (3) la synthèse chimique à partir de lactone (49). Cependant on va s'intéresser aux méthodes qui utilisent des micro-organismes (bactérienne et biosynthèse) et plus particulièrement par fermentation bactérienne.

IV.1 Production des PHAs par fermentation bactériennes

Bien qu'elle ait été le premier mode de synthèse à avoir été découvert, la synthèse bactérienne constitue encore aujourd'hui le mode de synthèse prédominant.

La fermentation, devient encore plus évoluée lorsqu'elle est jumelée aux nouvelles techniques biotechnologiques. Ce procédé consiste à faire appel à des microorganismes pour transformer des substances organiques en l'absence d'oxygène. La fermentation productrice de polyesters bactériens peut conduire, en moins de 40 h, à une solution contenant de l'eau, des sels et des cellules renfermant jusqu'à 90 % de leur poids sec en polymère.

IV.1.1 Méthodes de détection des bactéries productrices de PHA

D'après les recherches effectuées de nombreux microorganismes sont capables de produire des PHAs dans des conditions particulières de déséquilibre énergétique, c'est-à-dire lorsque surviennent simultanément une carence en éléments nécessaires au développement cellulaire et un excès de sources carbonées. Afin de repérer les micro-organismes producteurs, plusieurs méthodes de détection ont été décrites, basées sur la présence effective de PHA au sein des cellules, ou sur la détection des gènes impliqués dans la biosynthèse des PHAs (11).

Ainsi, dans les résultats du travail de Der-Shyan Sheu (2019) cité par Caroline Jain-Beuguel (2018) (11), des techniques de PCR (*Réaction en Chaîne de Polymérase*) de colonie et de PCR semi-imbriquées ont été employées pour le criblage des producteurs de polyhydroxalcanoates (PHA) isolés de l'environnement. Trois amorces dégénérées ont été conçues sur la base de résultats d'alignement de séquences multiples et ont été utilisées comme amorces PCR pour détecter les gènes de synthèse de PHA. Des conditions de PCR de colonie optimisées ont été obtenues en ajoutant 3% de DMSO combiné avec 1 M de

bétaine au mélange de la réaction. Dix-neuf bactéries positives à la PHA ont été utilisées pour évaluer ce protocole PCR ; quinze d'entre eux ont pu être détectés par PCR de colonie, et les quatre autres ont pu être détectés par la détection de PCR semi-imbriquée suivant PCR de colonie. Dans le cadre d'un projet de dépistage préliminaire, 38 souches positives à la PHA ont été isolées d'échantillons environnementaux en appliquant le protocole PCR, et leur phénotype a été confirmé par un test de coloration bleu du Nil A. En combinant les techniques de PCR de colonie et de PCR semi-imbriquées, une méthode de détection rapide, fiable et très précise a été mise au point pour détecter les producteurs de PHA. Ce protocole convient au dépistage d'un grand nombre d'isolats environnementaux. La capacité d'accumulation de PHA des colonies bien séparées, isolées à partir d'échantillons environnementaux peut être directement validée par PCR. Les résultats valident aussi l'application de ce protocole PCR pour la détection rapide des producteurs de PHA de l'environnement (50).

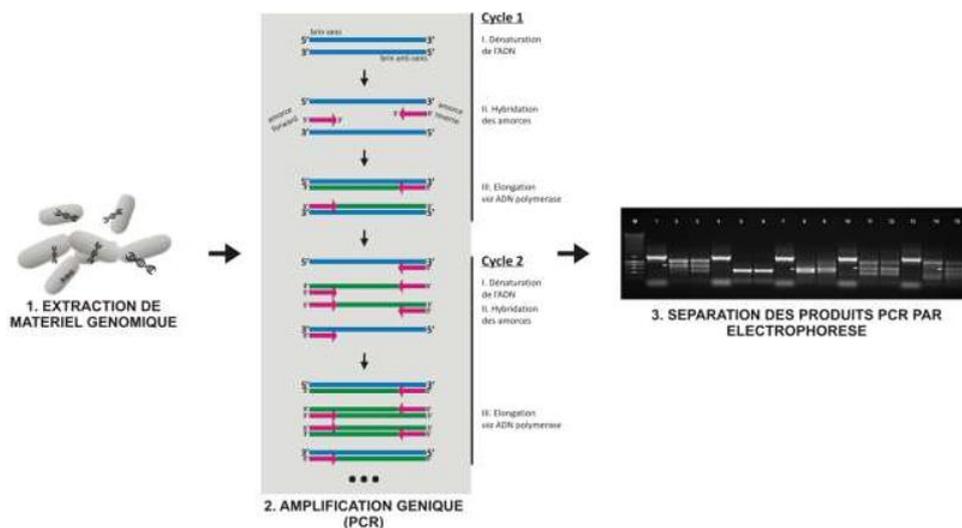


Figure II.5: Récapitulatif des étapes effectuées dans le cadre du criblage moléculaire par PCR (50).

IV.1.2 Processus de production par fermentation bactérienne

Plus de 250 souches bactériennes, des espèces gram-négatives et gram-positives, sous leur forme sauvage ou recombinante, sont capables de stocker des lipides sous forme d'acides polyhydroxalcanoates (PHAs). Le processus de production des PHAs est détaillé dans la *figure II.6*.

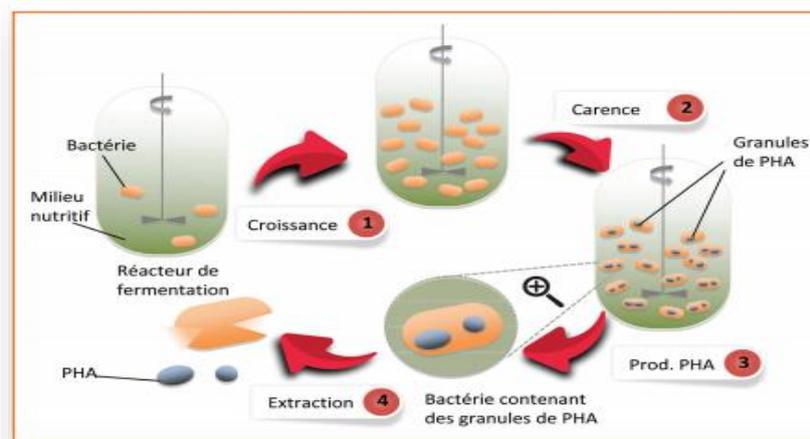


Figure II.6 : Les différentes étapes de la production de PHA bactérien (51).

Aimesther, OJITO bentan court (2008) (52) a rapporté que *L'Escherichia coli* recombinant a été utilisé par des chercheurs pour la production de PHB. Ils ont obtenu des accumulations de PHB dans la biomasse de 80% et 95% respectivement.

Les micro-organismes utilisent une source de carbone (alcane, alcool, saccharose, amidon, etc...) comme substrat. Il a été montré qu'il est possible de produire du PHA à partir de 137 substrats différents.

Plus récemment, des chercheurs ont découvert que *Alcaligeneslatus* pouvait servir à alimenter, comme source unique de carbone, pour la production de polymères. L'intérêt de cette réaction provient de la possibilité d'utiliser la sève directement, presque sans conditionnement.

L'accumulation de PHA dans les cellules est maximale lorsque les bactéries sont cultivées sur des substrats contenant simultanément un excès de carbone et une limitation de l'apport d'autres substances nutritives telles que, l'ammonium, le sulfate, le phosphate, le fer, le magnésium, le potassium ou l'oxygène. En créant ce déséquilibre, les microorganismes cessent de se multiplier pour commencer à produire du PHA. Le rendement de la production ainsi que certaines caractéristiques du polymère final tel que le degré de polymérisation ou encore le pourcentage molaire des unités monomères dépendent des conditions physico-chimiques de la culture (substrat, pH, température, force ionique, oxygénation, rapport C/N ou CIP, agitation). Ainsi, en fournissant à la culture une source

de carbone spécifique (ou un mélange de substrats carbonés) dans des conditions optimales, on peut influencer la structure moléculaire des PHAs et donc leurs propriétés mécaniques.

Pour éviter que les bactéries consomment leurs réserves de PHA, il faut optimiser le temps de fermentation, après lequel, la biomasse est centrifugée, rincée, congelée et lyophilisée. La lyophilisation consiste à congeler la biomasse humide et à sublimer l'eau congelée sous vide. La biomasse déshydratée, refermant le polymère, est analysée afin de déterminer le bilan en PHA (52).

IV.1.3 Condition de culture

Comme on vient de voir, lorsque des bactéries sont dans un milieu favorable, elles utilisent les éléments à leur disposition pour synthétiser les constituants nécessaires à leur métabolisme, leur croissance et leur multiplication. Si un nutriment (élément nécessaire à leur croissance), est limité, certaines bactéries sont capables d'accumuler des PHAs (38).

Tableau II.3 : Production de PHAs sous différentes conditions de culture (39).

PHA	Organisme	Production squalé	Conditions de culture	Biomasse (g.L ⁻¹)	Teneur en PHA (%)
<i>P3HP</i>	Recombinante E.coli	Fed-batch fermentation 2 L	Glycérol brut, Glycérol pur : 300mM, 37°C et 400 tr/min, t=92 h.	5.2	5.2
				12.0	11.8
<i>P3HB,P3HHx, P3HO,P3HD</i>	E. coli recombinante	Shake fl asks	Décanoate Glucose et cultures de décanoate conservées à 37°C et 200 tr/min	2.5-3.0	1.8-9.3
				4.3-5.1	5.9-36.4
<i>P4HB</i>	E.coli recombinante	Bioréacteur 1 L	Glycérol (20 g.L ⁻¹) avec K-4HB (4 g.L ⁻¹), 32°C, pH 7, 800tr/ min, 30% DO ₂ 1 L air/min, t= 48 h. Glucose (20 g.L ⁻¹) avec K-4HB (4 g.L ⁻¹), acide propionique et NZ-amines (1g.L ⁻¹), 32°C, pH 7, 800 tr/min, 30% DO ₂ 1Lair/min, 48 h.	N.S	2.0-61.0
				6.5-6.7	63.0-65.0
<i>P(3HB-co-3HHx)(90-10mol %)</i>	E.coli LS521 8(pBBJPC)	Shake fl asks	Milieu M9 alimenté en glucose (20.g L ⁻¹), 37°C, 200 rpm, t= 48 h.	7.8	14.1
<i>P3HB</i>	E.coli Q1911 (harboring bothpHP302) et pHP513)	Baffled shakefl asks 500 mL	Milieu M9 alimenté en glucose (20 g.L ⁻¹), 37°C, 200 rpm, t= 48 h.	4.9	10.2

<i>P3P(3HB-3HHx - 3HO-3HD-3HDD-3HTD)(21.2,6.1,45.8, 11.0,9.2, 6.8 mol%)HP</i>	E.coli LS5218	Shake fl asks batch300mL	50 mL de milieu supplémenté en glucose (30 g L ⁻¹), 30°C, 250 rpm, pendant 72 h	6.5	12.1
<i>P(3HB-co-3HV) (85–15mol %)</i>	E. coli XL10	Fed-batch (1 ^{er} stage, glucose; 2 ^{ème} stage, Propionate)	Alimentation continue en glucose (20 g L ⁻¹) et acide propionique (2 g L ⁻¹)	39.8	60.5
<i>P(3HB-co-3HHx) (60–40 mol%)</i>	C. necator Re2133/pCB81	Shake fl asks 250mL	Butyrate (0.5 %)	0.6	65

IV.1.4 Procédés d'extraction des PHAs

La méthode d'extraction des PHAs fréquemment utilisée est la lyophilisation de la biomasse cellulaire suivie de l'extraction au chloroforme.

En effet, il a été trouvé que le chloroforme est un bon solvant des PHAs (38). La solvation s'expliquerait d'une part par l'interaction polaire entre le chlore et l'atome de carbone du carbonyle du PHA et d'autre part par la formation d'une liaison hydrogène entre le carbonyle et l'hydrogène déficitaire en électron. Cette structure forme alors un cycle à cinq sommets qui la stabilise.

Les PHAs peuvent donc être extraits des cellules bactériennes lyophilisées par le chloroforme ou le dichlorométhane. Cependant, les lipides sont également co-extraits. Pour les éliminer, le polymère est purifié par précipitations successives dans un solvant adéquat (méthanol ou éthanol). Une méthode récente permet de diminuer les quantités de solvants pour les PHAmcl. Après extraction du PHAmcl de la biomasse par du méthyl tertio-butyl éther, la solution est filtrée plusieurs fois sur du charbon activé avant d'être précipitée une fois dans du méthanol (ou l'éthanol). Cette méthode n'utilise donc pas de solvants chlorés. L'utilisation de l'hypochlorite de sodium constitue une alternative de l'utilisation de solvants organiques. En effet, l'emploi d'une solution aqueuse de 30% d'hypochlorite de sodium pendant 30 à 60 min conduit à la destruction de l'organisation de la membrane bactérienne et ainsi à la libération des granules de polyester. Cependant, un traitement supérieur à 60 min entraîne une dégradation des chaînes du polyester. Les granules de PHB ainsi obtenus, sont précipités au méthanol ou l'éther éthylique afin d'éliminer les lipides.

Dans le cadre du traitement enzymatique, les granules de PHB sont isolés en traitant les cellules bactériennes à l'aide d'enzymes qui détruisent tous les composants cellulaires excepté le PHB.

Le procédé implique le traitement par ultrasons des cellules traitées au lysozyme pour permettre la libération des granules de PHB. Ces derniers sont séparés des débris cellulaires par centrifugation à faible vitesse. Un processus similaire a été employé avec succès pour l'extraction des PHAmcl (38).

IV.2 Biosynthèse des PHAs

La seconde méthode consiste en la biosynthèse utilisant des organismes génétiquement modifiés. Il s'agit d'une méthode faisant de plus en plus l'objet d'attention. Elle pourrait en effet réduire de manière significative les coûts de production. Cette méthode a comme objectif d'augmenter les rendements ou de diversifier les espèces de bactéries capables de produire des PHA (49)

IV.2.1 Implication des enzymes dans la production des PHAs

Dans le monde vivant, chaque réaction chimique est catalysée par sa propre enzyme. Les enzymes présentent une grande spécificité, car elles sont capables de discriminer des molécules de substrat, même légèrement différentes. Elles sont définies comme étant des protéines appelées catalyseurs biologiques en raison de leur capacité à rendre les réactions plus rapides et plus efficaces. Elles se lient à un substrat de manière très spécifique par une région appelée site actif où les acides aminés de l'enzyme auront une spécificité élevée pour un substrat. C'est ainsi que s'induit la formation du complexe enzyme-substrat. L'enzyme favorise, par la suite, une réaction telle qu'une hydrolyse du substrat par l'enzyme, ce qui entraîne la libération du produit. Après la réaction, l'enzyme revient à son état d'origine (53).

Ainsi, dans un travail récent (53), il a été rapporté que la PHA synthase (PHAc) est un type d'enzyme intéressant. En effet, elles sont considérées comme étant des enzymes clés de biosynthèse du PHA qui est un bioplastique biodégradable produit sous des conditions de stress par les bactéries. Les enzymes de type PHAc utilisent la coenzyme A (CoA) et des thioesters d'acides hydroxycarboxyliques (HA) comme substrats et catalysent la polymérisation des HA en PHA avec le relargage d'une CoA (*figure II.7*).

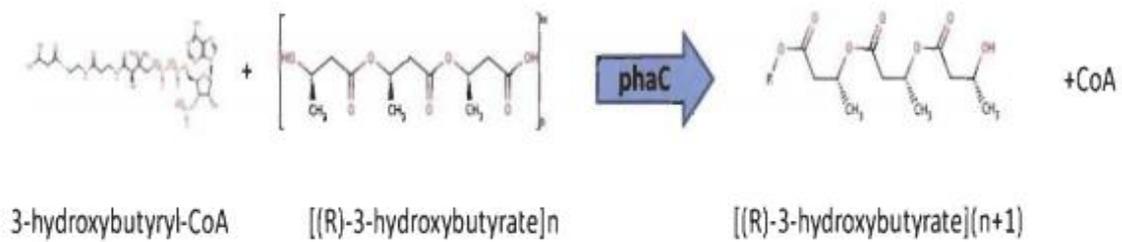


Figure II.7 : Production de PHA par catalyse avec l'enzyme PHAc

En présence de nitrate, *Alcaligeneseutrophus* (parfois appelé *Ralstoniametallidurans*, *figure II.8*) peut se développer en anaérobie. Ils ont synthétisé naturellement le polyhydroxybutyrate (PHB), un type spécifique de polyhydroxalcanoates (PHA), qui est utilisé dans la fabrication de plastiques biodégradables. (54)

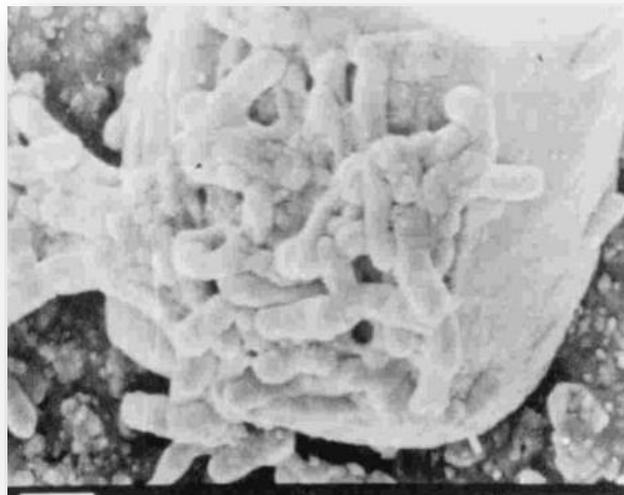


Figure II.8 : *Alcaligeneseutrophus* (54)

Il existe trois enzymes régulatrices impliquées dans la bioproduction du PHB chez *Alcaligeneseutrophus*: la 3-cétothiolase, l'acétoacétyl-CoA réductase et la PHA synthase, codées respectivement par les gènes *phbA*, *phbB* et *phbC*. La génétique moléculaire et la cartographie de ces enzymes ont été réalisées chez *E. coli* en utilisant les souches d'*A. Eutrophus* de H16, 11599, 1159981, PHB 2, PHB3, PHB19.

Sinkey et al. (1989) (54) ont proposé dans leur travail que l'*Alcaligenes eutrophus* possédait au moins deux enzymes P-cétothiolase et acétoacétyl-CoA réductase. Ils ont aussi noté les observations suivantes:

- Dans *E. coli*, l'expression de la *phbC* seule, entraîne une diminution de la synthèse de PHB et un taux insignifiant d'activité de la PHB polymérase.
- La présence des trois gènes d'*A. Eutrophus* (*phbC-phbA-phbB*) dans *E. coli* était nécessaire pour la production de plus de 50% de PHB. Ils ont aussi estimé que cette production est inhibée par la présence d'azote.
- L'interaction de la thiolase et/ou de la réductase avec la polymérase était nécessaire pour que la polymérisation.

IV.2.2 Processus de biosynthèse des PHAs

La biosynthèse des PHAs a été observée en cas de carence en magnésium, sulfate, azote, phosphate et/ou oxygène. Le polymère est essentiellement utilisé comme réserve de carbone et d'énergie. A cet effet, les PHAs sont idéaux. Le type de PHA qui sera produit dépend des PHA synthases, de la source de carbone et de la route métabolique utilisée par les microorganismes (42).

Des bactéries comme l'*Alcaligenes eutrophus*, la *Bacillus megaterium*, la *Pseudomonas oleovorans*, etc., possèdent des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse: la β -cétothiolase, l'acétoacétyl-CoA réductase et la PHA synthase. La biosynthèse du poly3-hydroxybutyrate (PHB) et du poly3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalérate (PHBV), est illustrée dans la **figure II.9** Elle commence avec la condensation de deux molécules, de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) avec l'acétoacétyl-CoA, en présence de l'enzyme 3-cétothiolase (3-ketothiolase). Ceci est suivi de l'action de la réductase de l'acétoacétyl-CoA qui réduit l'acétoacétyl-CoA à R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA. La PHA-synthase polymérise alors le R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA pour former le PHB et/ou le R(-)-3-hydroxyvalerylCoA pour obtenir le copolymère, noté PHBV ou P (3HB-co-3HV) (52)

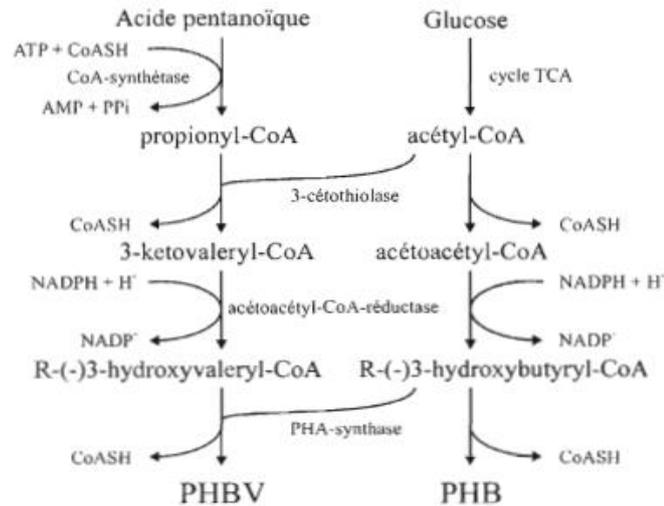


Figure II.9 : Biosynthèse du PHB et du PHBV dans l'*Alcaligenes eutrophus*. (52)

La majorité des PHAs se compose de R(-)-3-hydroxyalcanoate. Dans le cas des énantiomères, la réactivité chimique ou biochimique de l'un des isomères par rapport à certains agents, notamment les enzymes, peut différer radicalement. Les synthétases de PHA de l'*Alcaligenes eutrophus* et des *Pseudomonas oleovorans* peuvent seulement polymériser des 3-hydroxyalcanoates et ceci, dans une gamme de nombres de carbone de 3 à 14. Divers substrats, D(-)- et L(+)-3-hydroxyacyl CoA, avec des chaînes entre 4 et 10 carbones ont été étudiés. La PHB-synthase extraite d'*Alcaligenes eutrophus* n'est active qu'avec le D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA et le D(-)-3-hydroxyvaleryl-CoA, mais présente une activité nulle avec le L(+)-3-hydroxyacyl-CoA. L'*Alcaligenes* et l'*Escherichia coli* recombinant possèdent un très haut potentiel pour accumuler le PHB. Ces micro-organismes, durant leurs processus cellulaires, transforment les glucides (le glucose, le fructose, le saccharose, ...) ou les acides gras en homopolymère PHB. Comme indiqué sur la **figure II.9**, si l'acide pentanoïque est aussi présent, le sous-produit qui en découle est le copolymère. En employant de l'acide pentanoïque en tant que source unique de carbone, la proportion du 3HV dans le PHA produit par l'*A. eutrophus* est de 90%. La substitution de l'*A. Eutrophus* par le *Chromo bacterium violaceum*, sur le même substrat, donne un PHA avec 100% d'unités de 3HV (52).

Il a été observé que dans des milieux riches en saccharose, seules quelques bactéries sont connues pour synthétiser les PHAs constitués de monomères autres que le 3HB. La nature des PHAs synthétisés dépend donc de la souche qui la synthétise et des substrats carbonés

disponibles dans le milieu de culture (*tableau II.4* et *II.5*). Aussi, le taux de synthèse, le niveau d'accumulation et le rendement de PHA varient considérablement d'une souche à l'autre, et selon le substrat sous les mêmes conditions de fermentation et pour une même souche. Mais en étudiant la biosynthèse du PHB dans l'*A. Eutrophus*, il a été montré que la teneur de PHB est indépendante du niveau de PHB-synthase (52).

Tableau II.4 : Composition des poly (3- hydroxyalcanoate) accumulés dans des bactéries.
Le nombre de carbone (C) change selon le substrat utilisé

Souche	Nombre de carbones dans les unités monomériques de 3- hydroxyalcanoate									
	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	x	x	x							
<i>Alcaligenes faecalis</i>		x	x							
<i>Bacillus megaterium</i>		x	x		x	x				
<i>Pseudomonas cepacia</i>		x	x							
<i>Pseudomonas oleovorans</i>		x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tableau II.5 : Production de poly (3- hydroxyalcanoate) dans deux souches d'*Alcaligeneseutrophus* (ATCC 17699 et NCIB 11599) en fonction du substrat.

Souche	Source de carbone	PHA dans la biomasse (%w/w)	Composition (% mol)	
			3HB	3HV
ATCC	glucose	21	100	0
	fructose	45	100	0
	CH ₃ COOH	35	100	0
	CH ₃ CH ₂ COOH	31	69	31
	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	51	25	75
NCIB	glucose	92	100	0
	fructose	48	100	0
	CH ₃ COOH	42	100	0
	CH ₃ CH ₂ COOH	37	64	36
	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	45	10	90

En général, les valeurs des masses moléculaires moyennes (Mn) des PHAs sont comprises entre 2.10^{+5} et 3.10^{+6} daltons. Le *tableau 1.6* montre que ce poids moléculaire dépend également de l'hôte bactérien et du substrat carbonique. Les dimensions des granules varient selon le micro-organisme.

Les concentrations données (%w/w et % mol), ont été obtenues en plaçant deux souches distinctes de la bactérie *Alcaligeneseutrophus* dans les mêmes conditions de fermentation: 48 heures à 30°C et pH=7, en absence d'azote (N₂), avec 20 g/L de source de carbone (52).

Tableau II.6 : Composition et poids moléculaire des PHAs produits par différentes bactéries. (52)

Souche	Source de carbone	Composition du polyester (mol %)			Mn
		3HB	3HV	4HB	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	fructose	100	0	0	737 000
	acide butyrique	100	0	0	432 000
	acide pentanoïque	21	79	0	254 000
	γ -butyrolactone	83	0	17	369 000
<i>Escherichia coli</i> *	glucose	100 [§]	0	0	1 210 000 [§]
	glucose	100 [§]	0	0	1 540 000 [§]
<i>Bacillus megaterium</i>	glucose	100	0	0	166 000
<i>Zoogloea ramigera</i>	glucose	100	0	0	542 000

Mn: Poids moléculaire déterminé par la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

V. Cycle de vie des PHA

Le cycle de vie des PHAs peut être considéré comme vertueux, sous réserve que certaines étapes soient optimisées en termes d'impact environnemental (*figure II.10*). Dans cette approche le principe est simple : tout déchet devient nourriture et réintègre le procédé de production. Il s'agit tout simplement d'une version moderne du célèbre précepte d'Antoine Lavoisier appliqué à des polymères biosourcés et biodégradables : "*Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme, et ceci à l'infini*" (55)

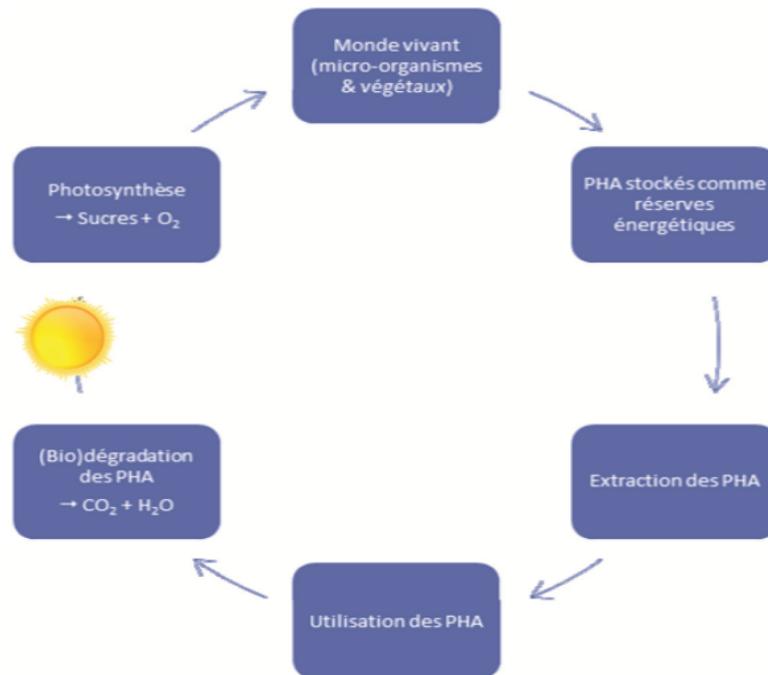


Figure II.10 : Schéma représentatif du cycle de vie des PHAs (55).

Enfin, pour appréhender au mieux l'analyse du cycle de vie des PHAs, de leur conception jusqu'à leur fin de vie, il convient de s'interroger sur les différentes possibilités de fin de vie envisagées (recyclage, biodégradation ou méthanisation). Pour ce qui est de l'aspect recyclage, les PHAs sont sensibles à la dégradation thermomécanique et doivent absolument être stabilisés.

L'étude de la durabilité et de la biodégradabilité des PHAs dans l'eau et en milieu marin a été entreprise dans différentes conditions par S. Bruzard et al. (2018) (56). La caractérisation multi-échelle des différents échantillons vieillissants a conduit à une meilleure connaissance des phénomènes de dégradation mis en jeu. Les phénomènes de dégradation liés à l'hydrolyse chimique des chaînes de PHA et à l'hydrolyse enzymatique ont été découplés et l'identification de ces mécanismes a montré que la part prise par chacun de ces phénomènes dépendait de la température de vieillissement ainsi que de la proportion de bactéries présentes dans le milieu (12).

VI. Méthodes d'analyse des PHAs

Il est possible de déterminer la quantité de biopolymère accumulé dans un micro-organisme par deux moyens :

- Par l'analyse directe de la biomasse contenant le polymère.
- Par l'analyse du PHA préalablement extrait de la biomasse.

Le PHA est un biopolymère, les différentes méthodes d'analyse utilisés pour sa caractérisation sont donc communes aux autres polymères.

Cependant, en raison de leur taille moléculaire, les biopolymères ne peuvent pas être directement quantifiés par des techniques simples comme la chromatographie en phase liquide (CPL) ou la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Ils doivent être dépolymérisés (hydrolysés), pour être analysés par la CPL. Pour utiliser la CPG, chaque groupement chimique polaire doit être dérivatisé pour rendre la molécule volatile.

Pour les autres caractérisations, on peut citer les plus essentielles :

- **Caractérisation de la structure** : Des techniques telles que la spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et les nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem (MALDIIMS) qui ne nécessitent pas une étape de dépolymérisation mais le polymère doit être extrait de la biomasse avant l'analyse (52).
- **Détermination de la masse moléculaire** : La masse molaire des PHAs comme les polymères en général peut être déterminée par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC). Le polymère est dissout dans du CHCl_3 à 10 g/L ou dans du LiNO_3 (0,5 M) aqueux, en fonction des capacités de solubilisation considérées (11)
- **Caractérisations des propriétés thermiques** : L'analyse thermique des PHAs peut être menée par deux techniques.
- **L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)** : La calorimétrie différentielle à balayage ou DSC pour la détermination des températures de fusion, la température de transition vitreuse et la température et le taux de cristallisation. Ainsi, 10 mg de l'échantillon peuvent être analysés sous azote, en suivant un

protocole comptant deux phases de chauffage jusqu'à 200°C à une vitesse 10°C/min séparées par une phase de refroidissement à -60°C.

- *L'analyse par l'analyse thermogravimétrique (TGA)* : Elle est généralement utilisée pour la détermination de la température et taux de dégradation (11).

Partie pratique

Chapitre III :

Matériels et Méthodes

Chapitre III : Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de l'environnement et de géochimie et de gisement qui se trouvent au sein du *Centre de Recherche et Développement SONATRACH de BOUMERDES (C.R.D)*.

Cette étude a pour but, la caractérisation physico-chimique et microbiologique d'un échantillon d'un mélange des bourbiers contaminés par les hydrocarbures. En effet après les opérations d'extraction du pétrole, un volume important de ces rejets est déversé dans des zones prédestinées appelés bourbiers, ce qui engendre un problème de pollution pour ces régions. D'un autre côté, ces déchets, comme rapporté dans la partie bibliographiques, sont riches en micro-organismes, qu'on voulait, à travers cette étude, valoriser pour une application dans l'élaboration de biopolymères bactériens.

Nous commençons l'étude par :

- Une caractérisation physico-chimique sur un échantillon de bourbier solide brut (l'humidité, teneur en matière sèche et la perte au feu etc.)
- Une caractérisation physico-chimique sur son lixiviat : Dosage des indicateurs de pollution (Nitrate, Nitrite, Phosphore, matière en suspension, Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours, Demande Chimique en Oxygène matière en suspension) et le dosage de l'indice des hydrocarbures
- Etude biologique de l'échantillon (dénombrement, ensemencement, isolement... etc.).

Cependant, le but majeur de notre présent travail étant l'application des micro-organismes séparés de ces bourbiers pour une application dans l'élaboration des PHAs, un biopolymère bactérien. Chose qu'on n'a pas pu finalisée suite au confinement mondial dû à la pandémie du covid-19 qui a touché le monde durant toute cette période. Ainsi ci-dessous sera étalée uniquement la partie pratique réalisée qui s'arrête à l'étape de la séparation des bactéries.

I. Matériels

I.1 Matériels non biologiques

L'appareillage, la verrerie, les solutions et réactifs ainsi que les milieux de cultures utilisés sont représentés dans l'annexe (*tableau*).

I.2 Matériels biologiques

I.2.1 Le borbier

Nous avons utilisés un échantillon de sol de plus de 30 borbiers qui ont été prélevé le 30/01/2020 au niveau des puits des champs de Hassi Messaoud. L'échantillon est mis dans un sac en plastique propre et conservé dans les mêmes conditions. Sachant aussi que, comme on l'a déjà vu, le borbier, en tant que collecteur des produits liquides et solides issus du forage, représente une source dangereuse de pollution (18).



Figure III.1 : Echantillon utilisé au cours de nos expériences : échantillon de sol du borbier (mélange de différents borbiers)

1.2.1.1 Situation géographique de HMD

La commune de Hassi Messaoud est située à 100 km au sud-est de chef-lieu de la wilaya d’Ouargla, et à 830 Km au sud –est d’Alger et elle couvre une superficie globale de 71237 Km²



Figure III.2 : Situation géographique de HMD

1.2.1.2 Données climatiques

Les précipitations varient de 8 mm entre le mois le plus sec et le plus humide. Il y a une différence de 23,8 °C entre la température la plus basse (mois de janvier (T moy. =10,5°C) et la plus élevée sur toute l'année (mois d’Août (T moy. = 34.3°C) (57).

Tableau III.1 : Données climatique HMD

Mois	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai.	Jui.	Juil.	Aoû.	Sep.	Oct.	Nov.	Déc.
Température moy. (°C)	10.5	13.1	16.8	21.4	26.9	32.5	34.1	34.3	29.4	22.7	15.9	10.8
Température min.moy. (°C)	3.8	6.1	9.5	13.6	19.3	24.5	25.4	25.8	21.7	15.4	9	4.4
Température max. (°C)	17.2	20.1	24.1	29.2	34.6	40.5	42.9	42.8	37.2	30.1	22.8	17.3
Précipitations (mm)	5	3	8	4	2	1	0	0	2	4	5	6

II. Méthodes

II.1 Echantillonnage de Bourbier

Nous avons utilisé dans notre étude un mélange des échantillons de chaque station des bourbiers. Le mélange a ensuite subi des analyses physico-chimiques et microbiologiques.

II.1.1 Mode opératoire de l'échantillonnage

La méthode utilisée est l'échantillonnage à faible profondeur qui s'effectue à moins de 1 mètre de profondeur. Les échantillons ont été prélevés à partir de bourbiers à 50 cm de profondeur, en utilisant un récipient en matière inerte, propre et suffisamment grand. Il s'agit d'abord de prélever des sous-échantillons de 5 points différents, selon la même méthode d'échantillonnage, de bien mélanger pour n'en former qu'un seul (*figure III.3*). Par la suite, l'échantillon composé est transféré dans une bouteille de conservation à l'abri de la lumière à 4°C. La bouteille est bouchée par le coton, afin d'assurer une bonne respiration des microorganismes.

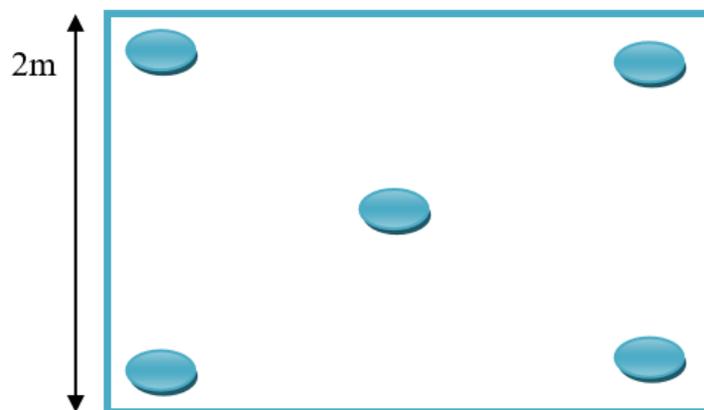


Figure III.3 : Schéma représentatif des points de prélèvement à partir des bourbiers.

II.1.2 Conditions d'échantillonnage

- **Prévention à la contamination**

Le matériel utilisé lors de chaque étape de l'échantillonnage doit être non contaminant vis-à-vis de la substance à analyser. Ainsi, le matériel de prélèvement sera en acier inoxydable

ou en autre matériau n'ayant aucune influence sur les analyses chimique prévues.

Le temps d'exposition à l'air est réduit au maximum afin d'éviter l'oxydation de certains composés de l'échantillon.

- **Conditions de stockage, conservation et transport**

Les échantillons sont conservés à une température inférieure à 10 °C (4 °C en générale) et à l'obscurité jusqu'à l'analyse. Il convient de prendre toutes les précautions afin de s'assurer qu'ils ne subissent aucune modification entre l'instant de prélèvement et celui de l'analyse (aucun agent de conservation ne doit être ajouté).

II.2 Analyse physico-chimique

D'après la norme française (XP X31-210) (*Annexe I Tableau A.1*), l'échantillon est mis en solution par des essais de lixiviation. En effet, les méthodes d'analyses nécessitant des échantillons liquides, préparés selon la norme (Normes NFX 31 160).Ceci a pour but de quantifier la mobilité des espèces chimiques polluante ou non, présentes dans les matrices solides. La préparation de l'échantillon de lixiviat est détaillée dans l'annexe.

II.2.1 Dosages des hydrocarbures

II.2.1.1 Teneur en matière sèche et teneur en eau

Dans un premier temps, on a mesuré un seul paramètre des déblais de forage. Ce dernier permet d'estimer la composition et le degré de pollution des borbiers étudiés. Le paramètre analysé ainsi que la méthode ou la norme d'analyse utilisée sont reportés dans le *tableau III.3* suivant :

Tableau III.3: Les différentes méthodes d'analyses sur le borbier sec.

Paramètres	Méthodes / Normes	Annexes
Teneur en matière sèche et teneur en eau	NF EN 12880	<i>Annexe III.1</i>

II.2.2 Dosage des indicateurs de pollution organique

II.2.2.1 Mesure du pH

Méthode	Norme	Technique
Electrométrie	NF T 90 008	pH-mètre

❖ Le principe

La différence de potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence (calomel–KCL saturé) plongeant dans une même solution est une fonction linéaire du pH de cette solution.

La détermination du pH consiste en la mesure d'une différence de potentiel, elle s'effectue à l'aide d'un dispositif potentiométrique.

❖ Appareillage

- Electrode en verre : à l'intérieur se trouve l'électrode de référence formant le relai (calomel-KCL), la partie utile de l'électrode est formée par une ampoule sphérique de 1 cm de diamètre ;
- Dispositif potentiométrique : pH-mètre, alimenté en courant continu constant ;
- Pipete de précision de 50 ml de volume ;
- Agitateur magnétique.

❖ Mode opératoire

D'abord, l'électrode du pH-mètre est abondamment rincée avec de l'eau distillée. On prélève à l'aide d'une pipette une prise d'essai de 50 ml et l'introduire dans un bécher propre qui est placé sous agitation magnétique. On introduit ensuite l'électrode dans la solution à analyser préalablement prélevée. Le potentiomètre est mis en marche et la valeur du pH est affichée après stabilisation.



Figure III.4 : PH-mètre

II.2.2.2 Détermination de la demande chimique en oxygène DCO

La méthode et l'appareillage utilisé sont reportés dans le tableau suivant :

Méthode/Norme	Analyseur
HACH /ISO 5667-3	Spectrophotomètre LANGE DR 1900

❖ Principe

Le test de la DCO consiste en la mesure de l'oxygène équivalent la quantité de matières organique oxydables par le bichromate de potassium K_2CrO_7 . Dans une solution d'acide sulfurique à 50 %, un composé à base d'Argent est ajouté comme catalyseur. Un composé mercurique est ajouté pour réduire les interférences dues à l'oxydation des ions chlorures par le bichromate. L'oxydation s'effectue à une température de 150°C pendant 2 h, la lecture se fait par colorimétrie.

Pour la gamme de DCO de 0 à 1500 mg/L (420 nm), la méthode consiste en la mesure de la concentration en chrome hexavalent restante qui est caractérisée par une coloration

jaune. Pour la gamme de 0 à 15000 mg/L (605 nm), la coloration obtenue est orange ou verte, et correspond à la quantité de chrome trivalent produite.

❖ Réactifs appareillages

• Réactifs

- Tubes DCO (0 à 1500 mg/L) pour les faibles concentrations ;
- Tubes DCO (0 à 15 000 mg/L) pour les fortes concentrations ;
- Eau déminéralisée.

• Appareillages

- Micropipette de 2 ml ;
- Adaptateur de tube DCO sur DR 1900 ;
- Portoir pour tube DCO ;
- Réacteur à 150 °C (DCO 120/240 V) ;
- Spectrophotomètre HACH type DR /1900.

❖ Mode opératoire

On commence par agiter pendant 2 minutes l'eau à analyser pour l'homogénéiser. On allume le réacteur à DCO et on préchauffe à 150°C. On prélève 2ml d'eau à analyser et on les introduit dans le tube qui sera fermé ensuite hermétiquement. On place le tube dans le réacteur puis, de la même manière, on prépare un blanc en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée. Les tubes sont chauffés pendant 2 h. On éteint le réacteur, on attend environ 20 minutes le refroidissement des tubes à 120°C puis on retourne chaque tube plusieurs fois pendant qu'il est encore chaud. Après refroidissement des tubes, on passe à la lecture.

II.2.2.3 Evaluation de Demande Biologique en Oxygène pendant 5 jours

La méthode et l'appareillage utilisés sont reportés dans le tableau suivant :

Méthode	Norme
Manométrique	HACH / DIN 38409T52

❖ Principe

En fonction de la valeur de la DCO mesurée et de la valeur de DBO suspectée, il est introduit une quantité continue d'eau dans un flacon de mesure qui est relié au système

manométrique. L'oxygène qui est absorbé par les micro-organismes pour dégrader la matière organique, est remplacé par l'air au-dessus de l'échantillon dans le flacon. Le CO₂ produit est absorbé par la soude. La différence de pression est directement affichée à l'échelle manométrique en mg/L de DBO.

❖ Réactifs et appareillage

• Réactifs

- Pastilles de soude caustique.

• Appareillage

- Flacons d'échantillons bruns en verre de 500 ml de capacité ;
- Barreau magnétique d'agitation ;
- Armoire thermostatée à 20°C ;
- Flacon avec pastille de soude ;
- Dispositif d'agitation.

❖ Mode opératoire

La valeur de la prise d'essai est déterminée en fonction des résultats attendus et en fonction de la valeur de DCO. (La valeur de DCO est multipliée par un coefficient de 0.75)

Marge de DBO	Volume d'eau en ml	Coefficient de conversion
0-40	432	1
0-80	365	2
0-200	250	5
0-400	164	10
0-800	97	20
0-2000	43.5	50
0-4000	22.7	100

La prise d'essai est d'abord mesurée avant d'être introduite dans un flacon brun avec un barreau aimanté. Un support en caoutchouc qui contiendra une à deux pastilles de NaOH est placé dans le col de bouteille. On ferme et on enclenche l'agitateur pendant 1 heure pour équilibrer la température. Fermer les bouchons de flacon. La lecture des valeurs

indiquées sur l'échelle est effectuée quotidiennement. Elle est multipliée par le coefficient de conversion. Le résultat correspond à la consommation d'oxygène en mg/L.



Figure III.5 : Dispositif d'agitation pendant cinq jours

II.2.2.4 Détermination du Carbone organique total

L'analyse a été effectuée en utilisant la méthode et les conditions reportés ci-sous : suivant :

Méthode	Norme	Conditions ambiantes à respecter	Analyseur
A l'aide des réactifs LCK380 et LCK381	ISO 8245	PH entre 4 et 10	Spectrophotomètre de marque LANGE DR 1900

❖ principe

Le carbone total (TC) et le carbone inorganique total (TIC) sont convertis au dioxyde de carbone (CO₂) par oxydation et acidification. Le CO₂ passe de la cuve de digestion à travers une membrane vers la cuvette indicatrice. Le changement de couleur de l'indicateur est évalué par photométrie, le carbone organique total COT est déterminé par la différence entre les valeurs de TC et TIC.

❖ Appareillage et réactifs

- Un thermostat de marque LANGE HT 200 S ;
- Micropipettes ;
- Spectrophotomètre ;
- Réactifs LCK 380 pour les faibles gammes (02-65mg /L) ;
- Réactifs LCK 381 pour les forte gammes (60-735mg /L) ;
- Cuvette TC, cuvette TIC, indicateur colore.

❖ Mode opératoire**a) Détermination de TC**

Le réactif poudre de digestion est transféré dans la cuvette TC Avec un doseur puis à l'aide d'une micropipette, on injecte 2 ml (pour la faible gamme) ou (0.2 mL pour la forte gamme) de l'échantillon dans la cuvette TC qui est ensuite fermée avec un capuchon d'origine et qui est parfois inversée. On ferme et on visse la cuvette indicatrice, préparée sur la cuvette, très étroitement avec la membrane double-cap.

b) Détermination TIC

A l'aide d'une micropipette, on injecte 2 ml (pour la faible gamme) ou 1mL (pour la forte gamme) de l'échantillon dans la cuvette qui est ensuite fermée avec capuchon d'origine puis inversé de temps en temps. On ferme et on visse la cuvette indicatrice, préparée sur la cuvette TIC, très étroitement avec la membrane double-cap.

c) Etapes de la lecture et expression des résultats

Les deux combinaisons de cuvettes TC et TIC ont été chauffées simultanément dans le thermostat préchauffé pendant deux heures à 100 °C. On laisser refroidir à température ambiante. La combinaison de cuvette TC est invertie, soigneusement l'extérieur de la cuvette indicatrice est soigneusement nettoyé. Elle est enfin insérée dans le photomètre et mesurée à la longueur d'onde 435 nm.

Le résultat est exprimé par la formule : **COT = TC-TIC**



Figure III.6 : Les réactifs LCK 380/381



Figure III.7: Thermostat



Figure III.8: Spectrophotomètre

II.2.2.5 Détermination des matières en suspension

La méthode utilisée est reportée sur le tableau suivant :

Méthode	Norme
Filtration	NF T 90 105

❖ Principe

L'eau est filtrée et le poids des matières retenues est déterminé par la différence de pesée.

❖ **Appareillages**

- Dispositif de filtration sous pression ;
- Disque filtrant en fibre de verre type AP 20.

❖ **Mode opératoire**

On verse la prise d'essai sur le filtre préalablement pesé et on met le dispositif de filtration sous pression en marche. On fait sécher ensuite le filtre contenant le filtré à l'étuve (105°C) pendant 30min avant sa pesée.

❖ **Expression des résultats**

Le taux de matières en suspension exprimé en mg/L est donné par la formule :

$$\text{MES} = \frac{m2 - m1}{PE} \times 10^6$$

Avec :

m1 : la masse de filtre vide (en g) ;

m2 : la masse de filtre plein (en g) ;

PE : le volume de la prise d'essai d'eau a analysé (en ml).

II.2.2.6 Dosage de nitrate

La méthode utilisée est reportée sur le tableau suivant :

Méthode/Norme	Conditions opératoire
HACH Réactifs LCK 340 Gamme : 5–35 mg/L	-Le pH de l'échantillon d'eau : entre 3–10. -La température de l'échantillon d'eau et de réactifs doit être entre 20–24 °C

❖ **Mode opératoire**

On commence par prélever soigneusement 0.2 ml d'échantillon et 1.0 ml de la solution A qu'on met dans la cuve qui est retournée plusieurs fois jusqu'à ce que le mélange soit complet. Après 15 minutes, la cuve est bien nettoyée à l'extérieur puis mesurée. Elle est enfin insérée dans le compartiment pour cuves.

II.2.2.7 Dosage de nitrite

La méthode utilisée est reportée sur le tableau suivant :

Méthode/Norme	Conditions opératoire
HACH Réactifs LCK 342 Gamme : 0.6–6.0 mg/L	-Le pH de l'échantillon d'eau entre 3–10. -La température de l'échantillon d'eau et de réactifs entre 15–25 °C

❖ Mode opératoire

On prélève soigneusement 0.2 ml d'échantillon, après avoir dévissé le capuchon, qu'on met dans la cuve. On secoue énergiquement jusqu'à ce que le lyophilisat se soit complètement dissous. Après 10 minutes, on retourne de nouveau la cuve, dont l'extérieur sera bien nettoyé et mesuré. On l'insère enfin dans le compartiment pour cuves DR 1900.

II.2.2.8 Dosage de phosphore

Méthode/Norme	Conditions opératoire
HACH Réactifs LCK 350 Gamme : 2.0–20.0 mg/L	-Le pH de l'échantillon d'eau entre 2–10. -La température de l'échantillon d'eau et de réactifs doit être entre 15–25 °C

❖ Mode opératoire

On prélève soigneusement 0.4 ml de l'échantillon qu'on chauffe après dans le thermostat. HT 200 S: 15 minutes avec le programme standard HT. Le thermostat est : pour 60 minutes à 100° C (212° F) ou pour 30 minutes à 120 °C (248 °F). On laisse refroidir à température ambiante. On prélève dans la cuve une fois refroidie: 0.5 mL de réactif B puis on revisse le capuchon sur la cuve qu'on retourne plusieurs fois jusqu'à ce que le lyophilisat se soit complètement dissous. Après 10 minutes, la cuve est retournée, son extérieur nettoyé puis mesuré et enfin insérée dans le compartiment pour cuves. DR 1900.

II.2.3 Dosage des minéraux**II.2.3.1 Dosage des métaux lourds**

La méthode et l'appareillage utilisés sont reportés sur le tableau suivant :

Méthode/ Norme	Analyseur
ISO 172-94-1	Spectrométrie de masse associée à un plasma d'argon a couplage inductif (ICP-MS)

❖ Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique instrumentale d'analyse reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs d'un échantillon fonction de leur masse. Elle est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et d'un spectromètre de masse qui sépare ces ions selon leur masse.

L'analyse des échantillons par ICP-MS peut être divisée en quatre étapes, représentées sur la *figure III.9* :

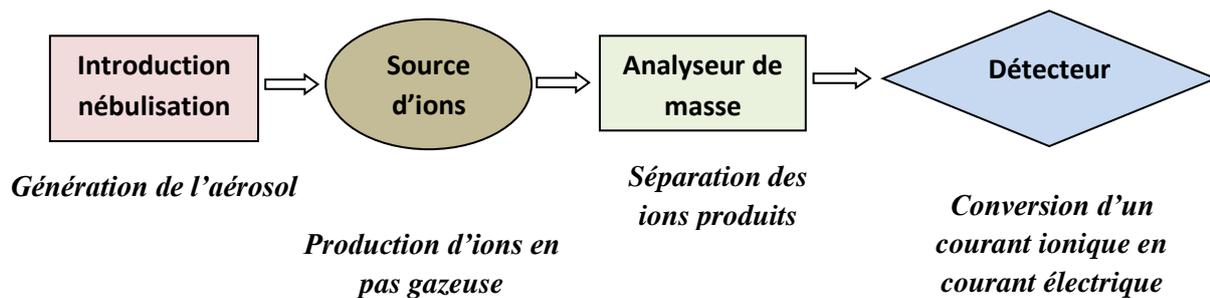


Figure III.9 : Les étapes d'analyse par ICP-MS.

❖ L'appareil ICP-MS

L'appareil utilisé dans ce travail est la marque Agilent technologie (Agilent série 7700x). Cet appareil est équipé d'une pompe péristaltique, d'un nébuliseur concentrique type Meinhardt, et d'une chambre de nébulisation type scott, ainsi que d'une torche en quartz. La puissance est fournie par un générateur de haute fréquence de 27 MHZ. L'alimentation en gaz est réalisée à partir d'argon et d'hélium en bouteilles à 99,999% minimum de pureté. L'ensemble du système piloté par le logiciel MassHunter.

II.2.3.2 Dosage du mercure total

Le dosage du mercure total a été réalisé par la méthode de l'absorption atomique selon la norme (ISO 12846), de marque Mercury vapor Monitor VM-3000, à une température entre 20-25°C.

❖ Absorption atomique à vapeur froide sans flamme (SAA)

C'est une méthode d'analyse spécifique qui permet d'analyser les éléments à l'état fondamental (atome de Hg) par absorption de la lumière UV à $\lambda=253.7$ nm qui est la raie de résonance de Hg.

❖ Equipements et réactifs requis

• Matériaux requis

- Des fioles jaugées de 100 ml ;
- Eprouvette de 50mL, 100 mL
- Micropipette ;
- Bécher de 50 ml et 100 ml ;
- Un flacon laveur ;
- Analyseur de mercure ;

• Réactifs

- Eau distillé ;
- Bromure de Potassium / Bromate de potassium KBrO_3 et KBr (B/B) (50/50) ;
- Solution de chlorure d'hydroxylamine ;
- Acide chlorhydrique HCl ;
- Chlorure stanneux $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

❖ Méthode d'échantillonnage

Un volume approprié d'échantillons a été introduit dans une fiole de 100 ml ; puis, à l'aide d'une micropipette un volume de 10 ml de Solution (B/B) a été ajouté. On introduit 1 ml d'acide sulfurique et le tout est bien agité. Si la couleur ne persiste pas, on ajoute le réactif

(B/B) jusqu'à persistance de la couleur jaune et on laisse reposer pendant 15 minutes. On ajoute 10 ml de la solution de chlorure d'hydroxyle ammonium et on laisse la solution refroidir à Température ambiante. L'excès d'oxydant (B/B) est réduit en ajoutant la solution de chlorhydrate d'hydroxylamine jusqu'à la décoloration, ensuite puis on complète avec l'eau distillé jusqu'à 100 ml. Une quantité de cette solution est transvasée dans une fiole réactionnelle. On ajoute 1 ml de chlorure de stanneux puis on procède à l'analyse.

- **Principe et fonctionnement de la méthode**

1^{er} étape : L'échantillon est digéré en présence d'un mélange d'acide nitrique et sulfurique, de permanganate de potassium et de persulfate de potassium (ces deux réactifs assurent une oxydation complète de composé organique) ; c'est-à-dire de décomposer la matière organique et rendre le mercure sous la forme Hg^{2+} .

2^{ème} étape : Les ions mercuriques Hg^{2+} sont réduits en mercure élémentaire par une solution de chlorure de stanneux (SnCl_2). Le mercure élémentaire est ainsi amené sous forme gazeuse dans la cellule de barbotage d'air.

- **Principe de fonctionnement de l'analyseur**

Une pompe intégrée dans l'équipement aspire l'air sec pour faire barboter l'échantillon dans un tube contenant un doigt fritté. Le mercure élémentaire (Hg°) se libère dans le gaz aspiré par l'équipement, puis amalgame sur une plaque d'or par une pompe à membrane. Un chauffage se produit pour libérer le mercure (Hg°) qui est acheminé vers une cellule d'optique en silice fondue. Un faisceau de lumière dans le domaine d'UV est ensuite envoyé par une lampe à décharge électrique EDL qui passe à travers la cellule optique. Une partie de la lumière UV est absorbée par les atomes Hg présents dans l'échantillon. La détermination quantitative du mercure est alors obtenue en mesurant cette absorbance après une comparaison par rapport à une courbe d'étalonnage d'une gamme large (0-5 $\mu\text{g/L}$). La détection se produit après une manipulation du signal résultat par photomultiplicateur.

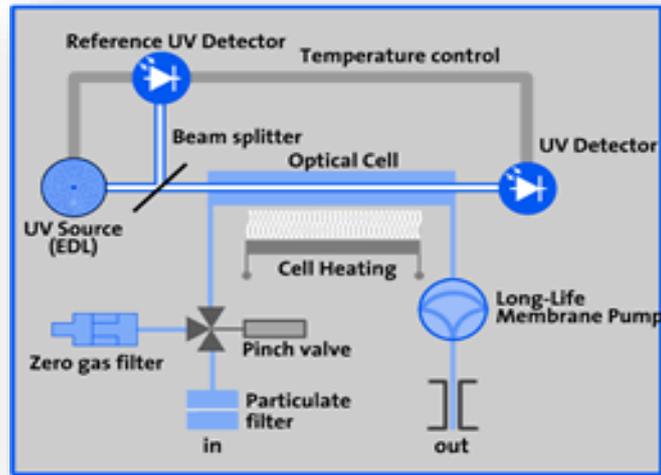


Figure III.10 : Schéma représentatifs du principe de fonctionnement de l'analyseur de Hg.

- **Réglage d'instrument**

- Mise en marche l'appareil / stabilisation.
- Réglage le débit de gaz vecteur 30ml/min.
- Effectuer des essais de contamination et de blanc.
- Introduire un flacon réactionnel 10 ml d'eau distillée.
- Ajouter quelque goutte de bromate de potassium
- Neutraliser avec l'hydroxylamine.
- Ajouter de chlorure d'étain. Procéder le dosage.



Figure III.10: Analyseur de laboratoire (mercure vapor)

II.3 Analyses microbiologiques du sol

II.3.1 Matériels

Pour la dilution des échantillons, nous avons besoin d'eau physiologique stérile, tubes stériles, une micropipette, un vortex et une balance.

Pour l'ensemencement et la purification, nous utilisons des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive ordinaire (GN).

II.3.2 Dilution décimale

Afin de dénombrer la microflore bactérienne existant dans l'échantillon, la solution mère du sol est préparée (10g de sol dans 90mL de bouillon nutritif) suivie d'une série de dilutions décimales allant de 10^{-1} (*solution mère*) à 10^{-8} en conditions d'asepsie sous une hotte à flux laminaire de type « KOTTERMANN ».



Figure III.11 : Dilution décimale sous la hotte.

II.3.3 Isolement des bactéries

On prélève 0,1 ml de chaque dilution préparée qu'on ensemence par étalement sur les boîtes de Pétri contenant de la GN à l'aide d'un râteau. L'incubation des boîtes se fait à 30°C pendant 24h.

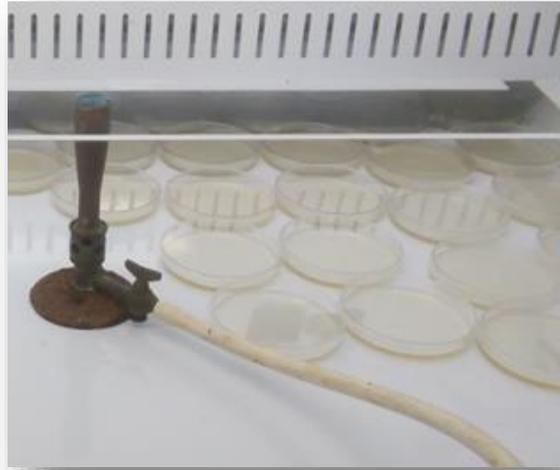


Figure III.12: L'ensemencement sur les boîtes pétries de la GN

II.3.4 Dénombrement des bactéries

Le dénombrement après culture concerne, évidemment les cellules viables de l'échantillon. Autrement dit, les cellules capables de croître. Il est basé sur l'aptitude de chaque bactérie, fixée par la solidification du milieu gélosé, à former une colonie visible à l'œil nu (Austin, 1988). Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies en UFC (Unité Formant Colonie).

Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne Arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule de (Marchal et Bourdon ,1982) (29)

$$N = n / d \cdot v$$

Où :

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

N: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé (0.1ml).

D: Dilution).

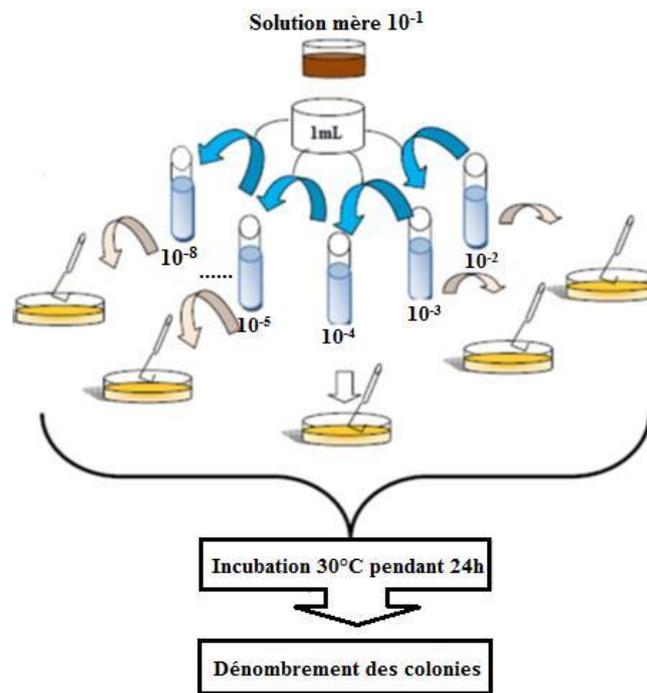


Figure III.13: Schéma des étapes de l'analyse bactériologique.

II.3.5 Purification des isolats

La méthode citée par SELMOUN Meriem, BENKHEBCHECHE Djamel Eddine (29) de Delarras et al. (2007). Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir de différentes colonies isolées. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs et alternés en milieu liquide, puis en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur.

II.3.6 Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées

Une observation microscopique après coloration de Gram et des spores ainsi que quelques tests biochimiques préliminaires (oxydase et catalase), sont réalisés dans l'objectif de caractériser les isolats et les classer au sein de groupes, pour faciliter la suite d'étude.

II.3.7 Etude des caractères morphologiques

II.3.7.1 Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. D'après Joffin et al. (2006) (58), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies est : circulaire, irrégulières, filamenteuse, punctiforme.
- La couleur : jaune, crème, rouge, incolore.
- L'élévation: convexe, bossue, élevée, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- Le bord : régulier, ondulé, dentelé, filamenteux.
- L'aspect : lisse, rugueuse, muqueuse.

II.3.7.2 Aspect microscopique

Une observation sous microscope des bactéries à l'état frais permet de voir leur mobilité. La forme et le mode de regroupement seront déterminés par une coloration au bleu de méthylène. Une coloration de Gram est faite pour classer les bactéries et confirmer leur pureté en plus d'une coloration au vert de Malachite pour voir la présence des spores de résistance.

Chapitre IV :

Résultats et Discussions

Chapitre IV : Résultats et discussions

L'échantillon du borbier a été prélevé et analysé pour un diagnostic physico-chimique détaillé qui permet de vérifier si le sol choisi constitue un environnement favorable à la croissance des microorganismes.

I. Caractérisations physico-chimiques

I.1 Les analyses de dosage des hydrocarbures

I.1.1 Teneur en matière sèche et en eau

Le *tableau IV.1* représente les caractéristiques physico-chimiques des déblais de forage utilisés pour la solidification ainsi que les principaux paramètres déterminés par les différentes techniques d'analyses.

Tableau IV.1: Résultats des analyses physico-chimiques du borbier.

Analyses	Résultats (%)	Température (°C)
<i>Teneur en eau</i>	9.303	105
	3.408	532
<i>Teneur en matière sèche</i>	90.69	
<i>Teneur en huile</i>	7.868	532

La variation dans la teneur en eau nous a donné 2 résultats différents car l'analyse a été réalisée en utilisant 2 méthodes à différentes températures (9,303% à 105°C) et (3,408% à 532°C). Cependant, on trouve que cette différence entre les deux valeurs est logique car lorsque la température augmente, l'eau se vaporise plus.

Nous a notés à travers les résultats dans le tableau du haut le pourcentage de teneur en matière sèche, (90.69%)

D'après les résultats obtenus, on peut noter aussi que le pourcentage d'huile dépasse la norme conventionnelle en Algérie où la variation des teneurs des huiles ne doit pas dépasser 5% sur la teneur brut alors qu'on a trouvé un pourcentage de (7.868%). Ceci indique que le degré de pollution de notre échantillon de borbier à base d'huile est un peu élevé.

I.2 Dosage des minéraux

I.2.1 Dosage de mercure total

Le résultat du dosage de mercure total est donné dans le tableau suivant :

Tableau IV.3 : Résultats des concentrations de mercure.

Élément	Concentration ($\mu\text{g/Kg}$)
<i>Mercure (Hg)</i>	0.20

L'expression de la quantité du mercure est exprimée en $\mu\text{g/l}$. D'après le résultat obtenu, on remarque que sa concentration dans le borbier est inférieure à la norme (*Annexe I Tableau A.2*). Ainsi, on peut déduire que ces borbiers étudiés ne présentent pas une pollution par le mercure

I.2.2 Dosage des métaux lourds

Les résultats de dosage des métaux lourds sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau IV.5 : Résultats de dosage des métaux lourds.

<i>Eléments</i>	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
<i>Quantité ($\mu\text{g/l}$)</i>	0.6	3.26	16.94	2.40	3.78	16.58	5.20	8.45	0.35	0.05	4.63
<i>Eléments</i>	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
<i>Quantité (mg/kg)</i>	<0.01	0.03	0.17	0.02	0.04	0.37	0.05	0.08	<0.01	<0.01	0.01

D'après les résultats obtenus, on peut noter que les teneurs en métaux lourds des borbiers sont inférieures à celle requises par la réglementation algérienne (*Annexes II, tableau A.4*). On peut ainsi dire que les borbiers ne présentent pas une source de pollution par les métaux lourds.

I.3 Dosage d'indicateurs de pollution organique

I.3.1 Mesure de pH des borbiers

Les résultats des valeurs de pH obtenus sont reportés sur le tableau suivant :

Tableau IV.2 : Résultats des valeurs de pH.

PH	Température ($^{\circ}\text{C}$)
10.05	19.8

D'après les résultats obtenus, on remarque d'abord que le pH du borbier est basique. Cette basicité est due en fait à la soude et des additifs ajoutés aux boues de forage. Le pH doit être généralement maintenu entre 9.5 et 10.5 afin d'éviter la corrosion (18).

I.3.2 Evaluation de la biodégradabilité de la matière organique présente

Les résultats de la biodégradabilité des deux borbiers sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau IV.6 : Résultats de la de la biodégradabilité de la matière organique

Paramètre	Quantité (mg/L)
<i>DCO</i>	599
<i>DBO5</i>	21.1

La demande biochimique en oxygène pendant cinq jours (DBO₅), est l'un des paramètres de la qualité d'une eau. Elle mesure la quantité de matière organique biodégradable contenue dans une eau. Cette matière organique biodégradable est évaluée par l'intermédiaire de l'oxygène consommé par les micro-organismes impliqués dans les mécanismes d'épuration naturelle.

D'après les résultats des concentrations des DCO et DBO₅ obtenus, on peut noter que la DBO n'est pas vraiment supérieure aux valeurs limites normalisées (*Annexe II, tableau A.3*), contrairement aux DCO qui indiquent une pollution dans les sites de prélèvement de nos échantillons.

D'un autre côté, le rapport DBO₅/DCO donne un indice sur la provenance et l'origine de la pollution organique. Un rapport supérieur à 0,6 admet que le sol étudié suggère qu'il existe une flore indigène capable d'oxyder la matière organique polluante.

I.3.3 Dosage des paramètres de la pollution organique

Les résultats de dosage des indicateurs de pollution organique (matière en suspension, nitrate, nitrite et phosphore) sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau V.2.1 : Résultats de la concentration des indicateurs de pollution

Analyses	Résultats
<i>Nitrite</i>	0.321mg /L
<i>Nitrate</i>	4.22mg/L
<i>Sulfate</i>	1085mg/L
<i>Calcium</i>	73.46mg/L
<i>Chlorure</i>	723.3228mg/L
<i>Phosphore</i>	2.35mg/L
<i>(MES) matière en suspension</i>	228.2mg/L

D'après les résultats obtenus, que les borbiers contiennent une concentration importante de matières en suspensions, considérés comme indicateurs de pollution organique et inorganique, ainsi qu'une certaine concentration en électrolytes tels que les nitrites, les nitrates et phosphore. De ce fait, Il est bien clair que les résultats de ces paramètres indiquent un fort degré de pollution dans le borbier, en aval du déversement des fluides de forage.

I.3.4 Dosage de carbone organique total

Les résultats de dosage de carbone organique total sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau IV.4 : Résultats des concentrations en Carbone Organique Total des échantillons.

Elément	Concentration (mg/kg)
<i>COT</i>	185.7

D'après le résultat obtenu, on remarque que la teneur en carbone organique total (COT) n'est pas élevée par rapport aux normes (*Annexe II tableau A.2*). La présence de cette fraction organique en abondance, confirme l'importance de la contamination.

II. Caractérisations microbiologiques du sol

Les analyses microbiologiques ont été interrompues par la pandémie du Covid-19. Ainsi, on n'a pas pu continuer notre stage au CRD. Les résultats de cette partie sont illustrés dans des photos qui ne permettent pas une discussions constituante.

II.1 Dénombrement des bactéries

Le résultat du dénombrement sur gélose nutritive obtenus pour les différentes dilutions a permis d'avoir une idée sur la charge bactérienne du site pollué ainsi que de sa diversité (*figure IV.1*).



Figure IV.1 : La formation des colonies visibles à l'œil

II.2 Etude des caractères morphologiques

II.2.1 Aspect macro et microscopique

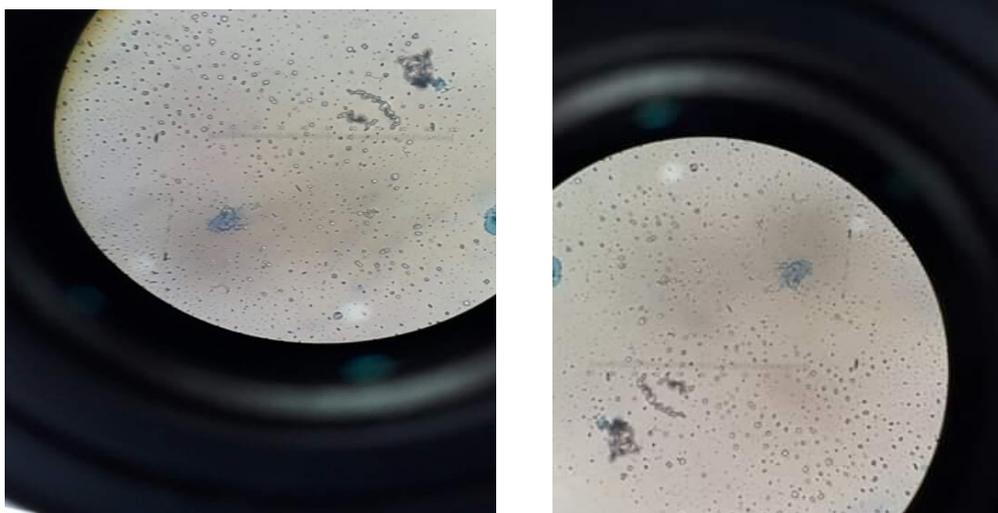


Figure IV.2 : Photos des bactéries sous le microscope

Conclusion Générale

D'après le travail étalé ci-dessous, qui se base beaucoup plus sur la synthèse bibliographique vu les problèmes rencontrés pour la réalisation de la partie pratique, nous pouvons conclure que nous avons mis la main sur plusieurs points essentiels de la recherche.

En effet, d'un côté nous avons montré la grande importance qui gagne le domaine de la biotechnologie ces dernières années. L'utilisation des micro-organismes présente différents avantages par rapport à l'environnement et par rapport au coût.

D'un autre côté, on a pu réaliser que les micro-organismes, particulièrement les bactéries, peuvent être valorisés et séparés à partir de différents ressources qui représentent des milieux pollués, comme les borbiers de forage pétrolier, qui représente un réel problème environnemental et qui constitue l'un des centres de notre intérêt.

On a vu aussi l'importance des biopolymères bactériens et les avantages qu'ils présentent et dans sa préparation via les sa source biologique intéressante et prometteuse et par rapport à leurs éventuelles applications. Les PHAs, en particulier, représente les biopolymères bactériens les plus prometteurs et on a pu voir à partir de ce manuscrit, la richesse de biopolymère bactériens et qui n'est qu'à ces début et qui promet beaucoup. En effet, il possède des propriétés très intéressantes qui lui procure des possibilités d'applications ciblées dans domaines très variés et sensibles comme le domaine médical. Ainsi, à travers la bibliographie réalisée, on a essayé d'apporter des connaissances nécessaires à travers même des travaux déjà réalisés dans ce domaine.

Enfin, on peut constater à travers les résultats obtenus de notre première partie biologique, elle-même non finalisée, qu'on a pu séparer une souche bactérienne et les résultats obtenus sont similaires à ceux des travaux utilisant les micro-organismes issus des mêmes sources mais pour une application différente, dans la dépollution. D'un autre côté, les différentes analyses étaient riches en expérience par rapport aux techniques utilisées et par les informations tirées comme ceux de la caractérisation des échantillons des borbiers.

Conclusion Générale

Ainsi, on peut dire que le travail réalisé, même si non finalisé, reste très riche en informations visant des domaines de recherches d'actualité et qui promet des recherches complémentaires en perspective.

En effet, reste à appliquer les bactéries qu'on a commencé à séparer pour la préparation éventuelle de PHAs et une caractérisation totale pour voir la réussite et son étendue d'une telle valorisation des déchets pétroliers dans l'élaboration des biopolymères.

ANNEXES

I- Tests de lixiviation

Le test de lixiviation du déchet est considéré actuellement comme un outil indispensable pour la prédiction du comportement à long terme des déchets stockés et/ou valorisés. Il permet de caractériser des déchets granulaires ou des blocs de déchets stabilisés/solidifiés et d'identifier les paramètres essentiels contrôlant le relargage. Certains tests sont employés pour simuler le comportement à la lixiviation de matériaux en conditions réelles d'utilisation. De nombreux tests existent et leurs principes se ressemblent. Préparations des échantillons.

La lixiviation est réalisée sur un échantillon représentatif pris de onze points différents de chaque plateau selon le schéma suivant :

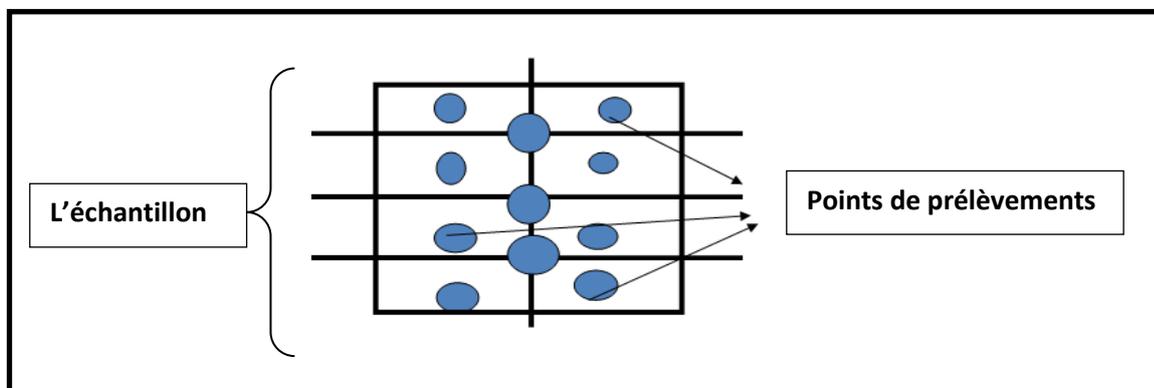


Figure A.1 : Schéma représentatif des points de prélèvement.

➤ Réactifs et appareillages utilisés

- Balance ayant une précision d'au moins de 0,1 g.
- Eau déminéralisée $5 < \text{pH} < 7.5$ et conductivité $\leq 5 \mu\text{S/cm}$.
- Flacon cylindrique en polyéthylène d'un volume minimal de 2 L avec un système de bouchage hermétique en matériau inerte.
- Diapositive d'agitation (60 cycle par minute) (HEIDOLPHReax 20).
- Membranes de filtration de $0.45 \mu\text{m}$ pour la filtration.
- Dispositif de filtration sous vide ou sous pression.

➤ Mode opératoire de lixiviation

Le test de lixiviation a été réalisé à une température ambiante (20 ± 5) °C. On commence par déterminer la masse exacte de l'échantillon à 0.1 g près. Un volume V (en litre) d'eau

Annexes

déminéralisé a été ensuite introduit de façon à ce que le rapport de volume d'eau à la masse exacte m_0 (g) de l'échantillon soit 1L/100g. Le flacon est placé, par la suite, dans le dispositif d'agitation réglé sur une vitesse de 60 cycles par minute pendant (24 ± 1 h). L'échantillon est alors divisé en un nombre approprié de sous-échantillons pour certaines analyses chimiques. Un sous échantillon est soumis à une filtration sous vide sur un filtre membrane de diamètre moyen de pore de $45 \mu\text{m}$ (pour l'analyse des métaux lourd).



Figure A.2 : Dispositif d'agitation pour l'essai de lixiviation

Tableau A.1 : Tests de lixiviation utilisés en Europe et en Amérique du Nord.

Test	Origine	Nom du test	Dimension	Extractant	Ph	Nombre d'étape d'extract ion	Rapport L/S parétape (L/kg)	Durée de contact par étape	Agitation	Filtration (μm)
Tests de conformité	Europe	EN 12 457 (1-4)	< 4 mm ou < 10 mm	Eau dm	NC	1 ou 2	2 ou 10 ou 2 et 10	24 h ou 6 et 18 h	Oui	0,45
	Pays Bas	NEN 7349	≤ 4 mm	Eau dm	4 (initial)	5	20	23 h	Oui	0,45
		NEN 7345	16*16*4 cm	Eau dm	4 (initial)	8	L/V = 5	0,3 à 64 jours	Non	0,45
	Deutch	DIN 38414 S4	< 10 mm	Eau dm	NC	1	10	24 h	Oui	0,45
	France	XP X 312 10	< 4 mm	Eau dm	NC	1 ou +	10	24 ou 16 h	Oui	0,45
		XP X 312 11	Monolithe	Eau dm	NC	1 ou+	10	24 ou 16 h	Oui	0,45
		XP X30 410	< 20 mm	Eau dm	4 (initial)	1 ou +	10	24 ou 16 h	Oui	0,45
	Suède	ENA skaktes	< 20 mm	Eau dm	4 (initial)	4	4	24 h	Oui	Centrifugation + 0,45
	Suisse	TVA Eluattest	Granulatou monolithe	Eau dm	5-6	2	10	24 h	Bullage au CO ₂	0,45
	Grande Bretagne	Waste Research Unit	< 10 mm	Eau dm ou acide acétique	NC ou 5	5	5 à 6	2 à 9 jours	Oui	Filtration Sous vide
Etat Unis	TCLP méthode 1310	< 9,5 mm	Eau +acide	3 (initial ou 5)	1	20	24 h	Oui	0,45	
Tests de caractérisation	Pays Bas	NEN 7341	< 125 μm	Eau dm	7 et 4	2	50	3h	Oui	0,5
		pH-static	< 1 mm	Eau dm+acide/base	4-12 (8 #)	1	10 (au final)	48h (en 3 périodes)	Oui	/
	Pays nordique	Nordtest	< 125 μm	Eau dm	7 et 4	2	100	3 h et 18 h	Oui	0,45
	Europe	XP CEN/TS 14997	< 1 mm	Eau dm+acide/base	4-12 (8 #)	1	10 (en 3 fois)	48 h (en 3 périodes)	Oui	/

II- Normes et réglementations

❖ Normes et réglementations en matière de protection des sols

En Algérie, les grands principes qui régissent la réglementation en matière de protection du sol et du sous-sol sont formulés par les textes suivants :

- La loi n° 83-03 du 05/02/1993, prend en considération la pollution du sol. Le législateur définit les déchets et pose les principes et les règles générales de leur gestion.

Concernant cette dernière, la loi fait obligation à tout détenteur ou producteur de déchets d'assurer ou de faire assurer leur élimination en évitant seulement, et non en supprimant, les effets néfastes sur le sol, la faune, la flore, etc....

- Le décret exécutif n° 93-160 du 10/07/1993, réglemente le déversement des huiles et lubrifiants aussi bien dans le milieu naturel que dans le réseau d'assainissement.
- L'Etat algérien en générale et Sonatrach en particulier misent sur une stratégie pour la protection de l'environnement en appliquant des textes législatifs. Le décret n° 93-16 relatif au rejet d'effluents liquides industriels fixe les limites maximales des paramètres de rejet de déversements industriels (métaux lourds, hydrocarbures,...). Ces limites sont portées sur le tableau

Tableau A.2 : Les limites maximales des paramètres des rejets industriels.

Paramètres	Valeurs max	Paramètres	Valeur max
<i>Température</i>	30 °C	<i>Phosphore</i>	02 mg/l
<i>Ph</i>	5.5 à 8.5	<i>Cyanures</i>	0.1 mg/l
<i>Matière en suspension</i>	30	<i>Aluminium</i>	05 mg/l
<i>DBO5</i>	40mg/l	<i>Cadmium</i>	0.2 mg/l
<i>DCO</i>	120mg/l	<i>Chrome III</i>	03 mg/l
<i>Huile et graisse</i>	20mg/l	<i>Chrome VI</i>	0.1 mg/l
<i>Hydrocarbure</i>	20mg/l	<i>Fer</i>	05 mg/l
<i>Phénol</i>	0.5mg/l	<i>Manganèse</i>	01 mg/l
<i>Solvant organique</i>	20mg/l	<i>Mercur</i>	0.01 mg/l
<i>Chlore actif</i>	01mg/l	<i>Plomb</i>	01 mg/l
<i>PCB</i>	0.001mg/l	<i>Cuivre</i>	03 mg/l
<i>Détergents</i>	02mg/l	<i>Zinc</i>	05 mg/l
<i>Tension actif</i>	10 mg/l	<i>Nickel</i>	05 mg/l
<i>Azote</i>	40 mg/l	<i>Chrome</i>	0.5 mg/l

- En absence de réglementation algérienne des limites tolérées pour les rejets solides, on se réfère au décret français le 30/03/1992.
- Publier au journal officiel le 30/03/1993.

Les valeurs limites maximales de rejet d'effluents fixées après une mise en solution de l'échantillon par le Test de lixiviation selon la norme : NFX 31-210 sont regroupées dans le *tableau A.3 (Annexe II)*.

Tableau A.3 : Valeurs limites maximales des déchets liquide

N°	Paramètres	Unité	Valeurs limites
1	PH	-	4 -13
2	Chrome Total	mg/Kg	70
3	Plomb total	mg/Kg	50
4	Zinc Total	mg/Kg	200
5	Cadmium	mg/Kg	5
6	Cuivre	mg/Kg	100
7	Nickel Total	mg/Kg	40
8	Arsenic	mg/Kg	25
9	Sélénium	mg/Kg	7
10	Mercure Total	mg/Kg	2
11	COT	mg/Kg	1000

L'Algérie a fixé des normes de rejets des eaux industrielles et en particulier des huiles. Ces mêmes valeurs viennent d'être renforcées par un nouveau texte réglementaire, le Décret Exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 Avril 2006, section 1, article 3. Les valeurs limites maximales de rejet d'effluents fixées par ces deux décrets sont regroupées dans le *tableau A.4*

Tableau A.4: Valeurs limites maximales des paramètres de rejets des installations de déversement en Algérie (J.O.R.A, 2006).

Paramètres	Valeurs limites (mg.L ⁻¹)
Huiles et graisses	20
Hydrocarbures totaux	10
Indice phenols	0,3
Solvants organiques	20
Composés organiques chlorés	0,5
PCB	0,001
Chlore actif	1
Détergents	2
Tensioactifs anioniques	10

Parmi les normes fixées qui définissent pour chaque polluant une valeur seuil facilitant les prises de décision et permettant de dire qu'un sol doit être dépollué ou non, sont celles établies par la Hollande représentés par le *tableau A.5*.

D'après, le Décret français les valeurs des seuils de référence pour les métaux lourds correspondant au 19 Avril 2006

Tableau A.5 : Seuils de référence pour les métaux lourds

Métaux lourds	Seuil de référence (mg/kg de sol)	Seuil de risque (mg/kg de sol)	Seuil de danger (mg/kg de sol)
<i>As</i>	20	30	50
<i>Cd</i>	1	5	20
<i>Co</i>	20	50	300
<i>Cr</i>	100	250	800
<i>Cu</i>	50	100	500
<i>Hg</i>	0,5	2	10
<i>Ni</i>	50	100	500
<i>Pb</i>	50	150	600
<i>Zn</i>	200	500	3000

III- L'analyse des échantillons sous forme solide

1) Détermination de la teneur en eau et la teneur en matière sèche

Méthode/Norme	Conditions ambiantes à respecter
EN 12880	105 ± 5°C pendant 16 h

❖ **Principe**

Des échantillons de sols sont séchés à masse constante, dans une étuve à 105°C jusqu'à la stabilisation de la masse. La différence en masse avant et après le processus de séchage est utilisée pour calculer la teneur en (TMS) et la (TE).

❖ **Mode opératoire**

Dans un creuset, on pèse m_1 (près d'1 mg) et une quantité appropriée m_2 de sols. Le creuset contenant l'échantillon est ensuite placé dans l'étuve de séchage réglée à 105°C pendant 16 h. Après refroidissement dans le dessiccateur, le creuset et son contenu m_3 sont pesés.

❖ **Expression des résultats**

$$W_w = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times f$$

$W_{dd} = 100 - W_w$

Avec :

- W_w : La teneur en eau de l'échantillon de sol en % ou en (g /kg) ;
- W_{dd} : est la teneur en matière sèche de l'échantillon de sol en % ou en (g/kg) ;
- m_1 : la masse de creuset vide en g ;
- m_2 : la masse de creuset contenant la matière sèche de l'échantillon de sol en g ;
- m_3 : la masse de creuset contenant la matière sèche de l'échantillon de sol en g ;
- f : Le facteur de conversion égal à 100 ; pour des résultats exprimé en % égal à 1000 pour expression en g/k.



Figure A.3 : Autre appareillage utilisé : étuve et dessiccateur

Bibliographie

Bibliographie

1. **catherine, Faucaud-scheunemann et sandra Helinck.** Caractéristiques générales des micro-organismes : Les micro-organismes au cœur des biotechnologies. *techniques de l'ingénieur*. [En ligne] 2009.
2. **Elefterios, Chalkiadakis.** Délégation Ifremer de Nouvelle-Calédonie. *Délégation Ifremer de Nouvelle-Calédonie Unité de Recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable*. [En ligne] 2014. <https://nouvelle-caledonie.ifremer.fr/Bienvenue>.
3. **Manel, Ghribi.** LA BIODIVERSITÉ MICROBIENNE DES DÉCHETS (BOUES PAPETIÈRES ET HUILES USÉES) ET SON POTENTIEL D'APPLICATION ENZYMATIQUE. Québec : s.n., 2019.
4. **Iris, borel.** techniques de l'ingénieur . *Des molécules extraites de bactéries marines pour la cosmétique*. [En ligne] 2018. <https://www.techniques-ingenieur.fr/actualite/articles/des-molecules-extraites-de-bacteries-marines-pour-la-cosmetique-57600/>.
5. **Florence, Brian-Jaisson.** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Toulon : s.n., 2014.
6. *biodiversité et roles des bactéries du sol*. [En ligne] <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=1269>.
7. **song, yan.** PRODUCTION DE POLYHYDROXYALKANOATE (PHA) EN UTILISANT LES EAUX USÉES COMME SOURCE DE CARBONE ET LES BOUES ACTIVÉES COMME SOURCE DE MICRO-ORGANISMES. Québec : s.n., 2007.
8. **Amel, BOUDERHEM.** UTILISATION DES SOUCHES BACTERIENNES TELLURIQUES AUTOCHTONES DANS LA BIODÉTECTION ET LA BIOREMEDIATION DES soles pollués par les hydrocarbures. alger : s.n., 2011.
9. **amina, haddadj.** Contribution à l'étude physicochimique et microbiologique d'un bourbier pétrolier pollué par les fluides de forage, et sa bioremédiation. alger : s.n., 2010-2011. p. 174.
10. **chalkiadakis, elféthérios.** bio-prospection et biodiversité des micro-organismes des milieux atypiques des lagons évaluation du potentiel de production de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologiques. nouvelle calédonie, australie : s.n., 16 décembre 2013.
11. **beugul, carolina jain.** potentiels des poly-hydroxyalcanoates (PHA) bactériens pour l'incapsulation de molécules à visée thérapeutique. brest : s.n., 14 décembre 2018.
12. **Bruzaud, Stéphane.** les polyhydroxyalcanoates de la biomasse à la fin de vie. Bretagne-sud, bretagne : s.n., 31 janvier 2016.
13. **Boukhalfa, zahra et Tordjman yasmin.** Etude des méthodes de traitement des boues de forage : Considération environnementale. 2017.
14. **Didier, BRIGANT et alexandre LEBLOND.** *forage*. [En ligne] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/forages/>.

Bibliographie

15. **Reguig, Zoulikha et bechichi selma.** CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DES METHODES EFFICACES POUR LE TRAITEMENT DES BOURBIERS PETROLIERS. 2019.
16. **M, MARTIN.** CARACTÉRISTIQUES RHÉOLOGIQUES ET COMPOSITION DES boues de forage. france : s.n., 1970.
17. **kherfi, aissa et guennoun laid.** Etude de l'efficacité des méthodes de traitement de boues de forage appliqué. alger : s.n., 2018. p. 66.
18. **Khoja, Mohamed.** LES FLUIDES DE FORAGE: ETUDE DES PERFORMANCES ET CONSIDERATIONS ENVIRONNEMENTALES. france : s.n., 2008.
19. **Abdelhamid, Braik et Abdelbaset Saidi.** les boues de forage a base d'huile. alger : s.n., 2016/2017.
20. **P.PARIGOT, G.GARCIAet.** boues de forage. france : institut de petrol, société des éditions technip, 1974. 27.
21. **M, CRINE.** le traitement des eaux industrielles chargées en métaux lourds. Turbune de l'eau. 1993. 561.
22. **F.BELAIB.** Etude expérimentale de l'effet de l'enrobage de support solide par des polymères conducteurs sur leur capacité de rétention des cations métalliques en solution aqueuse par adsorption. . *thèse de doctorat.* Constantine : s.n., 2006.
23. **SPIN, CENTRE.** Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation (les métaux lourds)." Axe "Génie des procédés". Ecole des Mines de Saint-Etienne : s.n., 1997. pp. 4-8.
24. **koller.** traitement des polluants industriels. Ed DUNOD. 2004.
25. **Khan, FI., Husain, T., Hejazi, R.** An overview and analyse of site remediation technologies. 71.95-122.
26. **Bounnard, M, Devien, S, and al.** The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil. 2010. 995-960.
27. (2006). «*Remediating polluted soils*». *Naturwissenschaften.* **Scullion, J.** 93.51-65, 2006.
28. **Searle, S.J.** Evaluating naphthalene sorption to cement-based solidification/stabilization additives. Dalhousie, Thèse de master, canada : s.n., 2010.
29. **SELMOUN Meriem, BENKHEBECHE Djamel Eddine.** Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants. 2016.
30. *bioremédiation.* [En ligne] <https://www.techno-science.net/definition/3430.html>.
31. **Babu, Rajendran Ramaswamy et al.** Isolation and Identification of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Producing Bacteria Pseudomonas aeruginosa EB4 from Petroleum Oil Contaminated Soil. 2012. p. 8.

Bibliographie

32. **E, Bugnicourt et al.** polyhydroxyalkanotes (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. s.l. : eXPRESS Polymer Letters, 2014. Vol. 8, 11, p. 18. 791-808.
33. *décret n° 2016-1170 du 30 août 2016 relatif aux modalités de mise en œuvre de la limitation des gobelets, verres et assiettes jetables en matière plastique.* france : s.n., 2016.
34. [En ligne] 2020. https://www.k-tradefair.fr/fr/Les_bioplastiques_l_alternative_de_demain.
35. **Avérous, L et J. Macromol. Sci C Polym.** [En ligne] 2004.
<http://hmf.enseeiht.fr/travaux/bei/beiere/book/export/html/2119>.
36. **Brend, Rehm.** bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications . 2008.
37. **R, autajon and al.** [En ligne] 2020.
http://aprespetrole.tpe.free.fr/site_internet/polymere_bac.html.
38. **lemechko, pierre.** élaboration de nouveaux biopolyesters bactériens fonctionnalisés biomédical. paris, france : s.n., 13 juillet 2012.
39. **kalia, vipine chandra.** *microbial factories biodiversity, biopolymers, bioactive molecules.* delhi : springer , 2015. Vol. 2 .
40. **Lemoigne, M.** Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide bêta oxybutyrique. *Bulletins de la Société de Chimie Biologique.* 1926/1927. Vol. 8, 770–782.
41. **Wang, W.S. and Lundgren, D.G.** Poly-beta-hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol.* 1969. Vol. 97, 947–950.
42. **hernandez-raquet, pérez-rivero c. et.** polyhydroxyalcanoates : une alternative bio aux plastiques traditionnels. toulouse : s.n., janvier 2017.
43. **Jean, guezennec, corre, Yves-marie et Simon-Colin, Christelle.** Polyhydroxyalcanoates (pha) : applications dans le domaine de la santé . *techniques de l'ingénieur.* [En ligne] 2014.
44. **Bugnicourt, and al.** polyhydroxyalkanotes (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. 2014.
45. **cristina perez-rivero, jillian marc, lucas auer et guillermina hernandez-raquet.** *ingénierie de consortia microbiens pour la production de bioplastiques de type PHA-mcl.* paris, france : s.n., 8 juin 2017.
46. **Weng, Y.-X., Jin, Y.-J., Meng, Q.-Y., Wang, L., Zhang, M., and Wang, Y.-Z.** Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing.* 2013. Vol. 32, 918–926.
47. **Nadège, follain and al.** Structure and Barrier Properties of Biodegradable Polyhydroxyalkanoate Films. amérique : s.n., 2014.
48. **meridian, inc and al.** marché du polyhydroxyalcanoate (PHA) 2020-2026. 2020.

Bibliographie

49. **Laurent, Gélina**t. PLASTIQUES BIOSOURCÉS : ÉTUDE DE LEUR PERFORMANCE ENVIRONNEMENTALE COMPARATIVEMENT AUX PLASTIQUES PÉTROCHIMIQUES. 2013. p. 111p .
50. **Sheu, Der-Shyan**. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. 2019.
51. **jean, luc and al**. le PHA, un bioplastique bactérien. Bretagne : s.n., 2017. p. 2.
52. **bentancourt, aimesther ojito**. analyses, extraction, récupération de poly-3-hydroxybutyrate présentes dans la biomasse. québec , montréal : s.n., janvier 2008.
53. **Ghribi, manel**. la biodiversité microbienne des déchets (boues papetieres et huiles useés) et son potentiel d'application enzymatique. Québec, montreal : s.n., 2019. p. 201.
54. *Alcaligenes Eutrophus and Its Role in Biodegradable Polymer Production*. s.l. : microbe web , 2011.
55. **Stéphane, BRUZAUD et pierre lemechko**. La biotechnologie au service de la chimie pour obtenir des polymères bactériens biodégradables. *chimie durable* . 2018. 427-428, p. 5.
56. **bruzaud, stéphane**. le polyhydroxyalcanoate de la biomasse au matériau. france : s.n., 2018.
57. [En ligne] www.CLIMATE-DATA.ORG.
58. **Joffin, Jean-Noël et Guy Leyral**. *Microbiologie technique t.1 ; dictionnaire des techniques (4e édition)*. s.l. : scéren, 2006.