

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**ECOLE SUPERIEURE NATIONALE POLYTECHNIQUE**  
**Département de Génie de l'Environnement**  
**Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement**

**PROJET DE FIN D'ETUDES**

**Présenté par :**

**GARMI LEILA**

**Pour l'obtention du diplôme**  
**d'Ingénieur en Génie de l'Environnement**

**THEME**

**ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES PLASTIFIANTS**  
**DI OCTYL PHTALATE ET DI ISONONYL ADIPATE**

Soutenu le 23 juin 2009 devant le jury composé de :

Président : Mr NAKIB, Chargé de cours, ENSP.  
Promotrice : Melle N.LARDJANE, Maitre Assistante, Université de Tizi Ouzou.  
Co- Promotrice : Mme N.BELHANECHÉ, Professeur, ENSP.  
Examineurs : Mr Y.KERCHICHE, Chargé de cours, Université de Médéa.  
Melle D. Hank, Doctorante, ENSP.

**PROMOTION JUIN 2009**  
**ENSP.10, Avenue Hassen-Badi, El Harrach, Alger**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma promotrice Mlle N.LARDJANE qui a bien voulu donner de son temps pour superviser mon projet de fin d'études.

Mes remerciements vont également à ma co-promotrice Mme N.BELHANECHÉ qui a eu l'amabilité de diriger mon travail.

Enfin, je remercie les personnes suivantes qui m'ont aidée de près ou de loin.

Les membres du jury.

Messieurs ALILECHE- AIT IHADADENE- AROUSS et MOUSSI de l'USTHB.

Mme Amara Anissa de l'Institut Pasteur.

Mlles HANK Dalila et TEBBOUCHE Latifa de L'ENSP.

Mr GHRIB et Mr KERBACHI de l'ENSP.

Mme NAFA et Mlle BENSERAI du CHUA MUSTAPHA.

Messieurs MAHFOUD – BOUSSOUM et Ami SALAH de l'ENSP.

Mes amis.

Ma famille.

## Liste des figures et schémas :

Schéma I. 1: Mode d'action d'un plastifiant . . . . .	7
Schéma I. 2 : Structure chimique des sébacates . . . . .	9
Schéma I. 3 : Structure chimique des azélates . . . . .	9
Schéma I. 4 : Structure chimique des adipates . . . . .	9
Schéma I. 5: Structure chimique des polyesters . . . . .	9
Schéma I. 6 : Structure chimique des phosphates . . . . .	10
Schéma I. 7 : Structure chimique des phtalates . . . . .	10
Schéma II. 1: Changement mineur . . . . .	14
Schéma II. 2: Fragmentation . . . . .	14
Schéma II. 3 : Minéralisation . . . . .	14
Figure II. 1 : Equation de la courbe de croissance . . . . .	18
Figure II. 2: Courbe de croissance en milieu non renouvelé . . . . .	19
Figure II. 3 : <i>P.aeruginosa</i> au microscope électronique à balayage . . . . .	20
Figure III. 1 : Domaine du spectre électromagnétique . . . . .	22
Figure III. 2: Loi de Beer Lambert . . . . .	23
Figure III. 3: Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau . . . . .	23
Figure III. 4 : Modes de vibration : exemple des vibrations localisées du groupement CH <sub>2</sub> d'une molécule . . . . .	24
Figure III. 5 : Passage de l'interférogramme au spectre IR par transformation de Fourier . . . . .	25
Figure III. 6: Schéma d'un interféromètre de Michelson . . . . .	26
Figure III. 7: Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier . . . . .	26
Figure IV. 1: Schéma du dispositif expérimental. . . . .	31
Figure IV. 2 : Courbe d'étalonnage de la croissance bactérienne. . . . .	33
Figure V. 1: Spectre infrarouge de di- octyl phtalate (DOP) . . . . .	35
Figure V. 2: Spectre infrarouge de di- iso nonyle adipate (DINA) . . . . .	36
Figure V. 3: Spectres infra rouges des échantillons témoins. . . . .	37
Figure V. 4: Evolution de l'absorbance de la bande caractéristique de la fonction ester des deux plastifiants en fonction du temps de biodégradation. . . . .	38
Figure V. 5: Evolution de l'absorbance de la bande caractéristique du groupement CH <sub>2</sub> des deux plastifiants. . . . .	39
Figure V. 6 : Evolution de l'absorbance des bandes caractéristiques en fonction du temps pour le DOP . . . . .	40
Figure V. 7 : Evolution de l'absorbance des bandes caractéristiques en fonction du temps pour le DINA . . . . .	41
Figure V. 8: Courbes de croissance dans les milieux 1 et 2. . . . .	41
Figure V. 9: Graphe représentant la phase exponentielle . . . . .	42

## Liste des tableaux

Tableau IV. 1 : Matériel utilisé .....	29
Tableau IV. 2 : Propriétés physico-chimiques du DOP .....	30
Tableau IV. 3 : Propriétés physico chimiques du DINA .....	30
Tableau V. 1: Groupements fonctionnels caractéristiques du di- octyle phtalate (DOP) .....	35
Tableau V. 2: Groupements fonctionnels caractéristiques du di- iso nonyle adipate (DINA) .....	36

## Liste des abréviations

PVC : poly chlorure de vinyle.

DOP : di octyl phtalate.

DINA : di isononyle adipate

D.O : densité optique.

REMERCIEMENTS .....	I
Liste des figures et schémas : .....	II
Liste des tableaux .....	III
Liste des abréviations .....	III

## Table des matières

Introduction .....	1
Chapitre I : Généralités sur les matières plastiques et les plastifiants .....	4
I.1- Définition d'une matière plastique .....	5
I.2- Les étapes de fabrication .....	5
I.2.1- Du pétrole au monomère.....	5
I.2.2- Du monomère au polymère (Polymérisation).....	6
I.2.3- Du polymère à la matière plastique .....	6
I.3- Les plastifiants .....	7
I.3.1- Définition.....	7
I.3.2- Propriétés exigées de l'association polymère-plastifiant.....	7
I.3.3- Principaux types de plastifiants .....	8
I.4- Les impacts environnementaux des phtalates :.....	11
Chapitre II : Généralités sur la biodégradation.....	13
II.1- La biodégradation : .....	14
II.2- La culture en « batch » .....	15
II.3- La croissance bactérienne.....	17
II.4-Généralités sur les <i>pseudomonas</i> .....	19
Chapitre III : Description des techniques d'analyses utilisées .....	21
III.1-Spectroscopie UV-VIS.....	22
III.2-Spectroscopie infra rouge.....	24
Chapitre IV : Matériels et modes opératoires.....	27
IV.1- Matériels .....	28
IV.1.1- Matériel biologique.....	28
IV.1.2- Milieu de culture.....	28
IV.1.3- Appareillages : .....	29

IV.2- Produits utilisés :.....	29
IV.2 .1- Di octyl phtalate :.....	29
IV.2 .2- Di isononyle adipate .....	30
IV.3- Dispositif expérimental :.....	31
IV.3.1- Préparation de la pré culture .....	32
IV.3.2 Préparation du batch.....	32
IV.4 –Mode opératoire .....	32
IV.4.1- Mesure de la croissance microbienne .....	32
IV.4.2 Mesure de la biodégradation des plastifiants .....	33
Chapitre V : Résultats et discussion .....	34
V.1- Caractérisation préliminaire des plastifiants par la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier  35	
V.1.1- Le dioctyl phtalate (DOP) : .....	35
V.1.2 : Le di isononyle adipate (DINA) : .....	36
V .2- Spectres infra rouge des échantillons témoins : .....	37
V.3- Evolution de l’absorbance des groupements fonctionnels des plastifiants : .....	38
V.4-Courbes de croissance .....	41
Conclusion.....	44
Bibliographie.....	46
Annexes.....	47

# Introduction

La demande mondiale en polychlorure de vinyle (PVC) est estimée à des dizaines de millions de tonnes. En 2000, la production mondiale de ce polymère représentait plus de 20 millions de tonnes par an, alors qu'elle n'était que de 3 millions de tonnes en 1965, ce qui correspond à environ un cinquième de la production totale de matières plastiques [1]. Ses applications d'usage s'étendent du domaine médical à l'industrie automobile en passant par la construction du bâtiment. [2]

Les plastifiants sont incorporés aux polymères dans le but de [3] :

- faciliter leur mise en œuvre,
- de modifier leurs propriétés
- de développer de nouvelles propriétés absentes dans le cas de la résine elle-même

Le PVC est la matière plastique qui utilise la plus grande quantité de plastifiants , environ 35% d'autres polymères se partagent l'utilisation d'un peu plus de 10% des plastifiants [4].

La proportion de plastifiants ajoutée à la résine de PVC est comprise entre 15 et 50 % [5].

L'augmentation importante de l'utilisation du PVC, induit une augmentation de l'utilisation des plastifiants et génère donc la pollution de l'air, du sol et de l'eau.

En effets les plastifiants sont des substances persistantes, bioaccumulables et toxiques **(PBT)**.

Il s'agit de substances chimiques bioaccumulables (accumulation dans les tissus vivants et la chaîne alimentaire), peu biodégradables (persistantes) et potentiellement toxiques.

De manière générale, les plastifiants sont considérés comme des substances très nocives, bien que le niveau et le type de toxicité varient d'un composé à l'autre [6].

Des recherches ont montré que les phthalates qui sont les plastifiants les plus utilisés sont cancérigènes et contribuent à provoquer certaines malformations génétiques [7].

Considérant leur haute toxicité, leur élimination ou leur substitution s'avère nécessaire et urgente. Cette opération d'élimination peut se faire par méthode biologique ; la biodégradation étant une décomposition des matières organiques par des micro-organismes.



Ces derniers contribuent à détruire ou à neutraliser ces substances toxiques. Tous les êtres vivants participent à des degrés divers au recyclage des déchets et ce par leur aptitude à coloniser tous les milieux [8].

En ce qui concerne la substitution, il s'agit de remplacer les plastifiants phtalates toxiques par d'autres plastifiants moins nocifs pour l'environnement. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail qui a pour objectif :

- De substituer l'un des plastifiants les plus utilisés, le di octyl phtalate (DOP), par un plastifiant de la famille des adipates, le di isononyl adipate (DINA).
- De comparer leur biodégradabilité.

Pour cela, la biodégradabilité en batch des deux plastifiants a été analysée par spectroscopie infrarouge.

Le présent mémoire comporte cinq chapitres. Les deux premiers concernent des généralités sur les matières plastiques et les plastifiants ainsi que sur la biodégradation. Le troisième traite des techniques d'analyses utilisées. Le quatrième décrit les matériels et modes opératoires tandis que le cinquième et dernier chapitre présente les résultats et discussion.

Enfin, une conclusion est donnée.

# **Chapitre I : Généralités sur les matières plastiques et les plastifiants**

## **I.1- Définition d'une matière plastique**

Dans un sens général, on dit qu'un matériau est plastique lorsqu'il peut se déformer sous l'action d'une force sans perdre sa cohésion, tout en conservant sa nouvelle forme lorsque la force a cessé d'agir. Le terme « plastique » est utilisé dans l'industrie pour désigner les substances et les matériaux (matières premières ou produits finis) à base de polymères organiques synthétiques qui peuvent devenir fluides et se prêter au moulage.

La définition actuelle se limite, en outre, aux matières plastiques à base de polymères organiques, à l'exclusion des élastomères et des fibres. Dans le domaine de la technologie, on appelle matière plastique, un mélange comportant un polymère et divers ingrédients (par exemple, des plastifiants, des stabilisants, des charges, etc.), transformé en produit fini.

Chaque matière plastique possède un ensemble de propriétés, de procédés de fabrication et de considérations d'ordre économique qui la rend idéale pour certaines applications et impropre à d'autres. Par conséquent, il est important que les usagers connaissent la nature de ces matériaux afin d'être en mesure de s'en servir avantageusement dans des applications appropriées [5].

## **I.2- Les étapes de fabrication**

### **I.2.1- Du pétrole au monomère**

Le pétrole est un liquide visqueux constitué d'un mélange de produits appelés hydrocarbures qui sont plus ou moins lourds. De ce fait, ils ont des points d'ébullition relativement différents les uns des autres. C'est sur ce point qu'est basée la séparation des constituants du pétrole qui est une distillation fractionnée.

Cette distillation s'effectue dans une haute colonne en acier dite colonne de fractionnement. Cette colonne est compartimentée intérieurement par un certain nombre de plateaux horizontaux.

Le pétrole est préalablement chauffé dans un four à environ 400°C. A cette température, la plupart des fractions constituant le pétrole sont sous forme de gaz. Lorsqu'elles pénètrent dans la colonne, elles s'élèvent à l'intérieur en se refroidissant au fur et à mesure de leur ascension. Chacune des fractions obtenues lors de la distillation fractionnée ne peut être utilisée directement car il ne s'agit pas de produits purs. Ce sont encore des

mélanges qu'il faudra traiter pour obtenir les hydrocarbures utilisés dans différents secteurs (gas-oil, essence, produits de base de la pétrochimie).

En particulier, l'une des coupes obtenues est le naphta qui va être à la base de plusieurs polymères.

En sortie de raffinage, le naphta va donc subir plusieurs transformations jusqu'à l'obtention de monomères.

### **I.2.2- Du monomère au polymère (Polymérisation)**

Sous l'action de la chaleur, des radiations, ou plus généralement, d'un catalyseur, des molécules activées prennent naissance. Cette phase est assez lente.

Par additions successives de molécules activées, la macromolécule se forme. Cette étape est très rapide ; l'écart entre la vitesse d'apparition des molécules activées et la vitesse de croissance des macromolécules fait que certaines ont déjà atteint leur taille définitive alors que d'autres commencent tout juste à croître. C'est pourquoi le polymère recueilli sera un mélange de macromolécules de poids moléculaires différents [5].

La polycondensation fait intervenir des réactions élémentaires classiques en chimie organique : amidification, anhydrisation, estérification, par exemple, avec élimination d'un résidu généralement simple : eau, gaz carbonique ou ammoniac, le plus souvent. Si les corps en présence comportent deux fonctions susceptibles de réagir, il se forme une macromolécule linéaire, s'il y a trois groupes fonctionnels la molécule obtenue sera tridimensionnelle [5].

### **I.2.3- Du polymère à la matière plastique**

Afin d'améliorer les propriétés physiques (mécaniques, thermiques...), chimiques ainsi que la mise en œuvre, on incorpore des additifs aux polymères.

Le mélange physique de polymères et d'adjuvants (additifs) est appelé *premix* ou *compound*. La nature précise et la proportion des substances à ajouter dépend du polymère, de la méthode de traitement utilisée pour convertir le plastique et des propriétés exigées pour la pièce finie. Le choix des adjuvants et l'opération de mélange de ces derniers avec le polymère constituent la préparation du *compound* (ou *compoundage*). Les proportions des divers ingrédients d'un plastique constituent sa formulation. La résine de base d'un plastique peut être un homopolymère ou un mélange des deux [5].

Le terme adjuvant (ou additifs) peut servir à désigner toute substance incorporée généralement en faible concentration (il y a quelques exceptions) aux polymères, soit pour modifier les propriétés de la résine, soit pour faciliter la mise en forme (ou mise en œuvre), soit pour changer les propriétés physiques, chimiques ou électriques du produit fini [5].

Les principales classes des divers adjuvants utilisés dans la fabrication des matières plastiques sont : les lubrifiants, les stabilisants, les charges, les plastifiants, les pigments....

Dans cette étude l'accent est mis sur les plastifiants.

### I.3- Les plastifiants

#### I.3.1- Définition

Un plastifiant est une substance incorporée à un plastique afin d'abaisser son intervalle de ramollissement, de faciliter sa mise en œuvre et d'augmenter sa flexibilité.

Un plastifiant peut aussi être défini comme étant un solvant lourd qui, incorporé au polymère, détruit partiellement les interactions entre chaînes responsables de la cohésion mécanique (schéma.1) et transforme un matériau initialement rigide en matériau souple, flexible. Toutes les interactions ne sont pas détruites, celles qui restent confèrent au polymère une structure de réseau tridimensionnel évitant le glissement des chaînes les unes par rapport aux autres [9].

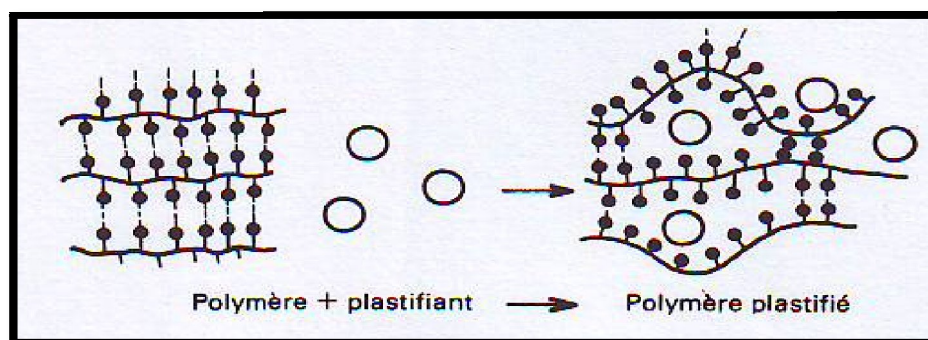


Schéma I. 1: Mode d'action d'un plastifiant [9].

#### I.3.2- Propriétés exigées de l'association polymère-plastifiant

Un plastifiant est jugé à ses qualités, essentiellement en fonction de l'usage que l'on veut faire du plastique dans lequel il est incorporé.

Dans tous les cas, les propriétés suivantes sont indispensables :

- excellente compatibilité plastifiant-polymère.
- action plastifiante efficace.
- permanence raisonnable de façon à maintenir les propriétés désirées pendant la durée de vie du produit.
- stabilité suffisante (thermique, oxydative, UV, etc.) pour assurer, d'une part, une mise en œuvre sans décomposition notable du plastifiant et, d'autre part, la longévité souhaitée pour le produit plastifié.

D'autres propriétés peuvent être appréciées ou même exigées selon l'utilisation [10] :

- performances électriques (résistance d'isolement).
- tenue thermique aux hautes ou aux basses températures.
- résistance à l'extraction par les solvants et par l'eau, résistances aux salissures et à la migration.
- bonne tenue au feu.
- faible odeur, non-toxicité.
- facilité de mise en œuvre.

### I.3.3- Principaux types de plastifiants

#### *I.3.3.1- Époxydes*

Ce sont, le plus souvent, les dérivés époxydés d'acides gras dont les plus connus sont l'huile de soja époxydée, les époxy-stéarates et époxy-tallates d'octyle (Tallate : sel ou ester des acides gras du tallöl, résine liquide obtenue comme sous-produit de la pâte à papier.).

Ils sont en effet d'excellents plastifiants par eux-mêmes, mais leur prix très élevé, limite en général, leur utilisation comme plastifiants à des cas exceptionnels [10].

#### *I.3.3.2- Esters d'acides aliphatiques dicarboxyliques : adipates, sébaçates, azélates, etc.*

La linéarité d'une partie de la chaîne carbonée de ces esters se traduit par une amélioration des caractéristiques aux basses températures des produits plastifiés. L'utilisation de ces types de plastifiants est limitée à cause de leur coût [10].

Dans la présente étude le plastifiant utilisé appartient à la famille des adipates, il s'agit du diisononyl adipate (DINA).

Ce dernier résiste aux basses températures et à la lumière, il est utilisé dans le PVC et ses copolymères et caoutchouc. Grâce à sa faible viscosité, il est utilisé pour la fabrication de polymères et d'esters de cellulose. On le retrouve dans les déodorants, films plastiques et les emballages [5].

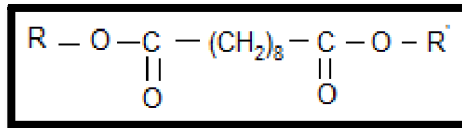


Schéma I. 2 : Structure chimique des sébacates [5].

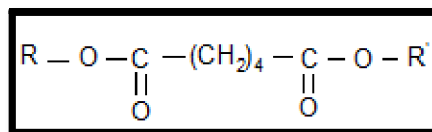


Schéma I. 3 : Structure chimique des azélates [5].

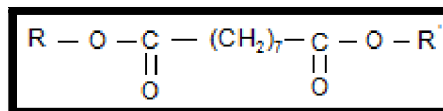


Schéma I. 4 : Structure chimique des adipates [5].

### 1.3.3.3- Polyesters ou plastifiants polymériques

Ce sont les produits de la réaction d'un diacide aliphatique sur un diol. Les plus courants sont les polyadipates de glycol de masses moléculaires variées (de 800 à 10 000).

Ces plastifiants, souvent difficiles à mettre en œuvre, ne sont utilisés que dans les applications pour températures élevées, où ils confèrent une longévité convenable aux objets plastifiés. Leur excellente résistance à l'extraction par les solvants et l'eau savonneuse augmente avec leur masse moléculaire [10].

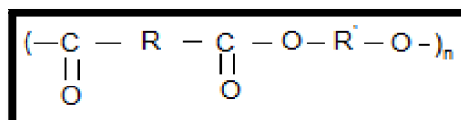


Schéma I. 5: Structure chimique des polyesters [5].

### I.3.3.4- Phosphates

Ils sont très utilisées dans les anciennes formulations du PVC, les *orthophosphates* d'alkyle ou (et) d'aryle sont souvent *mixtes*. Le plus ancien est le phosphate de tricrésyle mais les phosphates de diphenyl-octyle (ou de diphenyl-*isodécyle*) sont, en général, préférés car ils confèrent aux polymères de bonnes performances à froid [10].

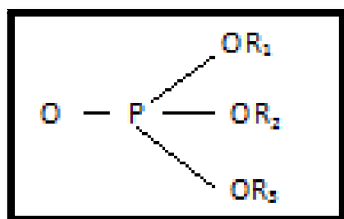


Schéma I. 6 : Structure chimique des phosphates [10].

### I.3.3.5- Phtalates

Les phtalates constituent une famille composée de nombreuses substances. Ce sont des esters dérivés de l'acide phtalique et d'alcools à chaînes plus ou moins ramifiées, pouvant aller de C<sub>1</sub> à C<sub>2</sub>. Ils peuvent être considérés comme les plus courants des plastifiants du PVC car ils présentent le plus souvent un ensemble des propriétés requises acceptables [2].

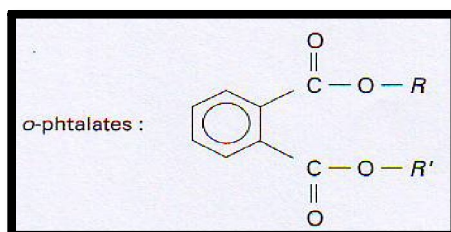


Schéma I. 7 : Structure chimique des phtalates [10].

Les moins coûteux : le phtalate de dioctyle (**DOP**), ou la gamme des *isophtalates*, phtalate de diisooctyle (**DIOP**) phtalate de diisononyle (**DINP**), phtalate de diisodécyle (**DIDP**), sont les plus courants [10].

Les phtalates sont présents dans de nombreux produits de consommation courante : revêtements de sol (phtalate de butylbenzyle [BBP] ; phtalate de di-isononyle [DINP] ; phtalate de di-(2-éthylhexyle) [DEHP]), câbles (exemple : électriques), matériel médical ([DEHP] dans les poches et les tubulures), emballages alimentaires, garnitures de voiture, papeterie et matériaux de construction. Ils ont des applications plus limitées comme plastifiants de résines et polymères autres que le PVC, et peuvent être incorporés dans des



encres, des pigments, des peintures, (les laques, et des adhésifs (phtalate de di-n-butyle [DBP]). Le DBP est également utilisé en cosmétologie et en parfumerie (exemple : laques pour les cheveux, vernis à ongles) [4].

Le plastifiant phtalate utilisé au cours de cette étude est le di octyl phtalate (DOP) de formule moléculaire brute  $C_{24}H_{38}O_4$ . C'est un ester de l'acide phtalique. C'est l'isomère non ramifié du DEHP [3,11].

#### **I.4- Les impacts environnementaux des phtalates :**

Les phtalates sont quasi présents dans notre quotidien, cela est dû à leur vaste champ d'application : ils sont utilisés comme plastifiants pour le PVC et comme additifs dans les cosmétiques (parfums et lotions) [12].

Le secteur des emballages alimentaires est la source prédominante d'exposition des populations (films plastiques, joints pour les bouches) [13,14]. On peut y être aussi exposé à travers certains traitements médicaux comme l'hémodialyse et les transfusions [15].

Comme les liaisons entre plastifiants et PVC ne sont pas covalentes, le plastifiant peut donc migrer, se lessiver ou s'évaporer dans l'atmosphère, la terre, et dans la nourriture, ce qui les rend ubiquitaires [16].

Donc les humains sont exposés à ces produits toxiques par ingestion buccale, inhalation et par la peau [17].

En effet des études ont détecté la présence de ces produits, dans le sang, le liquide amniotique et les urines [18].

Les phtalates entrent également dans la composition des peintures pour bateaux. La concentration dans ce cas est de 0.1–300 mg/l dans les surfaces marines et les eaux douces. Le taux est de 0.1 mg/g–100 mg/g de concentration pour les sédiments au fond des rivières [19].

Il y a lieu de souligner également que des chercheurs ont mis en évidence que certains invertébrés marins plus précisément des gastropodes, présentaient des modifications sexuelles, avec comme résultat par exemple le développement d'organes mâles chez les femelles [20]. Environ 150 espèces de gastropodes présentant ces mêmes symptômes ont été recensées dans le monde [21].

On trouve aussi les phtalates dans les habitations, surtout dans les matériaux de finition et de décoration : papiers peints (30–40%), laques et vernis (20–40%), tuiles (5.0–15%) et revêtements du sol (30–50%) [22].

Un récent rapport a déterminé qu'il y avait une liaison entre l'asthme infantile, les allergies et la poussière ambiante qui contenait, entre autres le DEHP [23].

## **Chapitre II : Généralités sur la biodégradation**

### II.1- La biodégradation :

Un matériau est dit « biodégradable » s'il est dégradé par les microorganismes.

Le résultat de cette dégradation est la formation d'eau, du CO<sub>2</sub> et /ou CH<sub>4</sub> et éventuellement, des sous produits [24].

La biodégradation peut se décliner en trois types principaux de changements dans une molécule [25] :

1. Un changement mineur dans une molécule organique, laissant presque intacte la structure principale.

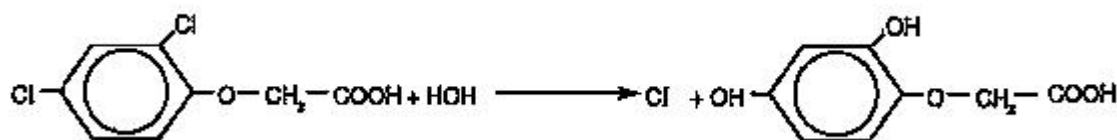


Schéma II. 1: Changement mineur [25].

2. Une fragmentation d'une molécule organique complexe, de telle façon que les fragments puissent être réassemblés pour revenir à la structure initiale.

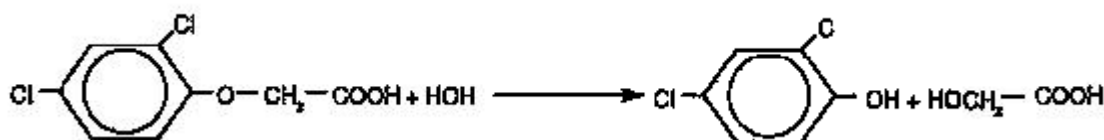


Schéma II. 2: Fragmentation [25].

3. Une minéralisation complète aboutit à la transformation de la molécule organique en forme minérale.

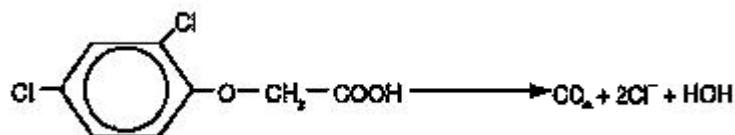


Schéma II. 3 : Minéralisation [25].

Souvent, les communautés microbiennes naturelles ne sont pas capables d'effectuer la biodégradation à la vitesse désirée, à cause de facteurs physiques ou nutritionnels limitants.

Par exemple, les faibles teneurs en oxygène limiteront souvent la biodégradation pour les bactéries aérobies, l'azote le phosphore et d'autres nutriments nécessaires peuvent aussi manquer ou n'être fournis que lentement, limitant ainsi les vitesses de dégradation.

En modifiant le milieu pour accélérer la biodégradation, on met en place un nouveau processus appelé « bioremediation » [25].

Les facteurs affectant la biodégradation concernent la molécule, l'environnement et la population microbienne.

Dans la molécule, interviennent :

- Le poids moléculaire
- Le degré de polymérisation
- Le degré de substitution (nature, nombre, position des substituants)
- La charge et l'encombrement stérique
- L'équilibre solide –liquide- vapeur
- La solubilité.

Dans l'environnement, les facteurs suivants interviennent dans la biodégradation [26] :

- La température, le pH, l'activité de l'eau, la force ionique, le potentiel redox
- La présence d'une interface liquide/solide, liquide/gaz
- Les concentrations en substrats et co-substrats.

Dans la population microbienne interviennent :

- La présence ou non d'une flore adaptée à l'environnement.
- La présence ou non d'une flore capable de dégrader les substrats considérés.

## II.2- La culture en « batch »

Batch est un mot anglais qui désigne une opération où tous les ingrédients sont mis ensemble au même moment en amont du réacteur et où tous les produits sont récupérés à la fin de la procédure [27].

La différence qui existe entre le bioréacteur en batch décrit précédemment et celui utilisé au laboratoire est que tous les ingrédients sont mis ensemble au départ mais des soutirages se font au fur et à mesure que la biodégradation s'opère, ces soutirages qui se font en fonction du temps sont nécessaires pour observer la croissance microbienne et la biodégradation du substrat.

Un bioréacteur comprend en général:

- L'enceinte de culture, encore appelée cuve ou réacteur.
- L'électronique de commande, qui est en effet essentielle pour maintenir dans le réacteur des conditions de culture optimales, spécifiques pour les micro-organismes considérés.

Il est aussi équipé d'un certain nombre de capteurs physico-chimiques pour mesurer par exemple:

- La température (du milieu de culture).
- La vitesse d'agitation.
- Le pH.
- Le taux d'oxygène dissous.
- Le potentiel RedOx
- La nature et les débits de gaz à l'entrée et/ou en sortie de réacteur.

Ces capteurs transmettent les données mesurées à l'unité de commande, le plus souvent, celle-ci comporte pour le paramètre étudié une électronique de régulation, c'est-à-dire un système "intelligent" qui va agir pour maintenir la variable à une valeur prédéfinie [28].

Quel que soit le type de micro-organismes, le bioréacteur doit permettre un contact aussi bon que possible entre les deux phases, biotique et abiotique du système.

Le bon déroulement du procédé, selon l'allure cinétique optimale, est lié aux phénomènes de transfert entre les cellules et le milieu de culture. Il s'agit tout d'abord de transfert de matières, du milieu extérieur vers la cellule pour ce qui est du substrat et des composés du milieu de culture nécessaires à la croissance cellulaire, en sens inverse pour les produits du métabolisme. Pour que les transferts puissent s'effectuer correctement, la répartition des cellules dans le milieu de culture doit être la meilleure possible.

Une caractéristique très importante du bioréacteur, dans le cas de processus aérobies, est sa capacité de transférer, à la biomasse microbienne qu'il contient, la quantité d'oxygène dont elle a besoin.

Le bioréacteur doit faciliter les transferts de chaleur, du milieu vers les cellules, tout d'abord, puis à l'inverse au fur et à mesure que la croissance cellulaire se produit. La répartition homogène des cellules dans le milieu évite alors tout phénomène de surchauffe locale dangereuse étant donné la sensibilité à la chaleur du processus

❖ Préparation d'une culture et pré culture :

Un ensemencement dans un bouillon nutritif est effectué, il est mis en incubation durant 48h à 37°C, c'est la pré culture, ensuite on introduit le bouillon riche en bactéries dans un milieu liquide adéquat qui est alors maintenu à la température optimale de croissance de l'espèce. A intervalles réguliers, on prélève un petit volume du milieu et on fait le dénombrement des cellules qu'il contient. De cette façon, on peut suivre le développement d'une population, c'est-à-dire l'augmentation du nombre de cellules avec le temps.

En portant le nombre de cellules en fonction du temps, on obtient une courbe de croissance qui, pour une espèce donnée, mise dans des conditions données, prend une forme caractéristique.

En faisant croître des bactéries dans un milieu, on réalise une culture. Une culture est donc un milieu liquide contenant les bactéries qui s'y sont développées (ou qui s'y développent encore) [29].

### II.3- La croissance bactérienne

Dans une population bactérienne, toutes les cellules ne se divisent pas de manière synchrone et la croissance s'effectue de façon continue. Dans un milieu non renouvelé, la croissance des bactéries est limitée par l'épuisement du milieu en nutriments. La cinétique de la croissance peut être établie expérimentalement en mesurant les variations de la masse bactérienne ( $X$ ) en fonction du temps ( $t$ ) (Figure II-1). La vitesse de croissance par unité de temps est proportionnelle à la masse bactérienne présente au temps  $t$ . Le coefficient de proportionnalité, désigné par  $\mu$ , est nommé taux de croissance [30].

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide pour plus de simplicité. Il existe six phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance [31]:

- a) **La phase de latence** : elle correspond à une période d'adaptation de la bactérie au milieu nutritif proposé. Le taux de croissance est nul ( $\mu = 0$ ). La durée de cette phase dépend de l'espèce bactérienne, de la quantité d'inoculum introduit dans le milieu, de l'état physiologique des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes nécessaires pour l'utilisation du substrat. Il n'y a pas de division cellulaire :  
 $\mu = 0$
- b) **La phase d'accélération** : les divisions cellulaires commencent et il se produit une augmentation de la vitesse de croissance.
- c) **La phase exponentielle** : les bactéries se multiplient sans entrave. La mortalité est faible, voire nulle. C'est la croissance exponentielle : le taux de croissance atteint un maximum  $\mu = \mu_{\max}$ . La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).  $\mu_{\max}$ , est constant et maximal. La valeur de  $\mu_{\max}$  varie selon les microorganismes et les conditions de milieu (composition milieu, pH, température, activité de l'eau...).

$$\log \frac{X}{X_0} = \frac{\mu t}{2,3}$$

Figure II. 1 : Equation de la courbe de croissance [23].

- d) **La phase de ralentissement** : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation de produits d'excrétion du métabolisme, déchets dont certains peuvent être inhibiteurs. Il existe un début d'autolyse des bactéries.  $\mu$  diminue.
- e) **La phase stationnaire** : le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ), les bactéries qui se multiplient compensent celles qui disparaissent par lyse cellulaire. La capacité limite du milieu est atteinte. Le taux de mortalité annule le taux de croissance. La croissance apparaît nulle.
- f) **La phase de déclin** : elle correspond à une période où les bactéries ne se divisent plus. Le taux de mortalité augmente. Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire.



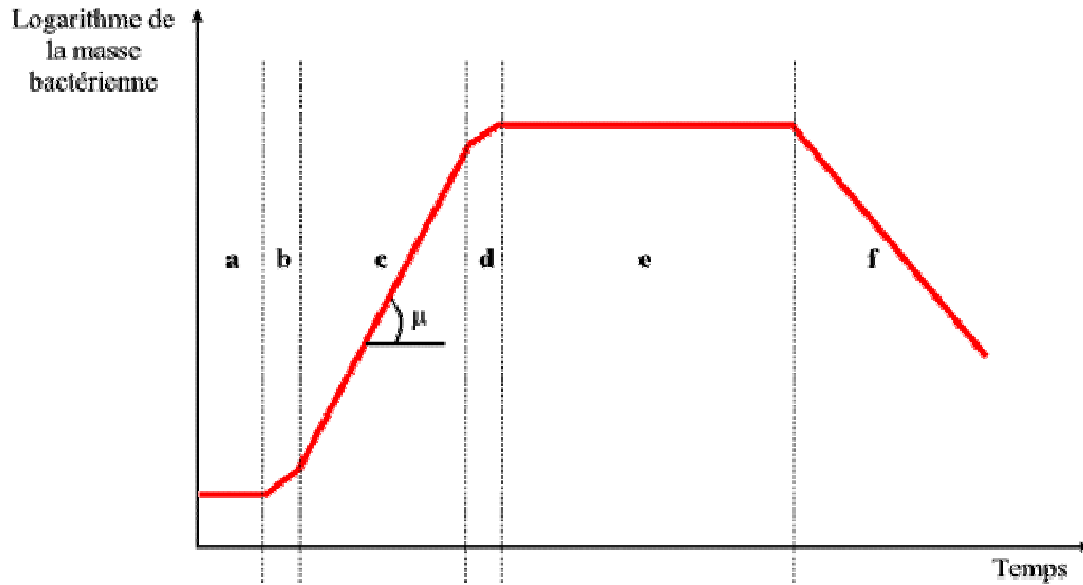


Figure II. 2: Courbe de croissance en milieu non renouvelé [30].

a : phase de latence
b : phase d'accélération
c : phase exponentielle
d : phase de ralentissement
e : phase stationnaire
f : phase de déclin

#### II.4-Généralités sur les *pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* peuvent être définies par [32]:

- Bâtonnets droits ou incurvés, de 0,5  $\mu\text{m}$  à 1  $\mu\text{m}$  sur 1,5  $\mu\text{m}$  à 4  $\mu\text{m}$
- Mobiles grâce à des flagelles polaires.
- Chimioorganotrophe.
- Aérobie strictes.
- Espèce type : *pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie gram négatif sous forme de bâtonnet mesurant 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  par 1,5 à 3,0  $\mu\text{m}$ . Elle est mobile grâce à des flagelles. Son métabolisme respiratoire est aérobie strict jamais fermentatif.

C'est une bactérie vivant librement que l'on trouve communément dans le sol et l'eau.

Elle a des exigences nutritives très simples. Dans le laboratoire, le moyen d'expression le plus simple pour la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* se compose de l'acétate comme une source de carbone et de sulfate d'ammonium comme une source d'azote [33].

L'une des caractéristiques de l'espèce *P. aeruginosa* est la production d'un pigment bleu ou pyocynine [34].

*P. aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste majeure responsable essentiellement d'infections acquises à l'hôpital et en général de traitement difficile que sont les pneumonies, et les infections urinaires [35].

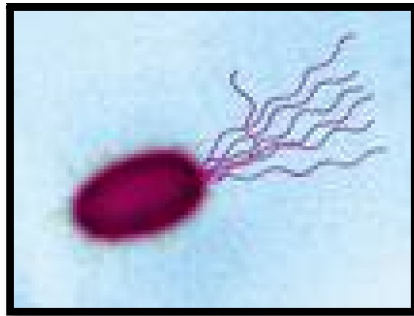


Figure II. 3 : *P.aeruginosa* au microscope électronique à balayage [50].

## **Chapitre III : Description des techniques d'analyses utilisées**

### III.1-Spectroscopie UV-VIS

L'absorption d'un rayonnement dans le domaine spectral UV-VISIBLE (180-800 nm) correspond à une excitation des électrons c.-à-d. une transition d'un état stable à un état moins stable, d'énergie plus élevée qu'à l'état fondamental et les spectres qui en résultent sont appelés spectres électroniques [36].

La figure III-1 illustre le domaine du spectre électromagnétique.

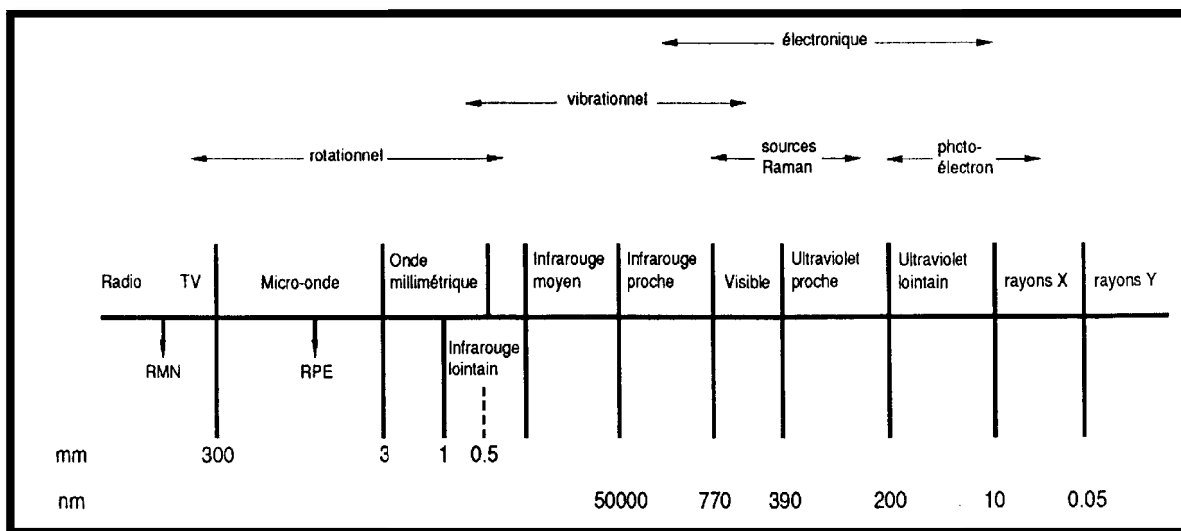


Figure III. 1 : Domaine du spectre électromagnétique [37].

C'est une technique de spectroscopie dont le domaine spectral est divisé en trois plages appelées proche UV (185-400 nm), visible : (400-700 nm) et très proche infrarouge (700-1 100 nm), cette technique apporte peu d'informations structurales, mais en revanche, elle permet beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs de concentration dans ce domaine, par application de la loi de Beer - Lambert, constituent la base de la méthode connue sous le terme général de colorimétrie [38].

La loi de Beer et Lambert relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution ; son principe est expliqué ci-dessous :

Soit un rayon lumineux traversant une solution absorbante de concentration  $C$  et de trajet optique égal à  $l$ . Si  $I_0$  est l'intensité du rayon lumineux à l'entrée de la solution et  $I$  son intensité à la sortie, alors [39] :

$$A = D.O = \log (I_0 / I) = \epsilon l C$$

Figure III. 2: Loi de Beer Lambert

**A** : l'absorbance.

**D.O** : la densité optique.

**I<sub>0</sub>** : l'intensité lumineuse incidente.

**I** : l'intensité lumineuse transmise.

**ε**: le coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée a une longueur d'onde donnée en L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

**l** : l'épaisseur traversée en cm.

**C** : la concentration en mol.L<sup>-1</sup>.

Cette loi n'est valable que pour les solutions diluées [36].

La figure III-2 illustre le schéma de principe d'un spectrophotomètre uv-visible mono faisceau.

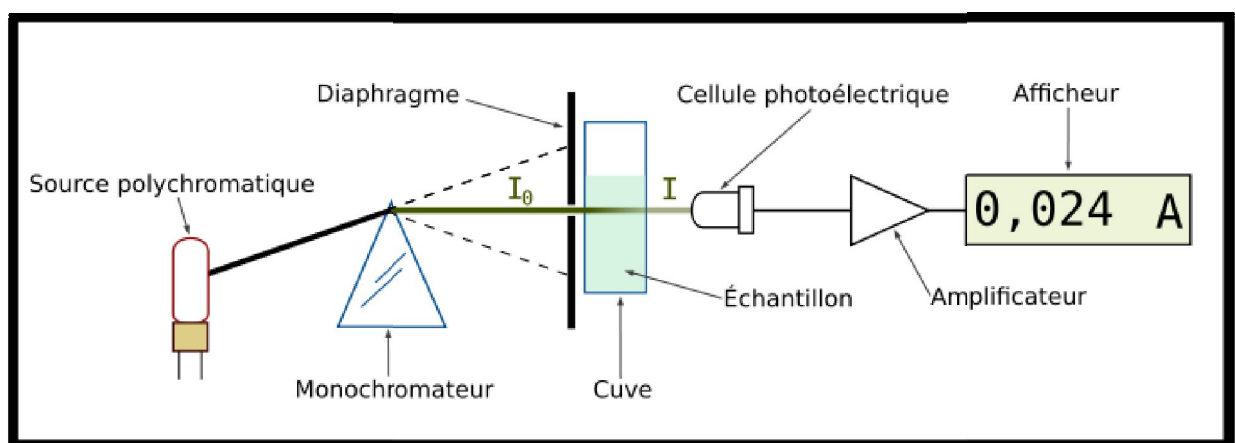
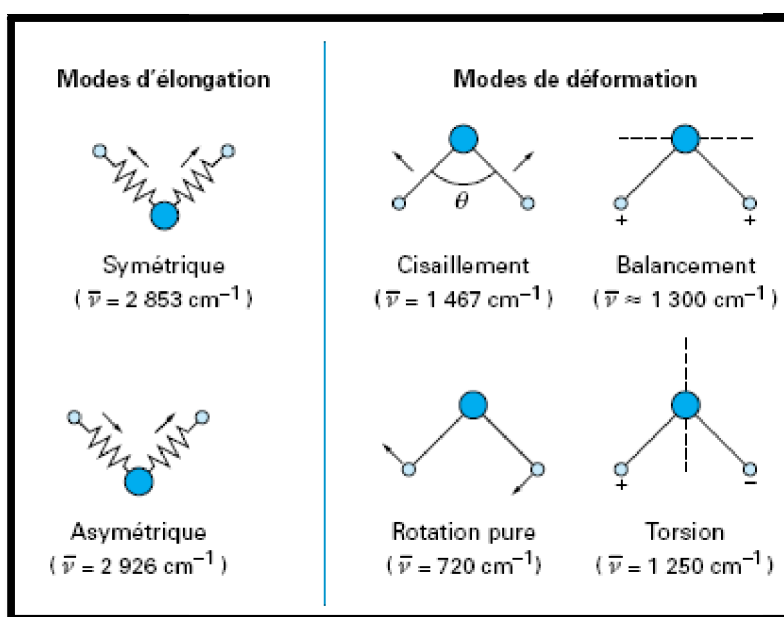


Figure III. 3: Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau [40].

### III.2-Spectroscopie infra rouge

Une molécule n'est pas un ensemble rigide d'atomes mais ressemble à un ensemble de boules reliées par des ressorts qui représentent les liaisons chimiques, ces ressorts ne sont pas rigides mais occupent des positions d'équilibre autour desquels des vibrations sont possible.

Au cours de ces vibrations, les liaisons connaissent un faible allongement ou bien se déforment. (Figure III .4)



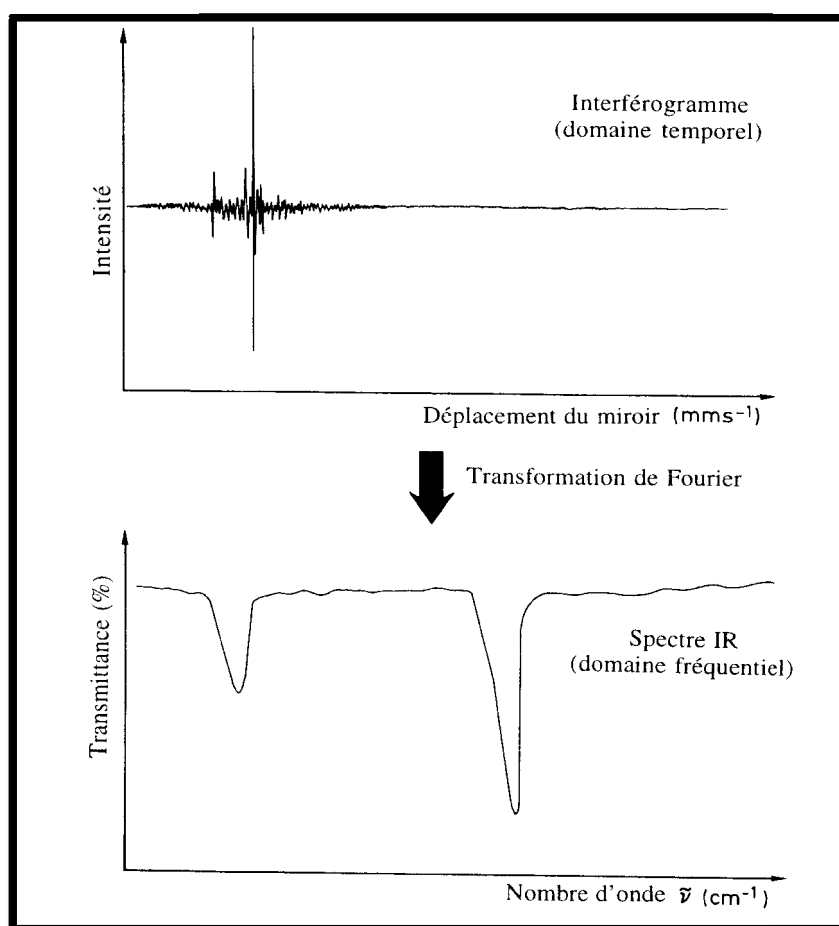
**Figure III. 4 : Modes de vibration : exemple des vibrations localisées du groupement CH2 d'une molécule [48].**

Si une molécule reçoit une lumière infra rouge, elle absorbe de l'énergie et l'amplitude de ces vibrations est amplifiée, le retour à l'état fondamental libère de l'énergie sous forme de chaleur (ce mécanisme n'a lieu que si la molécule possède un moment dipolaire).

De nombreux groupements fonctionnels de molécules organiques présentent ainsi des vibrations caractéristiques, qui correspondent aux bandes d'absorption dans les régions définies du spectre IR [41].

Ces vibrations moléculaires sont essentiellement localisées dans les groupements fonctionnels mais n'atteignent pas le reste de la molécule, de tels groupements fonctionnels peuvent ainsi être identifiés par leurs bandes d'adsorption [42].

Le principe de base du spectromètre infrarouge à transformée de Fourier est la saisie simultanée de toutes les fréquences du spectre IR dans le détecteur qui rend superflu le scan des longueurs d'onde qui nécessitait du temps. Cela est possible en transformant, grâce à un interféromètre, le rayonnement de la source lumineuse multifréquencielle et d'intensité égale dans le temps en un interférogramme, qui n'est pas une fonction de la fréquence mais du temps (ce qui signifie une transformation du *domaine des fréquences* en *domaine des temps*). Après traversée par le rayonnement ainsi « préparé » de l'échantillon, l'interférogramme est à nouveau traduit en un spectre (donc dans le domaine des fréquences) par une opération mathématique appelée transformée de Fourier [42].



**Figure III. 5 : Passage de l'interférogramme au spectre IR par transformation de Fourier [42].**

Les spectromètres infrarouges à transformée de Fourier correspondent à un montage simple faisceau qui comporte comme pièce essentielle un interféromètre — souvent de type Michelson — placé entre la source et l'échantillon. (Figure III.5)

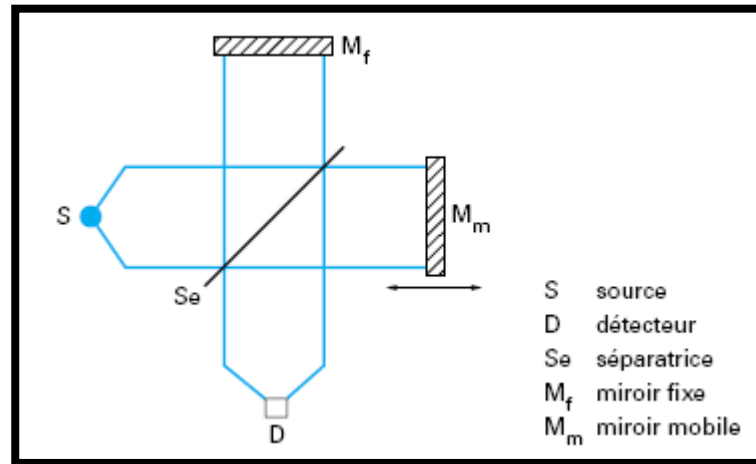


Figure III. 6: Schéma d'un interféromètre de Michelson [48].

Les radiations émanant de la source viennent frapper une *séparatrice*. Ce dispositif permet de générer deux faisceaux dont l'un se dirige vers un miroir fixe et l'autre vers un miroir mobile dont on fait varier la distance.

Ces deux faisceaux, recombinaés ensuite sur le même trajet, traversent l'échantillon avant de venir frapper le détecteur qui mesure l'intensité lumineuse globalement reçue [43].

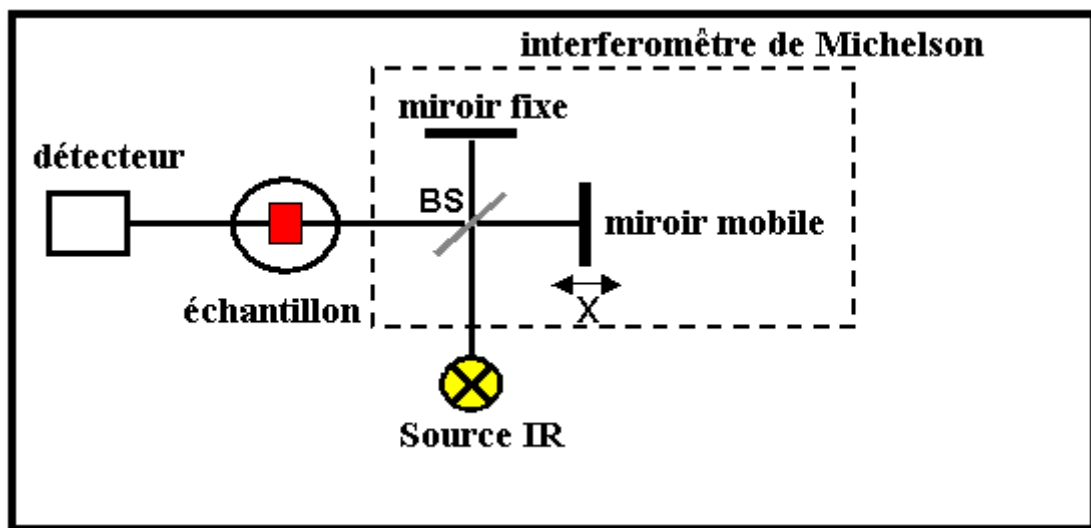


Figure III. 7: Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier [44].



## **Chapitre IV : Matériels et modes opératoires**

## IV.1- Matériels

### IV.1.1- Matériel biologique

La bactérie utilisée dans ce travail est la *Pseudomonas aeruginosa* fournie par l'Institut PASTEUR d'Alger, elle est conservée au réfrigérateur à une température de 4°C.

### IV.1.2- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un milieu minéral liquide contenant le di octyl phtalate et le di isononyle adipate comme unique source de carbone et des éléments minéraux indispensables à la croissance des *Pseudomonas aeruginosa*.

La composition de ce milieu pour 1l d'eau distillée est la suivante [45]

- 5.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 4.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,
- 2g  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ,
- 0.16 g  $\text{MgCl}_2$ ,
- 20 mg  $\text{CaCl}_2$ ,
- 2.4mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,
- 1.8mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,
- 1.5 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Le milieu de culture contenant le DOP comme substrat sera noté par milieu 1 et celui contenant le DINA par milieu 2.

## IV.1.3- Appareillages :

Tableau IV. 1 : Matériel utilisé

Matériels	Type
Agitateur	IKA labortechnik Yellow line
Balance	KERN de precision 0,0001g
Spectroscopie infrarouge	JASCO-V-530
Spectrophotomètre Uv-Visible	Anthelie light , SECOMAM
Autoclave	HiClave , HV 25l
Filtre stérilisant (0,45µm)	Sartorius, Minisart
Etuve	MEMMERT
Centrifugeuse	MIKRO 22R HETTICH
Pompe à air	Shark RS-510

## IV.2- Produits utilisés :

## IV.2 .1- Di octyl phtalate :

C'est un produit fourni par la Société Générale des Plastifiants –SGP (Tunisie), sa formule chimique est donnée dans le schéma IV.2 et ses propriétés physico-chimiques sont regroupées dans le tableau IV.3

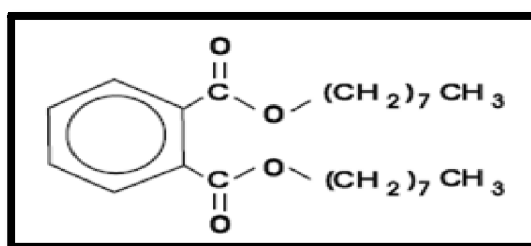


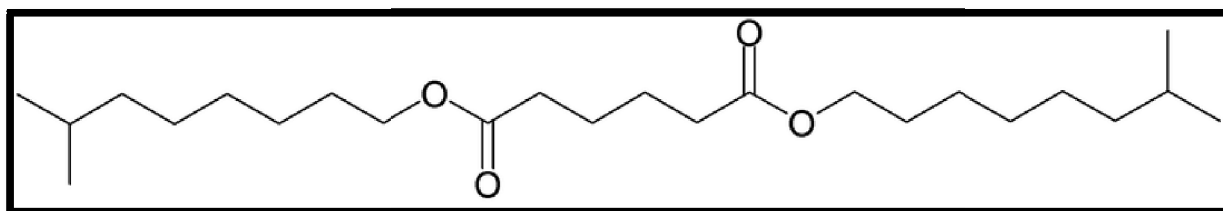
Schéma IV. 1: Structure chimique du DOP [11].

**Tableau IV. 2 : Propriétés physico-chimiques du DOP [5].**

Apparence	Liquide huileux et visqueux, incolore, inodore
Masse moléculaire	390,56
Densité :	0,9861 g/ml à 20 °C
Solubilité dans l'eau	: 0,0003 g/l à 20 °C
Point de fusion :	-46,00 °C
Point d'ébullition :	385,00 °C

#### IV.2 .2- Di isononyle adipate

C'est un produit de la société générale des plastifiants (Tunisie), sa formule est donnée dans le schéma IV-2 et ses propriétés physico-chimiques sont regroupées dans le tableau IV-3.

**Schéma IV. 2: Structure chimique du DINA [48].****Tableau IV. 3 : Propriétés physico chimiques du DINA [48].**

Apparence	Liquide clair
Formule chimique	$C_9H_{19}OOC(CH_2)_4COOC_9H_{19}$
Masse moléculaire	398,63 g/mole
Densité	0,922 g/ml à 20°C
Solubilité dans l'eau	Insoluble
Point de fusion	-65 °C
Point d'ébullition	235 °C

### IV.3- Dispositif expérimental :

Le dispositif expérimental est constitué de :

- Un erlenmeyer de 1l en guise de cuve.
- Un agitateur magnétique muni d'un thermocouple pour maintenir et réguler si nécessaire la température et l'agitation.
- Une seringue avec cathéter pour les prélèvements.
- Une pompe d'injection d'air.
- Un bain marie dans lequel est placé l'erlenmeyer contenant le milieu de culture

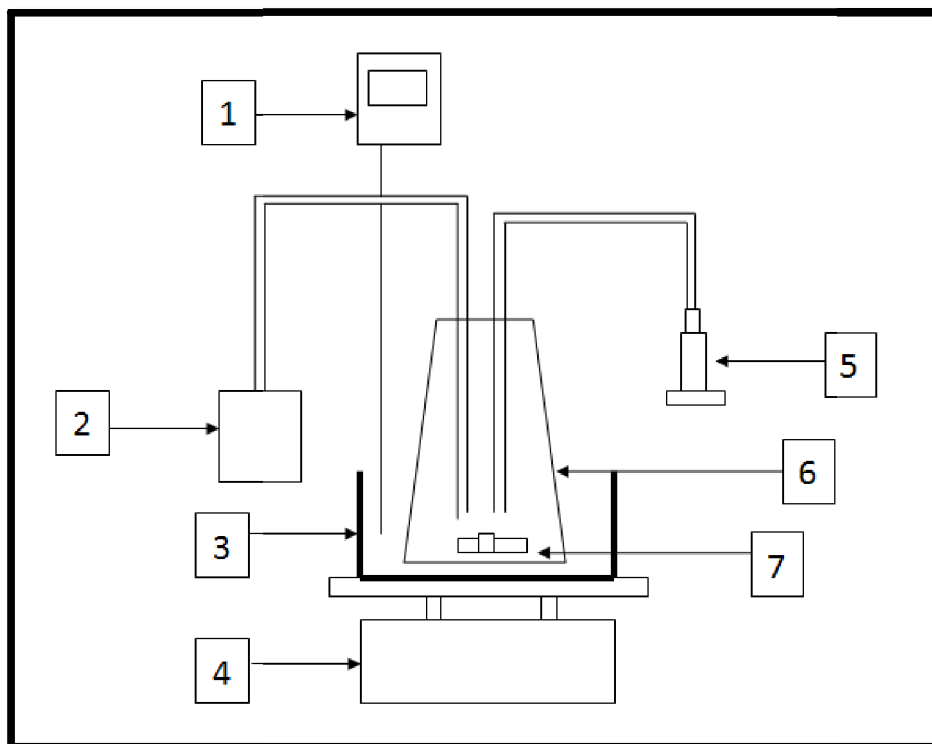


Figure IV. 1: Schéma du dispositif expérimental.

1. Thermocouple
2. Diffuseur d'air
3. Bain marie
4. Agitateur
5. Seringue avec cathéter
6. Bioréacteur
7. Barreau magnétique

### IV.3.1- Préparation de la pré culture

- Prélever des colonies de *P.aeruginosa* d'un tube de conservation à l'aide d'une pipette pasteur stérile.
- Ensemencer dans deux tubes de bouillon nutritif de 10 ml.
- Incuber 48h à 37°C, l'apparition d'un trouble indique la présence de croissance bactérienne.
- Un tube du bouillon servira d'inoculum et l'autre servira à lire la densité optique à 600 nm.

### IV.3.2 Préparation du batch

- stériliser 2 erlenmeyers de 1l contenant chacun 1 litre du milieu de culture et le plastifiant (L'un de 0,11 g de DOP et l'autre de 0,10 g de DINA).
- Ajouter l'inoculum qui est de 1%.
- fixer les conditions opératoires : température de 37°C, faible agitation. aération de 0,1 l/mn d'O<sub>2</sub>.

## IV.4 –Mode opératoire

### IV.4.1- Mesure de la croissance microbienne

La mesure de la biomasse cellulaire la plus simple, la rapide et donc la plus utilisée au laboratoire est la turbidimétrie [25]. Cette méthode nécessite l'emploi d'un spectrophotomètre UV-VISIBLE réglé à une longueur d'onde de 600 nm.

Il y a lieu de procéder à des prélèvements à des intervalles réguliers après homogénéisation du milieu et de mesurer la D.O.

La valeur de la DO est ensuite convertie en poids cellulaire sec par le biais d'une courbe d'étalonnage présentée dans la figure IV2 [36].

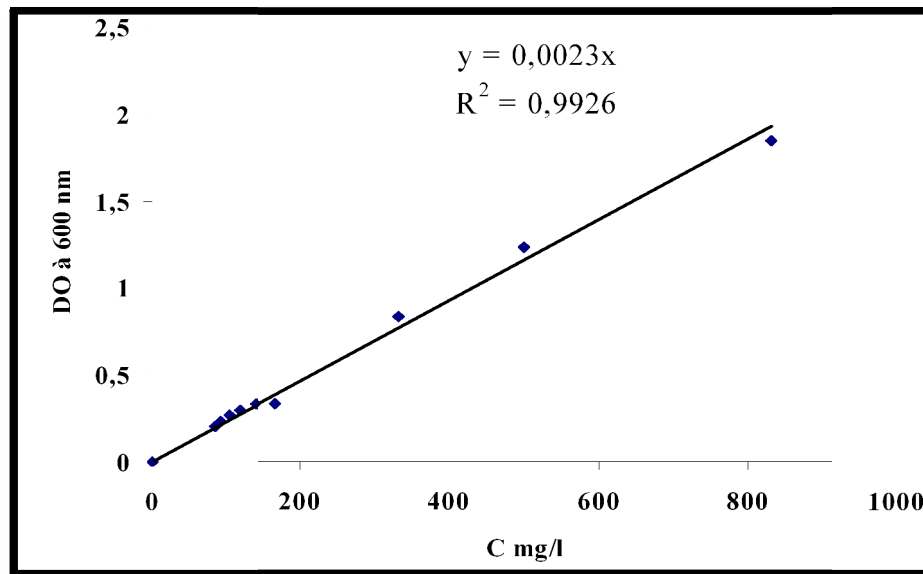


Figure IV. 2 : Courbe d'étalonnage de la croissance bactérienne [36].

#### IV.4.2 Mesure de la biodégradation des plastifiants

L'échantillon servant à mesurer la croissance bactérienne est centrifugé durant 20 mn à une vitesse de 6000 tours /mn puis analysé avec un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  et un nombre de balayages égal à 120 grâce à la technique du KBR.

## **Chapitre V : Résultats et discussion**



## V.1- Caractérisation préliminaire des plastifiants par la spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier

### V.1.1- Le dioctyl phtalate (DOP) :

La figure V.1 représente le spectre infra rouge du plastifiant DOP et le tableau V.1 regroupe les principales bandes caractéristiques de ce dernier [42 ,49].

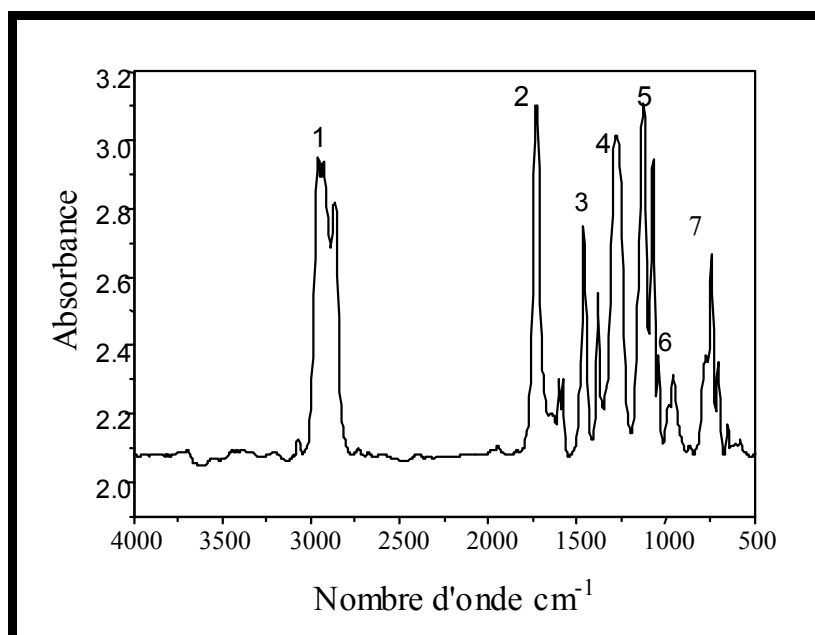


Figure V. 1: Spectre infrarouge de di- octyl phtalate (DOP) [42,49]

Tableau V. 1: Groupements fonctionnels caractéristiques du di- octyle phtalate (DOP) [42,49].

N°	Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Mode de vibration et attribution
1	2937 – 2863	Elongation de C-H
2	1722	COO (ester)
3	1468 – 1384	Déformation –C-H ( $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ )
4	1271	Elongation –C-O
5	1121	Elongation –C-O
6	960	Déformation –CH=CH-
7	742	Déformation $(\text{CH}_2)_n$ , $n > 4$

### V.1.2 : Le di isononyle adipate (DINA) :

Le spectre infra rouge du DINA est représentée par la figure V.2. Le tableau V.2 résume les principaux groupements caractéristiques du plastifiant.

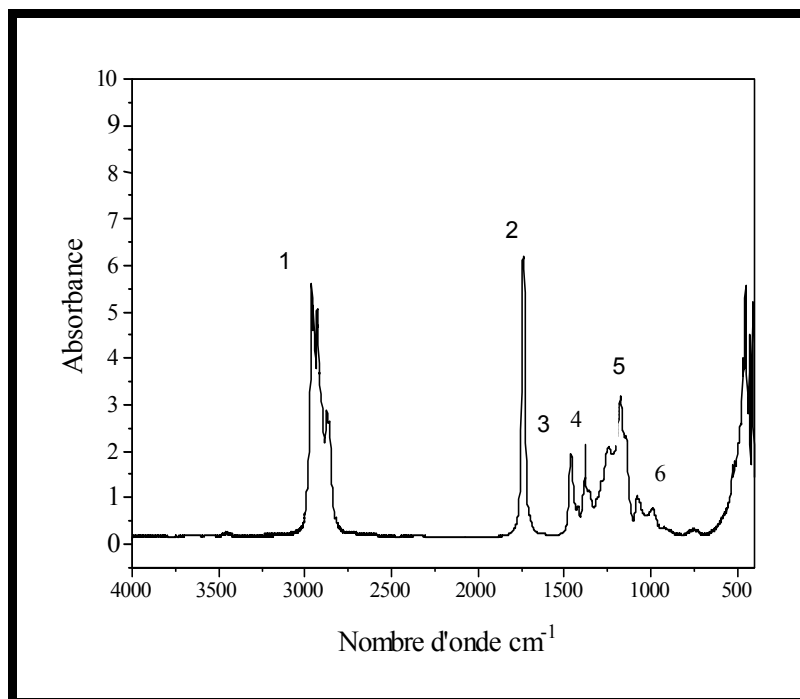


Figure V. 2: Spectre infrarouge de di- iso nonyle adipate (DINA) [42 ,49].

Tableau V. 2: Groupements fonctionnels caractéristiques du di- iso nonyle adipate (DINA) [42,49].

N°	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Mode de vibration et attribution
1	2937 – 2863	Elongation de C-H
2	1722	COO (ester)
3	1468 – 1384	Déformation –C-H (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> )
4	1379	-CH <sub>3</sub> (méthylène)
5	1172	-C-O (ester), -CH <sub>2</sub> -
6	989	Déformation des CH <sub>2</sub>

### V.2- Spectres infra rouge des échantillons témoins :

La figure ci-dessous représente les spectres infra rouges des échantillons témoins du milieu 1 et 2.

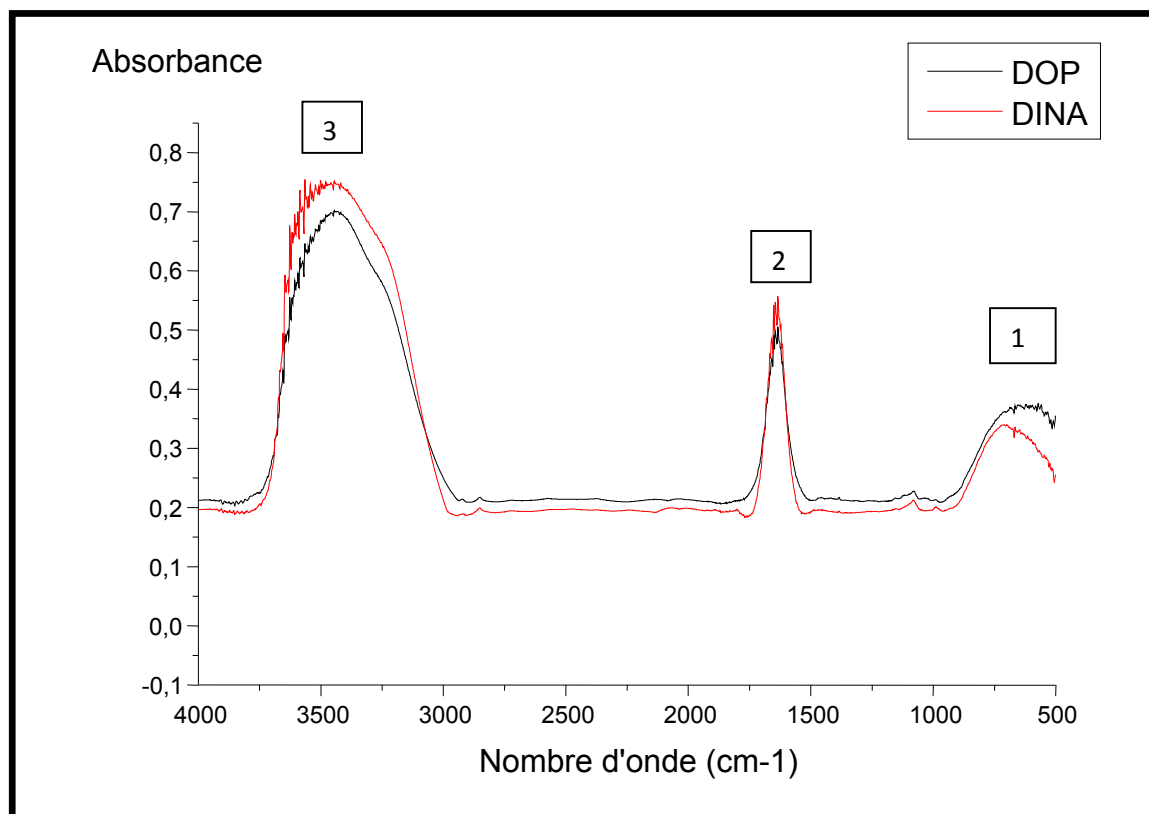


Figure V. 3: Spectres infra rouges des échantillons témoins.

Nous remarquons l'existence de trois pics :

1. La bande n°1 est observé aux environs de  $640\text{ cm}^{-1}$  et représente la déformation  $(\text{CH}_2)_n$ ,  $n > 4$  des plastifiants .
2. La bande n°2 est observée aux environs de  $1650\text{ cm}^{-1}$  et représente la fonction ester  $\text{COO}$  liée aux plastifiants.
3. La bande n°3 est observée aux environs  $3500\text{ cm}^{-1}$  représente la fonction  $\text{OH}$ .

On remarque aisément la différence entre ces spectres et ceux des plastifiants bruts.

En effet les spectres infrarouge représentés par les figures V.1 et V.2, ne présentent pas les même bandes caractéristiques :

La bande de déformation de la fonction  $(\text{CH}_2)_n$ ,  $n > 4$  se situe à  $742\text{ cm}^{-1}$  [49].

Le pic représentant la fonction ester se situe à  $1722\text{ cm}^{-1}$  [49].

Et entre  $2937$  et  $2863\text{ cm}^{-1}$  on trouve une bande qui représente l'élongation de C-H [49].

Nous observons que les deux bandes représentant la fonction ester et la déformation  $\text{CH}_2$  sont décalées dans les spectres des échantillons par rapport aux spectres des produits purs.

La bande d'élongation C-H n'apparaît pas car elle a été masquée par une large bande due à la présence de la fonction OH.

Ces modifications sont dues à la présence du groupement OH de l'eau qui crée des interactions de type liaisons hydrogènes avec les groupes carbonyles des plastifiants.

Il est connu que la liaison hydrogène diminue la fréquence d'adsorption [49].

### V.3- Evolution de l'absorbance des groupements fonctionnels des plastifiants :

Les figures V.4 et V.5 représentent respectivement l'évolution de l'absorbance des groupements ester et  $\text{CH}_2$  liés aux plastifiants en fonction du temps de biodégradation.

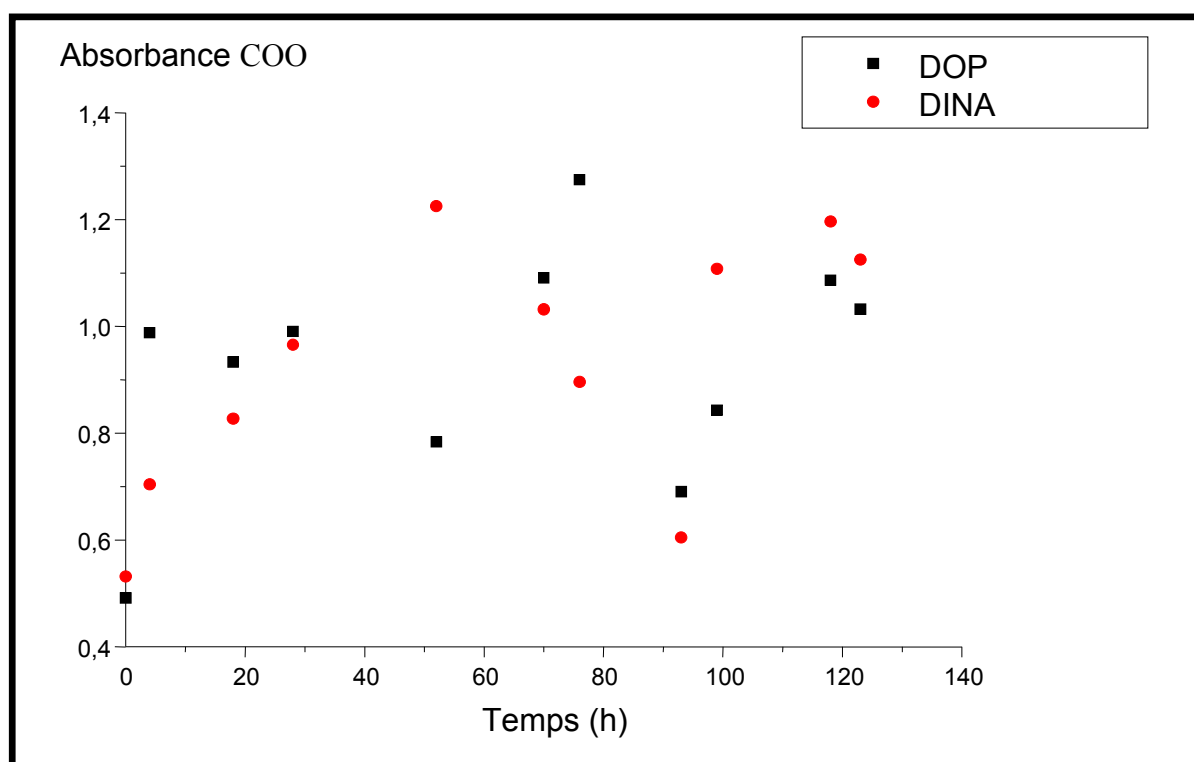
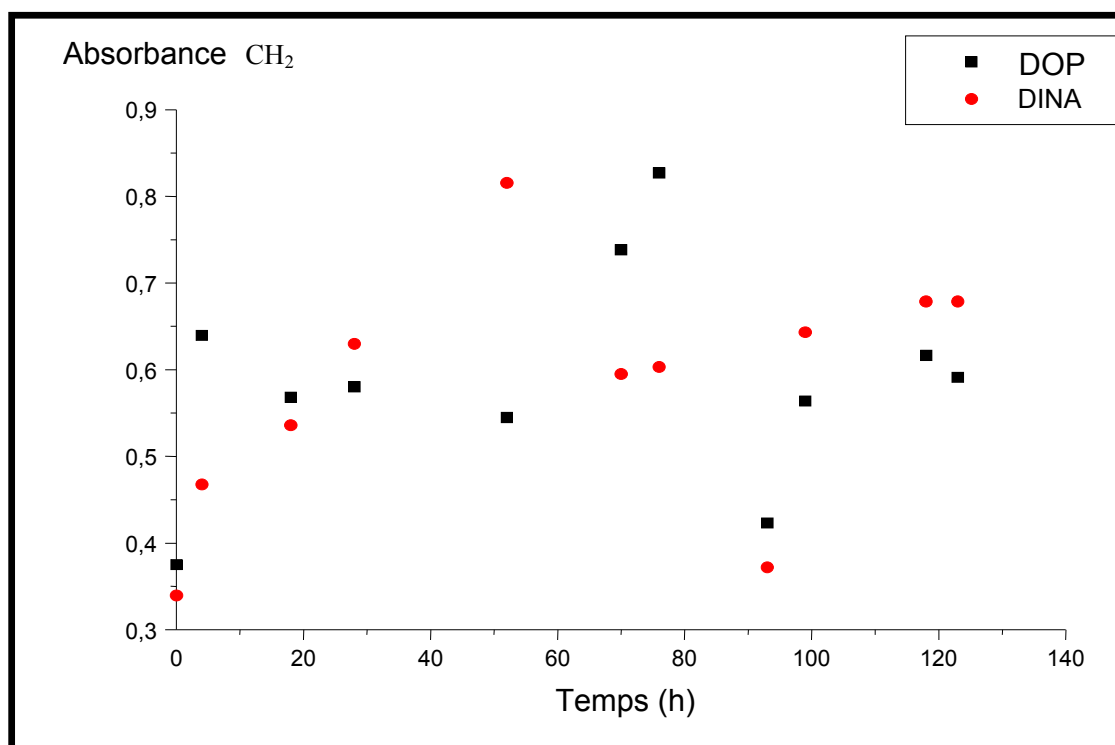


Figure V. 4: Evolution de l'absorbance de la bande caractéristique de la fonction ester des deux plastifiants en fonction du temps de biodégradation.



**Figure V. 5: Evolution de l'absorbance de la bande caractéristique du groupement CH<sub>2</sub> des deux plastifiants.**

On constate que les absorbances des bandes caractéristiques augmentent et diminuent en fonction du temps

L'augmentation de ces absorbances est plus importante durant les 50 premières heures pour les échantillons contenant le DINA, cette augmentation est due à la formation de nouveaux métabolites liés à la biodégradation des plastifiants

Cette augmentation est plus élevée après 50h, pour les échantillons contenant le DOP, ce qui nous permet de dire que la biodégradation du DOP est plus lente par rapport à la biodégradation du DINA.

Cette différence est liée directement à la structure chimique des deux plastifiants.

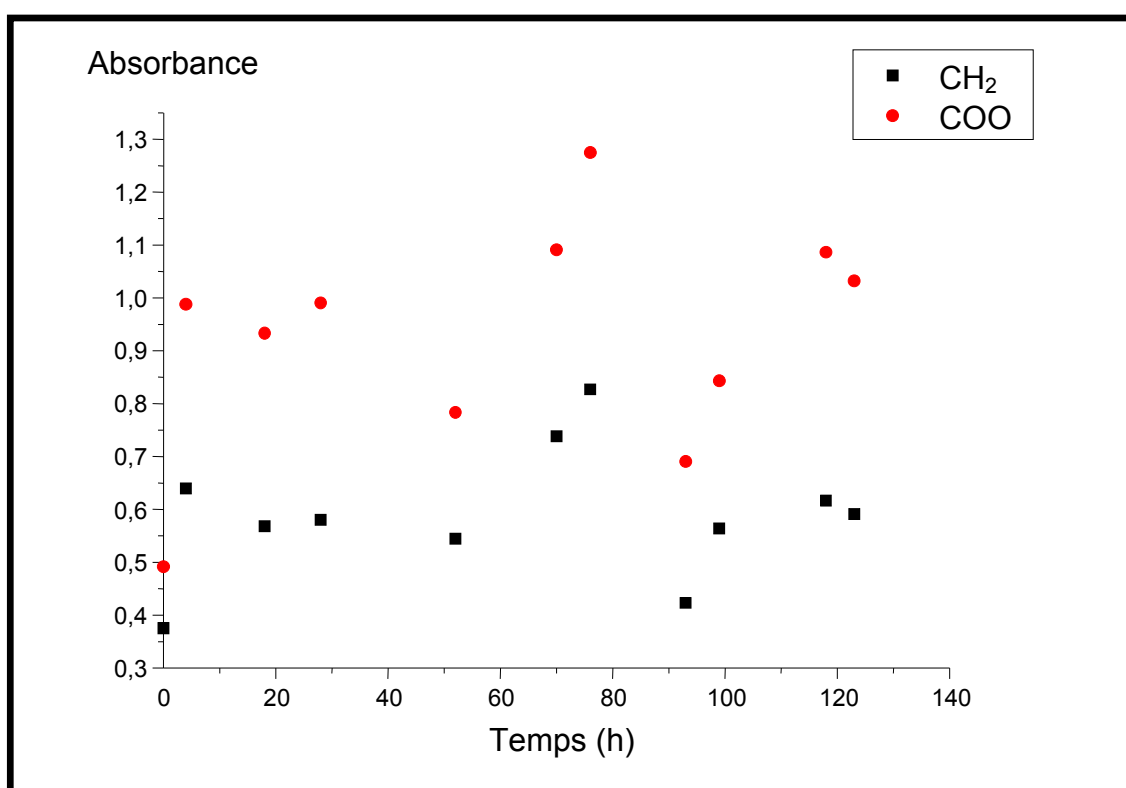
En effet, les phtalates à chaînes longues et qui contiennent un noyau aromatique ne sont que partiellement biodégradables.

En revanche le DINA possède une structure linéaire, il est biodégradable par rapport aux phtalates [1] par la suite on constate une diminution et augmentation des absorbances qui

peut être expliquée par la biodégradation des métabolites eux même et la formation d'autre nouveau métabolites.

Les figures V.6 et V.7 illustrent les variations des bandes caractéristiques des deux plastifiants en fonction du temps.

L'allure globale des courbes est similaire et les mêmes fluctuations sont observées, ce qui peut s'expliquer par la présence des métabolites liés à la biodégradation des deux plastifiants. Deux plus, les deux courbes sont similaires, ce qui veut dire que les deux bandes caractéristique évoluent de la même manière.



**Figure V. 6 : Evolution de l'absorbance des bandes caractéristiques en fonction du temps pour le DOP**

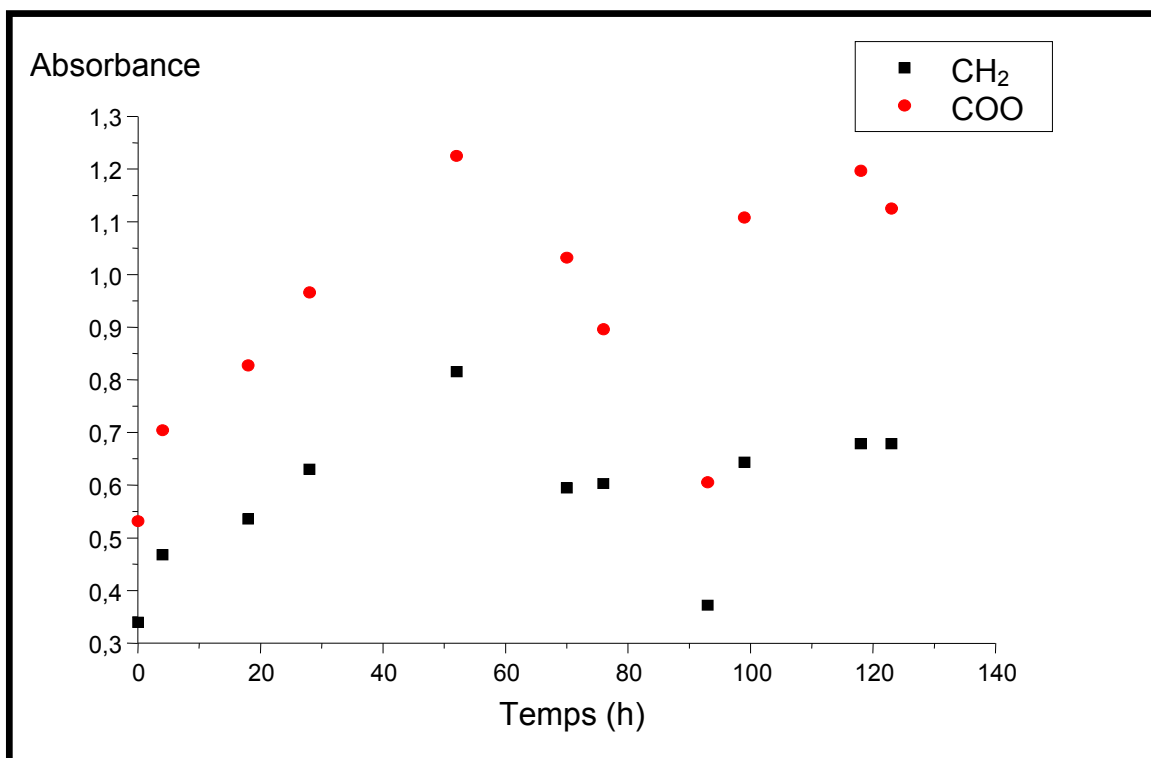


Figure V. 7 : Evolution de l'absorbance des bandes caractéristiques en fonction du temps pour le DINA

#### V.4-Courbes de croissance

Le graphe ci-dessous représente les courbes de croissance de *P. aeruginosa* dans les milieux 1 et 2.

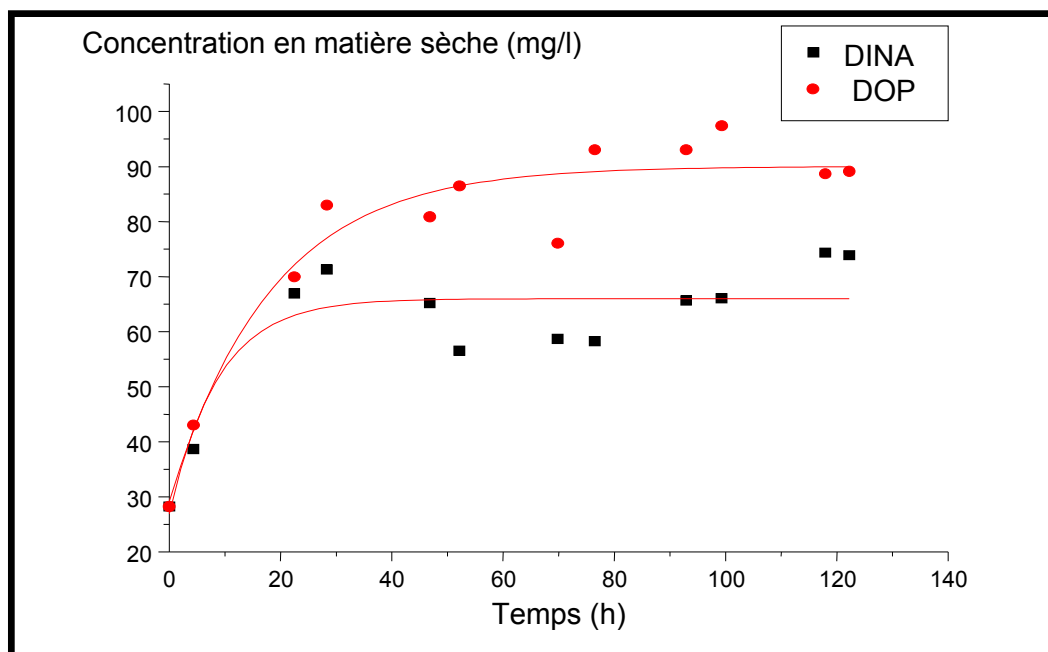


Figure V. 8: Courbes de croissance dans les milieux 1 et 2.

Nous remarquons que les courbes ne correspondent pas parfaitement à la courbe de croissance bactérienne évoquée précédemment.

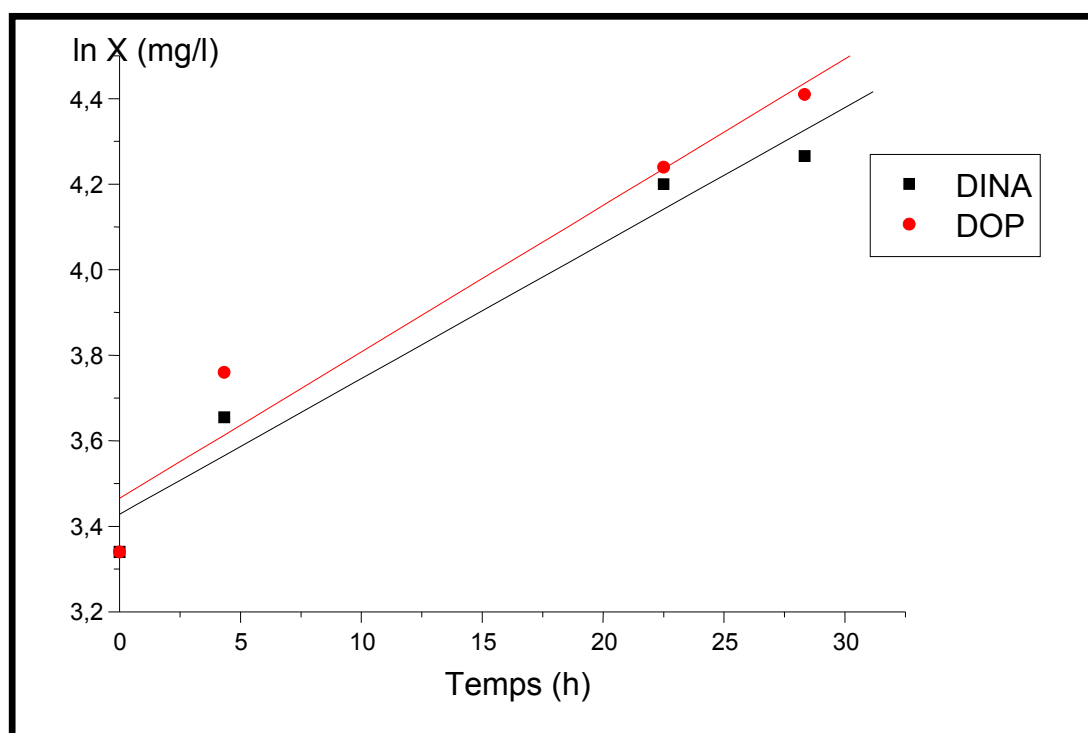
On observe trois phases distinctes :

La phase exponentielle, la phase de ralentissement et la phase stationnaire

La phase de latence n'a pas pu être déterminée en raison de l'absence de prélèvements nécessaires.

Durant la phase exponentielle, les bactéries se multiplient sans entrave, cette phase est plus longue dans le milieu 1 que dans le milieu 2. En effet, pour le milieu 1, elle dure 22h et pour le milieu 2 elle dure 9h, cette phase correspond à l'étape de dégradation des plastifiants la plus active, elle dure tant que le substrat et les éléments nutritifs sont présents.

Le taux de croissance calculé à partir des pentes de la figure V.9 est de 0,034 mg/l\*h pour le milieu 1 et de 0,031 mg/l\*h pour le milieu 2.



**Figure V. 9: Graphe représentant la phase exponentielle**

Ensuite les bactéries entrent dans la phase de ralentissement où la vitesse de croissance régresse à cause de l'épuisement des substrats et l'accumulation de



déchets , la concentration en biomasse atteint les 86mg /l pour le milieu 1 et 63mg/l pour le milieu 2 après une incubation qui dure 52h et 24h respectivement.

Au delà de 24 h pour le milieu 2 et 52 h pour le milieu 1, on a apparition d'un palier qui caractérise la phase stationnaire dans laquelle la capacité limite des milieux est atteinte, Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui disparaissent par lyse cellulaire donc le taux de mortalité annule le taux de croissance. La croissance apparaît nulle.

Dans cette phase les concentrations bactérienne atteignent leurs valeurs maximales, elles sont de 89,5 mg/l pour le milieu 1 et de 68 mg/l pour le milieu 2. La finalité des traitements biologiques est d'éliminer la pollution organique au moyen de micro-organisme, des bactéries principalement.

Les micro-organismes hétérotrophes, utilisent la matière organique comme source de carbone et d'énergie, matière qui est en partie éliminée sous forme gazeuse lors de minéralisation du carbone avec production de CO<sub>2</sub> dans les procédés aérobies et de biogaz (CO<sub>2</sub>+CH<sub>4</sub>) dans les procédés anaérobies.

# Conclusion

Cette étude a montré qu'il y a eu effectivement une biodégradation des deux plastifiants considérés mise en évidence par les variations des absorbances des bandes caractéristiques en fonction du temps. Ces variations sont liées aux métabolites des deux plastifiants.

Ainsi, les deux plastifiants sont biodégradable et le DINA peut être utilisée remplacement du DOP.

Comme perspectives, ce travail peut être approfondi en :

- Utilisant d'autres techniques d'analyses, en complément à la spectroscopie infrarouge, afin d'identifier les métabolites par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse.
- Il y a lieu également d'utiliser différentes concentrations de plastifiants qui pourraient s'avérer très utiles et cela pour suivre les différentes valeurs de l'absorbance des groupements fonctionnels, si la spectroscopie infra rouge est utilisée comme méthode d'analyse.
- De porter la durée de l'expérience à plus de sept jours en augmentant le volume du réacteur, ce qui pourrait être très utile pour obtenir la cinétique complète de biodégradation.

## Bibliographie

- [1] **LIVRE VERT** « Problèmes environnementaux du PVC », Commission des communautés européennes COM (2000) , 469, (26 juillet 2000).
- [2] **G.M.Vinhas, R.M.Souto- Maior, Y. M.B de Aimeida, B.B.Neto**, « Radiolitic dégradation of poly (vinyl chloride) systemsPolym ». Degr. & Stab., n° 86, pp 431-436 ,(2004).
- [3] **J.Stepek H.Daoust**, « Additives for plastics», Springer Verlag , New York, pp 7-33 ,(1983).
- [4] **A-M. Saillenfet, A. Laudet-Hesbert**, « Phtalates », EMC Toxicologie et Pathologie, (2005).
- [5] **N.Lardjene** « caractérisation et étude d'impacts de nouvelles formulations à base de polychlorure de vinyle », Mémoire de magister, ENP, Alger (2005).
- [6]Green Peace « greenpeace-briefing-basf».
- [7] **O. Ogunfowokan, N. Torto, A. A.Adenuga and E. K. Okoh** « Survey of level of phthalate ester plasticizers in a sewage lagoon effluent and a receiving stream », Environmental Monitoring and Assessment, pp 457-480 , ( 2005).
- [8] **J.Pelmont** « Biodégradation et métabolismes » EDP Sciences, 1ère édition, Paris, (2005).
- [9] **A. Dobraczynski**, « les matières plastique », l'usine nouvelle, tome1, Paris (1982).
- [10] **P.Verrier**, « Plastifiants », Techniques de l'ingénieur, A3231, (1992).
- [11] « **Lois canadienne sur la protection de l'environnement : Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation : Phtalate de Di-octyle** », (1993).
- [12] **R .Hauser, S .Duty, L .Godfrey-Bailey, AM .Calafat**. « Medications as a source of human exposure to phthalates», Environl Health Perspect Environl Health Perspect, n°112, pp 751-3,(2004).

- [13] **M. Biedermann, K. Grob** «GC Method for Determining Polyadipate Plasticizers in Foods: Transesterification to Dibutyl Adipate, Conversion to Migrating Polyadipate » , n° 19 ,pp 159–178, September (2006).
- [14] **WW.Huber, B .Grasl-Kraupp, R .Schulte-Hermann.** « Hepatocarcinogenic potential of di (2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk » Crit Rev Toxicol, n°26, pp 365–481, (1996).
- [15] **J .Doull, R .Cattley, C.Elcombe, BG .Lake, J .Swenberg, C.Wilkinson, et al.** « A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate » Regul Toxicol Pharmacol, n°29, pp 327–357, (1999).
- [16] **U.Heudorf, H.S .Volker, J. Angerer** « Phthalate toxicology and exposure ».
- Hyg.Environ. Health. n°210,pp 623–634,(2007).
- [17] **JJ .Adibi, FP.Perera, W.Jedrychowski , DE .Camann, D.Barr, R.Jacek, et al.** Prenatal « exposures to phthalates among women in New York city and Krakow, Poland. » Environ Health Perspect. N°111, pp 1719–22, (2003).
- [18] **N.Pant, M.Shukla, D.Kumar, Y.Shukla , N.Mathur , Y.Kumar, D.Krishna.** « Correlation of phthalate exposures with semen quality ». n° 231, pp 112-116, (2008).
- [19] **F.L. Mayer, D.L.Stalling, J.L.Johnson,** « Phthalate esters as environmental contaminants». n° 238, pp 411–413,(1972).
- [20] **GW.Bryan, PE.Gibbs, GR.Burt** « A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog whelk». J Mar Biol Assoc UK, n° 68,pp 733–744 ,(1988).
- [21] **K .Fent** « Ecotoxicology of organotin compounds». Crit Rev Toxicol, n° 26, pp 1-117 , (1996).
- [22] **J .Spengler, J.Semet, , J.McCarthy,** « Indoor Air Quality Handbook». McGraw-Hill,New York (2001).

- [23] **C-G. Bornehag, J.Sundell, C.J.Weschler, T.Sigsgaard, B.Lundgren, et al.**  
« The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case control study». *Environmental Health Perspectives*, n° 112(14), pp 1393–7, (2004).
- [24] **ADEME** « Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables Note de synthèse I, (2005).
- [25] **Prescott, Harley, Klein** « Microbiologie » 2<sup>ème</sup> édition française, De boeck, Paris, pp 1009-1012, (2003).
- [26] **R.Scriban** , « Biotechnologie » , 5<sup>ème</sup> édition .TEC et DOC, Paris, pp 835-836 (1999).
- [27] **N.Abdi** ,cours :« opérations unitaire biologique » ,ENSP ,Alger (2009).
- [28] La gazette du laboratoire n°12 novembre,(1996).  
[www.gazettelabo.com](http://www.gazettelabo.com)
- [29] **P.Singleton** « bactériologie, pour la médecine, la biologie et les biotechnologies »  
6<sup>ème</sup> Dunod, Paris, pp 243 (2005).
- [30] **J.P. Euzéby** « Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale » à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,(2007).
- [31] **A.Branger, M.M.Richer** « microbiochimie et alimentation » Educagri, Dijon, pp 111-113 (2007).
- [32] **J.Michael, Jr.Pelczar** « éléments de microbiologie » HRW, Montréal, (1982).
- [33] **K.Todar** « courses of microbiology»,University of Wisconsin Department of Bacteriology, (2004).
- [34] **P.courvalin** « antibiogramme » Eska, Paris, (2006).
- [35] **J.L.Fauchère, J.L.Avril** « Bactériologie générale et médicale » Ellipse, Paris, (2002).

[36] **O.Ali** , Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur. Mémoire de Magister, ENP.Alger,(2005).

[37] **J.M.Hollas** « spectroscopie cours et exercices », DUNOD, Paris, pp 35,(1998).

[38] **F.Rouessac, A.Rouessac** « analyse chimique, méthodes et technique instrumentale modernes » DUNOD, 5<sup>ème</sup> édition, Paris, pp 139, 149-150, (2000).

[39] Spectrophotométrie dans l'UV-visible

<http://jflflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/SPECTRO/berlam.htm>

[40] Spectrophotométrie

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrophotom%C3%A9trie>

[41] **R.Kerbachi** cours « spectroscopie infrarouge », ENSP ,Alger (2007).

[42]**M.Hesse,H.Meier,B.Zeeh**, « Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique »Masson, Paris ,(1997).

[43] **J.P.MERCIER**, « Chimie des polymères : synthèse, réactions et dégradation », Presses Polytechniques et Universitaires, Romandes, Lausanne (1996).

[44] Spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier ,Université d' ULM

<http://www.uni-ulm.de/index.php?id=3973>

[45] **W.L.Chao, C.M.Lin, I.I. Shiung, Y.L. Kuo** « Degradation of di-butyl-phtalate by soil bacteria» n° 63, pp 1377-1383, (2005).

[46] **J.J.Perry, J.T.Staley, S.Lory** « microbiologie, cours et questions de révision » Dunod, , Paris, (2002).

[47] **D.L.Servant** « Spectroscopie dans l'infrarouge » Techniques de l'ingénieur.pp 2845

[48] DIISONONYL ADIPATE

<http://chemicalland21.com/industrialchem/plasticizer/DIISONONYL%20ADIPATE.htm>

[49] **G.SOCRATES**, « Infrared characteristic group frequencies»,John wiley and Sons,New York, n° 22, pp 2719-2726 ,( 2002).

[50] *Pseudomonas aeruginosa*

[www.deniskunkel.com](http://www.deniskunkel.com)



# **Annexes**

## A.1-biodégradation du DOP

### A.1.1-Evolution de la croissance microbienne

JOUR	HEURE	Lecture à 600 nm	X ( mg/l)
1	0	0.065	28.26
	4.33	0.099	43.0435
2	22.5	0.161	70
	28.33	0.191	83.435
3	46.83	0.186	80.869
	52.16	0.199	86.521
4	69.83	0.175	76.087
	76.5	0.214	93.043
5	92.91	0.214	93.043
	99.30	0.224	97.391
6	117.91	0.204	88.695
	122.25	0.205	89.1304

## A.2- biodégradation de DINA

### A.2.1-Evolution de la croissance microbienne

JOUR	HEURE	Lecture à 600 nm	X ( mg/l)
1	0	0.065	28.26
	4.33	0.089	38.695
2	22.5	0.154	66.956
	28.33	0.164	71.304
3	46.83	0.150	65.217
	52.16	0.130	56.521
4	69.83	0.135	58.695
	76.5	0.134	58.260
5	92.91	0.151	65.652
	99.30	0.152	66.087
6	117.91	0.171	74.347
	122.25	0.170	73.913

## ملخص

يتمثل مضمون هذا البحث في دراسة التحلل البيولوجي للملين و ذلك في مفاعل بيولوجي باستعمال بكتريا بسودوموناس اريجينوزا

متابعة التحلل البيولوجي كان باستعمال جهازي التحلل الطيفي للأشعة ما تحت الحمراء و ما فوق البنفسجية

النتائج أثبتت أن سرعة التحلل البيولوجي DOP اكبر من سرعة التحلل البيولوجي DINA

مفاتيح :التحلل البيولوجي ,, مفاعل بيولوجي DINA, DOP,

## RESUME

Le PVC est l'un des matériaux plastiques les plus utilisés au monde, leur mise en œuvre nécessite une proportion de plastifiants comprise entre 15 et 50%.

Ce projet de fin d'études a pour but d'étudier la biodégradation de deux plastifiants qui sont le di octyl phtalate (DOP) et le di isononyl adipate (DINA) dans un bioréacteur, la bactérie utilisée est la *P.aeruginosa*

La biodégradation est suivie pas à pas grâce au spectrophotomètre UV-visible afin d'établir une cinétique bactérienne, et spectrophotomètre infra rouge à transformée de Fourier (IRTF) pour suivre l'évolution des absorbances des groupements fonctionnels caractérisant les plastifiants.

Les résultats obtenus démontrent que la bactérie *P.aeruginosa* dégrade plus rapidement le DOP que le DINA .

**Mots clés :** di octyl phtalate(DOP), di isononyl adipate(DINA), biodégradation, bioréacteur.

## ABSTRACT

The PVC is the most used plastic material in the world, their implementation requires a proportion of plasticizers between 15 and 50 %.

The aim of this work is the evaluation of the biodegradation of di octyl phtalate (DOP) and di isononyl adipate (DINA) in a bioreactor with the use of the bacteria *P.aeruginosa*.

The biodegradation is studied with the technical analysis: infrared Fourier Transform (IRTF) and UV visible spectroscopy.  
The results showed that DOP was more quickly biodegradable than DINA

**Keywords:** DOP, DINA, biodegradation, bioreactor,