

Université de Reims Champagne Ardenne
UFR Sciences Exactes et Naturelles

Thèse de Doctorat

Spécialité : chimie des matériaux

Soutenue publiquement le 12 Juillet 2005 par

Antoine LONGIERAS

Mise au point d'un milieu solide inerte pour l'étude de
la biodégradation des polymères dans le compost

Devant le jury composé de :

Anne-Marie DELORT	Directrice de recherche CNRS, Clermont Ferrand	Rapporteur
Michel VERT	Directeur de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
Aurore RASMONT	Chargé de recherche NATISS, Ath, Belgique	Examinatrice
Guy MATEJKA	Professeur, ENSIL, Limoges	Président
Véronique COMA	Maître de Conférence, Bordeaux	Examinatrice
Gilbert Bureau	Professeur, ESIEC, Reims	Examineur
Alain Copinet	Maître de Conférence, ESIEC, Reims	Directeur de Thèse

Université de Reims Champagne Ardenne
UFR Sciences Exactes et Naturelles

Thèse de Doctorat

Spécialité : chimie des matériaux

Soutenue publiquement le 12 Juillet 2005 par

Antoine LONGIERAS

Mise au point d'un milieu solide inerte pour l'étude de
la biodégradation des polymères dans le compost

Devant le jury composé de :

Anne-Marie DELORT	Directrice de recherche CNRS, Clermont Ferrand	Rapporteur
Michel VERT	Directeur de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
Aurore RASMONT	Chargé de recherche NATISS, Ath, Belgique	Examinatrice
Guy MATEJKA	Professeur, ENSIL, Limoges	Président
Véronique COMA	Maître de Conférence, Bordeaux	Examinatrice
Gilbert Bureau	Professeur, ESIEC, Reims	Examineur
Alain Copinet	Maître de Conférence, ESIEC, Reims	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement les personnes qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être membres de mon jury : Aurore Rasmont, Véronique Coma, Guy Matejka, Gilbert Bureau, et tout particulièrement mes rapporteurs Anne-Marie Delort et Michel Vert.

Le travail a été effectué au CERME, le laboratoire de recherche de l'ESIEC. Je remercie donc Yves Couturier et Lan Tighzert, directeurs du laboratoire, ainsi que Gilbert Bureau directeur de l'ESIEC pour m'avoir accueilli dans leur structure.

Un travail de thèse ne s'effectue jamais seul et par conséquent beaucoup de personnes m'ont aidé durant ces quatre ans ; je tiens donc à remercier Christian Brand du CRBA de Montpellier, qui a bien voulu m'accorder un peu de son temps pour m'enseigner les rudiments de l'électrophorèse capillaire et me dispenser quelques conseils précieux. Henri Garreau, du même laboratoire, m'a également permis d'effectuer des analyses SEC qui m'ont été d'une aide précieuse. J'ai pu effectuer quelques analyses HPLC au sein du laboratoire de microbiologie industrielle sous la direction de Francis Duchiron et avec l'aide amicale de Sébastien Givry et Estelle Copinet, qu'ils en soient remerciés.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnels de l'ESIEC pour leur aide technique dans de nombreuses situations mais également pour la bonne humeur qui ne leur fait jamais défaut : les filles du rez-de-chaussée : Nicole, Martine, Véronique, Stéphanie, Dominique, Marie pour la multitude de turpitudes administratives qu'elles m'ont épargnées notamment !!! Les hommes de la section 28 : le lieutenant colonel Erre et son adjoint le sergent Odof ; L'homme de Picardie dit Pévé ; les hommes de la technique : (petit) Phillou, Phill' le punk, Jibix le Gaulois (champion du monde de mauvaise foi), Nath qui ne fait pas de bruit mais qui fait beaucoup ; Madame Ralisgarden La baronne de Neufelize ; Catherine « hutchinson » Lacoste (celle du bureau d'à côté !) ; Rob le responsable informatique (vous connaissez le responsable informatique ?) ; tous mes collègues de thèse ou stagiaires: Edhi, Ahmed, Manue et Manu, Frédérique, JB, Monia ; Tous les amis que j'ai rencontrés parmi les étudiants de l'ESIEC ; il y en a trop, je ne peux pas tous les citer (si une quand même, Delphine) !!

Je souhaite exprimer ma reconnaissance sincère envers ma famille, et plus particulièrement ma mère, pour son soutien moral et ses encouragements continus tout au long de ces 4 ans et ce, même dans les moments difficiles !

Last but not Least, je tiens à remercier plus particulièrement Alain Copinet, mon directeur de thèse, pour son soutien sans faille. Au delà du côté formel de la chose, il a toujours été là dans les moments critiques où l'urgence était de mise !! D'après ma courte expérience, il semble que tous les thésards n'ont pas eu la chance d'avoir travaillé avec la confiance qu'Alain m'a témoignée. Merci ! Je n'oublierai pas.

L'expérience, ça ne s'apprend pas, ça se vit...

Michel Colucci dit « Coluche »

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I> LA DEGRADATION D'UN MATERIAU POLYMERE EN CONDITION AEROBIE – DEFINITIONS ET MECANISMES	6
I.1 Définitions et terminologie	6
I.1.1 Dégradation.....	6
I.1.2 Biodégradation.....	7
I.1.3 Bio-assimilation	9
I.1.4 compostage	10
I.2 Mécanismes de dépolymérisation	11
I.2.1 Hydrolyse chimique	11
I.2.2 Hydrolyse enzymatique	12
I.2.3 Photo-dégradation	13
II LES PARAMETRES QUI INFLUENCENT LA BIODEGRADATION 14	
II.1 La flore microbienne	14
II.2 Paramètres physico-chimique du milieu.....	15
I.2.1 La teneur relative en eau	15
II.2.2 Température.....	16
II.2.3 pH	16
II.2.4 Rapport C/N.....	17
II.3 Structure et propriétés du polymère.....	17
II.3.1 Taux de cristallinité	17
II.3.2 surface de contact spécifique micro-organismes/substrat	18
II.3.3 composition du polymère	19
II.3.4 hydrophobie	19
III> LES POLYMERES DEGRADABLES	21
III.1 Les matériaux à base de polymères naturels	21
III.1.1 Acétate de cellulose.....	21
III.1.2 Amidon.....	22

III.2 Les polyesters	23
III.2.1 Le poly (acide lactique) ou PLA	24
III.2.2 Le poly (ϵ -caprolactone) ou PCL	25
III.2.3 Le poly(3-hydroxybutirate) (PHB) et poly(3-hydroxybutirate-co-hydroxyvalerate) (PHBV).....	27
III.2.4 le poly(butylène succinate-co-butylène adipate) (PBSA), poly(butylène succinate) (PBS) et poly(éthylène succinate) (PES)	28
III.2.5 Poly(ester-amide)	29
III.3 Les polymères photodégradables	29
IV> LES METHODES D'ESTIMATION DE LA BIODEGRADATION D'UN MATERIAU POLYMERE.	30
IV.1 Paramètres de mesure.....	30
IV.1.1 Perte de masse	30
IV.1.2 Développement microbien	31
IV.1.3 Suivi des propriétés mécaniques et analyses physico-chimiques	32
IV.1.4 Respirométrie	34
IV.2 Les différents tests en laboratoire	39
IV.2.1 Les tests en milieu compost	40
IV.2.2 Les tests en milieu liquide.....	49
IV.2.3 Les tests en milieu gélosé.....	52
V> POSITIONNEMENT DU SUJET- LES TESTS DE BIODERADATION EN MILIEU SOLIDE INERTE.....	53
V.1 Pourquoi un milieu solide inerte ?.....	53
V.1.1 Avantages et inconvénients des tests existants.....	53
V.1.2 But des milieux solides inertes	56
V.2 Les différents types de supports existants	56
V.2.1 La Perlite	56
V.2.2 La Pouzzolane	57
V.2.3 La Vermiculite.....	58
V.3 Apport minéral et organiques pour le déroulement du test	58
V.3.1 Inoculum microbien	58
V.3.2 Apport minéral	59
V.3.3 Mise en place et déroulement du test	60

V.4 Application des milieux solides inertes.....	63
V.5 Conclusions	67
PARTIE B : MISE AU POINT D'UN TEST DE BIODEGRADATION EN MILIEU SOLIDE INERTE AVEC L'AMIDON.....	68
I> INTRODUCTION	69
II> MATERIEL ET APPAREILLAGE	69
II.1 Matériel.....	69
II.1.1 Origine des produits utilisés	69
II.1.2 Vermiculite	70
II.2 banc de test automatisé	70
III> MISE EN PLACE DES TESTS ET RESULTATS	72
III.1 Test compost	72
III.1.1 Acclimatation	72
III.1.2 Test.....	73
III.2 Milieu solide inerte.....	74
III.2.1 solution minérale	74
III.2.2 Préparation du lexiviat de compost	75
III.2.3 Test sans activation, influence de la quantité de lexiviat	75
III.2.4 Test avec activation.....	76
III.3 Bilan carbone.....	77
III.3.1 Prélèvements	77
III.3.2 Protocole d'extraction et analyse des prélèvements.....	77
III.3.3 Etablissement du bilan carbone	79
III.4 Discussion	80
III.4.1 Phase d'activation	80
III.4.2 Effet de la phase d'activation sur le test.....	81
III.4.3 Biodégradation de l'amidon dans la vermiculite et le compost	83
III.4.4 bilan carbone	85
IV> CONCLUSION	87
PARTIE C : APPLICATION A L'ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES POLYMERES.....	88

CHAPITRE I : BIODEGRADATION DU POLY(ACIDE LACTIQUE)... 89

I> INTRODUCTION 90

II> MATERIEL ET METHODES 90

II.1 Poly (acide lactique) 90

II.2 Méthodes Chromatographiques 91

II.2.1 Chromatographie liquide haute pression 91

II.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique 92

II.2.3 Electrophorèse capillaire de zone (CZE)..... 92

II.3 Analyse enthalpique différentielle (DSC) 93

II.4 Protocole de test et de bilan carbone 94

II.4.1 Protocole 1 94

II.4.2 Protocole 2 97

II.4.3 Protocole 3 100

II.5 extraction du PLA non dégradé pour les analyses physico-chimiques..... 102

III> RESULTATS ET DISCUSSION 102

III.1 Minéralisation du PLA 102

III.1.1 Dans le compost 102

III.1.2 En milieu solide inerte..... 104

III.2 Bilan carbone pour le biodégradation du PLA en milieu solide inerte activé..... 112

III.2.1 Taux de minéralisation et durée de la phase d'activation 113

III.2.2 Protocole 1 114

III.2.3 protocole 2 118

III.2.4 Protocole 3 122

IV> CONCLUSION 130

CHAPITRE II : BIODEGRADATION DU POLY(ACIDE 3-HYDROXYBUTYRIQUE)..... 132

I> MATERIEL ET METHODE 133

I.1 Poly(acide 3-hydroxybutyrique) 133

I.2 Tests de biodégradation 133

I.3 Bilan carbone 134

I.3.1 Protocole d'extraction du carbone	134
I.3.2 Calcul du bilan carbone	136
II> RESULTATS ET DISCUSSION	137
II.1 Minéralisation du PHB	137
II.1.1 Dans le compost.....	137
II.1.2 En milieu solide inerte	139
II.2 Bilan carbone de la biodégradation du PHB.....	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes de rupture de chaîne pour les polyéthylènes contenant des groupements carbonyles photo-sensibles (Hocking et coll., 1992).

Figure 2 : voies de synthèse de poly(lactique acide) de degré de polymérisation élevé

Figure 3 : formule développée de poly (ϵ -caprolactone)

Figure 4 : formule développées des poly(β -hydroxyalcanoates) biodégradables.

Figure 5 : formule développée du poly(butylene succinate-co-butylene adipate)

Figure 6 : formule développée d'un poly(ester-amide)

Figure 7 : processus biologique du compostage aérobie.

Figure 8 : Evolution de la température en fonction du temps (d'après la FNADE).

Figure 9 : Variation du pH au cours du compostage (Ecosys).

Figure 10 : Arrivée des déchets sur le site

Figure 11 : broyeur

Figure 12 : Andains en triangles

Figure 13 : Effet d'un brassage régulier sur la température du compost. (FNADE).

Figure 14 : Tas de compost en maturation

Figure 15 : Schéma de montage pour un test de Sturm (Itävaara et coll., 1996). Ici la mesure du dioxyde de carbone est automatisée.

Figure 16 : Bilans carbone de la dégradation du PHB en milieu liquide par oxydation sélective de la biomasse avec l'hypochlorite de sodium (Urstadt et coll., 1995). A gauche en présence d'une souche sélectionnée et à droite en présence d'un lexiviat de compost

Figure 17 : schéma du milieu « perlite/sol » (Solaro et coll., 1998).

Figure 18 : évolution du bilan carbone pour le biodégradation d'un film de PLA et d'amidon co-extrudé en milieu vermiculite avec la norme ISO/CEN 14852 (Gattin et coll., 2002).

Figure 19 : évolution du bilan carbone pour le biodégradation d'un film de PLA et d'amidon co-extrudé en milieu liquide avec la norme ISO/CEN 14852 (Gattin et coll., 2002).

Figure 20 : Schéma de principe du banc de tests automatisé

Figure 21 : Vue d'ensemble du banc de test automatisé (a), réacteur modifié pour un test en milieu solide (b).

Figure 22 : Production instantanée de dioxyde de carbone du compost placée à 58°C pour trois réacteurs différents.

Figure 23 : Protocole d'extraction du carbone du milieu solide inerte.

Figure 24 : Evolution du taux de minéralisation durant les phases d'activation. Les résultats présentés sont les moyennes obtenues pour trois répétitions.

Figure 25 : production instantanée de dioxyde de carbone lors de la dégradation de l'amidon pour des milieux activés et non activés (pour tous les milieux, le volume d'inoculum utilisé est de 15 ml d'extrait de compost).

Figure 26 : Courbe de minéralisation obtenues pour la biodégradation de l'amidon dans les milieux solides inertes et dans le compost.

Figure 27 : Evolution du bilan carbone pendant la biodégradation de l'amidon dans la vermiculite activée avec la dose $\frac{1}{2}$ (La courbe verte est le total des moyennes des quatre autres).

Figure 28 : courbe d'étalonnage pour l'acide lactique sur la colonne Bio-rad Aminex HP 87 H

Figure 29 : protocole 1 d'extraction et de quantification du carbone pour la biodégradation du PLA

Figure 30 : Protocole 2 d'extraction et de quantification du carbone pour la biodégradation du PLA.

Figure 31 : Protocole 3 d'extraction et de quantification du carbone pour la biodégradation du PLA

Figure 32 : Courbe de minéralisation du PLA dans le compost. Résultats obtenus pour trois répétitions.

Figure 33 : Production de dioxyde de carbone instantanée pendant la biodégradation du PLA dans le compost (valeurs obtenues pour un réacteur).

Figure 34 : Courbe de minéralisation du PLA dans des deux milieux solides inertes activés et dans le compost (les valeurs sont la moyenne de trois répétitions).

Figure 35 : Evolution du pH au cours de la phase d'activation pour les différents rapports C/N et proportions d'azote de l'urée et du sulfate d'ammonium (le premier chiffre indique le rapport C/N utilisé et celui entre parenthèses la proportion d'azote de l'urée).

Figure 36 : Minéralisation de la dose d'activation 1 pour les différents rapports C/N et proportions d'azote de l'urée et du sulfate d'ammonium (le premier chiffre indique le rapport C/N utilisé et celui entre parenthèses la proportion d'azote de l'urée).

Figure 37 : Courbes de minéralisation obtenues lors des tests ou ont été appliqués les protocoles 1, 2 et 3 (les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions).

Figure 38 : Evolution des différentes proportions de carbone du PLA non dégradé, minéralisée en CO₂ et incluse dans la biomasse, pour les réacteur 1.

Figure 39 : Evolution de la proportion de PLA dans les trois réacteurs, protocole 1.

Figure 40 : Minéralisation durant la phase d'activation avec la dose 1.

Figure 41 : Evolution du bilan carbone au cours de la biodégradation du PLA avec le protocole 2.

Figure 42 : bilan carbone avec le protocole 2 avec l'analyse élémentaire du culot R.

Figure 43 : Evolution de la proportion de PLA dans chaque réacteur.

Figure 44 : Evolution du bilan carbone au cours de la biodégradation du PLA avec le protocole 3.

Figure 45 : évolution du poids moléculaire moyen en nombre et en poids du PLA non dégradé dans le milieu solide inerte. Les valeurs sont la moyenne de résultats de trois réacteurs.

Figure 46 : Evolution de la masse molaire du PLA non dégradé en fonction du bilan carbone.

Figure 47 : Evolution de la température de transition vitreuse (la limite rouge représente la température dans les réacteurs pendant le test, 58°C).

Figure 48 : Protocole d'extraction du carbone pour la biodégradation du PHB

Figure 49 : Minéralisation du PHB dans le compost (les valeurs présentées sont la moyenne de valeurs obtenues sur trois répétitions).

Figure 50 : Courbe de minéralisation du PHB en milieu solide inerte activé (pour les deux références de vermiculite) et dans le compost (valeurs obtenues pour 3 répétitions).

Figure 51 : Production instantanée de CO₂ durant la biodégradation du PHB en milieu solide inerte pour un réacteur (avec la vermiculite 1, un point toutes les 2 heures).

Figure 52 : Evolution du bilan carbone au cours de la biodégradation du PHB

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : définitions relatives à la biodégradation et/ou la biodégradabilité des matériaux (Pagga et coll., 1996).

Tableau 2 : Polymères biodégradables commerciaux.

Tableau 3 : Propriétés mécaniques des principaux polyesters dégradables.

Tableau 4 : composition de la solution minérale pour compléter la vermiculite. 410 ml de cette solution sont mélangés avec 180 grammes de vermiculite (Gattin, 2000).

Tableau 5 : Composition d'un milieu solide inerte sans activation (Gattin et coll., 2000).

Tableau 6 : Composition d'une dose d'activation (Bellia et coll., 1999). 450 ml de cette préparation sont mélangés avec 150 g de Vermiculite.

Tableau 7 : Composition des milieux solides inertes.

Tableau 8 : Composition de la solution de Ringer.

Tableau 9 : composition des doses d'activation.

Tableau 10 : Evolution de la masse sèche corrigée du milieu en fonction du taux de minéralisation pour chaque réacteur.

Tableau 11 : Résultats obtenus pour la biodégradation de l'amidon dans divers milieu vermiculite (le taux de conversion est calculé lorsque la courbe de minéralisation est dans sa partie linéaire entre la phase de latence et de ralentissement).

Tableau 12 : conditions du test de biodégradation lors pour l'utilisation du protocole 1.

Tableau 13 : Evolution de la masse sèche corrigée en fonction du taux de minéralisation du milieu pour chaque réacteur, protocole 1.

Tableau 14 : Conditions du test de biodégradation lors pour l'utilisation du protocole 2

Tableau 15 : Evolution de la masse sèche corrigée en fonction du taux de minéralisation du milieu pour chaque réacteur, protocole 2.

Tableau 16 : Conditions du test de biodégradation pour l'utilisation du protocole 3.

Tableau 17 : Evolution des masses sèches corrigée en fonction du taux de minéralisation du milieu pour chaque réacteur, protocole 3.

Tableau 18 : Composition des réacteurs pour les tests de biodégradation du PLA.

Tableau 19 : Origine de l'azote présente dans le milieu en fonction des différents rapport C/N.

Tableau 20 : pH en début et fin de phase d'activation et taux de minéralisation.

Tableau 21 : Récapitulatif des paramètres importants variant du protocole 1 à 3.

Tableau 22 : Proportions de carbone du PLA sous forme de CO₂, de biomasse et de PLA non dégradé.

Tableau 23 : composition d'un réacteur pour les tests de biodégradation du PHB en milieu solide inerte.

Tableau 24 : Masse sèche corrigées de chaque réacteur pour le calcul du bilan carbone.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ASTM: American Society for Testing and Materials

C_b : Carbone contenu dans le biomasse

C_d : Carbone sous forme de composés organiques solubles dans l'eau

C_g : Carbone transformée en dioxyde de carbone

C_{nd} : Carbone contenu dans le polymère non dégradé

$C_{polymer}$: Carbone contenu dans le polymère dégradé

CEN : Comité Européen de Normalisation

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

COD: Carbone Organique Dissous

C/N : Rapport de la masse de carbone sur la masse d'azote

CZE : Electrophorèse capillaire de zone (Capillary Zone Electrophoresis)

DIN: Deutsch Institut Normierung

DSC : Differential Scanning Calorimetry

PBS: Poly (butylene succinate)

HB : monomère d'acide 3-hydroxybutirique

IRTF: Infra Rouge à Transformée de Fourier

ISO : International Standards Organisation

M_n : Masse molaire moyenne en nombre

M_w : Masse molaire moyenne en masse

PBSA : Poly (butylène succinate-co-butylène adipate)

PCL: Poly (caprolactone)

PHA : Poly (hydroxyalcanoates)

PHB : Poly (3-hydroxybutirate)

PLA : Poly (acide lactique)

PLLA : Poly (L-acide lactique)

SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique (Size Exclusion Chromatography)

T_g : Température de transition vitreuse

Introduction

Une des propriétés fondamentales des matériaux plastiques qui a largement contribué à leur succès commercial au cours des dernières décennies, est leur inertie vis à vis des agressions d'origine biologique et/ou physico-chimique. Cette particularité alliée à d'autres avantages, comme le faible coût de production, le rapport poids/volume ou encore une mise en forme aisée, a permis de multiples applications dans tous les domaines. Ainsi, les plastiques protègent « tout de tout », ils sont présents dès qu'il est question de mettre une barrière entre un produit, quel qu'il soit, et son environnement extérieur.

Si cette résistance aux divers facteurs de dégradation et d'altération est une des principales qualités des matériaux plastiques lorsque ceux-ci sont en cours d'utilisation, elle est également la raison pour laquelle l'accumulation de déchets plastiques en fin de vie est devenue un problème environnemental majeur. Les plastiques courants, comme le polyéthylène ou le polypropylène, demeurent très longtemps dans un milieu naturel en se dégradant lentement par fragmentations successives. Ce processus lent entraîne la disparition visuelle d'une masse de déchets par la dissémination de particules plus ou moins importantes qui vont envahir tous les écosystèmes. Une autre conséquence peut être un mode de dégradation qui va entraîner la concentration dans les sols de composés toxiques pour le développement de la flore, comme la libération de diisocyanates dans le cas des polyuréthanes. De manière générale, on peut dire que n'importe quel matériau qui sera stocké dans la nature, et dont nous ne connaissons pas, ou ne savons pas gérer le mode de dégradation, sera un danger potentiel pour notre environnement.

Plusieurs solutions ont été envisagées pour traiter les déchets plastiques comme le recyclage ou l'incinération. Cette dernière solution peut être source de valorisation si l'énergie produite par la combustion des déchets est utilisée pour d'autres applications. La combustion entraîne un dégagement supplémentaire de dioxyde de carbone qui contribue à l'effet de serre, même si cette contribution est bien moins importante que celle des gaz d'échappement. De plus, la combustion de certains polymères produit des gaz plus ou moins toxiques qu'il faut également gérer. Le recyclage est une alternative intéressante dans le cadre d'une économie de matériau, mais il suppose un tri préalable des déchets plastiques dont le coût est relativement élevé. Enfin, un polymère plastique ne peut pas être recyclé indéfiniment sans entraîner une perte plus ou moins importante de ses propriétés mécaniques. Le résultat du recyclage est donc, tôt ou tard, un ultime déchet plastique complexe (mélange de plusieurs types de polymères au fur et à mesure des recyclages successifs qui incorporent des impuretés dans la matrice), dont le traitement peut être plus difficile que celui de déchets ne contenant qu'une seule sorte de polymère.

L'utilisation de matériaux plastiques « biodégradables » totalement assimilables par l'environnement, et qui seraient métabolisés par les micro-organismes à condition d'être stockés dans un milieu suffisamment favorable, devient une nouvelle alternative particulièrement intéressante. La principale voie d'élimination qui a été envisagée est celle du compostage : le compost est un milieu particulièrement actif d'un point de vue biologique, et les conditions de température et d'humidité y sont particulièrement favorables. De plus, le compostage est un processus qui est déjà industrialisé sous forme d'unités de compostage aérobie ou anaérobie (celles-ci permettant la récupération d'un « biogaz » qui est également une source d'énergie). Au cours de ces vingt dernières années, de nombreuses références de plastiques dits biodégradables ont été mises sur le marché par les fabricants de plastiques classiques.

La biodégradabilité de ce nouveau type de matériaux dans le compost en conditions aérobie est désormais estimée par la proportion de carbone du polymère qui est minéralisée sous la forme de dioxyde de carbone après un séjour donné dans le compost (normes ASTM D-5338-92 ou ISO/CEN 14855 entre autres). Le matériau sera considéré comme biodégradable si 60 % du carbone contenu dans l'échantillon est transformé en CO₂. Les normes ne spécifient pas de restrictions quant à la nature et au devenir des 40 % de carbone du matériau restants. Puisque le compost est un milieu en perpétuelle évolution, et particulièrement complexe d'un point de vue biologique et physico-chimique, il est très difficile, voire impossible, de déterminer la composition d'un compost après qu'il ait supporté la biodégradation d'un polymère biodégradable. Il faut éventuellement considérer qu'une partie du polymère, ou un sous-produit de la dégradation de celui-ci, puisse persister dans le compost et entraîner une détérioration de la qualité. Or, le compostage des polymères biodégradables ne présente un intérêt que dans la mesure où le compost peut ensuite être utilisé comme amendement organique. Dans le cas de matériaux multi- phases, à base d'amidon et de polyéthylène par exemple, la partie amidon du matériau sera en général facilement assimilée par les micro-organismes du compost. Si cette charge d'amidon représente au moins 60 % du matériau, la limite des 60 % de matériau minéralisé est atteinte, mais il reste dans le compost la partie polyéthylène, dont la biodégradabilité est très limitée, voire nulle.

Devant les nombreuses références de plastiques dits biodégradables proposées par l'industrie, il est donc important de se doter de méthodes et d'outils de mesure qui permettent de sanctionner réellement la biodégradabilité d'un nouveau produit quel qu'il soit : polymère, copolymère, matériau multi- phase d'origine pétrochimique ou provenant de ressources

renouvelables. Le seul moyen de s'assurer du devenir du carbone du polymère stocké dans le compost pour être biodégradé, est d'établir un bilan carbone complet. Le carbone du polymère, en présence d'oxygène, sera transformé en dioxyde de carbone, en sous-produits de dégradation solubles, en biomasse. Etablir un tel bilan dans le compost est impossible dans la mesure où on ne pourra pas faire la différence entre le carbone du polymère et celui déjà contenu dans le milieu. L'introduction récente (Spitzer et coll., 1996) d'un nouveau type de support solide inerte susceptible de simuler la minéralisation des polymères dans le compost, peut permettre une nouvelle approche plus exhaustive de la biodégradation. Nous proposons donc, dans ces travaux de thèse, d'étudier les potentialités de ces milieux solides inertes pour caractériser la biodégradation des matériaux, et donc établir des bilans carbone complets.

Ces travaux de thèse sont présentés en trois parties. La première partie définit tout d'abord la terminologie utilisée pour caractériser la biodégradation, puis elle met à jour les connaissances concernant les mécanismes mis en jeu dans ce type de processus, et les méthodes utilisées pour le caractériser et le quantifier. Seront également présentés les principaux polymères biodégradables d'intérêt commercial ainsi qu'un état des lieux des premiers travaux visant à étudier la biodégradation des polymères en milieu solide inerte.

La deuxième partie expose la mise au point d'un test de biodégradation en milieu solide inerte par l'utilisation de l'amidon comme polymère biodégradable idéal. Une première approche de la méthodologie adéquate pour établir un bilan carbone complet d'un polymère en milieu solide sera proposée.

La troisième partie concerne l'application des méthodes mises au point avec l'amidon, à l'étude de la biodégradation par l'établissement de bilan carbone, de deux polymères biodégradables courants : le poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) et le poly (acide lactique) (PLA).

Partie A : Etude bibliographique

I> LA DEGRADATION D'UN MATERIAU POLYMERE EN CONDITION AEROBIE – DEFINITIONS ET MECANISMES

I.1 Définitions et terminologie

Le vaste domaine des polymères dit « biodégradables » véhicule un nombre important de termes et de dénominations qu'il est nécessaire de bien expliquer de manière à ce que tous les acteurs participants à la production, la mise en forme, l'utilisation et enfin le traitement de ces matériaux, parlent et comprennent tous le même langage. En effet, il existe plusieurs manières de caractériser la dégradation d'un polymère que ce soit en fonction de la nature de la dégradation qu'il subit (fragmentation, biodégradation) ou de la cause de cette dégradation (photodégradation). Ne seront traités dans ce chapitre que les phénomènes pouvant se dérouler dans des conditions aérobie.

I.1.1 Dégradation

Le terme dégradation désigne de manière générale toutes les altérations d'origine chimique et/ou physique qu'un matériau est susceptible de subir. Cependant, il est important de différencier les altérations que subit ce matériau au cours de son utilisation que l'on pourra assimiler à un phénomène de vieillissement non désiré, de celles qu'il subit lorsqu'il est traité en fin d'utilisation par stockage dans un milieu particulier (le compost par exemple) afin de le faire disparaître de manière définitive ou partielle. C'est pour ce dernier cas que nous emploierons le terme dégradation.

D'après le Comité Européen de Normalisation (CEN) la notion de dégradation est décrite comme suit :

- « la dégradation est un processus irréversible entraînant un changement significatif dans la structure du matériau, ce changement est classiquement caractérisé par une perte des propriétés initiales (poids moléculaire, structure moléculaire, résistance à la traction) et/ou une fragmentation. La dégradation est affecté par les paramètres environnementaux et se déroule en une ou plusieurs étapes. » (Pagga et coll., 1996)

Le terme dégradation rassemble donc l'ensemble des phénomènes biotiques et abiotiques que le matériau subit lorsqu'il est placé dans un milieu particulier pour être traité en fin de vie, sans distinction d'origine. Un « plastique dégradable » peut donc être défini comme suit :

- « Un matériau est considéré comme dégradable dans certaines conditions s'il subit une dégradation quelconque déterminée dans un temps donné et selon un méthode de mesure standardisée adaptée »
définition CEN (Pagga et coll., 1996)

Ces définitions laissent tout de même une grande place à l'interprétation et ne donnent pas d'information sur le degré de dégradabilité que le polymère doit atteindre pour être considéré comme dégradable.

I.1.2 Biodégradation

Le préfixe « bio » est parfois abusivement utilisé comme argument commercial pour souligner le caractère respectueux de l'environnement d'un matériau donné. Cependant, il est important de réserver ce terme à des processus de dégradation qui mettent en jeu des organismes vivants par l'intervention de différentes enzymes qui provoquent la dégradation. C'est ce point qui est mis en évidence dans les différentes définitions proposées par les organismes de recherches (cf. tableau 1). Cependant si ces définitions justifient et limitent l'utilisation du terme biodégradation à certaines conditions de dégradation, elles ne permettent pas toujours de conclure à la compatibilité d'un matériau biodégradable avec le stockage dans un écosystème naturel comme le compost ou un milieu aqueux par exemple. En effet, d'après certaines définitions, un matériau peut subir une biodégradation et être donc considéré comme biodégradable, sans pour autant avoir totalement disparu du milieu. Il peut donc perdurer dans ce même milieu sous la forme de fragments plus ou moins importants sans jamais disparaître ou alors à une échelle de temps beaucoup trop importante. C'est le cas pour les définitions ISO et ASTM (cf. tableau 1). Il est d'ailleurs étonnant de constater que des définitions issues de normes censées caractériser la biodégradation ou la biodégradabilité d'un matériau ne permettent pas forcément d'arriver aux mêmes conclusions. Ainsi, on peut conclure qu'il n'existe pas de consensus international pour caractériser la biodégradabilité des matériaux.

Origine	Définition
DIN	<p><u>Biodégradation</u></p> <p>La biodégradation est un processus dû à une activité biologique qui entraîne des modifications de la structure chimique du matériau, menant à des composés métaboliques naturels</p> <p><u>Plastique biodégradable</u></p> <p>Un matériau plastique est considéré comme biodégradable si tous les composés organiques qu'il contient subissent un processus de biodégradation complet</p>
CEN	<p><u>Biodégradation</u></p> <p>La biodégradation est un type de dégradation causée par une activité biologique, particulièrement les attaques enzymatiques, qui entraîne un changement significatif dans la structure chimique du matériau</p> <p><u>Plastique biodégradable</u></p> <p>Un matériau dégradé pour lequel la dégradation résulte d'une action des micro-organismes et dont les sous-produits sont de l'eau, du dioxyde de carbone et/ou du méthane et de la biomasse</p>
ISO 472	<p><u>Plastique biodégradable</u></p> <p>Un matériau fabriqué pour subir une modification significative de sa structure chimique dans certaines conditions expérimentales qui a pour conséquence la perte de certaines propriétés [...]. Ce changement dans la structure chimique est dû à l'action des micro-organismes.</p>
ASTM	<p><u>Plastique biodégradable</u></p> <p>Un plastique dégradé dont la dégradation résulte de l'action de micro-organismes naturellement présents dans le milieu de dégradation tels que les bactéries ou les champignons.....</p>

Tableau 1 : définitions relatives à la biodégradation et/ou la biodégradabilité des matériaux (Pagga et coll., 1996).

C'est pour ces différentes raisons que de nouveaux termes ont été introduits pour estimer et caractériser sans ambiguïté l'assimilation d'un matériau par un écosystème donné sans qu'il y ait de conséquences néfastes pour celui-ci.

I.1.3 Bio-assimilation

La bio-assimilation est relative à la disparition complète du matériau du milieu dans lequel il est placé (Vert et coll., 2002). Idéalement, le matériau est minéralisé sous forme de dioxyde de carbone et d'eau d'une part et transformé sous forme de biomasse d'autre part. On ne considère plus ici le type de dégradation subie par le polymère mais sa capacité à être totalement transformé en composés assimilables dans un milieu particulier. On peut rapprocher cette notion de celle de « biodégradabilité ultime » d'un matériau dont on peut donner les définitions suivantes :

- « Biodégradation ultime (biodégradation totale) : correspond à la minéralisation totale : le matériau est totalement dégradé par l'action des micro-organismes sous forme de dioxyde de carbone (dans des conditions aérobie) ou de méthane (dans des conditions anaérobie, d'eau, de sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires (biomasse). » (Calmon-Decriaud et coll., 1998)

- « Biodégradation ultime : la dégradation d'un composé organique en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux (minéralisation) et en biomasse, par les micro-organismes en présence d'oxygène. » (Pagga et coll., 1997).

Pour mettre en évidence la bio-assimilation d'un matériau il devient nécessaire d'établir le bilan carbone de la biodégradation à un temps donné. En présence d'oxygène, pour un polymère composé uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène on aura :

$$C_{\text{polymer}} = C_b + C_g + C_d + C_{\text{nd}}$$

Où :

- C_{polymer} est la quantité de carbone totale contenue dans le polymère
- C_b la quantité de carbone du polymère transformé sous forme de biomasse
- C_g la quantité de carbone minéralisée sous forme de dioxyde de carbone
- C_d la quantité de carbone du polymère transformée en sous produits de dégradation solubles
- C_{nd} la quantité de carbone du polymère résiduelle qui n'a pas encore été dégradée

Pour que la biodégradation d'un polymère mène à sa bio-assimilation, les termes C_d et C_{nd} du bilan doivent être nuls. Cependant la disparition totale du polymère peut être plus ou moins longue et par conséquent les termes C_d et C_{nd} sont dépendants du temps. Ainsi, si ces sous produits de dégradation qui perdurent dans le milieu sont des composés facilement métabolisables par la flore microbienne (sucres, monomères ou oligomères de faible poids moléculaire), le matériau pourra tout de même être considéré comme **bio-assimilable**.

I.1.4 compostage

Le compostage vise à mélanger les matériaux en fin de vie avec divers déchets organiques au début ou la fin d'un processus de compostage. Ce matériau est donc susceptible de subir une biodégradation dans ce type de milieu sans entraîner de quelconque toxicité ni de perte de qualité pour le compost. Ce dernier point est très important car l'intérêt de ce genre de procédé est d'éliminer un déchet gênant grâce à un processus naturel et d'obtenir un compost de qualité qui pourra être utilisé pour l'épandage sur diverses cultures. Si le compost obtenu est toxique pour les plantes ou de qualité médiocre, sa valeur marchande est nulle et il devient à son tour un déchet inutilisable qui engendre les mêmes problèmes liés au stockage des polymères synthétiques non biodégradables. L'utilisation de polymères dit biodégradables par compostage ne serait donc dans ce cas d'aucune utilité.

I.2 Mécanismes de dépolymérisation

Les deux principaux mécanismes mis en jeu lors de la dépolymérisation d'un polymère sont l'oxydation et l'hydrolyse. L'oxydation est généralement provoquée par le rayonnement UV subi par le matériau lors d'une exposition plus ou moins prolongée à la lumière du soleil. L'hydrolyse peut être d'origine chimique ou enzymatique par les exoenzymes libérées par les micro-organismes du milieu. Les polyesters du fait de la présence des liaisons esters entre chaque monomère sont les plus sensibles à l'hydrolyse. Les polyoléfines ne semblent pas être sensibles à ce type de réaction mais les sous-produits de réaction résultant d'une exposition plus ou moins longue à un rayonnement UV pourraient être minéralisés dans une faible mesure (Bonhomme et coll., 2003)

I.2.1 Hydrolyse chimique

L'hydrolyse de manière générale est caractérisée par l'équation bilan suivante :



L'hydrolyse chimique peut avoir lieu en milieu basique ou être catalysée en milieu acide et provoque des ruptures de liaisons esters de manière aléatoire ou en bout de chaîne, cela dépend de la nature de l'hydrolyse et du type de polymère. L'hydrolyse basique du Poly(acide lactique) (PLA) intervient par rupture au hasard de la chaîne alors que l'hydrolyse acide se fera préférentiellement en fin de chaîne (Amass et coll., 1998). Dans le cas du PLA (et des poly(α -ester)s de manière générale), le mécanisme d'hydrolyse a été identifié (Li et coll., 1995 ; Li et coll., 1999) et est clairement désigné comme une étape prépondérante de la dégradation, le pourcentage de rupture de liaison esters déterminé par FTIR étant peu différent en présence ou en absence de micro-organismes (Agarwal et coll., 1998). L'hydrolyse libère des oligomères de plus petites tailles qui peuvent catalyser l'hydrolyse et migrer dans le milieu extérieur où ils pourront à leur tour être dégradés par les micro-organismes.

Dans le cas des poly(β -hydroxyalcanoates) (PHAs) ou du poly(ϵ -caprolactone) (PCL) qui sont des polymères plus hydrophobes, la participation de l'hydrolyse chimique à la dépolymérisation des longues chaînes semble être plus réduite (Albertsson et coll., 2000 ; Doi et coll., 1990).

Globalement, la sensibilité d'un polymère à l'hydrolyse dépendra (Amass et coll., 1998) :

- De ses propriétés physico-chimiques comme l'hydrophobicité, la masse molaire, ou la température de transition vitreuse
- Le taux de cristallinité
- Des sous-produits de dégradation (capacité à auto-catalyser la réaction)

1.2.2 Hydrolyse enzymatique

Il existe de très nombreux micro-organismes produisant les enzymes susceptibles d'hydrolyser des polyesters dans le sol, le compost ou d'autres milieux aquatiques. Certains micro-organismes produisent naturellement les enzymes hydrolysant le poly(β -hydroxyalcanoates), car c'est un polymère qu'ils accumulent naturellement comme réserve de carbone dans certaines conditions nutritives. Cependant il a été mis en évidence divers types d'enzymes pouvant hydrolyser du PCL (Tokiwa et coll., 2001), du PLA (Li et coll., 1995) ou d'autres copolyesters comme le Poly(butylène succinate-co-butylène adipate) (PBSA) ou encore certains polyester-amide commerciaux comme le BAK produit par la société Bayer (Botines et coll., 2002). Certaines enzymes seraient également capables de dégrader les sous-produits de dégradation de polyéthylène sensible aux peroxydations abiotiques après que celui-ci ait subi un vieillissement accéléré (Bonhomme et coll., 2003).

L'hydrolyse enzymatique peut se dérouler de deux manières différentes (Gattin, 2001 ; Lenz et coll., 1993). Dans le premier cas des endo-enzymes provoquent la rupture des liaisons esters au hasard de la chaîne carbonée du polyester libérant ainsi des polymères de masse molaire plus faible, cela se traduit par une diminution significative de la masse molaire moyenne du polymère résiduel. Le deuxième cas correspond à l'action des exo-enzymes qui hydrolysent spécifiquement les liaisons esters situées en bout de chaîne, libérant des monomères, la masse molaire moyenne du polymère n'en est que très peu affecté alors que l'on peut observer une perte de masse globale.

Ces premières ruptures de chaînes sont réalisées par des enzymes extra-cellulaires car les longues chaînes carbonées de polyesters ne sont pas solubles et trop importantes pour pénétrer dans la cellule. Ce ne sont que les sous-produits d'hydrolyse (enzymatique ou

chimique) de tailles plus réduites et solubles qui sont incorporés dans la cellule pour être minéralisés sous forme de CO₂ (ou de méthane en absence d'oxygène) ou incorporés dans de la nouvelle biomasse.

I.2.3 Photo-dégradation

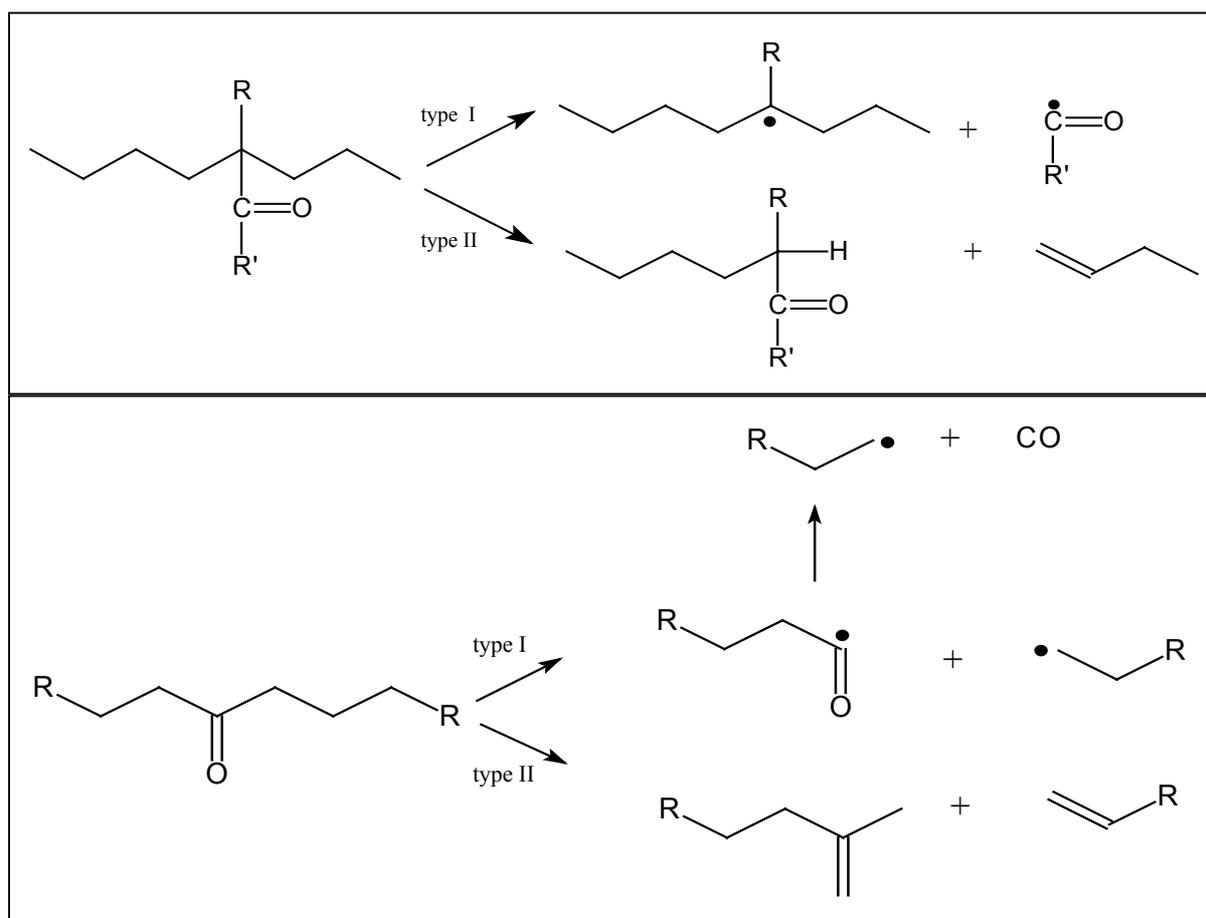


Figure 1 : Mécanismes de rupture de chaîne pour les polyéthylènes contenant des groupements carbonyles photo-sensibles (Hocking et coll., 1992).

Les polymères classiques comme le polyéthylène, le polypropylène ou encore le polystyrène sont connus pour être particulièrement résistants à toute sorte d'altération provoquée par leur environnement et notamment aux attaques enzymatiques ou aux réactions d'hydrolyse. Cependant il est possible d'augmenter leur sensibilité au rayonnement UV pour initier une première dégradation. Certains fabricants ont donc incorporé dans le squelette du polymère des groupements carboxyles par le biais d'une copolymérisation avec des cétones vinyliques ou du monoxyde de carbone (Hocking et coll., 1992). Le rayonnement UV

provoque la dégradation par rupture de la chaîne principale du polymère suivant la réaction de Norrish de type I ou II (cf figure 1). Au lieu d'inclure directement dans le squelette des groupements carbonyle, certains additifs à base de sels de métaux de transition peuvent agir comme antioxydants, quand ils sont en forte concentration pendant la durée d'utilisation du matériau et comme photoactivateurs à concentration plus faible. Le mécanisme de rupture de chaîne suit également la réaction de Norrish.

II LES PARAMETRES QUI INFLUENCENT LA BIODEGRADATION

II.1 La flore microbienne

Il est très difficile, pour ne pas dire impossible, de suivre l'évolution des populations microbiennes au cours d'un processus de compostage. Ceci est dû au fait que les micro-organismes qui sont responsables des divers types de réactions biochimiques sont très difficiles à isoler et par conséquent à dénombrer.

La température durant le compostage étant relativement élevée (jusqu'à 58°C suivant les normes) les micro-organismes actifs sont des micro-organismes thermophiles. Cependant l'analyse d'un prélèvement de milieu pour en analyser la composition biologique ne permet pas de différencier les micro-organismes réellement responsables de la biodégradation du matériau de ceux qui subsistent dans le compost en se nourrissant des restes de matières carbonées naturellement présents dans ce milieu, ou encore des champignons qui sporulent dans le compost en attendant des conditions de croissance plus favorable. Néanmoins, la capacité d'une souche microbienne à dégrader un polymère particulier pourra être étudiée en la mettant seule en présence du polymère en milieu gélosé (Torres et coll., 1996 ; Kleebeeg et coll., 1998 ; Rowe et coll., 2002).

Des travaux ont cependant montré l'influence de grandes classes de micro-organismes sur la biodégradation de quelques polymères biodégradables. Par l'utilisation de deux inoculum différents, l'un riche en champignons et actinomycètes et l'autre pas, on peut montrer le rôle prépondérant que jouent ces deux grandes classes de micro-organismes (les thermophiles en particulier) dans la biodégradation du poly(ϵ -caprolactone) en milieu compost (Othaki et coll., 1998). Constatation similaire pour Nishide et coll., 1999, lors d'un test de dégradation par enfouissement, qui ont ajouté un fongicide dans le milieu et stoppé ainsi toute activité de dégradation du poly(ϵ -caprolactone) mais également du PHB/HV. Au

contraire, l'ajout d'un bactéricide (streptomycine) n'a pas affecté significativement le déroulement de la biodégradation.

En 2001, Tokiwa et ses collaborateurs ont testé la capacité d'échantillons microbiens issus de sol d'eau ou de compost à dégrader quatre polyesters couramment considérés comme biodégradables (PCL, PHBV, PLA et Poly(buthylène succinate) par la méthode dite de la « zone claire » en boîte de Pétri. Ils ont pu observer que le nombre de micro-organismes capables de dégrader chaque polymère est inversement proportionnel à la température de fusion du polymère. En effet, pour le PCL et le PHBV dont les températures de fusion sont respectivement de 60°C et 113°C les souches microbiennes pouvant les dégrader sont très largement répandues, alors qu'elles sont beaucoup moins nombreuses pour le PBS ou le PLA dont les températures de fusion sont de 175°C et 180°C. Ces observations sont valables que le test de la zone claire soit effectué à 30°C ou à 50°C.

De manière générale, on peut supposer que le processus de biodégradation d'un polyester biodégradable quel qu'il soit, n'est jamais le fait d'une seule et unique souche et d'une même espèce microbienne. L'assimilation totale de l'ensemble du carbone du matériau résulte de la synergie de plusieurs espèces qui cohabitent dans le compost et dont la participation à la biodégradation est régulée par les paramètres physico-chimiques du milieu comme le pH ou le rapport C/N. Ces paramètres sont susceptibles de varier en fonction des sous-produits de dégradation libérés par les micro-organismes eux-mêmes.

II.2 Paramètres physico-chimique du milieu

I.2.1 La teneur relative en eau

La teneur relative en eau est évidemment un facteur limitant de la croissance des micro-organismes et donc du taux de dégradation d'un polymère dans quelque milieu que ce soit. C'est le taux d'humidité relative qui va faciliter ou non l'accessibilité des micro-organismes du milieu au substrat à dégrader. Dans le cas d'un test de biodégradation en milieu liquide sous agitation constante, le polymère à dégrader sera forcément en contact avec les micro-organismes alors que dans un milieu solide (à base de compost ou de sol) agité périodiquement par l'action de l'opérateur, le polymère est moins facilement accessible phénomène a été mis en évidence en observant la biodégradation d'un polymère naturel facilement biodégradable comme l'amidon dans un milieu minéral liquide et un compost (Gattin et coll., 2000). Dans les deux cas on obtient un taux de minéralisation équivalent mais

pour le milieu liquide la phase plateau indiquant la disparition de l'amidon est atteinte au bout de seulement 8 jours, alors qu'il faut attendre le onzième jour dans le compost. D'autres auteurs ont observé l'influence du taux d'humidité d'un compost sur la disparition de film d'acétate de cellulose avec un degré de substitution de 1,7 (Gu et coll., 1994). Pour des taux d'humidité de 60, 50 et 40%, les films disparaissent respectivement au bout de 6, 16 et 30 jours. Une diminution du taux d'humidité réduit donc de manière drastique la biodégradabilité de film de d'acétate de cellulose.

II.2.2 Température

Les températures élevées sont, en général, un facteur qui favorise l'ensemble des réactions abiotiques comme l'oxydation des films de polyéthylène (Jacubowicz et coll., 2003). Lorsque la température du milieu est supérieure à la température de transition vitreuse du polymère (à l'état vitreux à température ambiante), l'absorption d'eau est favorisée du fait de la mobilité des chaînes favorisant ainsi l'hydrolyse chimique (Agarwall et coll., 1998). Cela a logiquement pour conséquence d'accélérer le rendement final du processus de biodégradation.

Cela est particulièrement vrai pour le PLA dont le taux de dégradation abiotique augmente avec la température (Agarwal et coll., 1998). Des tests de biodégradation effectués à 40°C, 50°C et 60 °C sur ce polymère montrent que l'on observe une diminution de la masse molaire mais pratiquement aucune perte de masse sur les échantillons placés à 40°C et 50°C en présence de micro-organismes. Au contraire, à 60°C, température supérieure à la température de transition vitreuse du matériau (environ 58°C), on constate une perte de masse significative. Cela peut s'expliquer par le fait que les petits oligomères, libérés par l'hydrolyse due à l'absorption de l'eau dans le matériau, peuvent dans ce cas migrer vers le milieu extérieur du fait de l'état caoutchoutique du matériau. Les mêmes résultats ont été observés par d'autres auteurs (Ho et coll., 1999) dans des environnements biotiques pour des tests à 28, 40 et 55°C. On observe des résultats similaires pour plusieurs types de polymères biodégradables (Nishide et coll., 1999 ; Jung et coll, 1999).

II.2.3 pH

Pour garantir la survie de la flore microbienne dans le milieu il est nécessaire de maintenir un pH proche de la neutralité. Les tests en milieu liquide sont donc effectués dans

des solutions tamponnées. Il en est de même pour l'utilisation de milieux solides inertes qu'il est nécessaire de compléter avec un milieu minéral tamponné. Le compost étant un milieu complexe, aussi bien d'un point de vue organique que minéral, il est en général « naturellement » tamponné à un pH proche de 7 en fin de phase de maturation par les très nombreuses espèces chimiques qui le composent (De Oliveira et Tanchette, 2004). Il a aussi été montré pour le PLA présente une meilleure dégradation hydrolytique dans un milieu tamponné à pH 7,4 plutôt qu'à 3,7 (Li et coll., 1999). Ceci serait dû à une meilleure absorption de l'eau dans le cœur du matériau dans le cas du milieu tamponné à pH 7,4, ce qui favorise évidemment la rupture des liaisons ester par hydrolyse.

II.2.4 Rapport C/N

La norme ASTM D-5338-92 préconise un rapport C/N compris entre 10 et 40 pour le compost utilisé lors d'un test de biodégradation. Cependant, ce paramètre est très variable en fonction du type de déchets dont est composé le compost (déchets ménagers souvent très riches en matière azotée ou déchets agricoles « verts » comme des chutes de taille de haies ou des tontes d'herbes).

II.3 Structure et propriétés du polymère

II.3.1 Taux de cristallinité

L'organisation structurale du polymère a une influence sur sa capacité à être dégradée. En effet, plusieurs auteurs ont observé que ce sont les parties amorphes d'un polymères qui sont dégradées en premier (Eldsäter et coll., 2000 ; Agarwal et coll., 1998). Cela se traduit par une augmentation du taux de cristallinité du résidu non dégradé au cours du test de dégradation. Cela peut s'expliquer par le degré d'organisation élevé des chaînes de polymère dans les parties cristallines du matériau, qui limite leur accessibilité aux enzymes susceptibles de rompre les liaisons. La pénétration de l'eau dans le matériau est également meilleure dans les parties amorphes, c'est en partie ce phénomène qui est à l'origine de processus très particulier de biodégradation d'un block de PLA (Li et coll., 1995).

II.3.2 surface de contact spécifique micro-organismes/substrat

La taille, le format et la granulométrie de l'échantillon sont directement en rapport avec la surface de contact spécifique micro-organismes/substrat. On observe donc que le même matériau subira une biodégradation d'autant plus rapide que la surface de contact est importante. Ce phénomène facilement mis en évidence en comparant les vitesses de dégradation de plaques d'amidon extrudés entières ou broyées en milieu liquide (Gattin, 2000), qui sont respectivement de 530 et 850 mg de carbone par jour.

Le cas du Poly (acide lactique) et de ses copolymères avec le Poly (acide glycolique) est néanmoins très particulier. La morphologie ou la taille de l'échantillon à dégrader conditionne directement le mode de dégradation subi. En effet, pour des plaques ou des films suffisamment épais dans des conditions hydrolytiques en milieu liquide (Grizzi et coll, 1995), l'eau diffuse dans le cœur du matériau et l'hydrolyse des liaisons esters provoque la libération d'oligomères de petites tailles qui peuvent diffuser dans le milieu. Au bout de quelques temps on obtient des structures dites « hollow body » où le bloc de matériau a préservé sa forme générale mais le cœur a subi une dégradation très importante voire une perte de masse. Ce phénomène a également été observé pour la dégradation de plaques extrudées de PLA (0,66 mm) dans du compost (Gattin, 2000). Aucun dégagement de CO₂ synonyme de minéralisation n'a été observé au bout de 45 jours de test mais l'auteur a mis en évidence visuellement une différenciation cœur/peau qui a été confirmée par analyse DSC. Des tests de biodégradation dans le compost avec des films de PLA plus fins ont permis de mettre en évidence la minéralisation de ce matériau dans le compost (Farrel et coll., 2001). Cependant il est difficile voire impossible de déterminer le mode de dégradation du matériau, dans ce genre de test, car on ne peut toujours récupérer l'échantillon au cours de test. Ce processus particulier pourrait s'expliquer par le fait que la dégradation au cœur du matériau est autocatalysée par les groupements carbonyles qui apparaissent au fur et à mesure des ruptures de liaisons esters provoquées par l'absorption de l'eau. Au contraire, à la surface du matériau ces groupements carbonyles seraient rapidement neutralisés par le milieu liquide tamponné utilisé, empêchant ainsi tout phénomène de catalyse (Li et coll., 1999).

D'autres auteurs ont comparé la minéralisation de plusieurs polymères biodégradables (PBSA, PCL, PLLA, PBS) sous forme de poudre et de film d'épaisseurs différentes (Yang et coll., 2005). Il apparaît que pour les polymères facilement biodégradables comme le PBSA et le PCL, on ne note pas de différences importantes entre les profils de courbe de minéralisation, ni dans le taux de minéralisation. Par contre pour le PLLA (100% cristallin) et

le PBS qui sont légèrement plus résistants, on observe un taux de minéralisation plus important dans le cas des poudres.

II.3.3 composition du polymère

Lors de la dégradation de copolymères comme le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) on peut observer une certaine sélectivité de la part des enzymes. Si l'augmentation de la proportion d'unité HB dans le polymère semble favoriser le taux de dégradation des copolymères PHBV dans le compost ou dans des conditions hydrolytiques (Mergaert et coll., 1994 ; Li et coll., 1995), il semble que les enzymes ont tout de même une préférence pour les unités HB car la concentration d'unité HV mesurée par IRTF-ATR à la surface d'un film augmente au cours de la biodégradation du matériau dans le compost (Eldsäter et coll., 1999). L'ajout d'unité HV au poly (3-hydroxybutyrate) a cependant pour conséquence de faire diminuer le taux de cristallinité du matériau qui est un facteur influant de la biodégradation des matériaux comme expliqué plus haut.

Pour les copolyesters de poly (D-acide lactique-co-L-acide lactique), il a été mis en évidence une préférence de la protéinase K pour l'hydrolyse des liaisons esters D-L, L-D et LL. En conséquence les auteurs ont observé des taux de dégradation décroissants pour le PLA₄₀ puis le PLA₂₅ et enfin le PLA₁₀, contenant respectivement 40 25 et 10% d'isomère L (Li et coll., 2001). Cette enzyme n'est, par contre, pas capable de dégrader le poly (D-acide lactique). Au contraire, la copolymérisation de 50% d'unité D dans la chaîne carbonée permet de ramener la période de demi vie du PLA₅₀ à 10 semaines au lieu de 110 semaines pour le Poly (L-acide lactique) dans le cas de test en milieu liquide tamponné visant à estimer la dégradation hydrolytique du PLA (Hakkarainen, 2002). On a donc une influence différente de la proportion d'unité L dans le polymère suivant que l'on se place dans des conditions d'hydrolyse chimique ou biologique.

II.3.4 hydrophobie

Il est couramment admis qu'un matériau hydrophile sera plus sensible aux diverses attaques chimiques et biologiques auxquelles il est exposé. Les enzymes sont peu ou pas actives dans les parties hydrophobes des polymères. De même, le développement de biofilm et l'adsorption des micro-organismes à la surface du polymère seront favorisés par les matrices hydrophiles. Nous avons vu plus haut que l'absorption d'eau dans la matrice des

Classe de matériaux	fabricants	Nom commercial	
Acétate de cellulose	Mazzucchelli	BIOCETA®	
	Planet polymer	EnviroPlastic®-Z	
Copolyester aromatique/aliphatique	BASF	Ecoflex	
	Eastman	Easter Bio™	
Poly(ε-caprolactone) (PCL)	Birmingham polymers	Poly(ε-caprolactone)	
	Planet polymer	EnviroPlastic®-C	
	Solvay	CAPA®	
	Union carbide	TONE®	
Poly(ester amide)	Bayer	BAK 1095, 2195	
Poly(éthylène terephthalate) modifié	DuPont	Biomax®	
Poly(acide glycolique) (PGA)	Alkermers	Medisorb®	
	Birmingham polymers	Poly(glycolide)	
	Boehringer Ingelheim	Resomer®	
	PURAC	PURASORBPG	
Poly(hydroxyalcanoates) (PHA)	Metabolix	PHA	
	Biomer	Biomer™	
	Monsanto	Biopol®	
Poly(acide lactique) (PLA)	Alkermers	Medisorb®	
	Birmingham polymers	Poly(L-lactide) & Poly(DL-lactide)	
	Boehringer Ingelheim	Resomer®	
	Cargill Dow Polymers	EcoPLA®	
	Chronopol	Heplon™	
	Hygail	PLA	
	Neste	Poly(L-lactide)	
	PURAC	PURASORB® PL/PD/PDL	
	Poly(alcool vinylique) (PVA)	Idroplast	Hydrolene®
		Novon	Aqua-NOVON®
Planet Polymer		Aquadro™	
Texas Polymer		Vinex™	
Amidon & mélange à base d'amidon	AVEBE	Paragon™	
	Bio Plastic	Envar™	
	BIOTEC	Bioplast®, Bioflex®, Biopur®	
	Buna Sow Leuna	Sconacell®	
	Earth Shell	Starch-based composite	
	Midwest Grain	Polytriticum™ 2000	
	Novamont	Mater-Bi™	
	Novon	Ply-NOVON®	
	Starch Tech	ST1, ST2, ST3	
	Autres mélanges	Alkermers	Medisorb®
Bio Platic		Biocomposite material	
Birmingham polymers		Poly(lactide-co-caprolactone) ou (lactide-co-glycolide)	

Tableau 2: Polymères biodégradables commerciaux

poly (α -hydroxyacides) est un processus important voire indispensable dans le processus de bio-assimilation de ce type de polymères biodégradables (hakkarainen et coll., 2002).

Cependant tous les polymères hydrosolubles ne sont pas biodégradables et l'eau n'a que très peu ou pas d'influence sur la biodégradation dans le compost de certains polymères biodégradables comme le PHBV (Eldsäter et coll., 1999).

III> LES POLYMERES DEGRADABLES

Il existe plusieurs types de polymères biodégradables que l'on peut classer de différentes manières en fonction de leurs origines (ressources fossiles ou renouvelables), de leur nature chimique (cf. tableau 2) ou encore de leur processus de biodégradation. Le but ici n'est pas de faire un inventaire exhaustif, mais plutôt de donner quelques groupes représentatifs de ce que sont ces matériaux aujourd'hui. Une attention toute particulière sera donnée aux polyesters car c'est la classe de polymères la plus largement représenté sur le marché que ce soit seul ou dans des mélanges avec des polymères naturels issus de ressources renouvelables comme l'amidon.

III.1 Les matériaux à base de polymères naturels

III.1.1 Acétate de cellulose

L'acétate de cellulose est obtenu par l'action de l'anhydride acétique sur le coton ou la pulpe de bois. La biodégradabilité de ce type de polymère est très discutée et serait dépendante du degré de substitution des groupements hydroxyyles de la chaîne de cellulose par les groupements acétate. Gu et ses collaborateurs (1993) ont observé une perte de masse totale dans le compost pour des films d'acétate de cellulose avec des degrés de substitution de 1,7 et 2,5. D'après les mêmes auteurs, la perte de masse observée serait principalement due à l'activité biologique et les facteurs abiotiques n'auraient pratiquement aucune influence. Cependant ces travaux ne permettent pas de conclure quant à la minéralisation de matériau et encore moins sur sa bio-assimilation. On admet couramment que des films d'acétate de cellulose avec des degrés de substitution inférieurs à 1 sont susceptibles de se dégrader dans le compost (Fambri et coll., 2000). Les mêmes auteurs notent qu'il est important de déterminer la biodégradabilité des films d'acétate de cellulose avec leurs plastifiants car l'acétate de

cellulose seul a une température de dégradation qui est très proche de celle sa température de fusion, donc ce matériau ne sera pas utilisé sans plastifiants.

III.1.2 Amidon

L'amidon peut être employé dans des mélanges, avec d'autres polymères courants ou biodégradables, de plusieurs manières différentes, sous sa forme granulaire « native », d'amidon déstructurée ou encore après une plastification avec de l'eau ou du glycérol. L'intérêt est double dans la mesure où cela peut permettre de rendre les mélanges avec les polymères classiques plus sensibles aux réactions de dégradation après leurs utilisations, mais également de valoriser de manière non alimentaire une ressource renouvelable et bon marché comme l'amidon.

III.1.2.1 Mélange à base d'amidon granulaire natif

C'est le cas le plus simple où l'amidon natif garde sa structure granulaire. On obtient un matériau composite où l'amidon se comporte comme une charge au sein de la matrice. Par exemple cette matrice peut être du polyéthylène (Hocking et coll., 1992), ce qui permet d'obtenir un matériau dont les propriétés sont proches de celles du polyéthylène qui reste très majoritaire, mais qui est sensible aux attaques enzymatiques du fait de la présence de l'amidon. Cette première dégradation de l'amidon permet de fragiliser la structure générale de la matrice et de la rendre éventuellement plus sensible aux phénomènes abiotiques de son environnement même si l'on sait que le polyéthylène n'est pas ou très peu bio-assimilable. L'inconvénient des mélanges avec de l'amidon granulaire « natif » est que les proportions d'amidon que l'on peut incorporer dans la matrice doivent rester très faibles, entre 6 et 10 ou 15% (Vert, XXX), sous peine de réduire considérablement les propriétés mécaniques du matériau obtenu.

III.1.2.2 Mélange à base d'amidon déstructuré

De manière à incorporer de plus grande quantité d'amidon dans les mélanges, il est possible de modifier irréversiblement la structure granulaire de l'amidon pour le mélanger avec des polymères synthétiques à caractère hydrophile (PGA, PLA) ou avec des « polymères hydrophobes conventionnels » comme le polyéthylène. On obtient un matériau

multiphase beaucoup plus homogène où il est possible d'incorporer jusqu'à 50 ou 60% d'amidon déstructuré ou gélatinisé. La fraction amidon de ces matériaux est évidemment rapidement dégradée dans des environnements biologiquement actifs comme le sol ou le compost, ce qui peut permettre au matériau d'être considéré comme biodégradable au vue des directives imposées par certaines normes ou 60% du matériau doit être minéralisé sous forme de CO₂ dans la limite de 45 jours (ASTM D-5338-92, ISO/CEN 14855). Cependant, la partie « polymères synthétiques » peut rester pendant de très longues périodes dans le milieu où le matériau a été placé pour être dégradé avant d'être totalement bio-assimilé. Cela peut entraîner une contamination plus ou moins grave de ce milieu et le rendre ainsi impropre aux cultures dans le cas d'un sol (dans le cadre de l'utilisation de ce matériau comme film de paillage) ou à l'épandage dans le cas d'un compost (hocking et coll., 1992).

III.1.2.3 Amidon plastifié

Enfin l'amidon peut aussi être utilisé comme la partie majoritaire du mélange sous une forme dite plastifiée encore appelé « amidon thermoplastique ». L'amidon natif de par sa structure granulaire n'a pas de propriétés plastiques, sa température de dégradation est inférieure à sa température de fusion et il est donc impossible de la mettre en œuvre. On peut le plastifier en l'extrudant avec des additifs plastifiants qui vont permettre de rompre les liaisons faibles entre les chaînes glycosidiques de l'amidon et améliorer ainsi la mobilité des chaînes lors d'une augmentation de température. Le matériau obtenu peut être utilisé seul (NOVON, mélange amidon/eau principalement) ou mélangé avec un autre polymère minoritaire et/ou de faible poids moléculaire (MaterBi, mélange amidon/PVA ou PCL). Du fait de la quantité importante d'amidon qu'ils contiennent, ces mélanges sont en général facilement biodégradables. L'amidon plastifié peut également être greffé avec des agents de compatibilisation pour améliorer les propriétés mécaniques du matériau. Ces agents peuvent être des compatibilisants classiques comme des peroxydes ou des diisocyanates mais ils peuvent aussi être spécifiques des deux phases du mélange.

III.2 Les polyesters

Les polyesters sont les principaux représentants des polymères que l'on peut réellement considérer comme biodégradables. De part leur nature chimique, ce sont les plus sensibles aux différentes attaques susceptibles de provoquer une biodégradation, ce qui est

particulièrement vrai pour les hydrolyses d'origine chimique ou biologique comme expliqué plus haut (cf. paragraphe I.2).

III.2.1 Le poly (acide lactique) ou PLA

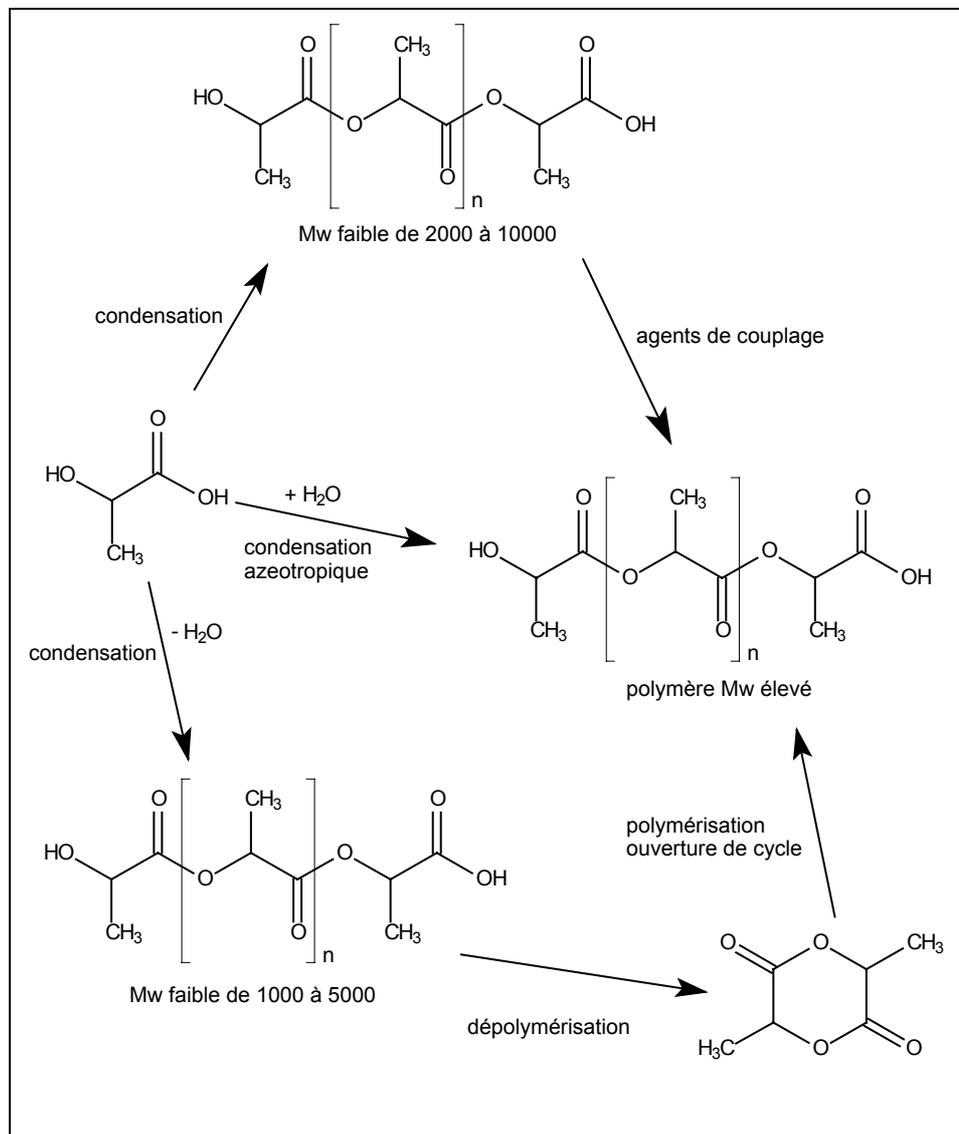


Figure 2 : voies de synthèse de poly(lactique acide) de degré de polymérisation élevé

La synthèse du PLA est particulièrement intéressante parce qu'il peut être obtenu indirectement à partir de ressources renouvelables. L'acide lactique peut être produit par fermentation du glucose par diverses souches microbiennes du genre *Lactobacilli* en fonction du polysaccharide naturel qui fait office de substrat (Garlotta et coll., 2002). L'acide lactique obtenu par fermentation est neutralisé avec de l'hydroxyde de calcium pour éviter que

l'acidification du milieu n'inhibe l'activité microbienne. Une nouvelle acidification avec de l'acide sulfurique permet de précipiter le calcium sous forme de sulfate de calcium et de récupérer l'acide lactique par filtration. Le produit final sera purifié en fonction de l'utilisation que l'on souhaite faire de l'acide lactique. Il peut ensuite être polymérisé en PLA de poids moléculaire élevé en suivant les différentes voies de synthèse présentées dans la figure 2.

Les propriétés mécaniques de ce matériau varient suivant la proportion de stéréoisomères D ou L (le Poly(L-acide lactique) est pratiquement 100% cristallin), mais le PLA est un polymère plutôt rigide et cassant avec des propriétés mécaniques comparables à celles du polystyrène.

C'est le polymère biodégradable qui a été aujourd'hui le plus développé commercialement et il est produit sous divers noms (cf. tableau 2). Ses propriétés mécaniques en font un matériau avec de nombreuses applications dans le domaine de l'emballage comme film de protection. De plus il est sans risque pour le contact alimentaire car le monomère dont il est constitué, l'acide lactique est un composé que l'on retrouve naturellement dans l'organisme humain. Pour cette raison il est déjà utilisé comme fil de suture qui se résorbe naturellement sans nécessiter d'intervention chirurgicale ou dans diverses autres applications médicales ou pharmaceutiques.

La dégradation de ce polymère a déjà été étudiée dans divers types de milieux et se déroule selon un mécanisme en deux phases (cf. paragraphe I.2.1 et I.3.3.2) : Hydrolyse chimique des longues chaînes de PLA par l'eau qui pénètre dans la matrice puis bio-assimilation des monomères et petits oligomères qui migrent dans le milieu de dégradation. Ce processus n'est pas homogène et c'est la partie interne du block de PLA qui est dégradé en premier (différenciation cœur/peau).

III.2.2 Le poly (ϵ -caprolactone) ou PCL

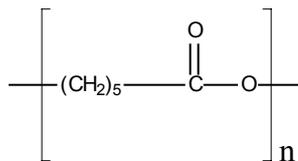


Figure 3 : formule développée de poly (ϵ -caprolactone)

Propriétés	PLA	PHBV	PCL	PEA	PBAT	PBSA
	(naturework)	(BiopolD400G)	(Tone787)	(BAK 1095)	(Eastarbio 14766)	(bionolle 1000)
Fusion (°C)	158	177	60	125	110-115	114
Module d'Young	2000	4000	386	180	81	500
Elongation à la rupture (%)	10	6	800-1000	400	600	800
Densité	1.25	1.25	1.15	1.07	1.21	1.20
Tg (°C)	60	0	-60	-	-	-
Perméabilité vapeur d'eau WVTR (g/m ² /Jour)	172	21	177	680	550	330

Tableau 3 : Propriétés mécaniques des principaux polyesters dégradables

Le PCL (Figure 3) est obtenu par polymérisation par ouverture de cycle du ϵ -caprolactone (obtenu à partir du pétrole). C'est un polymère linéaire qui est à l'état caoutchoutique à température ambiante, sa température de transition vitreuse étant aux environs des -60°C pour une température de fusion située entre 60°C et 80°C . C'est un polymère semi-cristallin et relativement hydrophobe.

De ce fait, ce matériau semble assez résistant aux facteurs de dégradation abiotique. A l'inverse du PLA, on n'observe pas de phénomène d'autocatalyse par les groupements carboxyles provenant des premières ruptures des liaisons esters (Siparsky et coll., 1998). Pour la dégradation de PCL en poudre marqué au tritium dans un milieu liquide tamponné à 7.4, d'autres auteurs n'ont détecté que très peu ou pas de libération de radioactivité dans le milieu, alors que 75 à 90 % est recouvert dans le milieu au bout de 45 jours pour un test en milieu liquide en présence boues activées (Ponsart et coll., 2001). Il a été confirmé que les souches microbiennes capable de dégrader le PCL sont largement répandues dans l'environnement (Tokiwa et coll., 2002). La biodégradation enzymatique se déroule suivant un mécanisme d'érosion de surface par hydrolyse des liaisons esters en bout de chaîne, phénomène mis en évidence par le suivi du poids moléculaire moyen qui ne diminue que très faiblement (Hakkarainen et coll., 2002 ; Eldsäter et coll., 2000). Selon les mêmes auteurs, ce sont les parties amorphes du polymère qui sont dégradées préférentiellement et le principal sous-produit de dégradation, l'acide hydroxycaproïque peut être oxydé en acétylcoenzymeA par certains micro-organismes (Albertsson et coll., 2001).

III.2.3 Le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) et poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV)

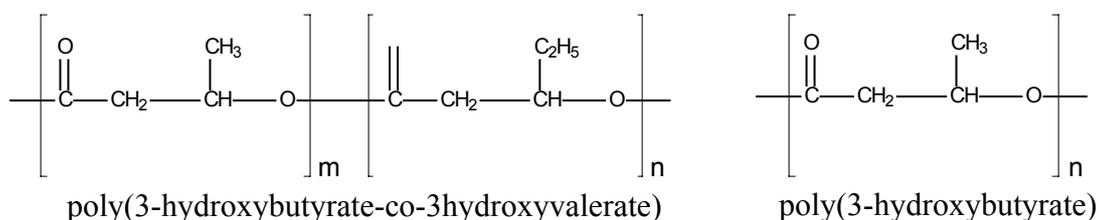


Figure 4 : formule développées des poly(β-hydroxyalcanoates) biodégradables.

Le PHB (Figure 4) fait partie des poly(β-hydroxyalcanoates) et est produit biotechnologiquement par certaines souches microbiennes. Lorsqu'elles sont placées dans certaines conditions nutritives, elles produisent naturellement ce polymère comme réserve de carbone. Pour améliorer les propriétés de ce polymère, le copolyester avec des unités 3-hydroxyvalerate peut également être produit par voie microbienne en amenant de l'acide propionique comme substrat. Des études sont actuellement en cours pour faire produire ces polymères par des plantes transgéniques de manière à baisser le coût de production qui est le principal obstacle à leur succès commercial. Monsanto, la société qui commercialisait ce polymère sous le nom « Biopol » a abandonné la production pour cette même raison..

Ces polymères sont fortement cristallins avec des températures de fusion et de transition vitreuse proches de celle du polypropylène. Les propriétés mécaniques varient en fonction de la proportion d'unité 3-hydroxyvalerate dans le copolyester. Une augmentation de ces unités permet de diminuer la température de fusion, permettant de travailler à des températures plus éloignées de la température de dégradation lors de leur mise en forme.

Le PHB et le PHBV sont reconnus pour n'être que très peu ou pas sensibles aux facteurs abiotiques du milieu de dégradation dans lequel ils sont placés. De plus les micro-organismes qui les produisent possèdent naturellement le pack enzymatique nécessaire pour les dégrader et les utiliser comme sources de carbone. Par conséquent la biodégradation du PHB et du PHBV dans le compost ou le sol est principalement due à des hydrolyses enzymatiques (généralement en bout de chaîne). Les souches, autres que celles qui les produisent, capables de dégrader ces polymères, sont également présentes dans la nature

(Tokiwa et coll., 2001). Il est intéressant de noter que le PHB n'est pas le seul poly (β -hydroxyalcanoate) (PHA) que les micro-organismes peuvent synthétiser, il existe de multiples unités « β -hydroxyacide » que certaines souches sont capables de polymériser (Mohanty et coll., 2000). Actuellement, des études sont en cours pour étudier les PHA synthétisés par la flore microbienne vivant près des sources chaudes des grandes profondeurs de l'océan (nouveaux sujets de recherche IFREMER).

III.2.4 le poly(butylène succinate-co-butylène adipate) (PBSA), poly(butylène succinate) (PBS) et poly(éthylène succinate) (PES)

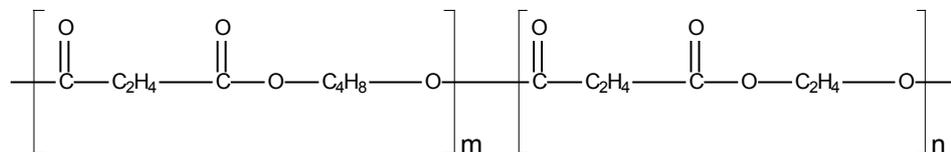


Figure 5 : formule développée du poly(butylène succinate-co-butylène adipate)

Ces Polymères (Figure 5) sont obtenus par polycondensation de glycols (éthylène glycol ou 1,4-butandiol) avec l'acide adipique et/ou l'acide succinique. Ils sont principalement commercialisé sous le nom de Bionolle par la société Showa High Polymer qui est basée au Japon. Le PBSA est un polymère blanc cristallin dont la température de fusion est comprise entre 90 et 120°C et la température de transition vitreuse entre -45 et -10°C. Les travaux concernant l'étude de la biodégradabilité (notamment les taux de minéralisation dans le compost) de ce matériau sont encore assez rares mais certains auteurs ont étudié l'influence de la proportion d'unité « butylène succinate » par perte de masse et ont constaté que plus cette proportion est élevée, moins les micro-organismes les dégradent. La dégradation hydrolytique dans un environnement liquide à pH 10.6 dépourvu de microorganismes serait au contraire favorisée par une augmentation de cette proportion (Ahn et coll., 2001). Farrel et coll, 2001 ont déterminé la biodégradation de films de Bionolle 3000 (PBSA) par minéralisation dans le compost et ont obtenu un taux de 75%. D'autres auteurs ont étudié la minéralisation des divers grades de Bionolle sous forme de poudre dans le sol, le compost ou des boues de station d'épuration (Nishioka et coll., 1994). Après 7 semaines dans des boues de station, environ 90% du PES a été minéralisé contre seulement 5% pour le

PBSA et le PES. Dans le compost, le PBSA atteint un taux de minéralisation de 88% au bout de 30 jours. D'après les courbes présentées par ces auteurs, ce taux ne semble pas stabilisé et pourrait donc encore augmenter, signifiant que le bionolle 3000 serait biodégradé à 100% sous forme de CO₂ dans le compost.

III.2.5 Poly(ester-amide)

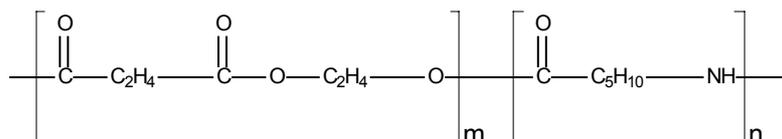


Figure 6 : formule développée d'un poly(ester-amide)

Ces polymères sont synthétisés à partir d'acide adipique d'éthylène glycol et d'un acide aminé telles que la glycine, la leucine ou la phénylalanine. Ils sont principalement connus sous l'appellation commerciale BAK produit par Bayer mais dont la production a été stoppée en raison d'un coût trop élevé. Ce produit existe sous deux grades différents, le BAK 1095 et 2095, possédant des températures de fusion égales respectivement à 125 et 135°C. Le Bak 1095 possède des propriétés proches de celles du polyéthylène basse densité et son taux de minéralisation atteint les 40% en milieu compost.

III.3 Les polymères photodégradables

Ces matériaux sont censés se dégrader sous l'action du rayonnement UV suite à une exposition plus ou moins longue à la lumière du soleil. On trouve leur application majeure dans le domaine des films de paillage pour l'agriculture. Comme indiqué plus haut (cf. § I.2.3), cette sensibilité est due dans la majorité des cas à l'incorporation dans des chaînes de polyoléfines de groupements carbonyle photo-sensibles qui provoquent la rupture des longues chaînes en fragments plus réduits. Cependant des interrogations subsistent quant à la bio-assimilation des fragments qui restent tout de même assez résistants aux attaques microbiennes. Pour améliorer leur biodégradabilité « globale » il est possible de mélanger ces polymères à une charge d'amidon plus ou moins importante qui sera facilement dégradée par les micro-organismes du sol ou du compost. Le concept de ce genre de matériau veut que les micro-organismes qui se sont développés au dépend de l'amidon du matériau, puissent ensuite

dégrader les fragments de polyéthylène de poids moléculaire plus réduit produit par l'action du rayonnement UV. En raison du caractère « photosensible » de ces matériaux, leur stockage est limité aux endroits où le rayonnement sera suffisant pour initier les ruptures de chaînes du polyéthylène, il n'est donc pas envisageable de les stocker en fin de vie dans une unité de compostage. Cette dernière est pourtant un site privilégiée pour que le matériau soit au contact de souches microbiennes capables d'accomplir l'élimination des chaînes courtes, il y a donc paradoxe quant à l'élimination des matériaux photosensibles.

IV> LES METHODES D'ESTIMATION DE LA BIODEGRADATION D'UN MATERIAU POLYMERE.

Le but de ce paragraphe est de synthétiser les différentes méthodes et techniques qui sont utilisées pour caractériser et/ou quantifier la biodégradation d'un matériau. Ces méthodes n'impliquent pas forcément que le matériau soit étudié directement dans le compost car les différents supports existants sont très variés et sont destinés à caractériser la biodégradation des matériaux dans d'autres milieux. Cependant ils sont tous susceptibles d'apporter une information sur la biodégradation du matériau que ce soit au niveau des mécanismes biologiques et physico-chimiques mis en jeu ou alors pour l'estimation de la biodégradabilité du polymère. Les tests en milieux liquides sont d'ailleurs souvent utilisés pour donner une première approximation de la capacité d'un matériau à se dégrader de manière générale.

IV.1 Paramètres de mesure

Il est possible de suivre la biodégradation d'un matériau en étudiant différents paramètres. Ces paramètres vont permettre d'apporter diverses indications sur le degré d'avancement de la dégradation. Les paramètres utilisés pour estimer/observer la biodégradation d'un matériau conditionnent directement l'interprétation que l'on pourra tirer des résultats obtenus. En effet, tous ne permettent pas de conclure à une réelle bio-assimilation du polymère, mais témoignent d'une altération de l'intégrité physique du matériau ou d'une éventuelle modification des propriétés physico-chimiques et/ou mécaniques.

IV.1.1 Perte de masse

La mesure de la biodégradabilité par perte de masse consiste à peser à un temps donné la masse de l'échantillon placé dans un milieu de biodégradation quelconque. Cette masse rapportée à la masse initiale de l'échantillon avant le test permet d'obtenir un pourcentage de perte de masse de l'échantillon. C'est sans doute la méthode la plus élémentaire pour avoir une première idée du comportement d'un polymère dans le compost. Elle peut être appliquée quel que soit le milieu (compost ou milieu minéral liquide), mais il y a des précautions à prendre pour obtenir des résultats corrects :

- Lors de la pesée de l'échantillon il est nécessaire de le soumettre à un nettoyage parfait pour ne pas fausser la mesure de la masse. Or dans le cas d'un développement microbien à la surface du film, il est parfois très difficile de s'assurer que la surface de celui-ci est totalement propre.
- L'échantillon est susceptible d'absorber de l'eau (PLA), il est donc nécessaire de bien le faire sécher avant la pesée

Il est important de noter que cette mesure reste valable tant que l'intégrité du matériau est conservée. Dans le cas contraire la perte de masse n'est plus du tout significative de l'état de dégradation du matériau test. Dans le cas où les températures appliquées tout au long du test sont élevées (58°C pour la norme européenne 14855), il est assez courant, pour un film, d'observer une fragmentation totale en de multiples morceaux plus ou moins importants à cause d'une altération irréversible des propriétés mécaniques. Alors, la pesée d'un des fragments ne donne pas une estimation satisfaisante de la perte de masse de l'échantillon. Il est important de noter qu'une perte de masse n'est absolument pas une preuve valable d'une quelconque biodégradation de l'échantillon et donc encore moins de sa bio-assimilation car il se peut que la fragmentation de l'échantillon ne soit que la conséquence d'une altération due aux facteurs abiotiques du milieu.

IV.1.2 Développement microbien

Le développement microbien est généralement utilisé pour déterminer la capacité d'une ou plusieurs souches données à dégrader un polymère particulier. Différentes méthodes sont utilisées pour mettre en évidence le développement microbien. La plus simple consiste à

observer le développement d'une colonisation à la surface d'un film de polymère. Dans ce cas l'estimation du développement microbien ne sera que visuelle.

La méthode dite de la « zone claire » est également utilisée lorsque l'on pratique un test en boîte de Petri sur milieu gélose. Dans ce cas le polymère, qui est la seule source de carbone présente dans le milieu de culture, est ajouté à la gélose sous forme de poudre très fine, ce qui a pour conséquence de la rendre opaque. Après inoculation et incubation, le développement d'une souche microbienne capable de dépolymériser le polymère créera l'apparition d'une zone claire dans la gélose (Manna et coll., 2000).

Ce paramètre de mesure ne permet donc pas une estimation chiffrée de l'état de biodégradation du polymère testé mais peut néanmoins fournir une première information quant à la résistance du matériau aux attaques microbiennes, avant de mettre en œuvre des tests plus avancés. C'est également le moyen le plus efficace pour rechercher la présence dans un milieu naturel de souches microbiennes capables de dégrader un polymère donné.

IV.1.3 Suivi des propriétés mécaniques et analyses physico-chimiques

Il est possible de suivre une ou plusieurs caractéristiques intrinsèques du matériau non dégradé comme la température de transition vitreuse, le taux de cristallinité ou encore mettre en évidence l'apparition de sous-produits de dégradation spécifiques. Ces analyses peuvent permettre de rendre compte d'une altération de la structure chimique ou des propriétés mécaniques du matériau alors qu'aucune trace de biodégradation n'est visible, ou encore apporter des informations sur le type de mécanismes mis en jeu lors du processus de biodégradation.

IV.1.3.1 Analyse infrarouge

L'analyse infrarouge d'un polymère donne un spectre de pics caractéristiques du type de liaison mis en jeu. Par conséquent, si une de ces liaisons est rompue suite à une attaque microbienne ou à cause des conditions du milieu de dégradation, le spectre infrarouge du polymère sera modifié. Des travaux ont permis de mettre en évidence une variation significative du pic caractéristique de cette liaison au cours de la dégradation d'un PLA dans divers milieux de dégradation (Agarwal et coll., 1998). Cette variation a notamment pu être chiffrée grâce à l'utilisation des pics caractéristiques des liaisons C-H du polymère comme « étalon interne », car elles ne sont pas affectés par la processus de biodégradation. Cet étalon

interne permet de normaliser l'aire des pics liés à la liaison ester quel que soit la concentration de l'échantillon et permet donc de quantifier une éventuelle variation.

IV.1.3.2 Chromatographie, suivi des sous-produits de dégradation

Au cours de la dépolymérisation d'un polymère, celui-ci libère des molécules qu'il est possible d'extraire sélectivement avec un solvant adéquate. On peut alors les identifier et suivre leur évolution dans le milieu par chromatographie. Braud, 2004 ont pu ainsi suivre par électrophorèse capillaire la dépolymérisation du PHB en milieu hydrolytique et mettre en évidence la formation d'acide crotonique par recombinaison des monomères d'acide hydroxybutirique. Lindström et coll, 2004, ont déterminé quantitativement les sous-produits de dégradation du PBS et du PBA par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, au cours de test en milieu hydrolytique.

Dans le cadre de la dégradation d'un co-polyester, ce type d'analyse peut mettre en évidence les unités qui sont préférentiellement hydrolysées par les micro-organismes ou lors d'attaques chimiques.

IV.1.3.3 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC), suivi du poids moléculaire

Si le milieu utilisé le permet, il est possible de suivre l'évolution du poids moléculaire moyen du polymère résiduel non encore dégradé par chromatographie d'exclusion stérique. La dépolymérisation du polymère n'entraîne pas nécessairement une diminution du poids moléculaire moyen, notamment dans le cas d'une dépolymérisation due en majeure partie à une attaque enzymatique (voir § I.2.2) où le mode d'attaque des enzymes aura une influence importante sur les résultats obtenus en SEC.

IV.1.3.4 propriétés physiques et mécaniques

Il se peut qu'un matériau placé dans un milieu de dégradation donné ne subisse que quelques ruptures de chaîne qui ne provoquent pas de perte de masse, de libération de monomère ou de minéralisation. Dans le cas de ces matériaux plus résistants, l'analyse des propriétés mécaniques et/ou physico-chimiques du matériau permet de mettre en évidence une altération qui n'est souvent que la conséquence des facteurs abiotiques du milieu telles

que l'humidité ou la température. Ces altérations mécaniques peuvent également être une étape préliminaire et nécessaire avant qu'une éventuelle dépolymérisation n'ait lieu.

On peut mettre en évidence par DSC, lors de la dégradation de plaque de PLA, une différenciation cœur/peau dans l'état du matériau, après 45 jours d'exposition en milieu liquide, compost ou solide inerte (Gattin, 2001).

Dans le cas du PHBV (Luo et coll., 2003), les analyses DSC après 50 jours d'exposition dans le compost, montre que le taux de cristallinité du film restant ne varie pas ou peu, tout comme le poids moléculaire moyen. Les auteurs ont pu conclure que leur film de PHBV n'était dégradé que par un phénomène d'érosion à la surface et qu'aucune réaction de dépolymérisation n'avait lieu dans la matrice même du film.

IV.1.4 Respirométrie

IV.1.4.1 Principe

En conditions aérobie, le but des mesures dites de respirométrie est de quantifier la dégradation ultime du matériau, c'est-à-dire sa disparition complète du milieu par assimilation par les micro-organismes présents. Cette mesure peut se faire en mesurant l'un ou l'autre des paramètres suivant :

- la quantité d'oxygène consommée par les micro-organismes du milieu pour minéraliser spécifiquement le polymère sous forme de dioxyde de carbone.

- la quantité de dioxyde de carbone libérée due à la minéralisation spécifique du matériau à tester par les micro-organismes du milieu.

IV.1.4.1.1 Mesure de la consommation d'oxygène

Dans des conditions aérobie, les micro-organismes consomment de l'oxygène pour oxyder le carbone du polymère sous forme de dioxyde de carbone. On peut calculer la quantité théorique d'oxygène nécessaire pour oxyder l'ensemble du carbone présent dans le polymère. Grâce à une électrode spécifique, on peut connaître la quantité d'oxygène consommée par le milieu durant le test pour oxyder le matériau test. Le degré de biodégradation atteint par le polymère en fin de test sera donc donné par la quantité

d'oxygène consommée rapportée à la quantité d'oxygène consommée si le polymère est complètement dégradé par les micro-organismes sous forme de CO₂.

IV.1.4.1.2 Mesure de la production de dioxyde de carbone

Il est également possible de mesurer directement le produit ultime de la biodégradation du polymère en condition aérobie. Le nombre de moles de dioxyde de carbone formées par la minéralisation du polymère est égal au nombre de moles de carbone constituant le polymère qui a été minéralisé. En divisant le nombre de moles de dioxyde de carbone formées durant un tests par le nombre de moles de carbone présentes dans l'échantillon dégradé, on obtient le taux de minéralisation du polymère dans les conditions du test.

IV.1.4.2 Equipement pour la mesure du CO₂

Le matériel nécessaire à la mesure de l'oxygène est en général une électrode paramagnétique, plongée dans le milieu de dégradation. La mesure du CO₂ est la technique de mesure la plus largement répandue pour les tests de respirométrie. Par conséquent de nombreux dispositifs pilote ont été développés pour la mise en place de test de biodégradation. Nous détaillerons dans ce paragraphe ces différents systèmes, destinés à la mesure du dioxyde de carbone produit par la biodégradation d'un polymère dans divers milieux de dégradation.

IV.1.4.2.1 Témoin

Lorsqu'on souhaite caractériser la biodégradation d'un polymère par son taux de minéralisation, il est important de ne prendre en compte pour le calcul que le dioxyde de carbone qui a pour origine la biodégradation par les micro-organismes du matériau test. Or l'inoculum microbien utilisé pour le test produira naturellement du dioxyde de carbone du fait de la respiration endogène des micro-organismes présents. Si cette production de CO₂ sera relativement limité et faible dans le cas d'un test en milieu liquide où le matériau test est la seule source de carbone, ce ne sera pas le cas pour un test de biodégradation se déroulant en milieu compost, dans le sol ou encore dans des boues activées d'une station d'épuration. En effet, dans ces milieux, les nombreux composés chimiques présents sont autant de substrats disponibles pour une population microbienne importante et variée.

La seule solution analytique pour différencier le dioxyde de carbone provenant de la dégradation du polymère de celui provenant de l'activité biologique du compost est d'utiliser un polymère test contenant des marqueurs sous la forme d'isotopes radioactifs du carbone. Cependant, les problèmes rencontrés pour obtenir le polymère souhaité contenant les marqueurs radioactifs ainsi que le coût élevé de ces produits empêchent l'utilisation de ces produits dans le cadre de tests de biodégradation routiniers (Shen et coll., 1996).

La solution la plus simple consiste à quantifier le dégagement de dioxyde de carbone dû à la respiration endogène du milieu par la mise en place d'expériences témoins. Le test témoin se déroule dans le même milieu que le test de dégradation mais sans le matériau test. La quantité de CO₂ dégagée est donc uniquement le résultat de la respiration endogène de l'inoculum. En s'appuyant sur l'hypothèse que cette activité biologique intrinsèque sera la même en présence du matériau test, la quantité de CO₂ produite lors de l'expérience témoin sera retranchée de celle produite pendant le test de biodégradation en présence du matériau test. Le résultat de cette soustraction est, théoriquement, la quantité de CO₂ produite du fait de la minéralisation du carbone du matériau à dégrader.

Cependant des auteurs ont montré, par l'utilisation de polymères contenant des marqueurs radioactifs, que certains substrats lorsqu'ils sont présents dans le compost, entraînent une activité biologique intrinsèque plus importante (shen et coll., 1996), susceptible de biaiser les résultats de tests en respirométrie.

IV.1.4.2.2 Système de piégeage et/ou de mesure du CO₂

Il existe principalement deux moyens différents de quantifier le CO₂ libérés par l'activité microbienne :

- le piégeage dans une solution alcaline de soude ou d'hydroxyde de Baryum en large excès

- la mesure directe non destructive grâce à une cellule de mesure infrarouge

IV.1.4.2.2.1 piégeage chimique

C'est le moyen le plus simple de capter le dioxyde carbone libéré par la minéralisation durant un test de biodégradation. Le débit gazeux qui sort de l'enceinte où se déroule le test

passer dans plusieurs flacons bulleux qui contiennent une solution alcaline de soude ou de d'hydroxyde de baryum en large excès et de concentration connue. Le dosage acido-basique de la solution permet de connaître la quantité de soude ou d'hydroxyde de baryum qui n'a pas réagi. Par différence on peut déduire la quantité totale de dioxyde de carbone présente dans le flux gazeux. Cette méthode permet à priori de piéger tout le CO₂ produit et donc de le quantifier avec exactitude y compris dans le cas où la minéralisation est assez faible. L'inconvénient est qu'il faut s'assurer que la solution alcaline est toujours en large excès et donc la renouveler régulièrement. A chaque renouvellement, il faut doser la solution et dans le cas de test assez long, ces opérations peuvent s'avérer assez fastidieuses.

Pour éviter cette perte de temps liée aux opérations de titration, des auteurs ont développé un système automatisé basé sur la variation de la conductivité électrique de la solution alcaline au fur et à mesure que le CO₂ est piégé. La conductivité de la solution est calibrée en fonction du CO₂ piégé et les données fournies par l'électrode de mesure sont automatiquement stockées dans un ordinateur (Itävaara et coll., 1996). Il est cependant toujours nécessaire de renouveler régulièrement la solution alcaline pour que le piégeage du CO₂ soit toujours efficace.

De manière générale l'utilisation du piégeage chimique n'est possible que dans la mesure où le débit gazeux qui alimente les réacteurs n'est pas trop élevé de manière à ne pas être obligé de changer la solution alcaline trop souvent.

IV.1.4.2.2 analyseur infrarouge

- Principe de fonctionnement :

L'utilisation d'un tel appareillage permet de mesurer directement, en continu et de manière non destructive la quantité de CO₂ présente dans le flux gazeux qui sort d'un réacteur. La cellule de mesure est généralement étalonnée avec un « zero » qui est un gaz ne contenant pas de CO₂ et une bouteille étalon de concentration connue. Ce système n'est intéressant que s'il est couplé avec un système d'acquisition automatique des données, de manière à ce que l'opérateur ne soit pas constamment obligé de relever les concentrations données par l'analyseur infrarouge lors de chaque mesure.

Un analyseur infrarouge est composé d'une source de lumière infrarouge dont le faisceau oscille entre une cellule de mesure où passe l'effluent gazeux à mesurer et une cellule dite de référence qui contient un gaz inerte. Le faisceau lumineux sera plus ou moins absorbé

en fonction de la concentration en CO₂ dans la cellule de mesure. La différence d'absorbance entre la cellule de mesure et la cellule de référence génère ainsi un signal électrique directement proportionnel à la concentration en CO₂ dans l'effluent gazeux provenant d'un réacteur où a lieu la biodégradation.

- Système d'échantillonnage :

L'analyseur infrarouge est généralement intégré dans un ensemble automatisé composé de plusieurs réacteurs permettant à l'opérateur de mettre en place plusieurs tests de biodégradation en même temps, avec le minimum d'intervention nécessaire. Il n'y a pas, en raison du coût élevé de ce type d'appareils, un analyseur infrarouge assigné à chaque réacteur. C'est pour cela que l'utilisation de ce type de matériel est généralement couplé à un système d'échantillonnage des gaz provenant de chaque réacteur.

Pour certains bancs de test de biodégradation automatisés, les réacteurs sont continuellement alimentés en air pour maintenir des conditions aérobies satisfaisantes. Dans ce cas, un système d'électrovanne programmé à l'avance permet à l'analyseur infrarouge de mesurer la proportion de CO₂ dans le débit gazeux de chaque réacteur pendant une durée déterminée et à intervalle de temps régulier. Ainsi pour le système utilisé par Gattin, 2001, les gaz d'échappement de chaque réacteur sont échantillonnés toutes les deux heures pendant 12 minutes. Le nombre de moles de CO₂ produites sur 12 minutes est ramené à deux heures grâce à une formule d'intégration qui prend également en compte la valeur de débit de l'effluent gazeux. La quantité totale de CO₂ produite en fin de test est donc la somme des quantités instantanées de CO₂ produites toutes les 2 heures. Il y a donc une approximation susceptible de générer une erreur d'analyse si la production de CO₂ varie beaucoup sur ces deux heures. Il existe d'autres systèmes automatisés d'échantillonnage du CO₂ avec des temps d'analyse différents mais dont le fonctionnement s'appuie sur le même principe (Grima et coll., 2002 ; Jayasekara et coll., 2001).

D'autres auteurs ont développé une autre méthode où les réacteurs ne sont pas alimentés en continu et où l'intégralité des gaz emprisonnés dans le réacteur est échantillonnée par l'analyseur infrarouge (Calmon et coll., 2000). Au début du test, les réacteurs contenant le milieu de dégradation et le matériau test sont vidangés avec un flux d'air débarrassé de CO₂ de manière à ce que tout le volume du réacteur soit complètement dépourvu de CO₂, puis le réacteur est isolé du reste du système. Au moment de l'échantillonnage du réacteur par l'analyseur, le réacteur est de nouveau vidangé en air dépourvu de CO₂ et l'ensemble du débit

gazeux de sortie passe dans l'analyseur pendant un temps suffisamment long pour que tout le CO₂ présent produit depuis la dernière vidange soit analysé par la cellule infrarouge. Dans ce cas, l'espacement entre deux analyses ne doit pas être trop important sous peine de créer un manque d'oxygène pour les micro-organismes du milieu. Ce type de système, est surtout adapté aux tests en milieu liquide où il n'y a généralement pas besoin d'ouvrir les réacteurs pour agiter le milieu manuellement, ceux-ci étant placés sous agitation constante grâce à un moteur. L'ouverture des réacteurs n'est pas possible dans la mesure où l'intégralité du CO₂ contenu dans l'espace de tête du réacteur doit être quantifié.

IV.2 Les différents tests en laboratoire

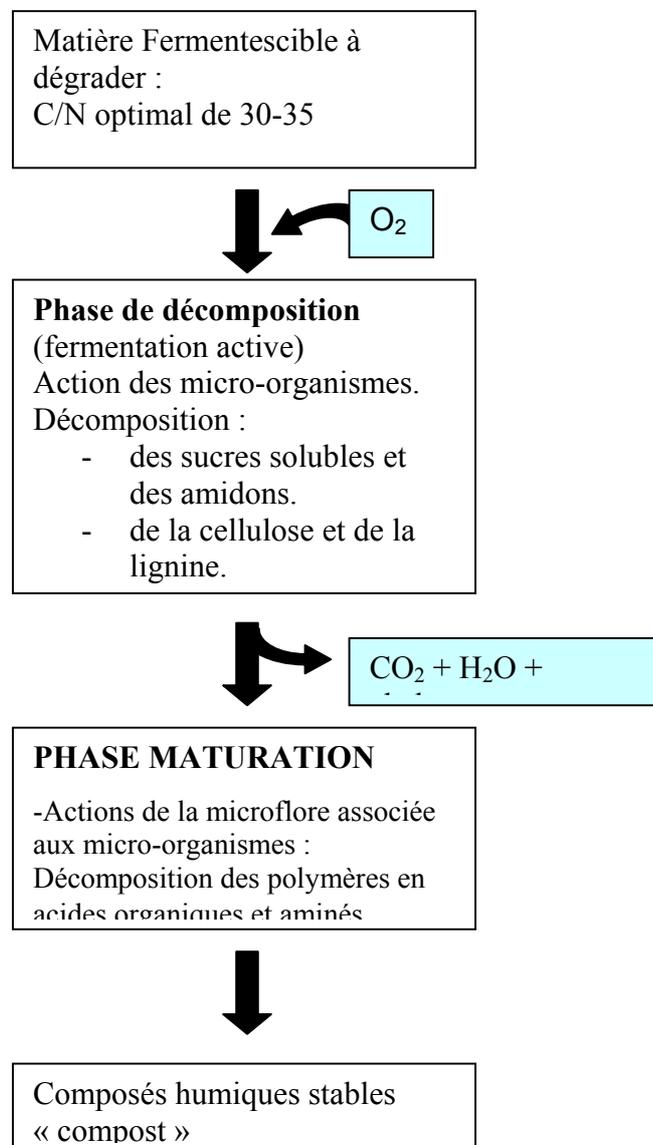


Figure 7 : processus biologique du compostage aérobie

IV.2.1 Les tests en milieu compost

Partant du principe que nous étudions le compostage des matériaux plastiques biodégradables, il nous paraît opportun de rappeler succinctement les grandes étapes du processus de compostage des déchets organiques ainsi qu'un exemple de mise en place de ce processus dans une unité de compostage.

IV.2.1.1 Principes et mécanismes généraux

Le compostage aérobie est un procédé de dégradation contrôlée de matières fermentescibles en présence d'oxygène produisant du gaz carbonique, de la chaleur et un résidu organique stabilisé riche en composés humiques : le compost (cf. figure 7).

La phase de décomposition correspond à la dégradation des molécules les plus facilement biodégradables qui servent de substrats aux micro-organismes afin de coloniser le milieu. Ceux-ci vont se développer, et augmenter leur activité d'oxydation des molécules plus résistantes (cellulose, hémicellulose, lignines, tanins). Cette forte activité entraîne une rapide augmentation de la température jusqu'à 65°C. Pendant cette phase qui dure trois mois, les besoins en oxygène sont élevés et le dégagement de CO₂ intense.

La phase de maturation est une phase très lente qui correspond à la réduction des besoins en oxygène, à une baisse de la température jusqu'à 55°C (développement d'une flore microbienne mésophile) et à une diminution de l'humidité au sein de l'andain. D'un point de vue biochimique, c'est durant cette phase de 2 mois, que les substrats humiques sont élaborés. Le dégagement de CO₂ est plus faible.

- Evolution de la température :

La décomposition de la matière se divise en plusieurs phases mésophiles ou thermophile. La variation de température est due à l'action des micro-organismes (cf. figure 8) :

- **Etape 1** : Phase mésophile : les micro-organismes commencent le processus de digestion et utilisent des enzymes qui détruisent d'abord les parois cellulaires des tissus tendres (le contenu de la cellule est libéré).

- **Etape 2** : Phase thermophile : la digestion est plus rapide. Les germes pathogènes sont neutralisés lorsque la phase de montée en température permet d'atteindre plus de 60°C plusieurs jours de suite.
- **Etape 3** : Phase mésophile : Après la phase de décomposition, la température retombe vers 30°C (phase de refroidissement) et les champignons peuvent recoloniser la matière.
- **Etape 4** : En dessous de 30°C, l'activité des micro-organismes est complétée par celle d'organismes de plus grandes tailles (vers, acariens ...).

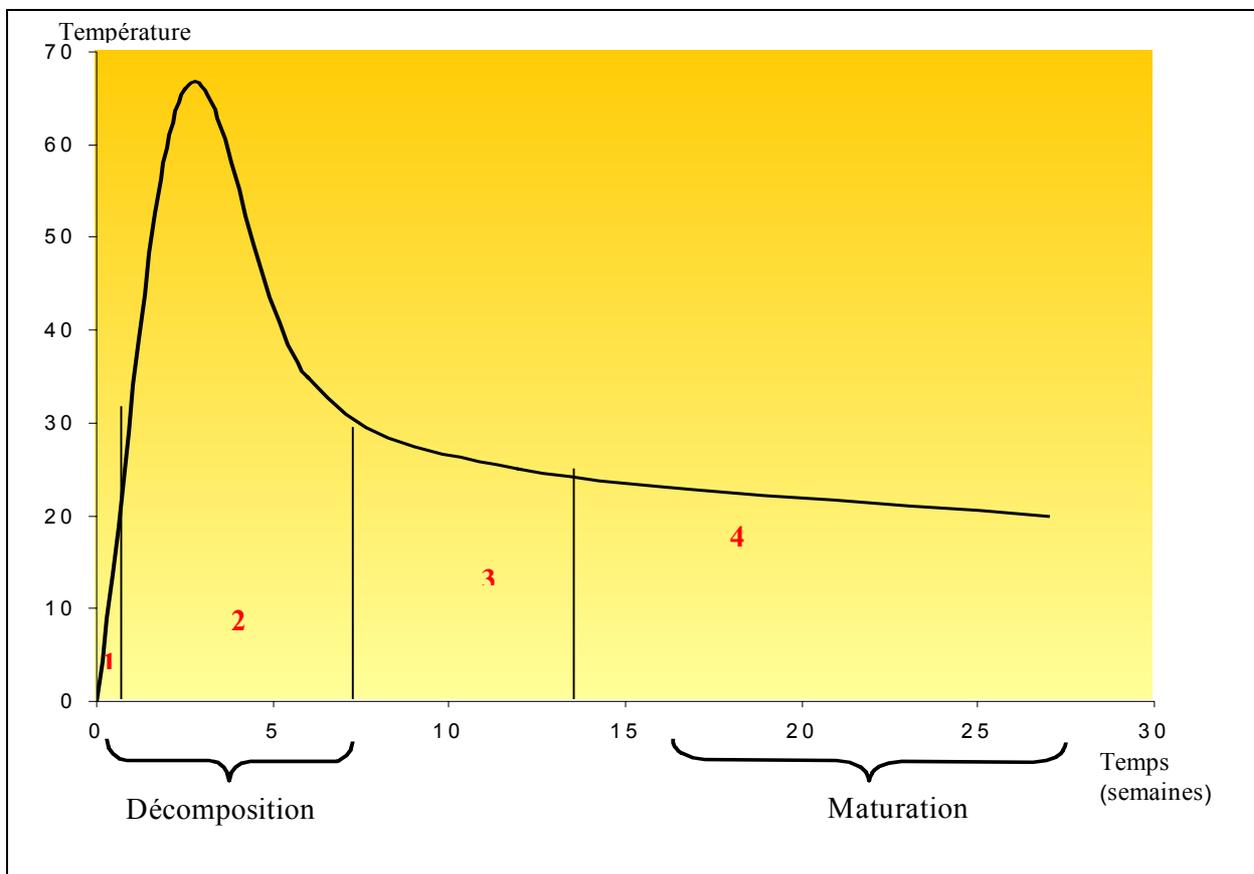


Figure 8 : Evolution de la température en fonction du temps (d'après la FNADE).

- Evolution du pH :

Au cours du compostage, le pH est un paramètre à contrôler avec attention. On peut diviser l'évolution du pH en quatre phases en fonction du temps (cf. figure 9) :

- **Phase 1** : le pH diminue, phase d'acidocétose : intense production de gaz carbonique et d'acide organique en début de phase thermophile (dominance flore mésophile).
- **Phase 2** : Le pH augmente, phase d'alcalinisation (flore thermophile dominante) avec hydrolyse bactérienne de l'azote protéique et organique, productrice d'ammoniac.
- **Phase 3** : phase de stabilisation du pH : le rapport C/N a diminué, les réactions deviennent plus lentes. De l'ammoniac a été perdu par volatilisation surtout au dessus de pH 8 et l'azote est utilisé par les micro-organismes pour réaliser la biosynthèse des matières humiques.
- **Phase 4** : Phase stable proche de la neutralité : Le compost est en voie de maturation. La stabilité du pH est due aux réactions lentes de maturation et au pouvoir tampon de l'humus.

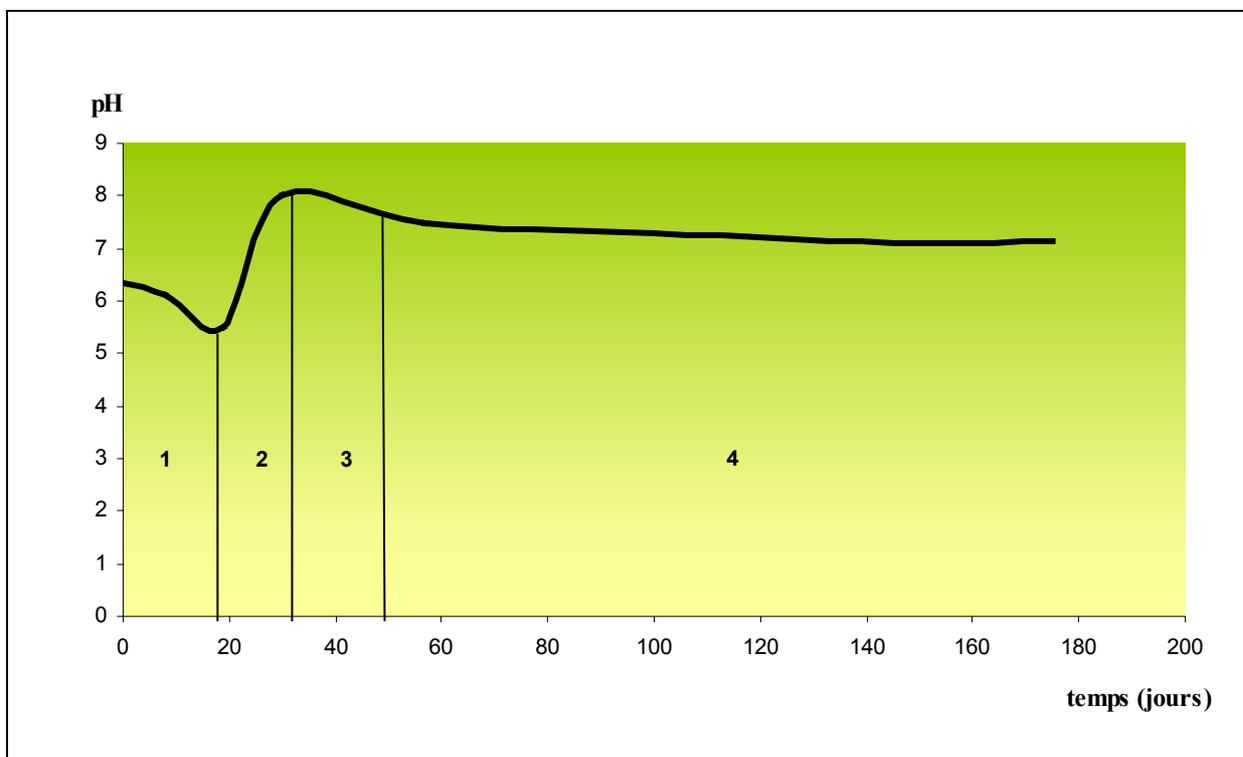


Figure 9 : Variation du pH au cours du compostage (Ecosys).

IV.2.1.2 Fonctionnement d'une unité de compostage aérobie

IV.2.1.2.1 Site de Pargny les Reims : Valorbio

Valorbio est une filiale du groupe Sita France (pôle propreté de Suez) qui a inauguré la première plate-forme de valorisation de déchets organiques, près de son siège social, à Pargny-lès-Reims en septembre 2001. S'inscrivant dans le plan départemental de traitement des déchets ménagers, l'unité de traitement gère 15 000 t de déchets/an, et cible la collecte de déchets végétaux dans un rayon de 30 km.

Valorbio s'est engagé dans l'obtention de la certification ISO 14 001 et entend ouvrir rapidement une quinzaine de plates-formes similaires dans le Nord-Est.

IV.2.1.2.2 Procédé de compostage VALORBIO

Ce procédé se divise en six étapes principales :

- **Réception et contrôle des apports** (cf. figure 10)



Figure 10 : Arrivée des déchets sur le site

Intérêts :

- Relever les quantités de déchets traités sur la plate-forme et identifier leur nature.
- Assurer la qualité des déchets traités, conséquence directe de la qualité du compost.

Méthode : À chaque arrivage, un opérateur réceptionne les bennes, les pèse, identifie les déchets et évalue le volume. Le chargement est contrôlé visuellement par l'opérateur qui s'assure de la propreté et de la qualité générale du chargement.

- **Broyage, mélange**



Figure 11 : broyeur

Intérêts :

- Obtenir un matériau homogène, présentant les conditions idéales de compostage,
- Réduire le volume des déchets.

Méthode : Le broyeur (cf. figure 11) réduit le volume des déchets bruts. Il constitue également une première attaque physique préalable au travail des micro-organismes en augmentant la surface de contact entre ces derniers et la matière végétale. Enfin le broyage a un rôle de mélange et d'homogénéisation. L'objectif est d'obtenir un mélange ayant un rapport C/N optimal (entre 30 et 40). Pour cela, il est utile de mélanger au moment du broyage les déchets ligneux aux déchets fermentescibles.

- **Mise en andains (broyat mis en tas)**



Figure 12 : Andains en triangles

Intérêts :

- Assurer un mélange homogène.
- Réaliser une forme d'andain adaptée au mode de retournement.
- Optimiser la surface disponible.

Méthode : Le broyat frais ou stocké depuis quelques jours est repris au chargeur pour être mis en andain (cf. figure 12). Cette opération permet de mélanger une nouvelle fois la masse à composter et surtout de décompacter le produit qui, à la sortie du broyeur, est souvent mis en tas sur plusieurs mètres de haut.

- **Fermentation avec aérations et arrosages**

Intérêts :

- Alimenter les andains en oxygène et maintenir un bon taux d'humidité.
- Homogénéiser la masse à composter.
- Accélérer le temps de compostage.
- Maintenir les conditions aérobies.

Méthode : Le retournement s'effectue sur une même journée. Ainsi, les conditions sont identiques du premier au dernier mètre de l'andain, soulignant son homogénéisation. C'est grâce à l'action d'un rotor que la matière est brassée et alimentée en oxygène. Cette étape est souvent accompagnée par un arrosage simultané. Elle permet de conserver les micro-organismes dans les meilleures conditions de développement aérobie.

Remarque :

Les interventions de retournement (brassage de la matière) permettent l'aération du mélange à composter et font remonter la température vers 40°C (cf. figure 13).

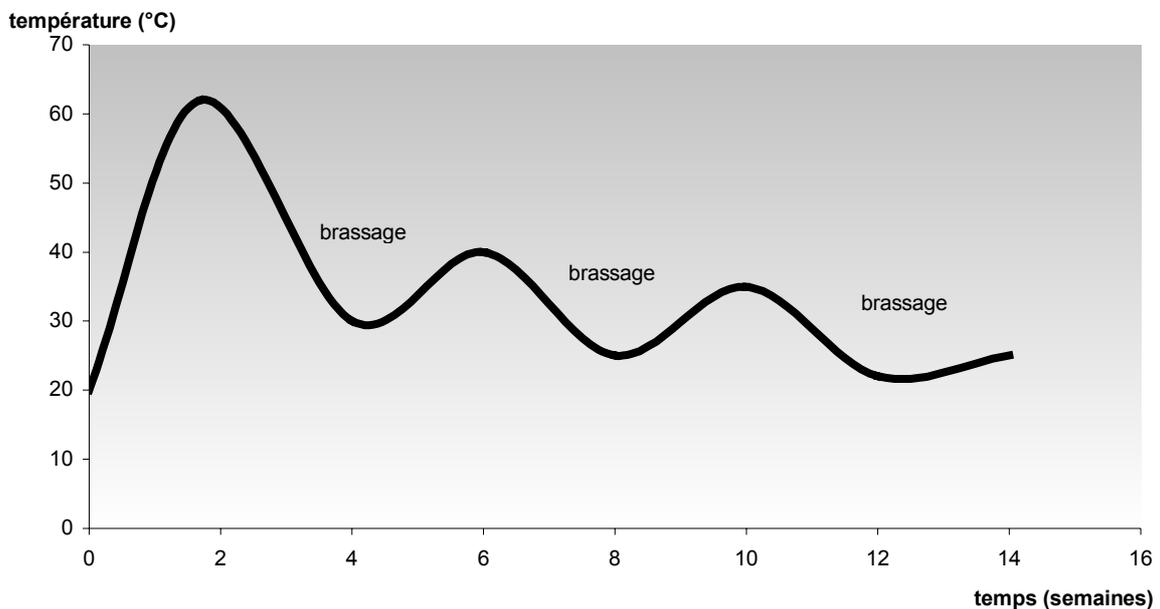


Figure 13 : Effet d'un brassage régulier sur la température du compost. (FNADE).

L'aération permet la réoxygénation du compost et donc l'apport d'oxygène aux micro-organismes. Le brassage provoque une augmentation de température, preuve d'une légère reprise d'activité microbienne qui se traduit par une augmentation de température (cf. figure 13). Il permet de conserver les conditions aérobies.

- **Maturation** (cf. figure 14)



Figure 14 : Tas de compost en maturation

Intérêts :

- Obtenir un compost dont la dégradation de la matière organique est complètement terminée (compost mûr)
- Durée de maturation raisonnée en fonction de l'utilisation finale du produit.

Méthode : Lorsque les phases thermophiles s'achèvent, le compost brut doit être stabilisé. Pour cela, il rentre dans la phase de maturation. La maturation est assimilable à l'humification du produit. Lors de cette étape, le compost continue d'évoluer mais plus lentement :

- il consomme peu d'oxygène
- il dégage du gaz carbonique
- sa température baisse

Une fois l'opération de criblage effectuée, le compost est mis en tas et stocké soit à l'air libre, soit à l'abri : la phase de maturation peut commencer. La durée de cette étape est déterminée par l'utilisation souhaitée du compost.

▪ **Criblage et vérification de la conformité du compost :**

Les broyats compostés sont criblés avec un crible à trommel à mailles carrées de 20 à 60 mm en fonction de l'utilisation (pépinières, épandage,...).

Intérêts :

- Déterminer la composition du compost et vérifier s'il respecte la norme en vigueur
- Surveiller la « qualité » du processus
- Identifier et fournir le compost qui répond aux attentes du client

IV.2.1.3 Les tests en laboratoire

Pour les tests de biodégradation, les organismes internationaux préconisent un compost mature d'au moins deux mois. L'activité biologique d'un tel compost est plus réduite par rapport à un compost frais ou l'ensemble des réactions biochimiques de dégradation peut faire monter la température du compost jusqu'à 80°C. De ce fait, le dégagement de CO₂ endogène qui en découle pourrait cacher le dégagement de CO₂ provenant de la minéralisation du matériau que l'on teste. Cependant, on peut supposer que cette période d'activité biologique intense serait la plus favorable à l'incorporation à grande échelle des déchets plastiques biodégradables au compost dans le but de les éliminer. C'est pour cette raison qu'un test en laboratoire sera toujours beaucoup plus sévère quand à la biodégradabilité d'un matériau, les conditions « naturelles » biotiques et abiotiques étant beaucoup plus rigoureuses dans la réalité.

On trouve dans la littérature plusieurs types de test de biodégradation dans le compost qui s'appuie tous plus ou moins sur le même principe, à savoir la mesure du taux de minéralisation du polymère. La différence principale de l'un à l'autre est basée sur la quantité de compost utilisé pour le test. Plus celle-ci sera importante et plus le test pratiqué en laboratoire sera proche des conditions réelles. Dans le cas de test compost où les quantités restent assez faibles, il est nécessaire de mettre en place un système de chauffage qui permet de maintenir la température à laquelle les micro-organismes du compost sont actifs. Un système de chauffage thermostaté est parfois aussi nécessaire pour imposer un profil de température particulier préconisé par une norme (American Standard ASTM D-5338-92). Gardner et coll., 1994, ont développé un système composé de 12 cuves de 60 litres où il n'est

pas nécessaire d'utiliser de système de chauffage, de même pour le test de compostage «VTT CO₂ compost test » se déroulant dans 6 cuves de 220 litres (Itävaara et coll., 1996).

Le compost générant un « bruit de fond » relativement important du fait de la respiration endogène des micro-organismes qu'il contient, il est recommandé, et ce particulièrement pour les tests à l'échelle laboratoire, d'alimenter les réacteurs avec un air exempt de dioxyde carbone. Cette opération est possible en faisant barboter l'arrivée d'air dans une solution alcaline d'hydroxyde baryum avant son entrée dans le réacteur. Il arrive également de trouver entre ce flacon de bullage et le réacteur un autre flacon bulleur contenant de l'eau ou le flux d'air est juste humidifié pour maintenir le taux d'humidité du compost à l'intérieur du réacteur.

Le laboratoire VTT a également développé un appareillage permettant de tester simultanément la biodégradabilité de plusieurs matériaux dans un le même environnement et dans des conditions très proches de celles que l'on pourrait rencontrer dans une unité de compostage (Itävaara et coll., 1996). Le test se déroule dans une cuve de 600 litres où l'on surveille l'évolution du pH, de la température et des concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone. La biodégradabilité des échantillons est estimée visuellement toutes les semaines et par perte de masse à la fin du test.

IV.2.2 Les tests en milieu liquide

Le premier test visant à estimer la biodégradation d'un matériau se déroule en milieu liquide, c'est le test de Sturm (voir figure 15). Une solution ne contenant que des éléments minéraux sert de milieu de croissance à un inoculum biologique pouvant provenir d'un extrait de compost de sol ou de boues activées de station d'épuration. Cependant il est également possible d'inoculer le milieu avec une seule souche microbienne ou un mélange de plusieurs souches sélectionnées. La seule source de carbone disponible est le matériau, soluble ou non, que l'on place dans le réacteur sous la forme de film ou de poudre. Le milieu ainsi préparé est placé sous agitation constante et alimenté par un flux gazeux débarrassé de CO₂. Le CO₂ est piégé dans une solution alcaline d'hydroxyde de baryum et dosé par titration de l'excès de BaOH qui n'a pas réagi.

- Bilan carbone en milieu liquide :

Les tests en milieu liquide sont les plus faciles à mettre en place et permettent plus de facilités pour l'étude du processus de biodégradation. Le milieu est homogène et sous agitation constante, on peut donc effectuer des prélèvements représentatifs à n'importe quel moment du test. Certains auteurs ont donc développé des protocoles d'extraction et de séparation du carbone à partir des échantillons prélevés pour établir un bilan carbone de la biodégradation de certains polymères.

C'est le cas pour la biodégradation du PHB en milieu liquide (Urstadt et coll., 1995, Figure 16). Après centrifugation de chaque prélèvement liquide, le culot solide contient la biomasse et le polymère qui n'est pas encore dégradé. Deux types d'expérience ont été réalisés sur le culot pour quantifier la biomasse.

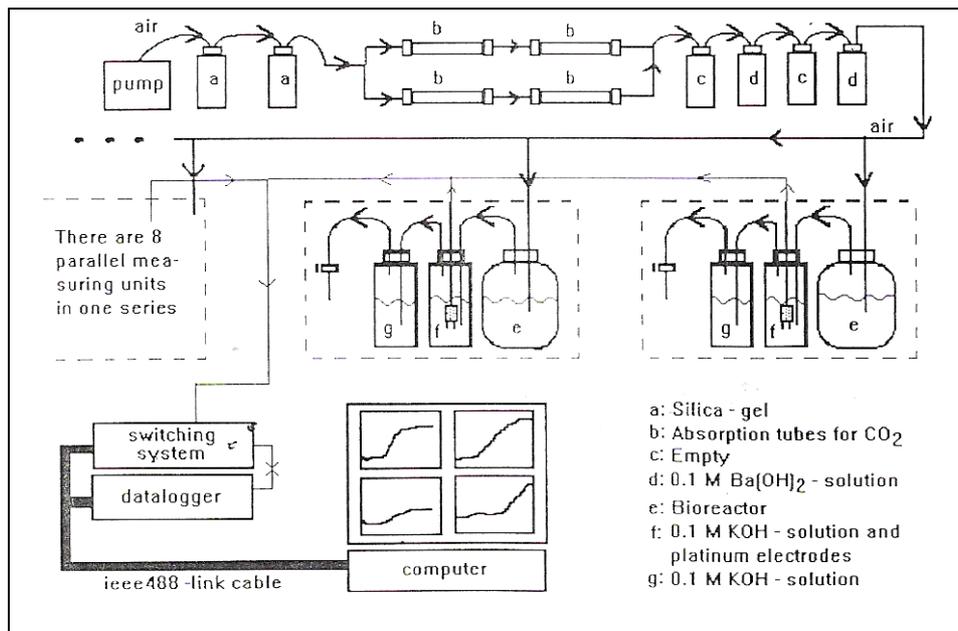


Figure 15 : Schéma de montage pour un test de Sturm (Itävaara et coll., 1996). Ici la mesure du dioxyde de carbone est automatisée.

Dans le premier cas, la biomasse a été quantifiée par l'analyse des protéines en s'appuyant sur l'hypothèse que les bactéries utilisées pour les tests étaient constituées respectivement de 55 et 65 % de protéines en masse pour une souche pure d'*Acidovorax facilis* d'une part et pour un lexiviat de compost d'autre part. Dans le deuxième cas, le culot a été traité par de l'hypochlorite de sodium, ce qui permet théoriquement de solubiliser

sélectivement la biomasse. Ce traitement ne provoque qu'une diminution de la masse molaire moyenne du PHB. Le culot est pesé avant et après traitement et la différence de masse donne la biomasse. Les résultats montrent que la deuxième méthode permet d'obtenir un meilleur bilan carbone avec une dérive moins importante même si les résultats sont moins bons dans le cas de l'utilisation d'un lexiviat de compost comme inoculum.

Pour le PCL, des auteurs ont également tenté d'établir un bilan carbone en milieu liquide en utilisant la méthode de Lowry (Spitzer et coll., 1996). La méthode est cependant modifiée car elle prend en compte l'avancement du test pour estimer la proportion de carbone contenue dans les souches microbiennes. Même si elle est plus précise, cette méthode est malgré tout dépendante d'hypothèses relatives au contenu protéique des cellules.

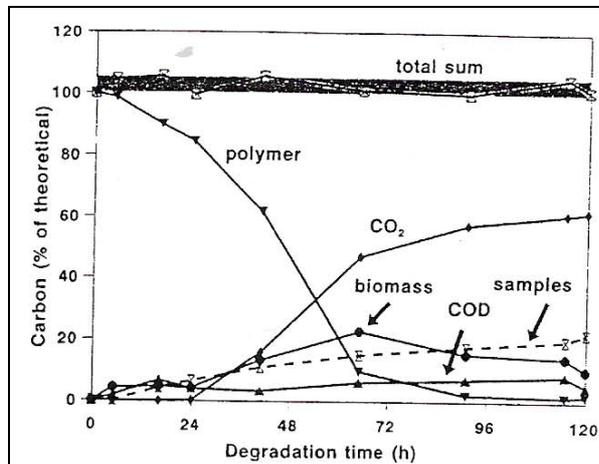


Fig. 2. Time course of PHB degradation with *Acidovorax facilis*; experiment V5; C balance B3.

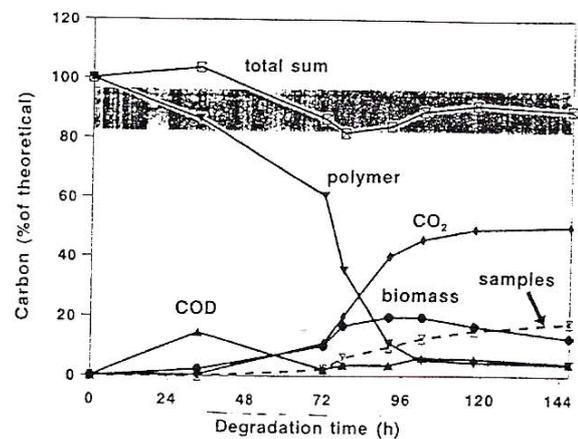


Fig. 3. Time course of PHB degradation with a compost eluate; experiment V6; C balance B3.

Figure 16 : Bilans carbone de la dégradation du PHB en milieu liquide par oxydation sélective de la biomasse avec l'hypochlorite de sodium (Urstadt et coll., 1995). A gauche en présence d'une souche sélectionnée et à droite en présence d'un lexiviat de compost

Comme l'illustrent ces deux exemples, le principal problème réside dans l'estimation du carbone contenu dans les sous-produits de dégradation non solubles qui sont principalement représentés par la biomasse et le polymère non-dégradé. La quantification du carbone de la biomasse par des méthodes indirectes comme la méthode de Lowry, le dosage de l'ATP ou encore celui de l'ADN impliquent le recours à des hypothèses sur le contenu des cellules. Or si ces estimations peuvent s'avérer valables à un instant donné, leur utilisation lors d'un test pouvant durer jusqu'à 45 jours est encore sujette à discussions. L'utilisation

d'une méthode de quantification directe est sans doute préférable mais la séparation de la biomasse du polymère non dégradé est parfois délicate et peut donc être source d'erreurs.

- Validation de la méthode d'estimation du bilan carbone

A notre connaissance, il n'y a pas de travaux rapportant la validation des ces méthodes d'estimation. La solution serait évidemment de les comparer avec un bilan carbone établi grâce à des polymères contenant un marqueur radioactif. Cette constatation n'est cependant évidemment pas le fait d'une volonté particulière des acteurs de ce domaine scientifique mais plutôt une conséquence du coût et de la difficulté de travailler avec de tels matériaux.

IV.2.3 Les tests en milieu gélosé

Pour les tests en boîte de Petri sur milieu gélosé, le polymère employé peut se présenter sous la forme d'un film ou d'une éprouvette d'épaisseur réduite, ou encore sous forme de poudre intégrée ou non à la gélose. Dans le cas d'un film, l'estimation des attaques microbiennes se fera visuellement par estimation du développement microbien au microscope sur et à proximité du film. Il est également possible et recommandé de pousser l'investigation par l'analyse des propriétés physico-chimiques et mécaniques du film afin d'appuyer les conclusions avec des valeurs. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence car les conditions d'incubation, notamment la température sont susceptibles d'être responsable d'une modification des propriétés intrinsèques du matériau. Pour une poudre, l'utilisation de la méthode de la zone claire (voir § III.1.2) permet de mettre en évidence facilement un développement microbien. Dans ce cas, la méthode de conditionnement du polymère dans la gélose est également à prendre en considération. Par exemple, si la poudre est intégrée à la gélose avant la stérilisation des boîtes, cette étape peut provoquer des ruptures de chaînes qui vont libérer des substrats disponibles pour les micro-organismes, alors que ceux-ci pourraient être incapables de se développer aux dépens du polymère s'il n'avait pas subi une première altération. Cette observation est particulièrement valable pour les polyesters sensibles à l'eau comme le PLA.

Ces tests en boîte de Petri permettent notamment de rechercher les souches microbiennes capables de dégrader un polymère particulier et donc par la suite de comprendre les mécanismes de biodégradation mis en jeu.

V> POSITIONNEMENT DU SUJET- LES TESTS DE BIODEGRADATION EN MILIEU SOLIDE INERTE

Dans le cadre de tests de biodégradation, un milieu solide inerte est un support de croissance pour les micro-organismes qui ne contient pas de carbone, qui ne crée aucune interaction avec le polymère à étudier et qui seul n'a aucune influence sur la cinétique de biodégradation de celui-ci.

La première utilisation d'un tel milieu comme support pour un test de biodégradation date de 1996 où les auteurs ont observé la biodégradation d'un polyester synthétisé à partir de 1,4-butandiol et d'acide succinique (Spitzer et coll., 1996).

V.1 Pourquoi un milieu solide inerte ?

V.1.1 Avantages et inconvénients des tests existants

V.1.1.1 En milieu sol ou compost

V.1.1.1.1 Problèmes liés à l'activité biologique de ces milieux

Observer la biodégradation d'un polymère dans le milieu ou, à priori, on souhaite le stocker en fin de vie, est la manière la plus simple et la plus évidente d'estimer son comportement. Le premier problème que l'on rencontre avec ces milieux est qu'ils sont biologiquement très actifs (surtout le compost) et que par conséquent, le dégagement de CO₂ « naturel » issu directement de la minéralisation des composés organiques restant dans le compost est très élevé.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la quantité de CO₂ issu de la minéralisation du polymère est calculée par la différence entre la quantité totale de CO₂ produite par un réacteur contenant le compost et le polymère et la quantité totale de CO₂ produite par un réacteur témoin qui ne contient que du compost. Or dans le cas d'un polymère qui se dégrade faiblement, cette différence peut être tellement faible qu'il est très difficile ou même impossible de la quantifier. Une des solutions envisagées est de dégrader le polymère sous forme de poudre, ce qui permet en général de favoriser l'ensemble des réactions chimiques et biologiques grâce à l'augmentation de la surface de contact spécifique du

polymère avec les micro-organismes. Néanmoins, lorsque l'on étudie le polymère sous forme de poudre, cela peut générer d'autres problèmes qui seront exposés plus loin.

Le compost ou le sol sont des milieux chimiquement très complexes, à la fois d'un point de vue organique, minéral et biologique en raison de la diversité de la flore microbienne. Pour ces raisons, il n'est pas rare d'avoir des taux de minéralisation présentant des écart-types proches des 15 ou 20 % pour un test effectué en triple exemplaire avec le même matériel et le même lot de compost (Bellia et coll., 2000 ; Degli-innocenti et coll., 1998). Ces problèmes de reproductibilité sont évidemment plus manifestes lorsque l'on compare des résultats obtenus avec des composts différents (par exemple déchets ménagers ou déchets verts agricoles).

V.1.1.1.2 Problème liés à la complexité du milieu

Comme indiqué plus haut, la détermination de la biodégradabilité d'un matériau est plus aisée si celui-ci est sous forme de fragment ou de film suffisamment fin. Dans ce cas, la recouvrement du matériau (pour un calcul de perte de masse, l'étude encore la quantification du polymère non dégradé) peut être problématique. L'extraction du matériau sous forme de poudre ne peut se faire que par extraction avec un solvant approprié. Du fait de la présence de très nombreuses espèces chimiques dans le compost, le mélange du compost avec un solvant organique comme le DMSO provoque une émulsion qu'il est impossible de « casser » dans des délais raisonnables (Bellia et coll., 1999). Il en est de même pour l'extraction d'un ou plusieurs sous-produits de biodégradation. Il a été montré que le recouvrement d'une quantité connue de 4,4'diamino diphényl méthane (MDA), un sous-produit nocif de la dégradation d'un polyuréthane à base de polycaprolactone et de 4,4'diphényl méthane diisocyanate (MDI), n'est que de 10% dans un milieu compost (Tosin *et al.*, 1998). Des phénomènes d'adsorption irréversibles sur les éléments minéraux du compost pourraient être responsables de ce faible pourcentage, ainsi que de la faible dégradation de certains polymères (Chiellini *et al.* 2000).

Le compost est donc très riche en divers substrats carbonés et l'établissement de « bilan carbone » pour connaître le destin ultime du polymère s'avère impossible car on ne peut pas faire la différence entre le carbone du compost et celui provenant du polymère à dégrader.

Dans le cas d'un film, bien souvent la récupération de celui-ci dans le compost s'avère délicate car au bout de quelques jours ou semaines, les propriétés mécaniques du matériau sont profondément modifiées par la température et l'humidité, le film est alors fragile et se

fragmente aisément. Les pertes de masse obtenues sont à interpréter avec prudence car on risque de ne pas comptabiliser un bout de film fragmenté qu'on aura « oublié » dans le compost.

Pour résumer, les tests en milieux solides compost ou sol permettent sans doute d'obtenir le résultat qui sera le plus proche de la réalité (en terme de taux de minéralisation) car a priori les conditions physico-chimiques et biologiques seront les mêmes, mais on ne pourra pas suivre l'évolution des propriétés physico-chimiques et/ou mécaniques du matériau ni analyser les sous produits de dégradation. L'établissement de bilan carbone sera impossible car à l'instar des sous-produits de dégradation, la biomasse n'est pas récupérable.

V.1.1.2 Milieux liquides

C'est le milieu de culture le plus simple à préparer puisqu'en général on n'y introduit seulement les éléments minéraux nécessaires à la croissance des micro-organismes. La seule source de carbone disponible est le polymère test. De ce fait il est possible en milieu liquide d'extraire et de séparer les sous produits de dégradation solubles, du polymère non dégradé et de la biomasse et donc d'établir un bilan carbone (Spitzer et coll., 1996b ; Urstadt et coll., 1995). Le principal inconvénient est que ces tests ne permettent pas de mettre en évidence le comportement réel d'un polymère dans le compost (même s'il n'ont peut être pas été mis au point dans ce but). En effet les résultats obtenus sont en général meilleurs en milieu liquide que dans du compost. La disponibilité du substrat pour les microorganismes est plus importante car le milieu liquide est sous agitation constante pour assurer un bonne aération. De plus, les réactions d'hydrolyse chimique qui permettent de fragiliser le polymère et donc de favoriser l'assimilation par les micro-organismes, sont évidemment plus importantes dans un milieu 100% liquide que dans le sol ou le compost même si le taux d'humidité est élevé (cf. § I.3.2). Or un test en laboratoire se doit d'être au moins représentatif de la réalité ou sinon d'être plus rigoureux par rapport à la réalité. C'est cette règle qui fait que d'après les normes ISO ou ASTM, on peut considérer un polymère comme biodégradable s'il a été minéralisé dans une proportion d'au moins 60%. On suppose que pour des quantités de compost plus importante (comme cela pourrait être le cas dans une véritable unité de compostage), le même polymère sera entièrement minéralisé et transformé en nouvelle biomasse.

V.1.1.3 Milieux gélosés

Ces milieux sont appropriés pour faire un criblage sur un milieu donné des souches susceptibles de se développer au détriment d'un matériau particulier (Tokiwa et coll., 2001) mais ne permettent en aucun cas de caractériser la biodégradation d'un matériau de manière chiffrée et incontestable. De plus les conditions de développement des micro-organismes sont beaucoup trop éloignées de celles du compost pour faire un quelconque rapprochement. L'utilisation de ce type de tests sera néanmoins complémentaire, par exemple pour identifier les mécanismes enzymatiques mis en jeu lors de la biodégradation.

V.1.2 But des milieux solides inertes

Considérant que les tests existants ne permettent pas d'étudier de manière exhaustive le compostage d'un matériau, Il est nécessaire dans un premier temps de mettre au point les paramètres physico-chimiques et biologiques d'un milieu solide inerte capable de simuler au mieux la minéralisation d'un polymère donné dans le compost, et ce avec une reproductibilité satisfaisante. Le caractère inerte du support doit permettre d'extraire du milieu puis de séparer les différents sous-produits de dégradation par un protocole adéquate. Ces derniers pourront être ensuite quantifiés pour établir un bilan carbone complet de la biodégradation du matériau, ou encore identifiés pour s'assurer qu'ils ne sont pas toxiques pour l'environnement. L'utilisation d'un tel milieu doit également permettre de s'affranchir des problèmes liés à la forte activité biologique du compost ou du sol.

Les premières tentatives pour mettre au point un milieu solide inerte sont présentées dans les paragraphes suivants, où sont détaillés les supports, les inocula biologiques et les paramètres physico-chimique utilisés.

V.2 Les différents types de supports existants

V.2.1 La Perlite

La perlite est produite en chauffant à 1200°C un silicate naturel volcanique (principalement d'aluminium). Cette température de chauffage très élevée provoque la fusion du matériau. Elle apparaît sous forme de granules très légers. Elle s'écrase facilement en

poussière entre les doigts. Elle est bien plus stable que la vermiculite mais accumule sensiblement moins d'eau.

Afin de réduire les émissions naturelles de CO₂ du sol dans le cadre de test de dégradation en enfouissement, certains auteurs (Solaro et coll., 1998 et Chiellini et coll., 1999), ont utilisé la perlite comme support de dégradation, en substituant par ce matériau une grande partie de la masse de terre utilisée habituellement pour le test, réduisant ainsi au minimum la quantité de sol utilisé pour le test. Le rôle de cette faible quantité se réduit à l'apport de la flore microbienne capable de dégrader le polymère étudié. Le milieu est constitué de plusieurs couches dont la composition est la suivante : Le fond d'un Erlen est tapissé de perlite seule, la couche intermédiaire est constituée d'un mélange de perlite, de sol et d'eau distillée, c'est à ce niveau que le polymère est situé. On recouvre enfin avec une dernière couche de perlite (Figure 17).

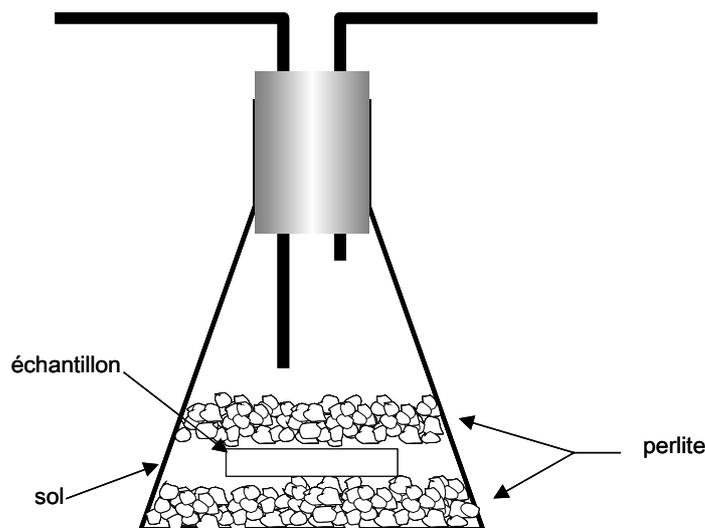


Figure 17 : schéma du milieu « perlite/sol » (Solaro et coll., 1998).

V.2.2 La Pouzzolane

La pouzzolane est une roche volcanique extraite de carrières. Certaines régions en sont très bien pourvues, comme l'Auvergne en France. La pouzzolane est généralement vendue calibrée, elle est de couleur marron à grise. Elle apporte quelques minéraux ; poreuse, abrasive, elle possède une surface de contact très importante, ce qui permet de favoriser la

croissance des micro-organismes à l'interface solide/liquide (pouzzolane/milieu minéral liquide).

Ce support de croissance est utilisé avec un inoculum biologique obtenu à partir d'échantillons de sol dans des tests de biodégradation visant à simuler le comportement d'un polymère lors d'enfouissement dans le sol ou après une utilisation comme film de paillage (Grima et coll., 2002 ; Grima, 2002).

V.2.3 La Vermiculite

La vermiculite expansée est un silicate d'aluminium, de magnésium et de fer. Elle est d'origine naturelle, mais produite par chauffage à des températures telles que le matériau ne fond pas mais se dilate. La vermiculite est une sorte de "mica" expansé et se décompose facilement en feuillet.

Tout comme la Pouzzolane et la Perlite, ce matériau est utilisé pour « aérer » la terre lorsque cela est nécessaire de manière à favoriser la croissance de certaines plantes mais elle est aussi utilisée comme isolant thermique pour les habitations. C'est le support inerte le plus employé pour des tests de dégradation (Spitzer et coll, 1996 ; Bellia et coll., 2000 ; Gattin et coll., 2000/2002 ; Tosin et coll., 1998), car elle retient très bien l'eau et procure une surface de contact très importante ce qui en fait un excellent support de croissance.

Ces différents supports doivent être supplémentés avec un inoculum biologique et minéral pour être opérationnels, ces différents protocoles d'ensemencement vous sont présentés dans le paragraphe suivant.

V.3 Apport minéral et organiques pour le déroulement du test

V.3.1 Inoculum microbien

L'inoculum microbien est un extrait de compost mais le protocole de préparation est différent en fonction des équipes de recherche :

- Gattin et coll., 2000 : 15 grammes de compost sont mélangés avec 150 ml de liquide de Ringer et placé sous agitation pendant 1 heure. Le mélange est filtré sur un tamis de 0.125 mm afin d'éliminer les particules les plus grossières. La solution est ensuite centrifugée à 10000 tours/minute pendant 20 minutes. Le

surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 150 ml de liquide de Ringer. C'est cette suspension du culot de centrifugation qui est utilisée comme inoculum. Un autre protocole très largement inspiré de celui-ci consiste à multiplier les étapes de centrifugation/lavage du culot pour minimiser l'apport de carbone dans le milieu du à l'inoculum. (Longieras et coll., 2004)

- Bellia et coll., 1999 : 200 grammes de compost mature sont mélangés avec un litre d'eau distillée pendant 30 minutes. La suspension est ensuite filtrée avec une passoire puis centrifugée à 1200 tours/minutes pendant 15 minutes. C'est le surnageant qui sert d'inoculum.

On remarque que dans un cas c'est le surnageant qui est retenu comme inoculum (Bellia et coll., 1999) et que dans l'autre c'est le culot de centrifugation (Gattin et coll., 2000). Dans le premier cas, les micro-organismes qui sont adsorbés sur les fragments de compost suffisamment lourds pour être entraînés dans le culot de centrifugation seront éliminés du surnageant et donc de l'inoculum. Dans le second cas, a priori tous les micro-organismes présents dans le compost seront présents dans l'extrait.

D'autres auteurs ont utilisés un protocole inspiré de celui de Bellia et coll., 1999, pour ensemercer un milieu solide inerte à base de pouzzolane et simuler la dégradation des polymère dans des conditions « sol ». Dans ce cas la quantité de sol mixé avec l'eau distillée est plus importante, sans doute dans le but de compenser un concentration de micro-organismes moins importante dans le sol que dans le compost.

L'apport microbien peut également être une faible quantité de sol que l'on mélange avec le support solide inerte comme présenté sur la figure 17 (chiellini et coll., 1999).

V.3.2 Apport minéral

Pour permettre un bon développement des micro-organismes, il est nécessaire d'apporter certains sels minéraux indispensables. D'après les données que l'on peut trouver dans la littérature, on voit que les solutions minérales sont toutes composées des mêmes éléments mais à des concentrations différentes en fonction de la quantité de support à mélanger, un exemple de solution minérale est donné dans le tableau 4. Il est important de noter qu'en général, la solution minérale est tamponnée pour permettre de stabiliser la pH au cours de la biodégradation du matériau, les monomères issus de l'hydrolyse des polyesters

étant des hydroxyacides ils peuvent provoquer une diminution du pH létale pour les micro-organismes. Dans le compost, c'est la très grande variété d'espèces chimiques libérées par le processus de compostage qui permet d'éviter une variation de pH trop importante. Itävaara et coll., 2002, ont montré que la dégradation du PLA n'engendrait pas de variation du pH dans le compost où il est placé en le comparant avec un compost témoin ne contenant pas de PLA. Une diminution de pH est observée à partir d'une proportion de PLA dans le compost d'environ 30% (Ghorpade et coll., 2001), mais cette proportion est très largement supérieure à celles couramment utilisées lors de tests de biodégradation dans le compost.

solutés	Masse (en g pour 5 litres)
CaCl ₂ ,2H ₂ O	0.6500
Na ₂ HPO ₄ ,2H ₂ O	34.8500
KH ₂ PO ₄	18.7500
(NH ₄) ₂ SO ₄	20.0000
MgSO ₄ ,7H ₂ O	1.0000
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0.0135
MnSO ₄ ,7H ₂ O	0.0050
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0.0050
H ₃ BO ₃	0.0050
KI	0.0050
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₃ ,4H ₂ O	0.0050

Tableau 4 : composition de la solution minérale pour compléter la vermiculite. 410 ml de cette solution sont mélangés avec 180 grammes de vermiculite (Gattin, 2000).

V.3.3 Mise en place et déroulement du test

La mise en place d'un test de biodégradation en milieu solide inerte consiste donc à mélanger un des supports de croissance précédemment cités (vermiculite, pouzzolane ou perlite) avec un inoculum microbien, un apport minéral et le matériau à dégrader. Dans ce cas la seule source de carbone présente dans le milieu est le matériau test (tableau 5).

constituants	quantités
vermiculite	180 g
Solution minérale	410 ml
Inoculum (extrait de compost)	15 ml
Matériau « test »	Masse équivalente à 7.7 g de carbone

Tableau 5 : Composition d'un milieu solide inerte sans activation (Gattin et coll., 2000).

D'autres auteurs ont encore simplifié ce protocole dans le cas de l'utilisation de la Perlite pour la simulation de test en enfouissement dans le sol, car il n'y a aucun apport minéral « synthétique » dans le milieu. En effet ces auteurs n'ont pas utilisé d'extrait d'un milieu naturel pour inoculer le milieu mais plutôt une faible quantité de sol qui est mixé avec la vermiculite (Chiellini et coll., 1999 ; Solaro et coll., 1998). On peut donc supposer que les éléments minéraux nécessaires au développement de la flore microbienne sont contenus dans l'échantillon de sol utilisé.

Ces deux protocoles sont les plus simples qui sont proposés dans la littérature pour un test en milieu solide inerte. Néanmoins, dans le but d'améliorer la corrélation entre milieux solides inertes et compost, des équipes de recherche ont introduit une nouvelle étape dans la réalisation de test en milieu inerte, c'est l'étape « d'activation du milieu » dont le déroulement est détaillé dans les paragraphes suivants.

V.3.3.1 Phase d' activation

L'activation d'un milieu solide inerte consiste à enrichir le milieu avec une quantité connue de composés carbonés avant de commencer le test de dégradation. Cette « dose d'activation » est alors dégradée pendant un temps donné par les micro-organismes inoculés dans le milieu solide inerte. Le test de biodégradation proprement dit ne commencera qu'après la fin de cette phase d'activation.

Lorsque un polymère est placé dans du compost pour être dégradé, les micro-organismes du compost ont d'ors et déjà colonisé tout le milieu et possède déjà le pack enzymatique nécessaire à la métabolisation des composés carbonés du compost. Lors d'un test en milieu inerte dont le protocole est celui donné dans le paragraphe précédent, le polymère a dégradé sera la seule source de carbone disponible, or si ce dernier est résistant aux attaques

enzymatiques, comme pour le PLA par exemple, il se peut que les micro-organismes disparaissent avant d'avoir de la matière carbonée disponible.

Il apparaît donc primordial de permettre aux micro-organismes de l'inoculum de croître au dépend de la dose d'activation et de se développer dans le milieu solide inerte. On aura une population microbienne suffisamment active, prête à dégrader le matériau test. Ainsi, on peut supposer que le milieu obtenu sera plus proche des conditions réelles d'un compost ou la flore microbienne occupe déjà uniformément le milieu et possède l'équipement enzymatique nécessaire à son développement.

La dose d'activation est composée de composés carbonés facilement consommables par les micro-organismes tels que l'amidon ou la cellulose, ce qui représentent assez bien les sources de carbone disponibles dans un compost. On ajoute également un bouillon de culture et une source de matière azotée qui est le plus souvent l'urée (Tableau 6).

constituants	quantités
Solution minérale	500 ml
Bouillon de culture	6.5 g
Urée	5.8 g
Amidon de maïs	10 g
Cellulose	10 g
Extrait de compost	Jusqu'à 1 l

Tableau 6 : Composition d'une dose d'activation (Bellia et coll., 1999). 450 ml de cette préparation sont mélangés avec 150 g de Vermiculite.

L'activation peut être mise en place individuellement dans chaque réacteur mais des auteurs ont développé un protocole d'activation commun à tous les réacteurs. Au lieu d'ajouter les mêmes quantités de composés carbonés dans chaque réacteur, l'activation est mise en place pour une grande quantité de milieu solide inerte. Lorsque la durée désirée de phase d'activation est atteinte, une quantité précise de milieu « activé » est utilisé pour chaque réacteur. Cela permettrait d'obtenir un milieu plus homogène et par voie de fait des écart-types moins importants sur plusieurs répétitions (Grima et coll., 2001).

La durée de la phase d'activation est variable en fonction du type d'inoculum et donc du type de milieu que le test en milieu solide inerte est censé simuler. Pour Bellia et coll., 1999 ; simulant des tests en conditions compost, la phase d'activation dure 3 jours. Il se base

sur le fait qu'au bout de cette durée la production journalière de CO₂ est équivalente à celle d'un compost mature. Pour Grima et coll., 2001 ; dans le cadre de test de simulation « sol » sur Pouzzolane, la phase d'activation est fixée à 10 jours, la température étant de 20 °C contre 50 précédemment. L'ensemble de la dose n'est pas forcément dégradé à ce moment la mais le dégagement de CO₂ journalier est relativement faible.

V.3.3.2 Test

Si le test se déroule dans un milieu solide inerte non activé, il n'est pas utile de faire des tests témoins car le dégagement de CO₂ d'un réacteur ne contenant que de la vermiculite et un inoculum est pratiquement nul. Dans le cas où le test est fait avec un milieu solide inerte activé, le test est généralement accompagné d'un réacteur témoin ne contenant que le support solide inerte activé. La population microbienne de l'inoculum qui s'est développée dans le milieu a une respiration endogène qui peut être sensible notamment dans les premiers jours du test. Néanmoins, ce dégagement de CO₂ n'a rien de commun avec celui d'un compost.

V.4 Application des milieux solides inertes

La première tentative de test de biodégradation dans un milieu solide inerte date de 1996 où des auteurs ont utilisé la vermiculite et un banc de test automatisé pour observer la minéralisation d'un polyester de type PBS sous la forme de particules de granulométrie différente (Spitzer et coll., 1996). Les résultats mettent en évidence une minéralisation dont la vitesse augmente quand la granulométrie du matériau test diminue mais il n'y a pas de comparaison avec la minéralisation du même polyester sous la même forme dans du compost. La vermiculite utilisée pour ce test n'est pas activée et n'est complétée qu'avec une solution ne contenant que des composés minéraux. Il est déjà mentionné dans cette étude l'intérêt que peut avoir ce type de milieu pour l'établissement de bilan carbone complet de la dégradation d'un polymère dans le compost. D'autres travaux utilisant le même type de milieu solide inerte non activé, montre la biodégradation de plaque d'amidon ou de PLA. Pour des films d'amidon (Gattin et coll., 2000), le profil des courbes de minéralisation dans la vermiculite et le compost sont en tous points similaires et les films sont minéralisés en moins de dix jours. Pour les plaques de PLA (Gattin, Thesis, 2001), une faible minéralisation est observée dans la vermiculite (14% au bout de 45 jours) alors qu'aucune minéralisation n'est

détectée dans le compost, ce dernier résultat pouvant éventuellement être dû à un dégagement endogène de CO₂ du compost trop important.

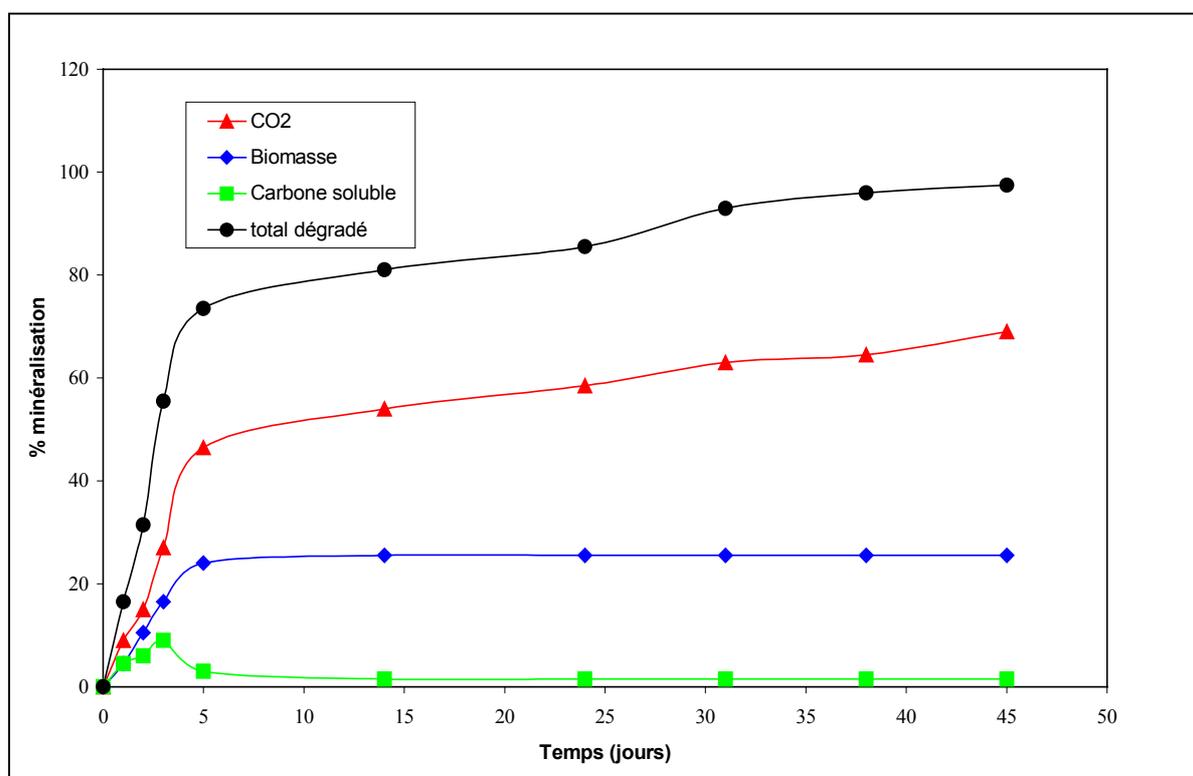


Figure 18 : évolution du bilan carbone pour le biodégradation d'un film de PLA et d'amidon co-extrudé en milieu vermiculite avec la norme ISO/CEN 14852 (Gattin et coll., 2002).

Une autre équipe de recherche de l'entreprise italienne Novamont, qui produit le matériau biodégradable Mater-Bi, a ensuite développé un nouveau type de milieu test à base de vermiculite activée (Bellia et coll., 1999). Ils ont notamment montré l'intérêt de ce type de milieu pour détecter la libération dans le milieu d'éventuels sous-produits de dégradation toxiques pour l'environnement (Degli-Innocenti et coll., 2001 ; Tosin et coll., 1998). Ces travaux ont aussi montré la compatibilité du support inerte avec l'extraction des sous-produits de dégradation avec un solvant organique. Plusieurs extractions successives avec de l'eau puis du DMSO ont permis de mettre en évidence la présence dans le milieu d'un résidu de dégradation toxique issu de la décomposition d'un polyuréthane (le matériau utilisé pour le test était composé de PCL, d'amidon et d'un polyuréthane). Les milieux inertes utilisés montre une corrélation intéressante avec le compost pour la dégradation d'un polymère « modèle » comme la cellulose mais également pour le Mater-Bi (un matériau multi-phase à base d'amidon et de Poly(ϵ -caprolactone)). En effet, le profil des courbes de minéralisation

des deux matériaux pour le milieu solide inerte et le compost sont similaires et le milieu solide inerte permet d'avoir des variations moins importantes sur plusieurs répétitions.

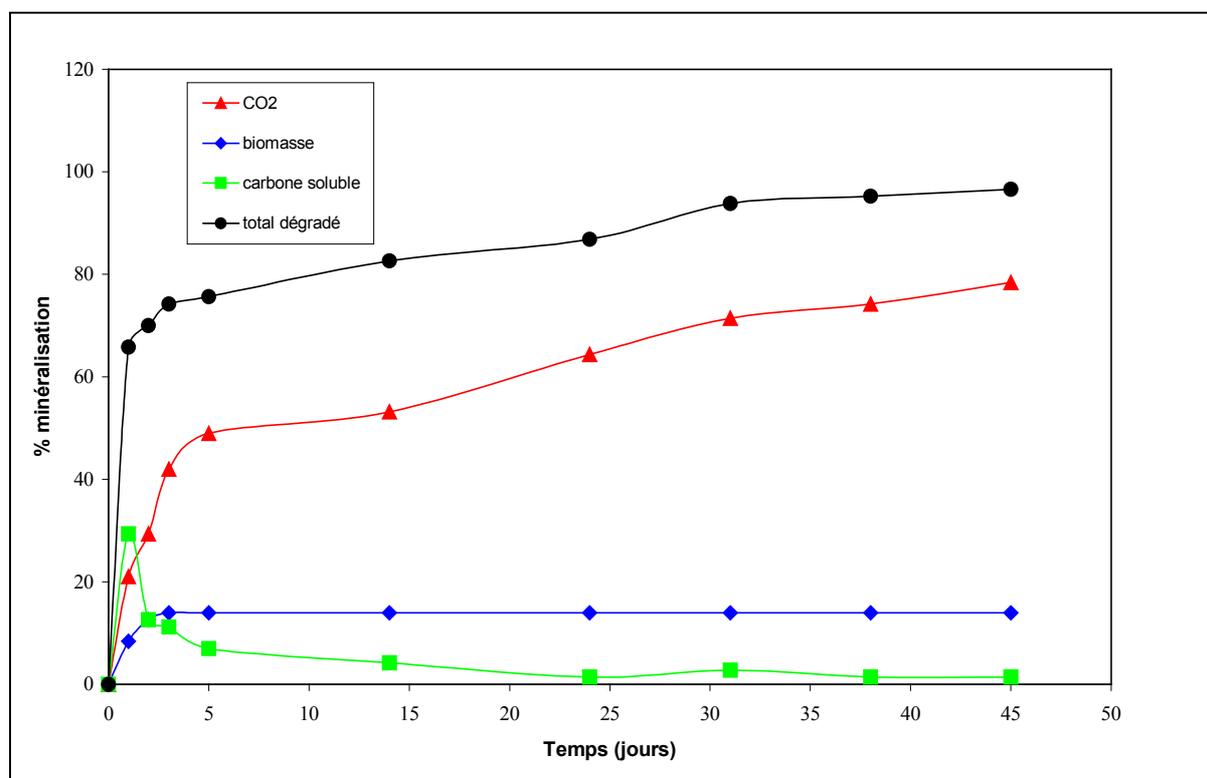


Figure 19 : évolution du bilan carbone pour le biodégradation d'un film de PLA et d'amidon co-extrudé en milieu liquide avec la norme ISO/CEN 14852 (Gattin et coll., 2002).

L'utilisation de ce type de milieu pour l'établissement de bilan carbone est encore rare mais on peut déjà trouver dans la littérature quelques résultats pour des matériaux multi-phases à base d'amidon et de PLA (Gattin et coll., 2002) ou d'amidon, PCL et polyuréthane (Bellia et coll., 1999). Dans le premier cas, les résultats présentés montrent un évolution similaire des différents termes du bilan carbone en milieu vermiculite et en milieu liquide pour le matériau étudié dont les proportions en amidon et PLA sont respectivement 80 % et 20 % (figure 18 et 19). On remarque une augmentation rapide de la proportion de carbone soluble lors des 3 premiers jours du test, montrant que le matériau (partie amidon) est sans doute dans un premier temps fragmenté en chaînes de taille plus réduites pour ensuite être minéralisé. La biomasse augmente rapidement également puis reste stable, le milieu n'étant pas activé, la quantité de micro-organismes présentes dans le milieu en début de test est insuffisante pour minéraliser le matériau. On observe donc dans un premier temps un accroissement de la biomasse qui utilise le carbone du matériau principalement dans des voies

de synthèse biochimique et lorsque la flore microbienne est suffisamment développée, le carbone du matériau est alors principalement minéralisé sous forme de CO₂ par la biomasse dont la proportion reste donc stable sur toute la fin du test.

Il est important de noter que ces bilans carbone ne sont pas complets dans la mesure où ils ne quantifient pas le terme du bilan carbone qui correspond au carbone du matériau résiduel qui n'a pas encore été dégradé. Ils permettent cependant de mettre en évidence la biodégradation ultime du matériau dans les milieux étudiés. En effet la somme des proportions de carbone minéralisé et inclus dans la biomasse est proche de 100 %, alors que le taux de minéralisation n'est que de 69 % ce qui ne représente pas le réel comportement de ce matériau dans un milieu solide simulant le compost. Dans ce cas, le matériau peut être considéré comme compostable sur la simple considération du taux de minéralisation. Cependant on peut supposer qu'un matériau un peu plus résistant aux réactions de dégradation peut ne pas atteindre la limite des 60 % de carbone minéralisé préconisée par les normes, donc ne pas être considéré comme biodégradable alors qu'une part non-négligeable du matériau a été transformée en biomasse, preuve de sa bio-assimilation par le milieu de dégradation. D'où l'importance de l'établissement d'un bilan carbone complet au moins en fin de test.

Dans le deuxième cas (Bellia et coll., 1999), les auteurs retrouvent 100 % du carbone introduit dans le milieu en faisant la somme du carbone minéralisé et de celui contenu dans le résidu de matériau non dégradé, ce qui semblerait prouver qu'il n'y a pas eu d'accroissement de la biomasse aux dépens du matériau, ni de carbone transformé sous forme de composés solubles dans le milieu. Le milieu vermiculite utilisé est un milieu activé, la flore microbienne est donc censée avoir colonisé le milieu avant le début du test, la part du carbone transformée sous forme de biomasse doit logiquement être moindre que pour un test où le milieu n'est pas activé. Cependant il peut paraître surprenant qu'elle soit nulle. Cette hypothèse devrait être vérifiée par une estimation directe de la biomasse du milieu. Les auteurs appuient néanmoins cela par le fait que les micro-organismes du milieu sont plus ou moins maintenus dans un état de manque de substrat qui les force à consommer les éventuelles réserves de carbone qu'ils auraient pu synthétiser à partir du carbone du polymère. Ces arguments excluent qu'une augmentation de la population microbienne puisse avoir lieu pendant le test, considérant que le nombre de micro-organismes en fin d'activation est suffisant pour accomplir la bio-assimilation du matériau.

V.5 Conclusions

La synthèse des premiers travaux disponibles dans la littérature concernant l'utilisation des milieux solides inertes laisse envisager un potentiel intéressant quant à la simulation et la caractérisation de la biodégradation des polymères synthétiques dans le compost. Le but de nos travaux sera donc dans un premier temps de mettre au point un premier milieu solide inerte permettant d'établir un bilan carbone pour la dégradation d'un polymère biodégradable modèle comme l'amidon. La première étape consistera à sélectionner les paramètres biologiques et physico-chimiques du milieu pour obtenir une bonne corrélation entre milieu solide inerte et compost. Puis dans une deuxième étape, un protocole d'extraction et d'estimation du carbone pourra être testé pour établir le bilan carbone

Dans un deuxième temps nous tenterons d'appliquer ce milieu à l'étude de la biodégradation de polymères synthétiques comme le PHB ou le PLA en ajoutant à cela le suivi de certaines propriétés physico-chimiques de ces polymères au cours de la biodégradation, Cela étant rendu possible par l'extraction des polymères du milieu par des solvants organiques adéquats. L'études des propriétés physico-chimiques devraient nous permettre de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu lors des différentes étapes de la biodégradation de ces polymères dans le compost.

**Partie B : Mise au point d'un test de
biodégradation en milieu solide inerte avec
l'amidon**

I> INTRODUCTION

Pour mettre au point le milieu de dégradation solide inerte nous avons choisi d'utiliser l'amidon comme polymère biodégradable « modèle ». L'amidon étant un substrat courant pour les micro-organismes, cela permet de nous préserver d'éventuels problèmes dû à une quelconque résistance du matériau aux diverses phénomènes de dégradation (biotique ou abiotique) ayant lieu dans le milieu.

En premier lieu nous avons testé cinq milieux de dégradation différents tous à base de vermiculite mais avec des phases d'activation ou des quantités d'inocula différentes. Les résultats obtenus sous la forme de courbes de minéralisation seront comparés avec la minéralisation de l'amidon dans le compost dont est extrait l'inocula utilisé pour les milieux solides inertes. Nous pourrons ainsi mettre en évidence l'influence et l'utilité de la phase d'activation et déterminer les conditions de départ qui permettent de simuler au mieux la dégradation de l'amidon dans le compost.

Dans un deuxième temps, un protocole d'extraction du carbone et des méthodes d'analyse simples ont été appliquées sur les prélèvements effectués à différents moments du test en milieu solide inerte ayant donné les meilleurs résultats quand à la minéralisation de l'amidon. Ainsi, nous avons pu suivre l'évolution du bilan carbone de la biodégradation de l'amidon au cours du temps.

II> MATERIEL ET APPAREILLAGE

II.1 Matériel

II.1.1 Origine des produits utilisés

Le supplément carboné destiné à l'activation est inspiré des travaux de Bellia et coll, 1999, et est composé d'amidon de blé (Roquette, France), de cellulose microcristalline (Sigma-Aldrich), d'urée (Sigma-Aldrich) et de bouillon de culture (Biokar Diagnostics).

Le compost utilisé lors des tests dans ce milieu et dont est extrait le lexiviat permettant de réaliser les tests en milieu solide inerte, est produit sur le site de compostage Valorbio situé à Pargny les Reims dans la marne. Les matières premières qui composent ce compost ainsi que son procédé de fabrication ont été détaillés au paragraphe § III.2.1.2.1. Après tamisage à

1 cm pour éliminer les morceaux les plus grossiers, le compost a été stocké au congélateur par sachets de 600 grammes à une température avoisinant les -18°C .

II.1.2 Vermiculite

Le support solide inerte qui a été choisi est la vermiculite (Sigma-Aldrich, vermiculite Grade 3) comme support solide inerte pour simuler la dégradation des matériaux dans le compost. C'est un silicate d'aluminium, de fer et de magnésium 100% minéral de composition $(\text{Mg,Fe,Al})_3(5\text{Al,Si})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2,4\text{H}_2\text{O}$. Ce matériau retient particulièrement bien l'eau et l'humidité relative y est égale à 100 % lorsqu'on lui ajoute 70 % d'eau en masse. Ces caractéristiques en font donc un bon support de croissance pour les micro-organismes.

II.2 banc de test automatisé

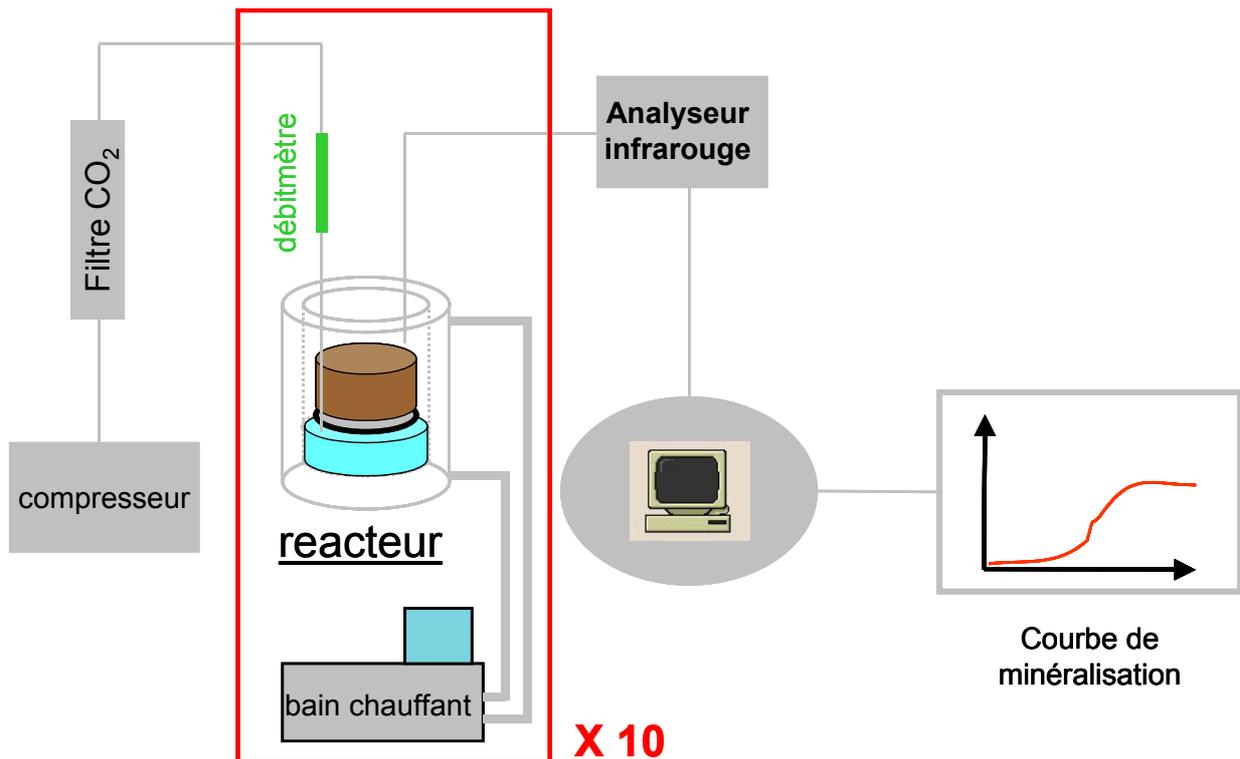


Figure 20 : Schéma de principe du banc de tests automatisé

Nous disposons au laboratoire d'un banc de test de biodégradation automatisé (Figure 20 et 21) qui nous permet de mener jusqu'à 10 tests simultanément. La mesure de la proportion de CO₂ est effectuée sans l'intervention d'aucun opérateur, ce qui permet un gain de temps appréciable par rapport un système titration du CO₂ inhérentes aux systèmes de piégeage chimique utilisant des solutions alcalines.

Il est composé de 10 bioréacteurs en verre d'un volume de deux litres (CMF 100, Chemap, Switzerland). La double enveloppe de ces réacteurs permet de maintenir la température souhaitée pour le test de dégradation par circulation d'eau thermostatée grâce à un bain marie. L'air qui alimente les réacteurs est fourni par un compresseur et est préalablement débarrassé du CO₂ qu'il contient grâce à un filtre à catalyse (Domnick Hunter). Le débit du flux d'air est fixé manuellement à 0,56 l.min⁻¹ par un rotamètre à bille et contrôlé par un débitmètre massique (KAG 1398 et 5850 Tr, Brooks Instruments, Veenendaal, Pays-Bas), cela permet (couplé à une agitation manuelle régulière) de maintenir des conditions aérobie à l'intérieur de chaque réacteur. En sortie de réacteur, la proportion de dioxyde de carbone contenu dans le flux gazeux est mesuré par un analyseur infrarouge (BINOS 100 2M, Rosemount, France) étalonnée avec un mélange gazeux connu (0,7% en CO₂, Air Liquide) et de l'azote pour le « zéro » (Azote U, Air Liquide).

Le temps d'échantillonnage de chaque réacteur est de 12 minutes toutes les deux heures et les données recueillies sont stockées dans un ordinateur via un système d'acquisition automatisé (Allen-Bradley, Milwaukee, Etats-Unis). La quantité de CO₂ dégagée par un réacteur en 2 heures est calculé en intégrant la quantité produite sur 12 minutes tout en tenant compte de la valeur du débit. A la fin de chaque test on obtient ainsi la quantité totale de CO₂ produite par réacteur. Cette quantité totale est minorée par la quantité de CO₂ présente dans l'air. En effet pour chaque test, un réacteur « témoin air » est réalisée pour déterminer la quantité de CO₂ présente dans l'air, même si celle-ci est très faible grâce à la présence du filtre à CO₂ (Nitrox CO2 RP 140, Domnick Hunter, USA). Ce Témoin permet également de se préserver des erreurs qui pourraient être dues à une dérive de l'analyseur infrarouge.

Les réacteurs utilisés ici étant initialement prévus pour des cultures en milieux liquides sous agitation, leur utilisation pour des tests de biodégradation en milieux solides (vermiculite ou compost) a nécessité quelques aménagements. A l'intérieur de chaque réacteur, on dispose un support en acier inoxydable ajouré qui permet de maintenir le milieu solide plus haut que le fond du réacteur ou se trouve de l'eau distillée (Figure 21b). L'air qui alimente les réacteurs arrive donc par le fond de celui-ci et barbote en permanence dans l'eau, aidant ainsi à maintenir à la fois l'humidité et les conditions aérobie du milieu.



a



b

Figure 21 : Vue d'ensemble du banc de test automatisé (a), réacteur modifié pour un test en milieu solide (b).

III> MISE EN PLACE DES TESTS ET RESULTATS

III.1 Test compost

III.1.1 Acclimatation

Pendant environ 4 jours, on laisse le compost « s'acclimater », car au cours des premiers jours où le compost est placé à 58°C, on observe une reprise de l'activité microbienne qui se traduit par un pic de production de CO₂ pendant les premières 24 heures qui pourrait masquer un dégagement de CO₂ dû à la biodégradation du substrat (voir figure 22). Au bout de cette période, la production instantanée de CO₂ est stable et relativement faible.

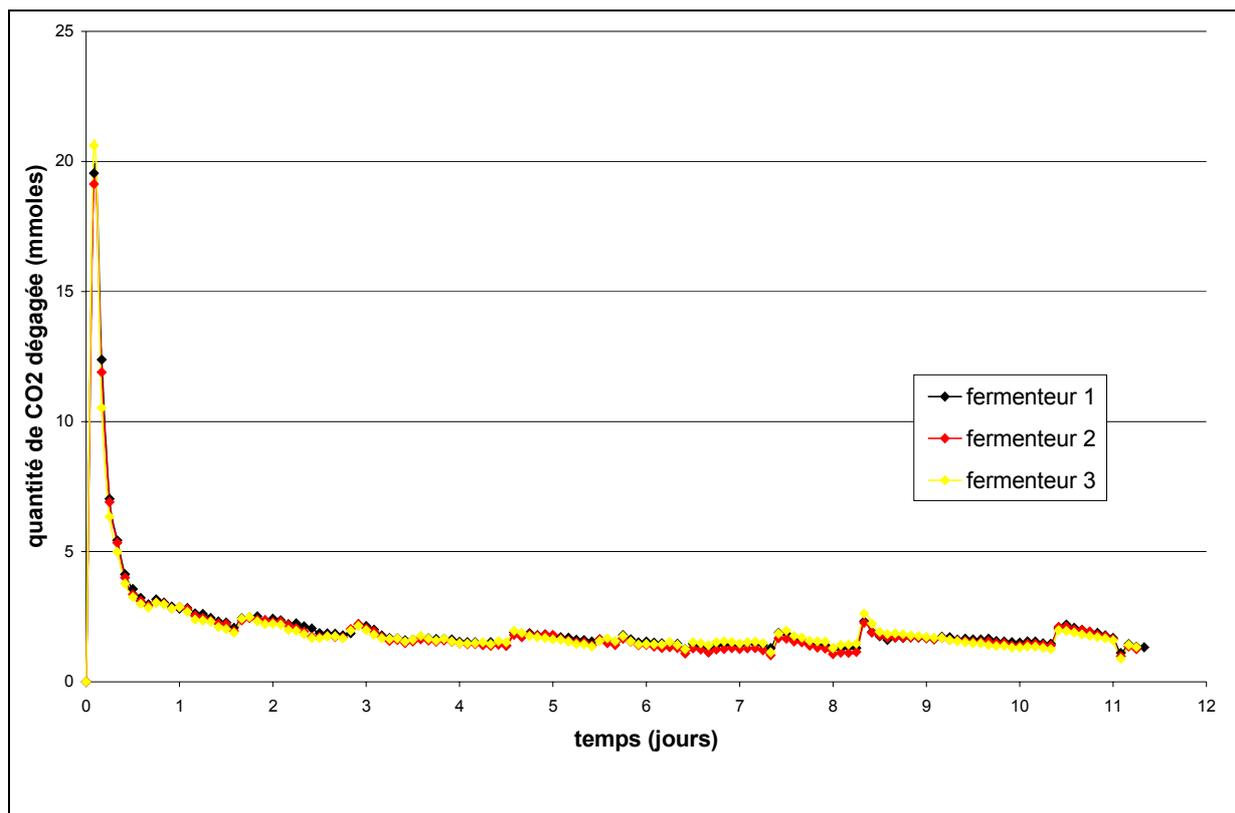


Figure 22 : Production instantanée de dioxyde de carbone du compost placée à 58°C pour trois réacteurs différents.

III.1.2 Test

560 grammes de compost sont décongelés pendant 24 heures au réfrigérateur puis placé dans un réacteur à 58°C pour acclimatation. Le compost n'est pas directement placé dans le réacteur mais dans un filet en polyéthylène à maille très fine pour éviter qu'il ne tombe au fond du réacteur. Lorsque le dégagement de CO₂ est stable on ajoute le substrat à dégrader. Comme dans les travaux précédents effectués au laboratoire, la masse de carbone introduite est égale à 7,7 grammes. L'amidon de blé que nous utilisons contenant 38,96 % de carbone en masse (proportion déterminé par analyse élémentaire), on introduit donc 22 grammes d'amidon de blé en poudre. Le test est répété trois fois.

Trois réacteurs ne contenant que du compost sont également mis en place. Après la période d'acclimatation de compost, on mesure la quantité de CO₂ produite. Cette quantité correspond à la production endogène du compost due à la dégradation des résidus carbonés que l'on trouve dans celui-ci. Si l'on retranche cette quantité à celle produite par les réacteurs contenant le compost et le substrat, on obtient la quantité de CO₂ produite par la

biodégradation du substrat (l'amidon). Le taux de minéralisation (%min) est calculé selon la formule suivante :

$$\%min = \frac{C_{test} - C_{témoin}}{C_{théorique}}$$

avec :

- C_{test} : quantité de CO₂ produite par le réacteur contenant le compost et le substrat.
- $C_{témoin}$: quantité de CO₂ produite par le témoin compost
- $C_{théorique}$: quantité de carbone produite si le substrat est entièrement minéralisé.

III.2 Milieu solide inerte

La composition des différents milieux utilisés est rappelée dans le tableau 7.

Test	Amidon (g)	activation	Extrait de compost (ml)	Vermiculite (g)	Solution minéral (ml)
1	22	-	15	180	410
2	22	-	45	180	410
3	22	Dose 1/2	15	180	410
4	22	Dose 1	15	180	410
5	22	Dose 2	15	180	410

Tableau 7 : Composition des milieux solides inertes

III.2.1 solution minérale

La vermiculite tient le rôle du support de croissance fournissant une surface de contact solide/liquide intéressante pour les micro-organismes. Elle ne contient aucun élément minéral indispensable à la croissance des micro-organismes. C'est pourquoi pour les tests en milieu solide inerte (activé ou non), chaque réacteur contient 180 grammes de Vermiculite avec 410 ml de solution minéral (Tableau 4). La vermiculite retient parfaitement ce volume de solution minérale et le pourcentage d'humidité est ainsi maintenu aux alentours des 70-80 % d'eau, conditions favorables à la croissance des micro-organismes.

III.2.2 Préparation du lexiviat de compost

Pour les tests en milieu vermiculite, les micro-organismes à l'origine de la biodégradation sont apportés grâce à un lexiviat préparé à partir du compost utilisé pour les tests en milieu naturel. Le protocole de préparation est le suivant :

On prélève 15 grammes de compost décongelé 24 heures au réfrigérateur que l'on place dans 150 mL de liquide de Ringer. Le tout est homogénéiser pendant une heure puis filtré sur tamis de 0,125 mm afin d'éliminer les particules les plus grossières. Le filtrat est ensuite centrifugé à 10000 tours/min pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans du liquide de Ringer pour subir une nouvelle centrifugation. Cette opération est répétée 4 fois de sorte que la concentration en carbone de l'extrait soit inférieur à 100 mg/L (déterminée par analyse élémentaire). Pour finir, l'ensemble des culots de centrifugation est repris dans 150 mL de liquide de Ringer.

Sels minéraux	Composition pour 1 litre (g)
NaCl	9
KCl	0,42
CaCl	0,48
NaHCO ₃	0,2

Tableau 8 : Composition de la solution de Ringer.

III.2.3 Test sans activation, influence de la quantité de lexiviat

Pour les tests sans activation, on place dans chaque réacteur la quantité d'inoculum désiré, à savoir 15 ou 45 ml d'extrait de compost ainsi que l'amidon à dégrader. Ces volumes d'inoculum sont volontairement assez éloigné de manière à observer l'influence de la quantité d'inoculum. La masse d'amidon utilisée est la même que celle des tests en milieu compost, 22 grammes, de manière à pouvoir comparer les résultats obtenus pour les deux milieux. Tous les tests sont menés en trois exemplaires. Le calcul du taux de minéralisation est obtenu grâce à la même formule que celle utilisée pour les tests dans le compost (§ VI.2.1.2). Cependant, le dégagement de CO₂ endogène d'un milieu vermiculite non activé est nul, il est donc inutile de

lancer un réacteur témoin qui ne contiendrait pas de substrat test. Donc le $C_{\text{témoin}}$ représente ici la quantité de CO_2 contenue dans l'air qui alimente les réacteurs (témoin air).

III.2.4 Test avec activation

III.2.4.1 Activation du milieu

Ici l'amidon n'est pas ajouté immédiatement pour quantifier la minéralisation, on ajoute dans un premier temps un mélange de substances carbonées à base d'amidon, de cellulose, d'urée et de bouillon de culture dans des proportions différentes suivant le type de dose d'activation utilisée. Nous avons testé trois doses d'activation différentes dont les compositions sont données dans le tableau 9. Pendant la dégradation de ces substrats, nous avons observé l'évolution des courbes de minéralisation pour déterminer le moment le plus opportun pour commencer le test de biodégradation. Le taux de minéralisation est calculé à partir de la masse de carbone introduite avec la dose d'activation (Tableau 9) et selon la formule donnée au paragraphe V1.2.1.2 où $C_{\text{témoin}}$ est la quantité de dioxyde de carbone dégagée par le témoin air.

	Amidon (g)	Cellulose (g)	Bouillon de culture (g)	Urée (g)	Equivalent carbone (g)
Dose ½	0,75	0,75	0,50	0,40	0,77
Dose 1	1,50	1,50	1,00	0,40	1,48
Dose 2	3,00	3,00	2,00	0,40	2,89

Tableau 9 : composition des doses d'activation

III.2.4.2 Test de biodégradation

Au bout de la période d'activation souhaitée, les réacteurs sont ouverts pour ajouter les 22 grammes d'amidon. Les tests sont menés en trois exemplaires également. Le dégagement en fin de phase d'activation étant très faible, nous n'avons pas jugé utile de faire des réacteurs témoins pour quantifier le dégagement de CO_2 endogène de la vermiculite activée. Le taux de

minéralisation est calculé selon la formule donnée au paragraphe V1.2.1.2 ou $C_{\text{témoin}}$ est la quantité de dioxyde de carbone dégagée par le témoin air.

III.3 Bilan carbone

III.3.1 Prélèvements

Nous avons effectué des prélèvements que sur les tests en milieu vermiculite dans le but d'établir le bilan carbone de la dégradation

La masse de chaque prélèvement est approximativement de 8 grammes de milieu humide et la masse totale de tous les prélèvements pour un seul réacteur ne dépasse pas 10 % du poids total du milieu. Le poids du milieu contenu dans un réacteur étant approximativement de 600 grammes, nous avons effectué 7 prélèvements.

En attendant d'être utilisé, les échantillons de milieu humide ont été stockés au congélateur à -20°C .

III.3.2 Protocole d'extraction et analyse des prélèvements

Nous avons mis au point un protocole d'extraction (Figure 23) pour nous permettre de séparer le carbone de l'amidon, qui après le processus de biodégradation est présent dans le milieu sous différentes formes.

A partir des prélèvements effectués, 1 gramme est placé à l'étuve à 105°C pendant 24 heures pour déterminer la pourcentage d'humidité du milieu au moment du prélèvement. L'échantillon est pesé régulièrement jusqu'à l'obtention d'une masse stable.

1 gramme de milieu est placé sous agitation dans l'eau distillé à 70°C pendant 40 minutes. Cette étape permet de solubiliser l'amidon présent dans l'échantillon en cassant sa structure granulaire. La concentration en amidon de la solution est déterminé par l'utilisation d'un Kit de dosage spécifique de l'amidon utilisant une méthode enzymatique couplée à des mesures UV-visible (Diffchamb SARL, Lyon, France). Le volume d'eau distillée utilisé pour dissoudre l'amidon est ajusté en fonction de la concentration d'amidon de manière à rester dans les limites d'utilisation du kit de dosage.

Deux grammes du même prélèvements sont placés sous agitation dans 30 ml de liquide de Ringer pendant 40 minutes. La solution est ensuite centrifugée à 10000 tours/minute pendant

20 minutes. Pour plus de précaution, le surnageant est filtré sur filtre acétate de cellulose de porosité 0,2 µm (Osmonics, Etats-Unis) et envoyé en analyse carbone organique dissous. Ces analyses ont été réalisées au laboratoire PROTEE de l'université de Toulon-Var. La méthode utilisée est celle dite d'oxydation par voie sèche. L'échantillon est acidifié, puis injecté dans un four à 850°C. Dans ce four, des billes d'aluminine platinées accélèrent l'oxydation totale du carbone en CO₂. Le flux de gaz (O₂) traverse ensuite un système de refroidissement à effet Pelleteir, une pièce halogène puis un détecteur infrarouge. La relation signal détecté (aire de pic) / carbone est déterminée par étalonnage avec des solutions de phtalates et d'acide de potassium de concentration connues.

Le culot de centrifugation (R) est placé à l'étuve à 105°C pendant 24 heures puis broyé à l'aide d'un broyeur à couteau (Janke et Kunkel, Allemagne). L'échantillon est ensuite soumis à l'analyse élémentaire pour déterminer le pourcentage de carbone présent dans l'échantillon.

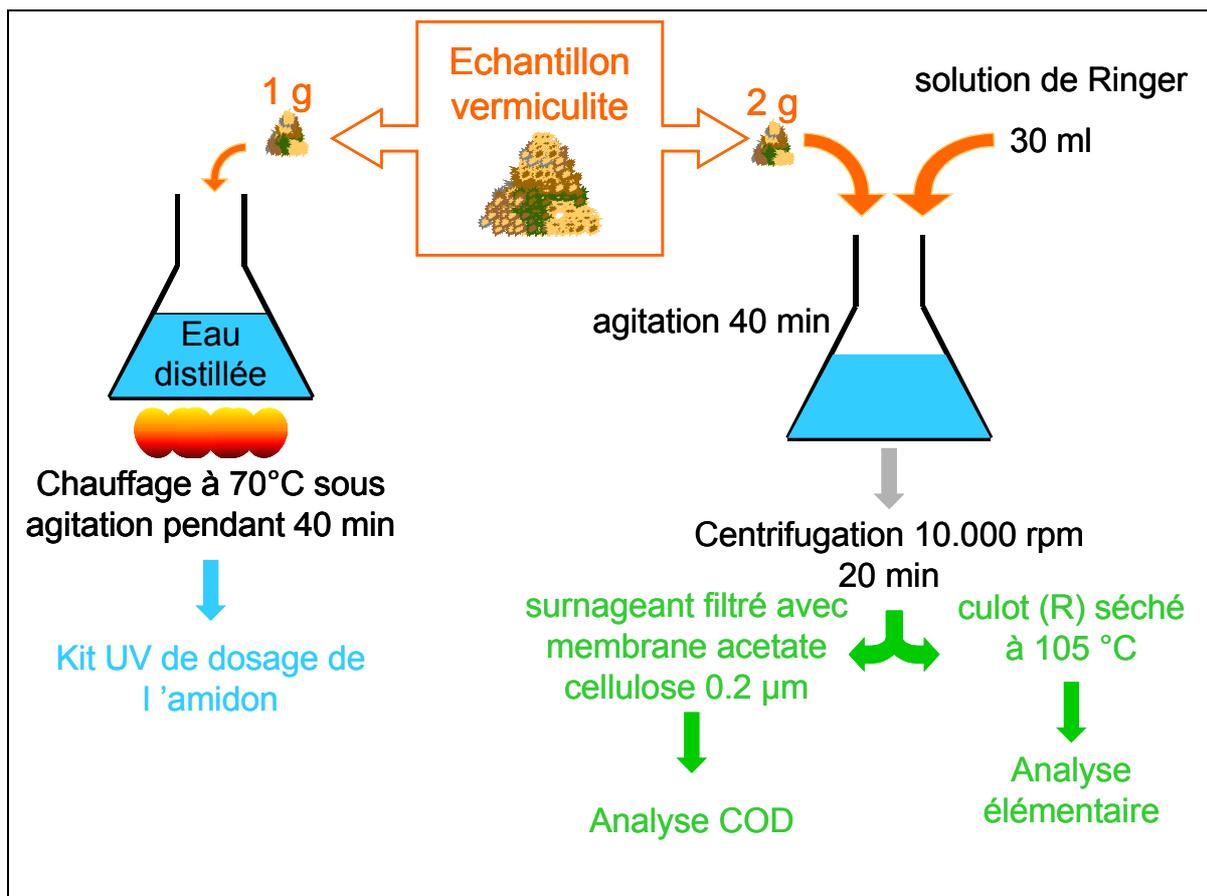


Figure 23 : Protocole d'extraction du carbone du milieu solide inerte.

L'appareillage utilisé est un Perkin Elmer 2400, composé d'un four à pyrolyse où l'azote, le carbone et l'hydrogène sont oxydés respectivement en CO₂, N₂ et H₂O et d'un chromatographe en phase gazeuse pour déterminer la concentration de chaque gaz à la sortie du four. La masse de l'échantillon utilisé est d'environ 4mg.

III.3.3 Etablissement du bilan carbone

Comme indiqué précédemment, le bilan carbone de la biodégradation d'un matériau composé uniquement d'hydrogène, de carbone et d'oxygène, peut se résumer par l'équation suivante :

$$C_{\text{polymer}} = C_b + C_g + C_d + C_{\text{nd}}$$

Dans des conditions aérobie le seul gaz libéré sera du dioxyde de carbone. La proportion du carbone du polymère minéralisée sous forme de CO₂ nous sera donnée grâce aux mesures effectuées par l'analyseur infrarouge du banc de test automatisé. Les termes du bilan restant (C_b, C_d et C_{nd}) nous seront donnés par les analyses réalisées à partir des protocoles d'extraction détaillés précédemment (§ VI.1.2.3.2).

L'analyse du carbone organique dissous du surnageant nous permettra de connaître la proportion de carbone présente dans les sous-produits de biodégradation solubles dans l'eau (C_d).

Après extraction des sous-produits de dégradation soluble par centrifugation il ne reste dans le culot R que la biomasse et l'amidon qui n'a pas encore été dégradé. La quantité de carbone obtenue par analyse élémentaire permet donc de connaître la masse de carbone présente dans le milieu sous la forme de biomasse et d'amidon. Or le dosage de la solution d'amidon donne la quantité d'amidon non dégradé dans l'échantillon et donc dans le milieu total (C_{nd}). On aura donc :

$$C_b = R - C_{\text{nd}}$$

On peut donc calculer directement tous les termes du bilan carbone.

Ces analyses donnent les quantités de carbone contenues sous différentes formes dans un échantillon sec représentatif du milieu total. Pour ramener les valeurs à la masse sèche totale, nous avons calculé la masse sèche totale au moment où chaque prélèvement a été effectué. Tout d'abord un milieu pour un réacteur prêt à être activé a été placé à l'étuve pour connaître la masse sèche de départ. Ensuite, les masses sèches à un temps donné ont été corrigées en modifiant la masse de départ en fonction de la masse de carbone échappée du réacteur sous forme de dioxyde de carbone lors de la phase d'activation, de la masse d'amidon introduite et enfin de la masse de carbone de l'amidon minéralisée en dioxyde de carbone. Les valeurs obtenues pour chaque réacteur sont données dans le tableau 10.

Date (jours)	Réacteur 1 (g)	Réacteur 2 (g)	Réacteur 3 (g)
0	196,10	196,10	196,10
0,92	191,98	191,92	191,78
1,25	191,34	191,09	190,89
2,17	189,55	189,26	188,86
3,17	188,65	188,36	187,83
4,17	188,34	188,16	187,59
7,92	188,09	188,00	187,36
11,58	188,01	187,95	187,31

Tableau 10 : Evolution de la masse sèche corrigée du milieu en fonction du taux de minéralisation pour chaque réacteur.

III.4 Discussion

III.4.1 Phase d'activation

On remarque qu'après une phase de latence très courte (quelques heures), on observe une phase de minéralisation intense qui se termine vers le jour 1 (Figure 24). Ensuite on peut voir qu'il n'y a pas de réelle « phase plateau » ou le taux de minéralisation reste définitivement stable. Le taux de minéralisation continue d'augmenter très faiblement jusqu'au jour 6 de façon régulière. On constate que l'augmentation de la masse de la dose d'activation (dose $\frac{1}{2}$ < dose 1 < dose 2) n'entraîne pas d'augmentation significative du taux de minéralisation final qui reste aux alentours des 40% (36,57, 38,50 et 39,51% respectivement

pour les doses 1/2, 1 et 2). Il n'est par conséquent pas utile d'augmenter encore la quantité de carbone dans la dose d'activation.

Avant de commencer le test de dégradation de l'amidon, nous avons donc décidé de laisser une activation de 6 à 7 jour, ceci afin d'obtenir un milieu solide inerte avec un production endogène de CO₂ toujours très faible. Un dégagement de dioxyde de carbone trop important pourrait cacher celui dû à la minéralisation de l'amidon. Au bout de 6 jours d'activation, le dégagement de CO₂ endogène d'un milieu activé est inférieur à 0,3 millimole quelque soit la dose employée, signe que la majorité du carbone de la dose d'activation est consommé.

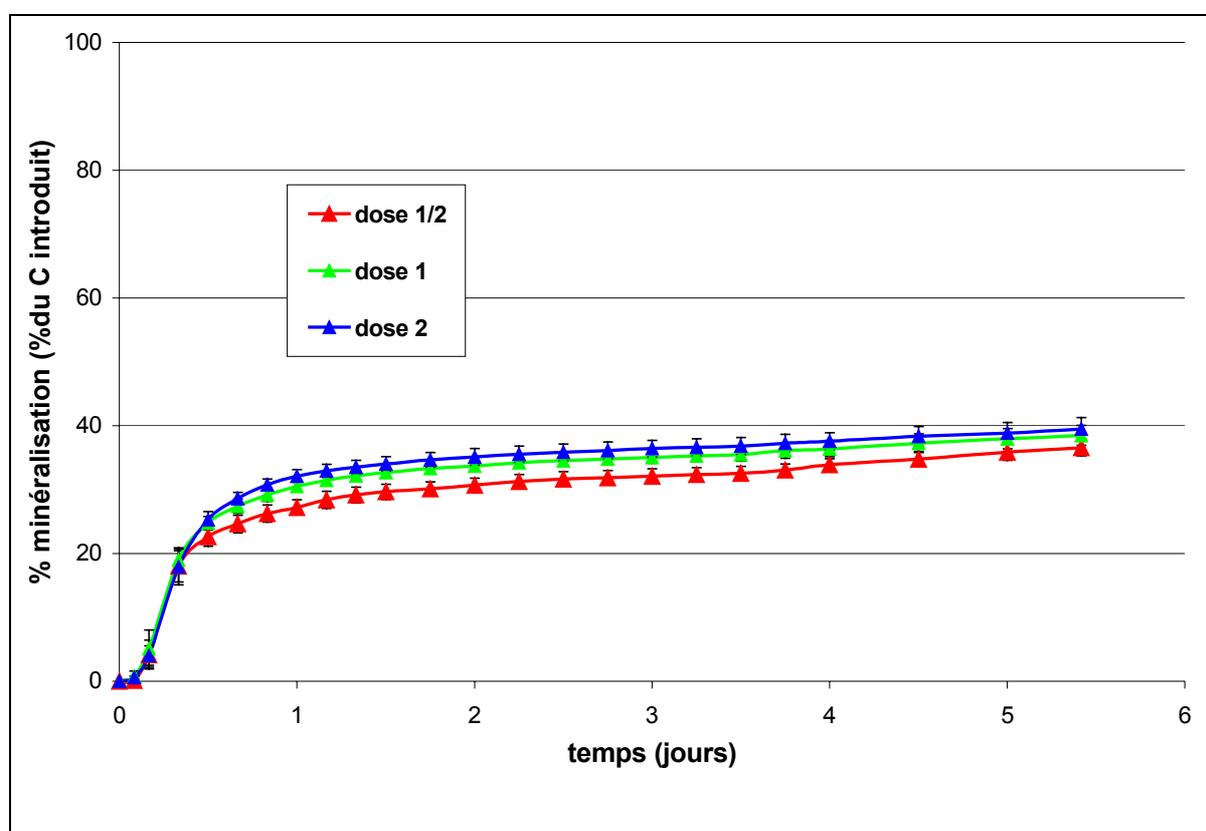


Figure 24 : Evolution du taux de minéralisation durant les phases d'activation. Les résultats présentés sont les moyennes obtenues pour trois répétitions.

III.4.2 Effet de la phase d'activation sur le test

Afin de comparer l'effet de la phase d'activation sur la minéralisation de l'amidon, nous avons testé différentes doses d'activation contenant plus ou moins de carbone (cf. tableau 9). Sur la figure 25 on constate que le dégagement de dioxyde de carbone instantané

dû à la biodégradation de l'amidon est jusqu'à 80 fois supérieur au dégagement endogène du milieu en fin d'activation pour la dose $\frac{1}{2}$ (dans les deux premiers jours du test) ce rapport étant encore plus important pour les doses 1 et 2.

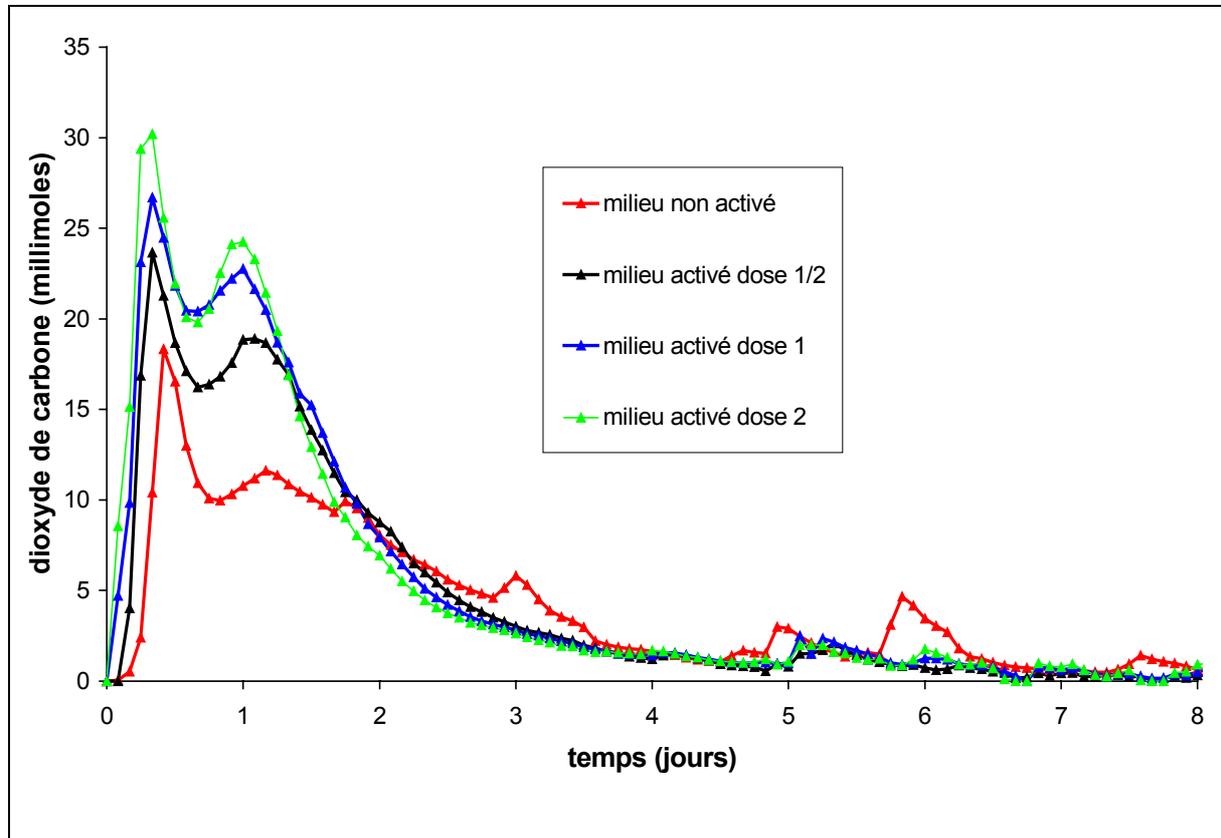


Figure 25 : production instantanée de dioxyde de carbone lors de la dégradation de l'amidon pour des milieux activés et non activés (pour tous les milieux, le volume d'inoculum utilisé est de 15 ml d'extrait de compost).

On remarque également le dégagement de CO₂ traduisant l'activité de minéralisation de l'amidon, est significativement plus important pour un milieu activé (quelque soit la dose utilisée) que pour un milieu non activé, cette différence étant significativement supérieure à la valeur du dégagement endogène d'un milieu activé. Pour les milieux activés il n'y a que deux pics majeurs de production de CO₂ situé avant le deuxième jour, puis cette production instantanée diminue pour demeurer stable jusqu'au douzième jour. Les pics sont d'autant plus intenses que la dose d'activation contient plus de carbone (dose $\frac{1}{2}$ < dose 1 < dose 2).

Pour le milieu non activé, les deux pics observé précédemment dans le cas des milieux activés sont toujours présents mais sont beaucoup moins importants (18 mmol pour la

vermiculite non activée, 24 mmol pour la vermiculite activée avec la dose ½). Par contre on note quatre autres pics de production aux alentours des jours 2, 3, 5 et 6.

En conséquence, pour un milieu activé, la minéralisation est plus rapide (la phase plateau est atteinte plus rapidement, cf. figure 25). Cette augmentation de l'activité de minéralisation pourrait être due, en plus d'une flore microbienne générale plus importante, à la présence d'amidon dans la dose d'activation résultant à une population de souche amylolytique plus importante dans le cas des milieux activés.

III.4.3 Biodégradation de l'amidon dans la vermiculite et le compost

Test	Phase de latence (heures)	Début de la phase plateau (jours)	Taux de conversion du carbone en CO ₂ (mmol/h)	Taux de minéralisation final
<i>Vermiculite non-activée</i>				
1	6	12/13	5,34 ± 0.60	68,9 ± 3.0
2	6	12/13	5,59 ± 0.66	72,9 ± 2.9
<i>Vermiculite activée</i>				
3	4	9/10	8,51 ± 0.20	74,1 ± 3.2
4	2	9/10	10,48 ± 1.00	84,7 ± 2.0
5	2	9/10	11,50 ± 1.14	85,8 ± 1.6
<i>compost</i>	4	8/9	8,37 ± 0.39	71,9 ± 1.4

Tableau 11 : Résultats obtenus pour la biodégradation de l'amidon dans divers milieu vermiculite (le taux de conversion est calculé lorsque la courbe de minéralisation est dans sa partie linéaire entre la phase de latence et de ralentissement).

Le but de ces tests dans des milieux solides inertes différents est de déterminer les paramètres d'un milieu à base de vermiculite qui pourrait simuler la dégradation d'un polymère dans le compost. Nous avons donc comparer le profil des courbes de minéralisation pour la biodégradation de l'amidon dans les milieux vermiculite et dans le compost. Les résultats sont donnés dans le tableau 11.

Comme on peut le voir sur la figure 26, la biodégradation de l'amidon est plus rapide dans le compost que dans les milieux non activés quelque soit le volume d'inoculum utilisé (15 ml pour le test 1 et 45 ml pour le test 2). En effet, dans le compost, il y a déjà une population microbienne importante possédant l'équipement enzymatique nécessaire à la

biodégradation d'une source de carbone comme l'amidon. Au contraire les micro-organismes des milieux non activés (issus de l'extrait de compost) sont en faible quantité. Ainsi on peut supposer que dans les premières heures du test et avant que la minéralisation ne commence réellement, il y a une première phase de croissance et d'accroissement de la masse microbienne accompagnée d'une activité importante de synthèse enzymatique. Le carbone de l'amidon serait donc prioritairement utilisé pour ces synthèses biochimiques, ce qui expliquerait que la minéralisation commencerait plus lentement dans le cas de milieux vermiculite non activés (cf. tableau 11, phase de latence).

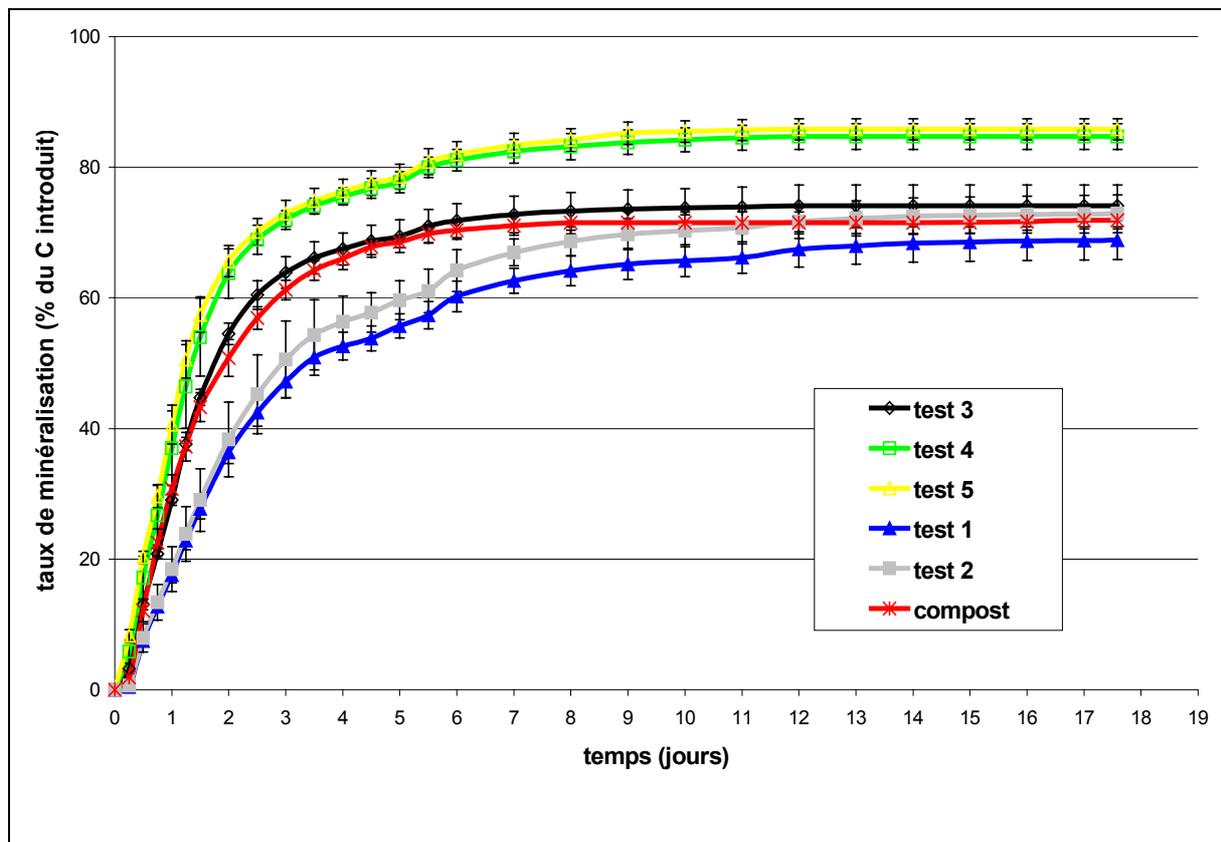


Figure 26 : Courbe de minéralisation obtenues pour la biodégradation de l'amidon dans les milieux solides inertes et dans le compost.

Les milieux vermiculite activés avec les doses 1 et 2 donne une minéralisation trop rapide comparé à la minéralisation de l'amidon dans le compost et le taux de minéralisation final y est supérieur de plus de 10%. Dans ces cas la, la quantité de carbone présente dans les dose d'activation doit être trop importante et en conséquence l'activité de minéralisation des micro-organismes déjà présents dans le milieu est trop élevée et rapide lors des deux premiers jours du test (cf. tableau 11, taux de conversion).

Le milieu vermiculite activé avec la dose $\frac{1}{2}$ donne un profil de courbe de minéralisation très proche de celui obtenu pour le compost (Figure 26). Dans les deux cas la phase de latence est très courte et pour la partie linéaire de la courbe de minéralisation, le taux de conversion du carbone de l'amidon en CO_2 est de 8,37 mmol/h dans le compost et 8,51 mmol/h dans la vermiculite activée (Tableau 4). De plus les taux de minéralisation finaux ne sont séparés que d'environ 2% (74,1 et 71,9 % respectivement pour la vermiculite et le compost, Tableau 10).

D'après ces résultats, nous avons considéré que le milieu vermiculite activée avec la dose $\frac{1}{2}$ permettait de simuler de manière satisfaisante la biodégradation de l'amidon dans le compost. En conséquence, nous avons tiré partie des avantages d'un tel milieu pour tenter d'établir un bilan carbone complet de la biodégradation de l'amidon à différents étapes du test.

III.4.4 bilan carbone

Cinq des sept prélèvements effectués ont été réalisés lors de quatre premiers jours du test qui correspondent à la période de minéralisation la plus intense. Un prélèvement a aussi été réalisé à la fin de la phase d'activation.

Sur la figure 27 on peut voir durant la phase linéaire de la courbe de minéralisation (du début au jour 2) que 35% de carbone de l'amidon est transformé en carbone organique dissous (courbe jaune), indiquant que l'amidon est sans doute dans un premier temps dégradé en chaînes plus courtes solubles puis minéralisé en CO_2 et/ou inclus dans la biomasse. L'activité des enzymes extra-cellulaires qui rompent les chaînes d'amidon est plus importante que les réactions de minéralisation qui ont lieu dans les cellules, c'est pourquoi on observe une accumulation de sous-produits de réaction solubles dans le milieu de dégradation.

La proportion de carbone dans la biomasse n'est jamais supérieure à 20% puis diminue lentement jusqu'à 13% (courbe rouge). Cette proportion est légèrement inférieure à celle observé pour d'autres travaux lors de la dégradation de plaque d'amidon broyée dans un milieu vermiculite non activé (Gattin, thèse, 2001). Ce résultat semble logique dans la mesure où la phase d'activation doit permettre une première phase de croissance de la flore microbienne, ainsi le carbone utilisé pour le test de dégradation (après la phase d'activation) est minéralisé sous forme de CO_2 plutôt que transformé en nouvelle biomasse. La proportion de carbone présente dans la biomasse n'est pas en accord avec les résultats d'une autre équipe ayant établi un bilan carbone pour le même type de substrat (Bellia et coll., 1999) car dans ce

travail le terme biomasse du bilan à la fin du test est établi comme nul. Cependant, le bilan carbone n'avait pas été calculé de la même manière, celui-ci étant déjà égal à 100% après la somme des termes C_g et C_{nd} , les auteurs en avaient déduit (par différence) qu'il n'y avait pas eu de carbone de l'amidon inclus dans la biomasse.

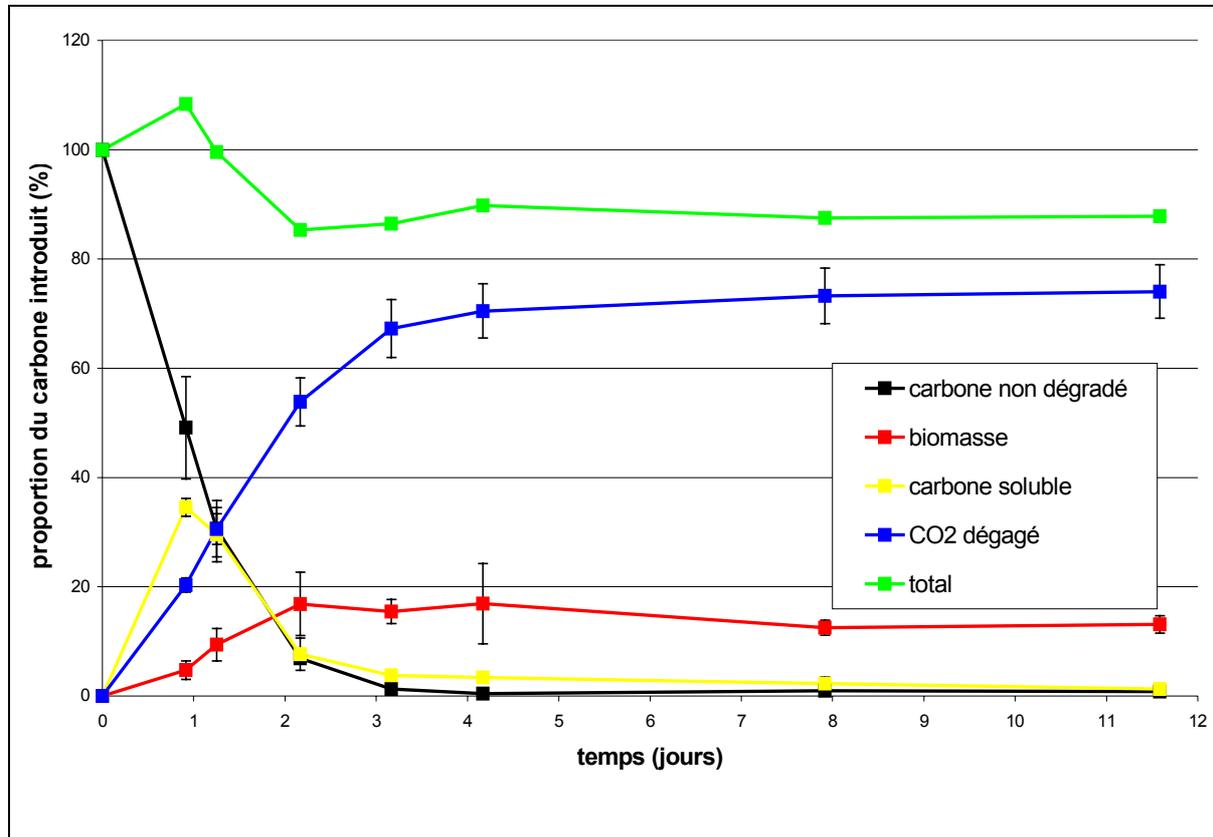


Figure 27 : Evolution du bilan carbone pendant la biodégradation de l'amidon dans la vermiculite activée avec la dose 1/2 (La courbe verte est le total des moyennes des quatre autres).

Sur la courbe verte de la figure 26, on peut voir que le bilan n'est pas exactement égal à 100% comme cela est prévu théoriquement. Il est possible qu'une faible quantité de carbone de la dose d'activation restant dans le milieu est provoqué un total supérieur à 100% pour le bilan carbone effectué sur le premier prélèvement. Dans les prélèvements suivants, comme l'amidon disparaît très rapidement, il est possible que les mesures effectuées avec le kit de dosage de l'amidon soient à la limite de détection de la méthode utilisée. De même les proportions de carbone mesurées par analyse élémentaire en fin de test sont très faibles et sans doute la aussi assez proches des limites de l'appareillage. Néanmoins, la dérive entre le bilan

théorique (100%) et les résultats obtenus par notre méthode d'estimation n'excède jamais 15%.

IV> CONCLUSION

Nous avons utilisé l'amidon comme polymère modèle pour la mise au point d'un premier milieu solide inerte pour l'étude de la biodégradation des polymères dans le compost. Plusieurs milieux solides inertes ont été testés avec des phases d'activation et des volumes d'inoculum différents. Le profil des courbes de minéralisation a mis en évidence une minéralisation rapide de l'amidon dans les milieux activés. Le rôle exacte de la phase d'activation est encore mal connu et il est difficile de déterminer la composition microbienne (d'un point de vue quantitatif et qualitatif) du milieu solide inerte activé. On peut néanmoins affirmer que la phase d'activation permet d'obtenir un milieu de dégradation uniformément colonisé par la flore microbienne permettant ainsi d'avoir une minéralisation rapide et immédiate du substrat test.

Un premier bilan carbone de la dégradation de l'amidon dans un milieu solide inerte simulant le compost a été établi en quantifiant directement chaque terme du bilan carbone. Bien que le total du carbone recouvré dans le milieu ne soit pas exactement égal à 100%, la précision est néanmoins satisfaisante et permet d'observer le déroulement de la biodégradation de l'amidon dans le compost. Les longues chaînes d'amidon sont d'abord rapidement et massivement hydrolysées en chaînes plus courtes solubles qui sont ensuite métabolisées par les micro-organismes. Au bout d'environ 8 jours la phase plateau (signifiant l'arrêt de la minéralisation) est atteinte et tout l'amidon introduit a été assimilé par le milieu.

Ces premiers tests avec l'amidon nous ont permis de mettre en évidence l'intérêt des milieux solides inertes vis à vis de l'étude et l'estimation de la biodégradation des polymères d'une part, et d'autre part de sélectionner un premier type de milieu avec lequel nous pourrions étudier la biodégradation de polymères biodégradables synthétiques.

La suite de nos travaux portera donc sur l'application des méthodes mises au point avec l'amidon à la simulation et l'étude de la biodégradation de polymères biodégradables commerciaux. Le caractère inerte de la vermiculite doit nous permettre d'améliorer les possibilités d'investigation du processus de biodégradation par le suivi des propriétés physico-chimiques du matériau résiduel dans le milieu.

Partie C : Application à l'étude de la biodégradation des polymères

Chapitre I : Biodégradation du poly(acide lactique)

I> INTRODUCTION

L'étude de la biodégradation de l'amidon nous a permis de mettre en évidence les possibilités offertes par les milieux solides inertes pour ce type de travaux. Nous allons donc essayer d'appliquer les résultats obtenus avec l'amidon à l'étude de la biodégradation de polymères synthétiques commerciaux dits « biodégradables ». Le poly(acide lactique) est le polymère synthétique qui est le plus susceptible d'être utilisé à grande échelle. Notamment parce que son procédé de fabrication a été améliorée et que le monomère constitutif, l'acide lactique, peut être obtenu par fermentation à partir de polysaccharides. Ces avancées ont permis d'abaisser le coût de production de manière significative et ainsi de commencer à pouvoir concurrencer les polymères classiques issus des ressources pétrolières et non biodégradables.

II> MATERIEL ET METHODES

II.1 Poly (acide lactique)

Le PLA, que nous avons utilisé, a été obtenu chez Cargill Dow sous la forme de granules et est composé à environ 94 % d'unité L. Avant d'être utilisé pour nos tests de biodégradation, les granules ont été broyées en poudre avec un broyeur à rotor (Retsch ZM 1000). Après avoir été passées dans l'azote liquide, les granules ont été broyées une première fois avec une grille de 1 mm puis, après un deuxième passage dans l'azote liquide, une grille de 0,5 mm.

Comme indiqué précédemment (§ II.3.2), la minéralisation du PLA en milieu naturel est particulièrement dépendante du format sous lequel il est dégradé, c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier la biodégradation avec du PLA sous forme de poudre plutôt que des films pour avoir une surface de contact spécifique polymère/compost qui soit la plus importante possible et ainsi un dégagement de CO₂ plus important. Le choix de la poudre est également dû à la volonté d'établir un bilan carbone. Il est donc important que les prélèvements effectués dans le milieu de dégradation soient les plus homogènes possibles. Le PLA sous forme de poudre sera réparti uniformément dans le milieu sous l'effet d'une agitation régulière.

Les tests de biodégradation ont été effectués avec le même équipement que pour les tests avec l'amidon. La masse de carbone introduite dans chaque réacteur est la même, 7,7 g.

La proportion de carbone dans le PLA déterminée par analyse élémentaire étant de 49,87%, on introduit donc 15,5 g de PLA dans un réacteur pour un test.

II.2 Méthodes Chromatographiques

II.2.1 Chromatographie liquide haute pression

Dans le protocole 2, nous avons utilisé la CLHP pour quantifier l'acide lactique libéré par le PLA résiduel dans le milieu après hydrolyse dans la soude en excès. Les analyses ont été effectuées au Laboratoire de Microbiologie Industrielle (LMI) sur une colonne Bio-Rad Aminex HP 87 H thermostatée à 40°C. L'appareil est constitué de deux pompes et d'un détecteur UV-visible Beckman. La phase mobile est de l'acide Sulfurique à 5 % (270 ml dans 1 l d'eau ultra-pure). La longueur d'onde de détection est 210 nm, le volume d'injection de 20 µl et le débit de 0,6ml/min.

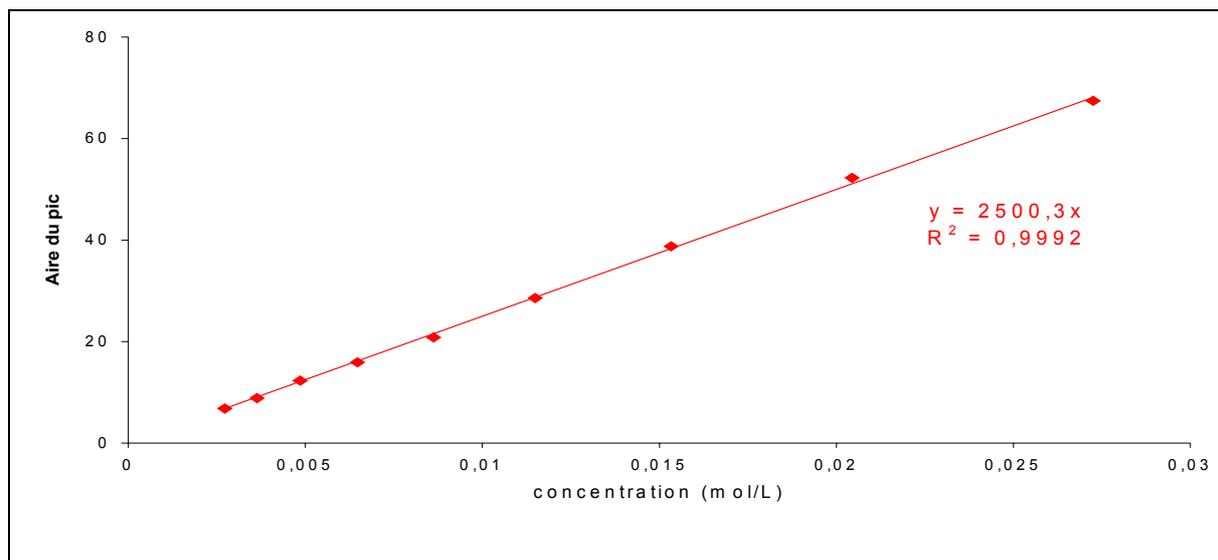


Figure 28 : courbe d'étalonnage pour l'acide lactique sur la colonne Bio-rad Aminex HP 87 H

Dans les conditions d'analyse, le temps de rétention de l'acide lactique est d'environ 14 minutes. La colonne a été étalonnée avec des solutions de concentrations connues préparées à partir de lactate de sodium pure (Sigma-Aldrich, figure 28).

II.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique

Les analyses visant à observer l'évolution de la masse molaire du PLA résiduel dans le milieu de dégradation ont été effectuées au Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels du CNRS à Montpellier.

Les échantillons de PLA extraits du milieu ont été dissous dans du THF à une concentration approximative de 10 g/l puis filtré sur membrane de porosité 0,2µm. Ces solutions ont été ensuite injectées sur une ligne CLHP/SEC composé de pompes Waters et d'un réfractomètre différentiel comme système de détection. La colonne (PL Gel 5µ mixed C, 60 cm, Polymer laboratories), a été précédemment étalonnée avec des échantillons standards de polystyrènes de masse molaire connue. Le débit est fixé à 1ml/min et le volume de la boucle d'injection est de 50µl.

II.2.3 Electrophorèse capillaire de zone (CZE)

Dans le protocole 3, Nous avons remplacé les analyses CLHP du protocole 2 par l'électrophorèse capillaire de zone pour déterminer la quantité de PLA résiduel dans le milieu. Les analyses ont été réalisées sur un appareil Beckman P/ACE 5000 avec un système de détection UV indirecte (longueur d'onde : 254 nm) suivant la méthode utilisé au laboratoire (Braud, 2004).

Avant chaque injection, les hydrolysats de PLA dans la soude sont filtrés sur membrane de porosité 0,2µm. Puis 20µL sont mélangés avec 380µl d'une solution de cholate de sodium. L'anion cholate servira d'étalon interne. Une goutte de ce mélange est placé dans une cupule pour être injectée à la cathode qui trempe dans une solution tampon d'anisate à pH 8,4. La tension appliquée est 25000 Volts.

Le système est étalonné avec une solution d'acide lactique de concentration connue préparée à partir de lactate de sodium en poudre (Sigma-Aldrich).

Pour chaque chromatogramme on détermine, grâce à une palette graphique, l'air du pic obtenu pour l'acide lactique et pour l'anion cholate.

Pour la solution étalon on a :

$$[\text{étalon}]/[\text{cholate}] = \text{aire}_{\text{étalon}}/\text{aire}_{\text{cholate}} = R_1$$

$$\text{d'ou : [cholate]} = [\text{étalon}] / R_1 \quad (1)$$

Pour une solution inconnue on a :

$$[\text{ac.lactique}] / [\text{cholate}] = \text{aire}_{\text{ac.lactique}} / \text{aire}_{\text{cholate}} = R_2$$

$$\text{d'où : } [\text{ac.lactique}] = R_2 \times [\text{cholate}]$$

$$\text{avec (1) on a : } [\text{ac.lactique}] = [\text{étalon}] \times R_2 / R_1$$

où R_1 et R_2 sont les rapports des aires obtenues après intégration.

Dans le cas où les hydrolysats ont un pH trop élevé, on les dilue de moitié avec une solution de tampon phosphate puis on prélève 20 μ l de cette solution qu'on mélange avec 380 μ l de cholate.

II.3 Analyse enthalpique différentielle (DSC)

Le calorimètre utilisé est un M-DSC de TA-instruments (USA). Environ 12 mg de matière ont été utilisées pour chaque échantillon. Les creusets hermétiques permettent d'éviter la vaporisation de l'eau. Pour déterminer la température de transition vitreuse du PLA au cours de la biodégradation, nous avons utilisé le programme suivant : les creusets sont équilibrés pendant 3 minutes à 0°C puis chauffés à une vitesse de 10°C/min jusqu'à 180°C où ils sont stabilisés pendant 2 minutes. Ils sont ensuite refroidis jusqu'à 0°C à 20°C/min, température à laquelle ils sont maintenus pendant 5 minutes. Pour finir le creuset est porté à 200°C à 10°C/min et enfin refroidi à température ambiante. La température de transition vitreuse est déterminée lors du passage par la méthode des tangentes. Le premier passage sert à éliminer l'histoire thermique de l'échantillon.

II.4 Protocole de test et de bilan carbone

II.4.1 Protocole 1

- Mise en place et prélèvements :

Les conditions du test de biodégradation sont données dans le tableau 12.

Test	PLA (g)	Dose d'activation	Durée activation	Extrait de compost (ml)	Vermiculite (g)	Solution minérale (ml)
Protocole 1	15,5	Dose 1	1 jours	15	180	410

Tableau 12 : conditions du test de biodégradation lors pour l'utilisation du protocole 1

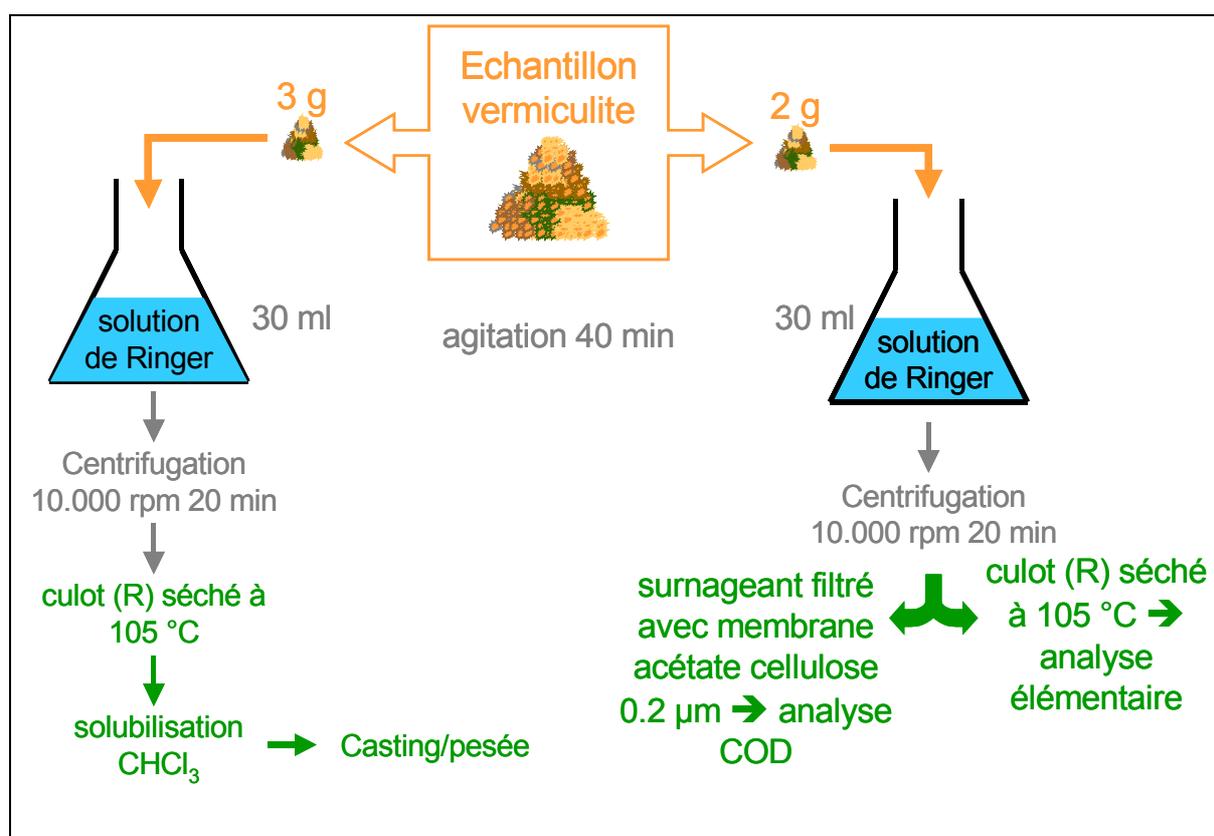


Figure 29 : protocole 1 d'extraction et de quantification du carbone pour la biodégradation du PLA

Nous avons effectué 7 prélèvements au cours du test de biodégradation et la masse total des prélèvements ne dépasse pas 10 % du poids total du milieu. Chaque prélèvement pèse environ 8 g (milieu humide) et est stocké à -20°C pour éviter une quelconque évolution en attendant d'être traité.

- Protocole d'extraction (Figure 29) :

A partir d'un prélèvement stocké à -20°C (Figure 29), deux grammes de milieu congelé sont placés à l'étuve jusqu'à obtention d'un poids constant pour connaître la masse sèche de l'échantillon. L'échantillon sec est ensuite placé sous agitation pendant 40 minutes dans 30 ml de solution de Ringer. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant est filtré pour quantification du carbone organique dissous. Le culot (R) est séché à 105°C jusqu'à obtention d'une masse constante et réduit en poudre avec un broyeur de paille à couteaux. Il est ensuite soumis à l'analyse élémentaire pour déterminer la proportion de carbone qu'il contient.

Trois grammes de milieu congelé supplémentaires du même prélèvement sont également placés à l'étuve pour détermination de la masse sèche. Comme précédemment, le milieu sec est placé dans 30 ml de solution de Ringer et soumis au même traitement. Le culot est de nouveau séché à 105°C puis placé dans un volume suffisant de CHCl_3 pendant 10 minutes afin de solubiliser le PLA non dégradé contenu dans le culot de centrifugation. Le chloroforme est un excellent solvant du PLA mais nous avons vérifié que ce temps était suffisant pour solubiliser la masse théorique maximale de PLA qu'il est possible de recouvrir dans le prélèvement dans le cas où il n'est pas dégradé. Après filtration sous vide sur membrane hydrophobe de porosité $0.2\mu\text{m}$, le filtrat est placé dans une boîte de Pétri préalablement tarée. Après évaporation complète du solvant, la boîte de Pétri est pesée pour obtenir la masse du film de PLA.

- Calcul du bilan carbone :

Comme pour l'amidon le bilan carbone de la biodégradation du PLA peut s'établir comme suit (§ VII.3.3):

$$C_{\text{polymer}} = C_b + C_g + C_d + C_{\text{nd}}$$

- C_g est toujours donné par l'analyseur infrarouge du système de mesure automatisé
- C_d , la quantité de carbone du PLA transformé en composés solubles dans l'eau est obtenue par l'analyse du carbone organique dissous de la solution de Ringer après l'homogénéisation de l'échantillon pendant 40 minutes (la concentration obtenue pour chaque échantillon est minorée de la concentration de carbone organique dissous de la solution de Ringer pure).
- C_{nd} , la quantité de carbone contenue dans le PLA qui n'est pas encore dégradé est obtenue par la pesée des boîtes de Pétri après casting. La proportion de carbone dans le PLA est de 49,87%.
- C_b : L'analyse élémentaire du culot R donne la proportion de carbone. La vermiculite seule n'en contenant pas, le carbone présent a pour origine la biomasse formée pendant le test et le PLA non dégradé. Les sous-produit de dégradation solubles ont été éliminés dans le surnageant après la centrifugation (cf. Figure 29).

Les valeurs obtenues pour les échantillons issus des prélèvements ont été rapportées à la masse sèche totale du milieu au moment du prélèvement. Les masses sèches totales corrigées (voir § VII.3.3) sont données dans le tableau 13.

Date (jours)	Réacteur 1 (g)	Réacteur 2 (g)	Réacteur 3 (g)
0	175,82	175,86	175,85
7,1	190,89	190,98	190,93
14,1	190,65	190,75	190,86
20,7	190,03	190,12	190,09
27,5	189,03	189,08	189,12
34,4	187,75	187,68	187,90
45	186,72	187,01	186,89

Tableau 13 : Evolution de la masse sèche corrigée du milieu en fonction du taux de minéralisation pour chaque réacteur, protocole 1.

II.4.2 Protocole 2

- Mise en place et prélèvements :

Les conditions du test de biodégradation sont données dans le tableau 14.

Test	PLA (g)	Dose d'activation	Durée activation	Extrait de compost (ml)	Vermiculite (g)	Solution minéral (ml)
Protocole 2	15,5	Dose 1	3 jours	15	180	410

Tableau 14 : Conditions du test de biodégradation lors pour l'utilisation du protocole 2

Nous avons effectué 6 prélèvements au cours du test de biodégradation et la masse totale des prélèvements ne dépasse pas 10 % du poids total du milieu. Chaque prélèvement pèse environ 12 g (milieu humide) et est stocké à -20°C pour éviter une quelconque évolution en attendant d'être traité.

- Protocole d'extraction :

La première partie du protocole d'extraction 2 (cf. Figure 30) qui consiste à déterminer le carbone organique dissous et l'analyse élémentaire du culot R reste inchangé par rapport au protocole 1 (voir § XI.4.1). La principale modification réside dans la quantification du PLA non dégradé. La méthode utilisée ici est destructive (hydrolyse du PLA dans la soude) et utilise la chromatographie liquide haute pression.

Nous avons vérifié préalablement que la quantité de soude utilisée est suffisante pour obtenir une hydrolyse totale du PLA. Une masse de PLA en poudre égale à la quantité théorique maximale qu'il est possible de recouvrir dans l'échantillon étudié, a été placée dans 40 ml de soude à 0,025 mol/l. Au bout de 48 heures, l'analyse de la solution par CLHP a montré que la totalité du PLA introduit était sous forme de lactate.

Trois grammes de prélèvement congelé sont placés à l'étuve à 105°C pendant 24 heures pour déterminer le poids sec de l'échantillon utilisé. L'échantillon est ensuite placé dans 40 ml de soude à 0,025 mol/l sous agitation dans une étuve à 70°C pendant 48 heures. Le PLA est particulièrement sensible à l'hydrolyse en milieu alcalin, cette étape a donc pour effet

de rompre les liaisons ester des longues chaînes de polymères et de libérer l'unité constitutive, l'acide lactique (sous forme de lactate de sodium).

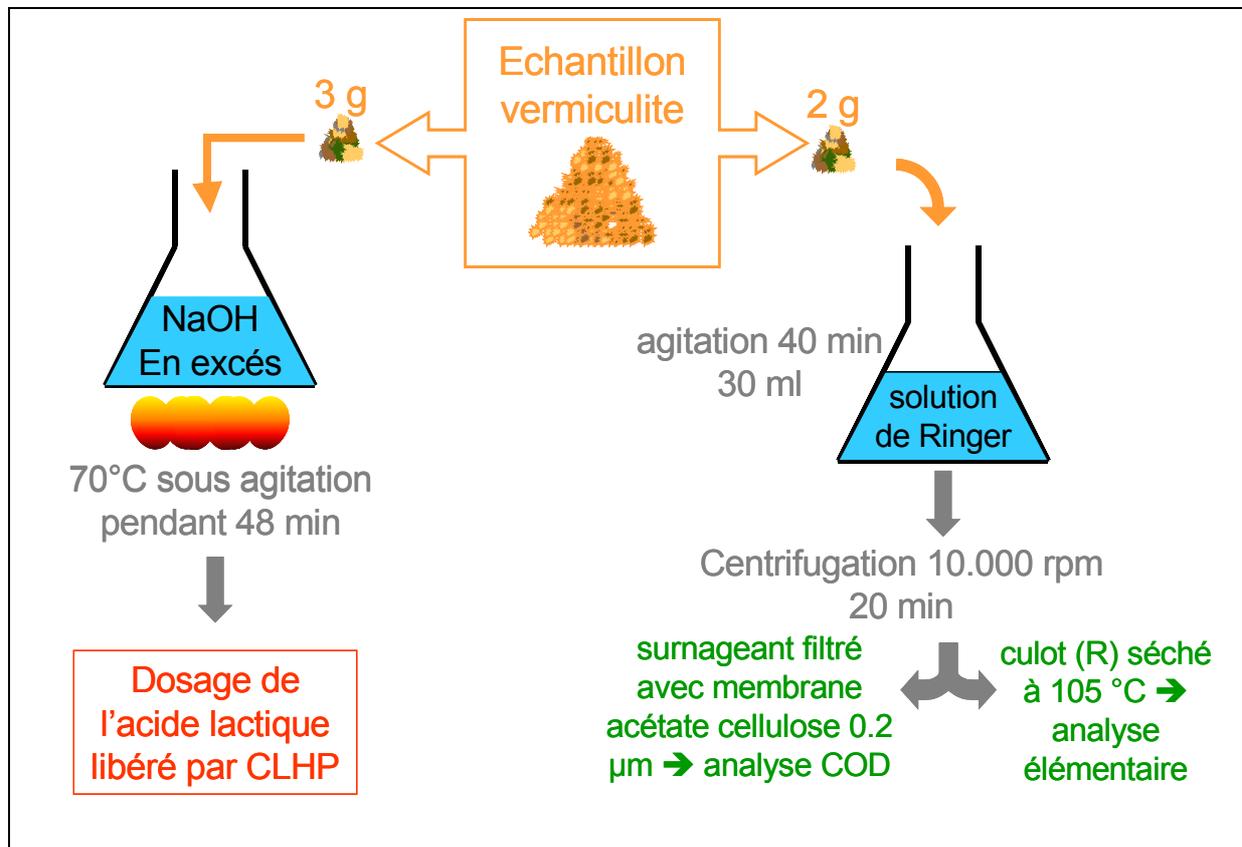


Figure 30 : Protocole 2 d'extraction et de quantification du carbone pour la biodégradation du PLA.

La solution contenant le lactate de sodium est ensuite filtrée sur membrane de porosité 0,2 µm avant d'être injectée en CLHP (voir XI.2.1). La concentration de lactate de l'hydrolysate est égale à la concentration d'unité constitutive libérée par le PLA non dégradé contenu dans l'échantillon. La masse molaire d'une unité constitutive est de 72 g/mol. La masse de PLA dans l'échantillon avant hydrolyse est alors obtenue par la formule suivante :

$$M_{\text{PLA}} = V_{\text{H}} \times [\text{lactate}] \times 72$$

Où V_{H} est le volume d'hydrolyse utilisé et $[\text{lactate}]$ la concentration en lactate de la solution déterminé par CLHP. On considère comme négligeable la contribution de la masse

des unités terminales des chaînes de polymère devant celle de la masse des unités constitutives.

- Calcul du bilan carbone :

D'après l'équation du bilan carbone de la biodégradation du PLA :

$$C_{\text{polymère}} = C_b + C_g + C_d + C_{\text{nd}}$$

- C_d et C_g sont toujours obtenus grâce à l'analyseur infrarouge et l'analyse de carbone organique dissous
- C_{nd} est obtenue grâce à l'analyse CLHP de la solution de soude après hydrolyse totale du PLA non dégradé dans l'échantillon et la proportion de carbone dans le PLA
- Comme pour le protocole 1, l'analyse élémentaire du culot R (voir figure 30) permet de calculer, grâce à la proportion de carbone et la masse du culot sec, la quantité de carbone dans le milieu sous forme de PLA non dégradé et de biomasse.
On a donc : $C_b = R - C_{\text{nd}}$

Date (jours)	Réacteur 1 (g)	Réacteur 2 (g)	Réacteur 3 (g)
0	175,97	175,96	175,88
9,8	191,10	191,1	190,96
17,4	190,93	190,86	190,74
25,1	190,57	190,52	190,33
38,4	190,17	190,15	189,86
45	189,89	189,83	189,57

Tableau 15 : Evolution de la masse sèche corrigée du milieu en fonction du taux de minéralisation pour chaque réacteur, protocole 2.

Les valeurs obtenues pour les échantillons issus des prélèvements ont été rapportées à la masse sèche totale du milieu au moment du prélèvement. Les masses sèches totales corrigées (voir § VII.3.3) sont données dans le tableau 15.

II.4.3 Protocole 3

- Mise en place et prélèvements :

Les conditions du test de biodégradation sont données dans le tableau 16.

Test	PLA (g)	Dose d'activation	Durée activation	Extrait de compost (ml)	Vermiculite (g)	Solution minérale (ml)
Protocole 3	15,5	Dose 1	7 jours	15	180	410

Tableau 16 : Conditions du test de biodégradation pour l'utilisation du protocole 3

Nous avons effectué 5 prélèvements au cours du test de biodégradation et la masse totale des prélèvements ne dépasse pas 10 % du poids total du milieu. Chaque prélèvement pèse environ 17 g (milieu humide) et est stocké à -20°C pour éviter une quelconque évolution en attendant d'être traité.

- Protocole d'extraction :

La déroulement de la première partie du protocole commune aux trois protocoles reste inchangé mais la masse de l'échantillon à partir de laquelle l'analyse est réalisée, passe de deux à quatre grammes de milieu congelé. La masse de milieu congelé utilisée pour l'hydrolyse du PLA non dégradé est également de quatre grammes (Figure 31).

L'étape de d'hydrolyse reste inchangée mais le lactate libéré est dosé par électrophorèse capillaire selon le protocole donné au paragraphe XI.2.3. Le calcul de la masse de PLA non dégradé dans le milieu utilise la même formule que pour le protocole 2 ou [lactate] est ici la concentration de lactate obtenue par l'analyse en électrophorèse capillaire après hydrolyse du PLA non dégradé contenu dans l'échantillon.

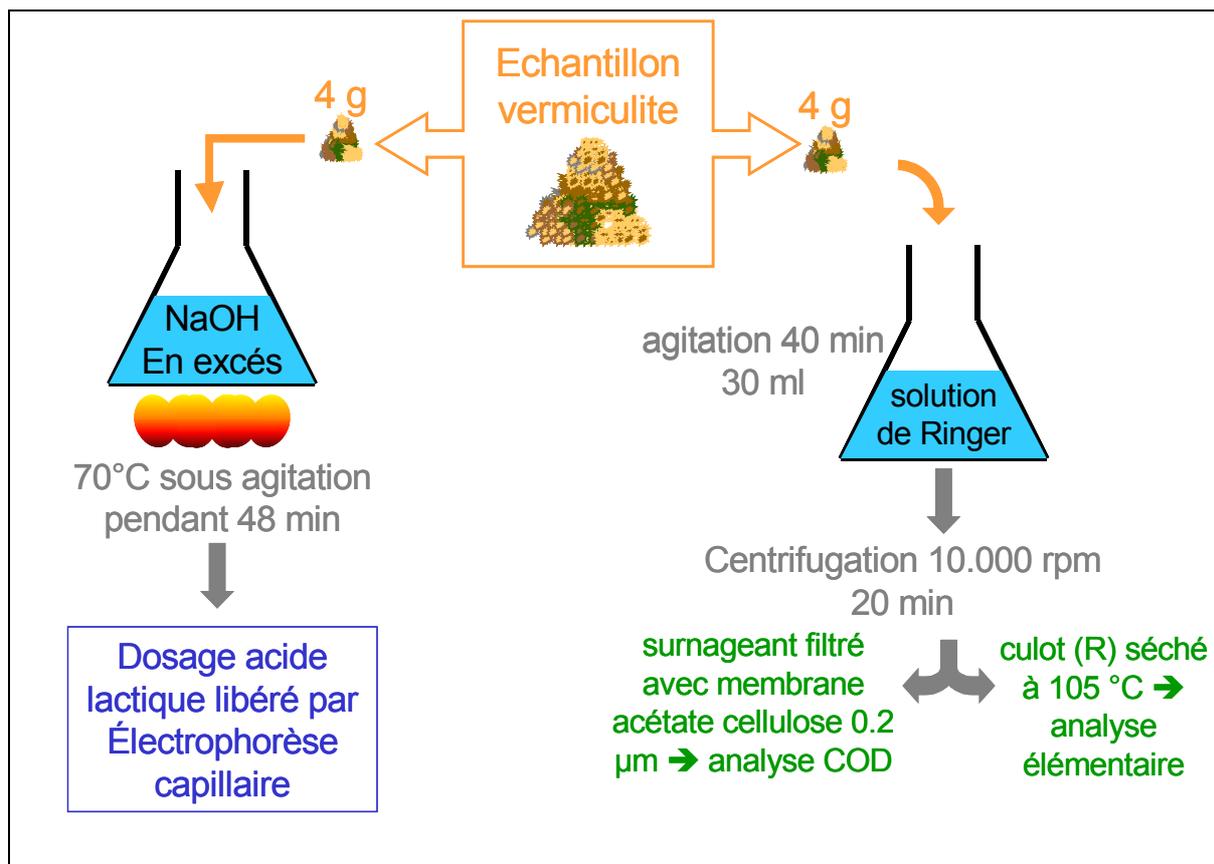


Figure 31 : Protocole 3 d'extraction et de quantification du carbone pour la biodégradation du PLA

- Calcul du bilan carbone :

Date (jours)	Réacteur 1 (g)	Réacteur 2 (g)	Réacteur 3 (g)
0	175,88	175,88	175,88
8,58	191,21	191,23	191,21
13,58	191,15	191,10	191,07
33	190,29	190,20	190,24
45	189,88	189,82	189,87

Tableau 17 : Evolution de la masse sèche corrigée du milieu en fonction du taux de minéralisation pour chaque réacteur, protocole 3.

Le calcul du bilan carbone s'effectue de la même manière que pour le protocole 2 (voir § VII.3.3) et les valeurs obtenues pour les échantillons sont ramenées à la masse sèche corrigée du milieu total au moment du prélèvement (cf. tableau 17).

II.5 extraction du PLA non dégradé pour les analyses physico-chimiques

Pour chaque prélèvements effectués, nous avons réalisé une extraction du PLA non dégradé par solubilisation dans le chloroforme après séparation des composés solubles dans l'eau. Si cette méthode ne nous a pas permis d'extraire quantitativement le PLA lors du protocole 1, on peut néanmoins réaliser divers analyses pour observer les propriétés du PLA dans le milieu au moment du prélèvement.

A partir d'environ 4 grammes de prélèvement congelés, les composés solubles dans l'eau ont été extraits par homogénéisation dans 30 ml d'eau distillée pendant 40 minutes. Après filtration sur membrane acétate de cellulose de porosité 0,2 μm , le rétentat est placé à l'étuve à 60°C et pesé régulièrement jusqu'à l'obtention d'une masse stable, de manière à éliminer toute trace d'eau. Le rétentat sec est ensuite placé dans 30 ml de chloroforme pendant 10 minutes pour solubiliser le PLA non dégradé. Après centrifugation à 10000 tour/min pendant 20 minutes, le surnageant est placé dans un seringue et filtré sur membrane teflon à 0,2 μm (Millipore, USA) dans une boîte de Pétri pour casting.

III> RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Minéralisation du PLA

III.1.1 Dans le compost

La minéralisation du PLA dans le compost (Figure 32) démarre pratiquement instantanément dès les premiers jours du test. On observe cependant une phase de ralentissement entre les jours 5 et 10. Au bout de 45 jours la courbe de minéralisation arrive à la fin d'une phase de ralentissement pour atteindre un taux de minéralisation final de 85%. Le même profil de courbe est obtenu pour la minéralisation du PLLA en poudre dans le compost (Yang et coll., 2005).

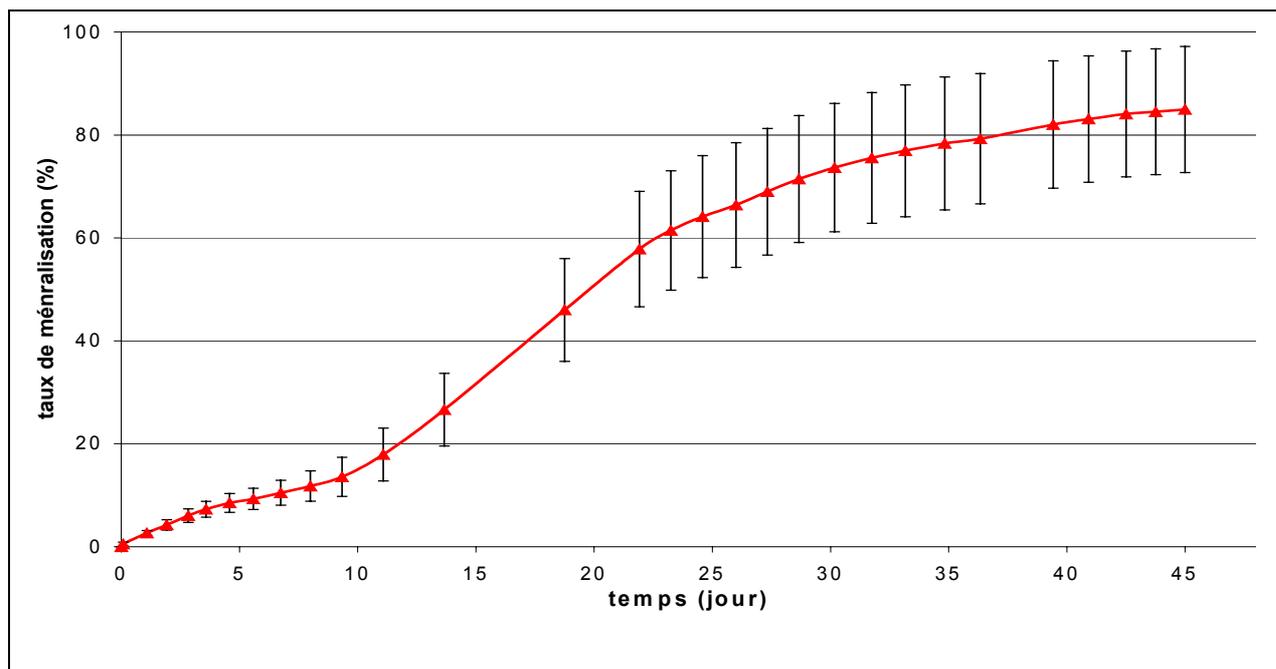


Figure 32 : Courbe de minéralisation du PLA dans le compost. Résultats obtenus pour trois répétitions.

La première phase très courte de minéralisation qui va jusqu'au cinquième jour peut être le résultat de la minéralisation de quelques résidus de chaînes courtes de PLA qui sont immédiatement disponible pour les micro-organismes du milieu. Ensuite la phase ralentissement, ou le dégagement de CO₂ est beaucoup moins intense (cf. Figure 33, entre les jours 5 et 10), peut correspondre à une période où le PLA n'est pas encore suffisamment hydrolysé par les phénomènes abiotiques pour que les micro-organismes puissent le dégrader. L'activité de minéralisation reprendrait donc au dixième jour après hydrolyse chimique des longues chaînes de PLA.

Les écart-types obtenues sur les trois répétitions augmentent au fur et à mesure du test pour atteindre une valeur maximale en fin de test proche des 13%. Ces écart-types peuvent paraître élevés mais sont néanmoins caractéristiques de la dégradation d'un polymère dans le compost. Farrel et ses collaborateurs (2001), obtiennent par exemple des écart-types pouvant aller jusqu'à 15% pour la dégradation de divers polymères biodégradables sous forme de films dans des conditions similaires.

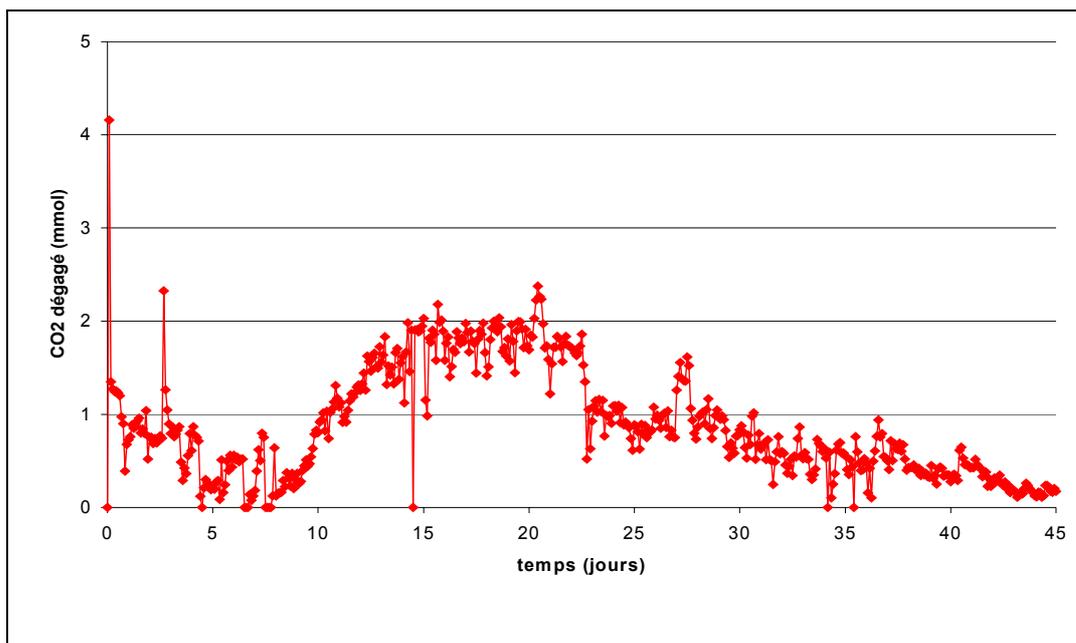


Figure 33 : Production de dioxyde de carbone instantanée pendant la biodégradation du PLA dans le compost (valeurs obtenues pour un réacteur).

Les taux de minéralisation de la littérature pour des tests similaires sont du même ordre de grandeur que ceux que nous obtenons : 75 % pour des fragments de film de PLA ecoPLA dans un compost d'unité de compostage industrielle de déchets ménagers (Farrel et coll., 2001), environ 55 % pour du PLLA en poudre dans un compost ménager également (Yang et coll., 2005). Dans ce dernier cas, le taux de minéralisation est sensiblement plus bas, mais le poly(acide lactique) utilisé est composé uniquement de L-acide lactique, le polymère qui en résulte est pratiquement 100% cristallin et par conséquent plus résistant aux hydrolyses chimiques due à l'absorption d'eau dans la matrice du polymère. Ces hydrolyses s'opérant préférentiellement dans les régions amorphes du polymère, le caractère cristallin du PLLA peut sans doute expliquer un taux de minéralisation plus bas malgré des conditions de test similaires.

III.1.2 En milieu solide inerte

D'après les résultats obtenus avec l'amidon, nous avons choisi d'utiliser un milieu solide inerte activé pour étudier la biodégradation du PLA dans le compost. Le PLA étant bien évidemment moins sensible que l'amidon aux attaques microbiennes, il ne nous a pas semblé opportun de tester un milieu solide inerte non activé pour un polymère synthétique.

Nous avons observé l'effet de deux doses d'activation différentes, la dose $\frac{1}{2}$ et la dose 1. L'activation avec la dose $\frac{1}{2}$ avait été satisfaisante quand à la simulation de la biodégradation de l'amidon dans le compost, mais un apport carboné (dose 1) plus important peut probablement permettre un activité microbienne plus importante.

Test	PLA (g)	Dose d'activation	Durée activation	Extrait de compost (ml)	Vermiculite (g)	Solution minérale (ml)
1	15,5	Dose 1/2	1 jour	15	180	410
2	15,5	Dose 1	1 jour	15	180	410

Tableau 18 : Composition des réacteurs pour les tests de biodégradation du PLA

Sachant que la biodégradation du PLA s'effectue en deux étapes, nous avons également raccourci la phase d'activation à 1 jour pour garder une réserve, même faible, de substrat carboné pour les premiers jours de test. Ainsi les micro-organismes, au cours de la phase d'hydrolyse chimique du PLA durant laquelle il n'y a pas ou peu de substrats disponibles, auront de quoi maintenir une flore microbienne suffisamment importante.

Les conditions de test sont les mêmes que pour les tests de biodégradation de l'amidon avec les doses d'activation $\frac{1}{2}$ et 1 (cf. tableau 18). Les courbes de minéralisation obtenues pour les deux doses sont présentées sur la figure 34.

Les taux de minéralisation finaux obtenus avec les doses $\frac{1}{2}$ et 1 sont respectivement de 44 et 58 %. On peut noter que les écart-types sont beaucoup plus faibles et donc que la reproductibilité des résultats est bien meilleure pour les milieux solides inertes (particulièrement dans la cas du milieu activé avec la dose 1), ce qui est un des intérêts de l'utilisation de ce type de milieu, l'apport du compost étant restreint aux 15 ml de lexiviat utilisés pour l'inoculum des milieux solides inertes (la même lexiviat étant utilisé pour les trois répétitions d'un test). Cela permet ainsi de minimiser l'influence de l'hétérogénéité du compost d'un lot à l'autre, la composition de celui-ci étant susceptible de varier en fonction du type de déchets qui alimentent l'unité de compostage.

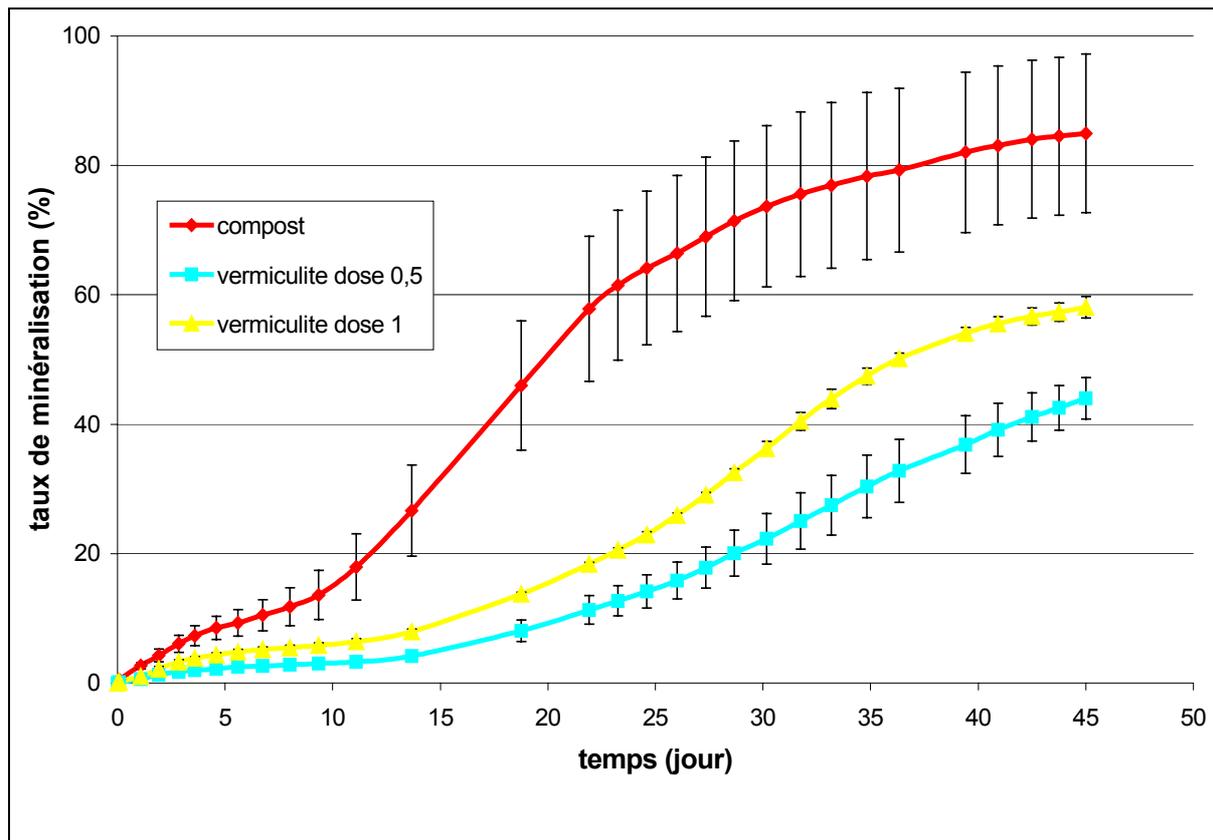


Figure 34 : Courbe de minéralisation du PLA dans des deux milieux solides inertes activés et dans le compost (les valeurs sont la moyenne de trois répétitions).

La courbe de minéralisation de la dose 1 (courbe jaune) semble atteindre un début de phase plateau avec le début d'une phase de ralentissement à partir du jour 35, alors que pour la dose $\frac{1}{2}$, la courbe de minéralisation semble être encore dans une phase linéaire.

Les profils des courbes de minéralisation du PLA dans les milieux solides inertes et dans le compost sont similaires mais la principale différence réside dans la durée de la phase de ralentissement qui est beaucoup plus longue dans le cas des milieux solides inertes (environ jusqu'au jour 15 au lieu du jour 10 pour le compost).

Nous avons vérifié que cette phase de ralentissement plus longue que dans le compost n'était pas due au fait que l'activation provoquerait une variation de pH trop importante. Le compost est un milieu naturellement tamponné grâce à la présence de nombreuses espèces chimiques organiques et minérales. L'incorporation de PLA n'a donc pas d'influence sur l'évolution du pH du compost dans lequel il est dégradé (itävaara et coll., 2002) même si certains auteurs ont montré qu'au delà d'une proportion de 30% de PLA (en masse) on pouvait observer une baisse de pH après quatre semaines de compostage (Ghorpade et coll.,

2001). Les proportions de PLA que nous utilisons sont très éloignées de ces valeurs, il n'y a donc pas de raison pour que le pH du compost varie pendant nos tests. Pour les milieux solides inertes, la solution minérale inerte que nous utilisons pour apporter les sels minéraux nécessaire à la croissance des micro-organismes est tamponnée à un pH de 7,2. Cependant nous avons souhaité vérifier que le pouvoir tampon de la solution était suffisant pour que le milieu, en fin de phase d'activation n'ai pas un pH susceptible de gêner la minéralisation du polymère test et donc de provoquer une phase de ralentissement plus longue comme observée sur les courbes de minéralisation.

- Suivi de l'évolution du pH pendant la phase d'activation en fonction de l'origine et de la source d'azote

Nous avons donc suivi l'évolution du pH pendant la phase d'activation. Dans le but d'optimiser la composition de notre dose d'activation, nous avons également fait varier le rapport C/N de la dose en modifiant la composition qualitative et quantitative de la source d'azote.

Expérience	Proportion d'azote du sulfate d'ammonium	Proportion d'azote de l'urée	Masse d'urée dans le dose d'activation (mg)	Masse de sulfate d'ammonium pour 410 ml de solution minérale (mg)
Rapport C/N 12				
Test 1	65	35	23	93
Test 2	85	15	10	121
Test 3	90	10	7	129
Test 4	95	5	3	136
Rapport C/N 8				
Test 5	65	35	70	288
Test 6	85	15	30	377
Test 7	90	10	20	399
Test 8	95	5	10	421
Rapport C/N 2				
Test 9	65	35	400	1643
Test 10	85	15	171	2143
Test 11	90	10	114	2269
Test 12	95	5	57	2395

Tableau 19 : Origine de l'azote présente dans le milieu en fonction des différents rapport C/N.

Les deux principales sources d'azote pour les micro-organismes sont le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) contenu dans la solution minérale (source minérale) et l'urée qui est introduite dans la dose d'activation (source organique). La bouillon de culture utilisé pour la dose d'activation contient également de l'azote dans un moindre mesure (15% de l'azote total introduit). La pouvoir tampon de la solution minérale est assuré par le couple HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻ amené respectivement par Na₂HPO₄, 2H₂O et KH₂PO₄.

La quantité d'azote contenue dans l'urée a été modifiée directement en variant la masse d'urée de la dose d'activation et l'azote minérale issu du sulfate d'ammonium été modifié en variant la masse introduite dans la solution minérale dont la composition est donnée dans le tableau 4. Nous avons donc testé trois rapports C/N différents dont la composition en azote issue de l'urée varie de 5 à 35 %. Les compositions exactes sont données dans le tableau 19.

La composition (vermiculite, volume de solution minérale et d'inoculum ...) de chaque réacteur est toujours la même et l'activation est réalisée avec la dose 1. La détermination du pH a été réalisée en prélevant 5 grammes de milieu qui sont placés sous agitation dans 250 ml d'eau distillé pendant 5 minutes. Le pH est relevé à l'aide d'une sonde après stabilisation de l'affichage.

D'après le courbe obtenues (figure 35), le pH reste relativement stable pendant le déroulement de la phase d'activation quelque soit le rapport C/N ou la proportion d'azote de l'urée utilisée. La valeur du pH oscille entre des valeurs allant de 7,1 à 7,8 et l'écart maximal entre le pH de début et de fin de test pour un test est de 0,4 (cf. tableau 19). Ces courbes ne permettent donc pas de mettre en évidence des écarts de pH susceptible de gêner la croissance microbienne et donc d'être responsable de la phase de ralentissement observée sur les courbes de minéralisation pendant le test de biodégradation (Figure 34).

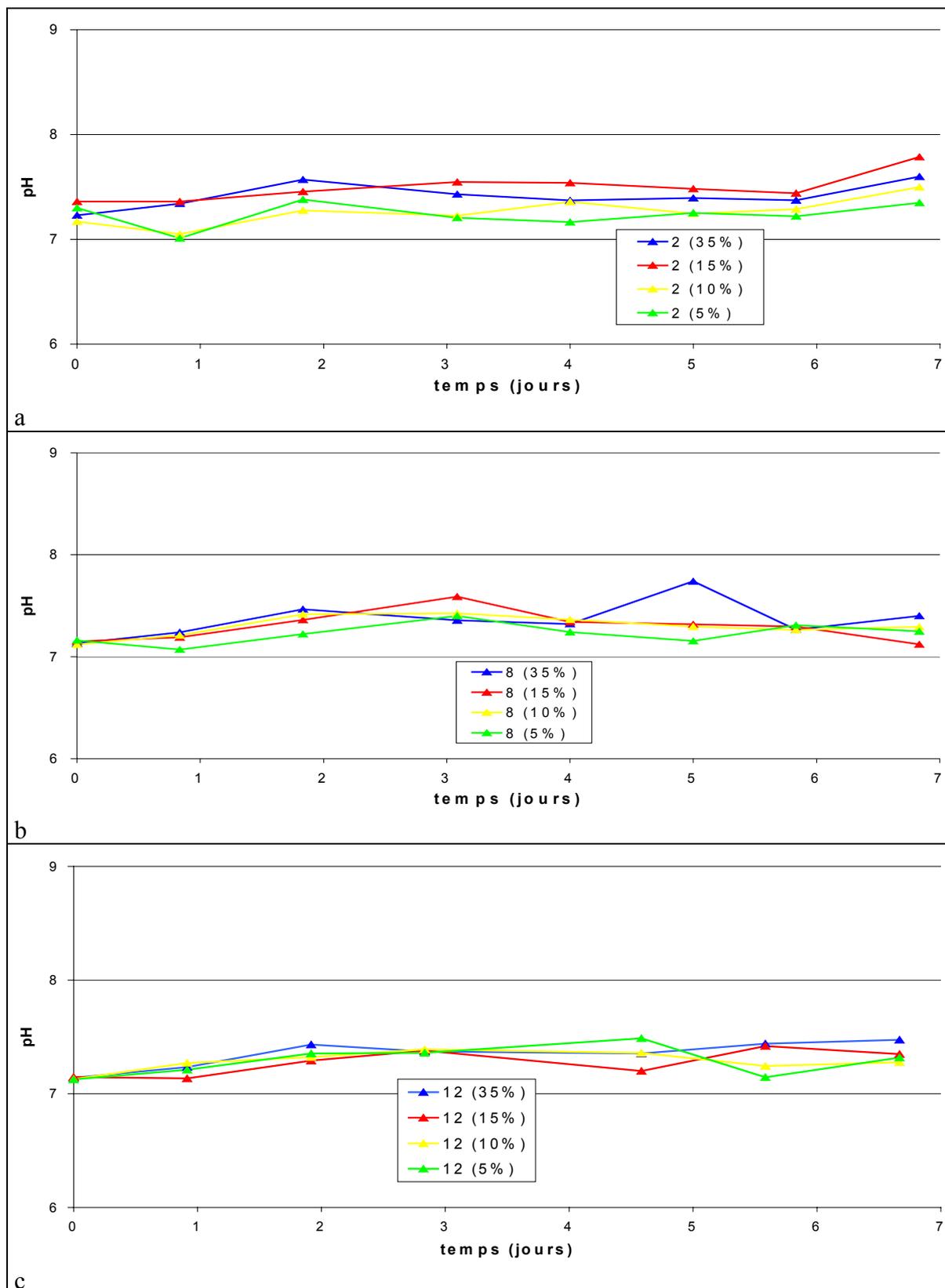


Figure 35 : Evolution du pH au cours de la phase d'activation pour les différents rapports C/N et proportions d'azote de l'urée et du sulfate d'ammonium (le premier chiffre indique le rapport C/N utilisé et celui entre parenthèses la proportion d'azote de l'urée).

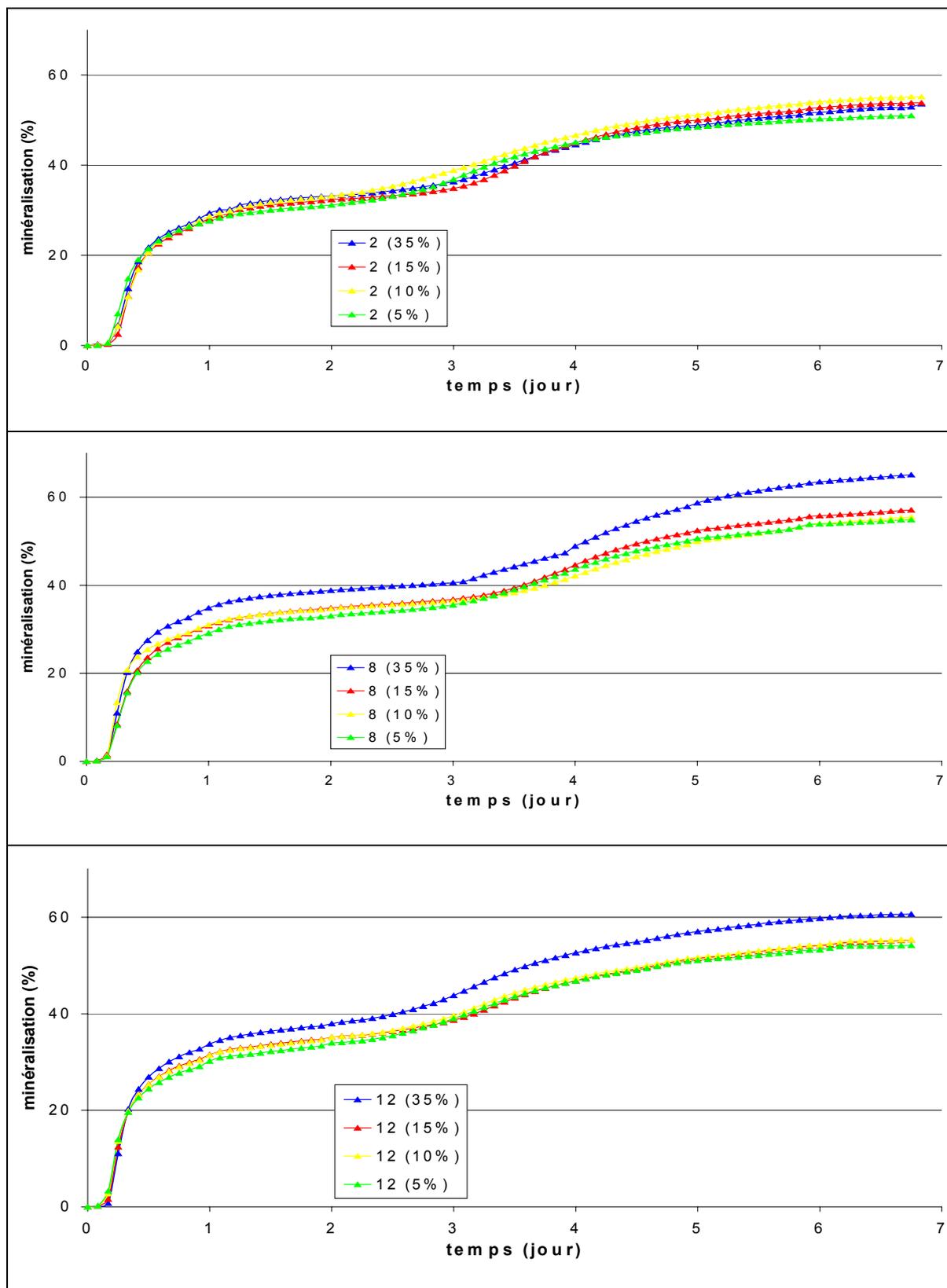


Figure 36 : Minéralisation de la dose d'activation 1 pour les différents rapports C/N et proportions d'azote de l'urée et du sulfate d'ammonium (le premier chiffre indique le rapport C/N utilisé et celui entre parenthèses la proportion d'azote de l'urée).

Expérience (% azote urée)	PH début de test	PH fin de test	Taux de minéralisation après 7 jours (%)
C/N = 2			
35	7,2	7,6	54
15	7,4	7,8	54
10	7,2	7,5	55
5	7,3	7,3	51
C/N = 8			
35	7,1	7,4	65
15	7,2	7,1	57
10	7,1	7,3	55
5	7,2	7,2	55
C/N = 12			
35	7,1	7,5	61
15	7,1	7,3	55
10	7,1	7,3	55
5	7,1	7,3	54

Tableau 20 : pH en début et fin de phase d'activation et taux de minéralisation.

Nous avons laissé les activations se dérouler jusqu'à 7 jours alors que les tests de biodégradation du PLA sur lesquels nous avons observé cette phase de ralentissement ont été menés avec une phase d'activation d'un jour. On peut donc affirmer que le pouvoir tampon de la solution minérale utilisée pour les tests (cf. tableau 4) permet d'éviter un pH limitant au début du test de biodégradation (après la phase d'activation de 1 jour) mais également au moins pendant les 6 premiers jours de ce dernier. Nous pouvons également vérifier qu'une phase d'activation plus longue ne donne pas de pH limitant pour la flore microbienne.

Les profils des courbes de minéralisation de la dose d'activation sont également homogènes (cf. figure 36). Les taux de minéralisation les plus faibles sont généralement obtenus lorsque la proportion d'azote de l'urée est de 5 % et le taux de minéralisation le plus élevé est atteint pour un rapport C/N de 8 et une proportion d'azote de l'urée de 35% (cf. tableau 20). L'écart de taux de minéralisation entre les proportions d'azote que nous utilisons (test 9, cf. tableau 19) et ce taux plus élevé ne nous a pas semblé significatif compte tenu du fait que ces expériences n'ont été réalisées qu'en une seule répétition (nous avons observé couramment un écart-type de 5% sur le taux de minéralisation au bout de 7 jours d'activation). Par conséquent nous n'avons pas jugé utile de modifier la composition en urée et en sulfate d'ammonium pour les tests ultérieurs (0,4 g d'urée dans la dose d'activation et 1643 mg de sulfate d'ammonium dans 410 ml de solution minérale).

Pour l'établissement du bilan carbone du PLA en milieu solide inerte, nous avons donc choisi d'utiliser la dose d'activation 1 en raison d'une courbe de minéralisation plus proche de celle obtenue pour le biodégradation du PLA dans le compost.

III.2 Bilan carbone pour le biodégradation du PLA en milieu solide inerte activé

Le principal objectif de nos travaux est de tenter de mettre au point une méthode permettant d'établir ,à un moment donné d'un test de biodégradation du matériau, le bilan carbone de la biodégradation en milieu solide en quantifiant individuellement chaque terme du bilan carbone donné dans l'équation suivante :

$$C_{\text{polymère}} = C_b + C_g + C_d + C_{nd}$$

Nous avons vu dans l'étude bibliographique que cet objectif a déjà été atteint pour la dégradation d'un polymères en milieu liquide, la nature du milieu de dégradation permettant un séparation beaucoup plus aisée qu'en milieu solide. Le principal obstacle à l'établissement du bilan carbone pour la dégradation d'un polymère dans le compost était la nature même du compost, milieu particulièrement riche en matière carbonée d'origines diverses. C'est l'introduction très récente (Spitzer et coll., 1996) des milieux solides inertes pour les tests de biodégradation qui a permis d'envisager la réalisation de bilans carbone en milieu solide.

protocole	Durée de la phase d'activation (jour)	Masse des échantillons pour les analyses (g)	Mode de quantification du PLA
1	1	2 et 3	Solubilisation dans le CHCl ₃
2	3	2 et 3	Hydrolyse et CLHP
3	7	4	Hydrolyse et CZE

Tableau 21 : Récapitulatif des paramètres importants variant du protocole 1 à 3

La principale source de problème réside dans la séparation de la biomasse du polymère résiduel non dégradé dans le milieu. Si de rares bilans carbonés dans la vermiculite existe déjà dans la littérature, aucun n'est réalisé en calculant directement chaque terme du bilan mais

plutôt en calculant le terme C_{nd} ou C_b par différence avec le total du carbone introduit théoriquement égal à 100 %.

Nous avons donc testé trois protocoles différents visant tout d'abord à séparer les différents sous produits de biodégradation, biomasse, composés soluble et polymère non dégradé et ensuite à quantifier la proportion de carbone du polymère introduit présente dans chaque partie. Les principales différences et points importants variant d'un protocole à un autre sont détaillés au paragraphe XI.4 et précisés dans le tableau 21.

III.2.1 Taux de minéralisation et durée de la phase d'activation

On peut voir que les résultats obtenus présentent une répétabilité toujours satisfaisante avec des écart-types relativement faibles (figure 37). Cependant les taux de minéralisation en fin de test sont nettement plus faible (58 % pour le protocole 1 contre 22 et 20% respectivement pour les protocole 2 et 3) lors des tests de biodégradation ou nous avons appliqué les protocole 2 et 3 et donc des phases d'activation plus longues (cf. tableau 21), le même PLA ayant été utilisé pour les trois tests.

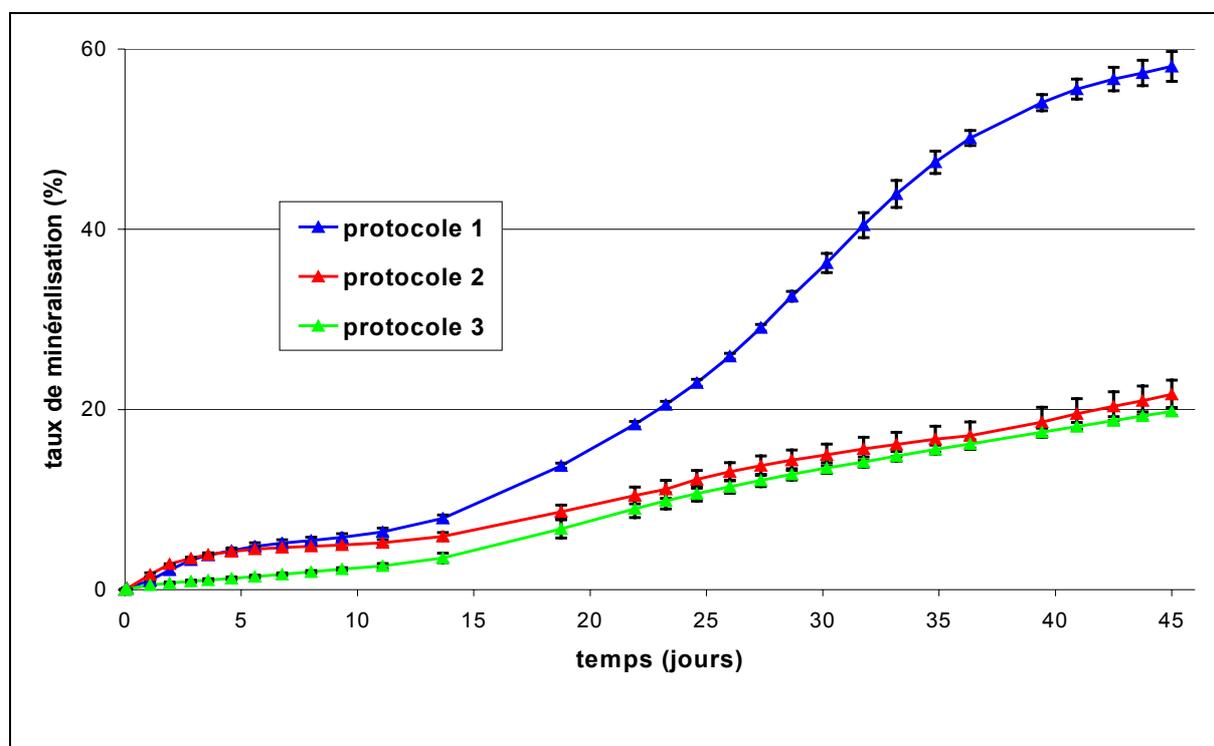


Figure 37 : Courbes de minéralisation obtenues lors des tests ou ont été appliqués les protocoles 1, 2 et 3 (les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions).

Il semble donc que la durée de la phase d'activation ait une influence non négligeable sur la minéralisation du PLA en milieu solide inerte. Les 10 premiers jours où l'on constate une minéralisation très faible peut correspondre (cf. § I.2.1) à la période où le PLA est hydrolysé chimiquement par l'eau. Pendant cette période le PLA introduit n'est pas encore disponible comme substrat pour les micro-organismes du milieu, ceux-ci n'étant pas capables d'hydrolyser les longues chaînes de PLA. Dans le cas d'une phase d'activation courte (1 jour, protocole 1) du carbone restant de la phase d'activation peut être utilisé par la flore microbienne durant la phase d'hydrolyse chimique du PLA. Pour des phases d'activation plus longues cette quantité de carbone résiduel est beaucoup plus faible et les micro-organismes peuvent être en situation de manque de substrat. De ce fait, lorsque des oligomères solubles de PLA sont disponibles (entre les jours 10 et 15), la viabilité de la flore microbienne est donc meilleure dans le cas où la phase d'activation est plus courte. On note ainsi pour les trois cas une augmentation de l'activité de minéralisation entre les jours 10 et 15 mais celle-ci est beaucoup moins intense dans le cas des protocoles 2 et 3.

Sur la figure 37, on note que lors des dix premiers jours, le taux de minéralisation est plus élevé dans le cas des deux tests où les phases d'activation sont plutôt courtes (protocole 1 et 2, 1 et 3 jours). Au contraire pour le protocole 3 où la phase d'activation est beaucoup plus longue, le taux de minéralisation est très bas. Cela peut signifier qu'une partie non négligeable du carbone contenu dans la dose d'activation n'a pas été dégradé durant celle-ci et que la différence de minéralisation observée en début de test pourrait être due à la conversion en dioxyde de carbone résiduel de la phase d'activation. Cela implique que l'absence de réacteur témoin dans nos tests de biodégradation peut ici entraîner une erreur dans le calcul du taux de minéralisation dans le cas des tests où la phase d'activation est plus courte, car nous ne quantifions pas le dégagement de dioxyde de carbone endogène du milieu. Si cette approximation n'a pas beaucoup d'incidence dans le cas de substrat facilement biodégradable, cela peut être préjudiciable pour l'estimation de la minéralisation dans les premiers jours d'un test de biodégradation pour un matériau plus résistant.

III.2.2 Protocole 1

Les résultats que nous avons obtenus pour les bilans carbone avec le protocole 1 sont très hétérogènes. C'est pour cela que ne sont présentés à titre d'exemple (et séparément, Figure 38) que les résultats obtenus pour le réacteur 1, la moyenne des trois répétitions n'étant

pas représentative et ne permettant pas d'interpréter correctement les résultats. Le détail des résultats est donné dans le tableau 22.

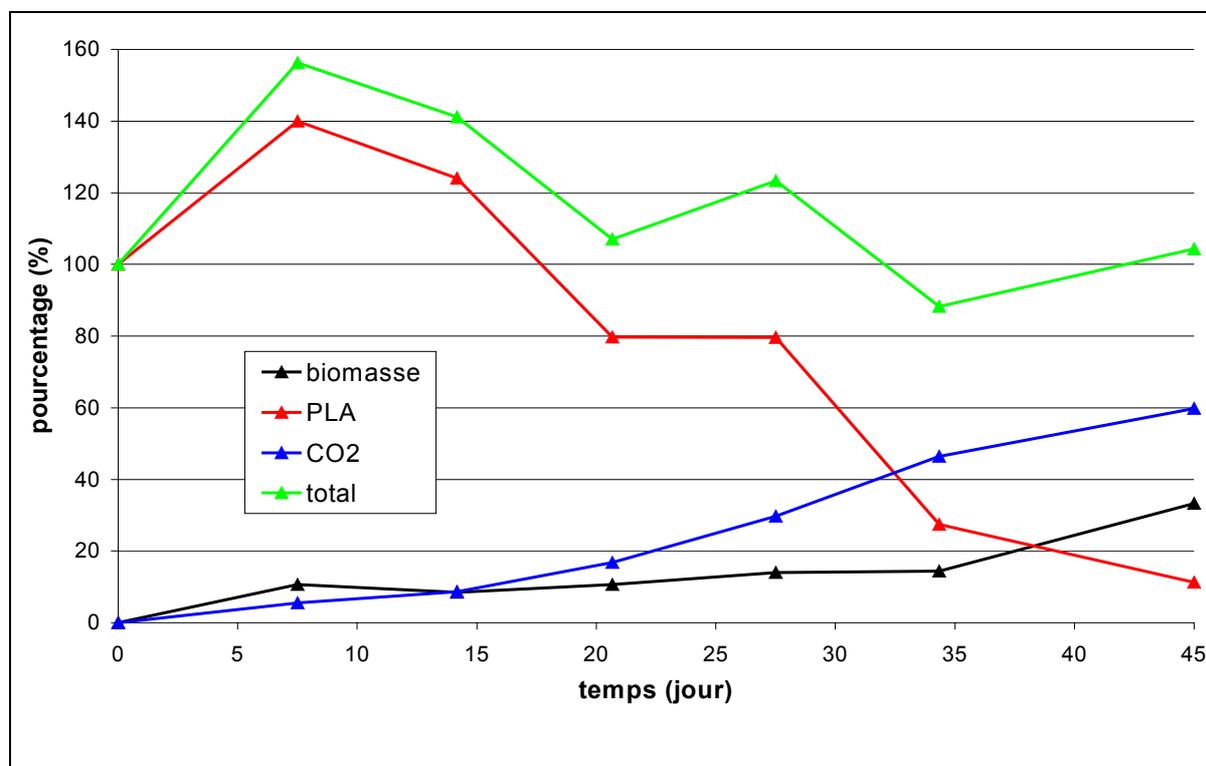


Figure 38 : Evolution des différentes proportions de carbone du PLA non dégradé, minéralisée en CO₂ et incluse dans la biomasse, pour les réacteur 1.

Comme on peut le voir, ces bilans carbone ne sont pas complets puisqu'il manque l'évolution de la fraction C_d qui correspond aux sous-produits de réaction soluble dans l'eau. La somme des fractions (courbe verte) étant déjà parfois très largement supérieure à 100 % nous n'avons pas jugé utile de finaliser les analyses de carbone organique dissous

On peut voir que le total théoriquement égal à 100 % est très largement supérieur à cette valeur et ce quelque soit le temps du prélèvement ou le réacteur observé. On a donc une surestimation globale de la quantité de carbone présente dans le milieu (tableau 22).

On observe également (figure 39 et tableau 22), des proportions de PLA non dégradé anormalement élevées, prélèvement 1, 2 et 4 pour le réacteur a, prélèvement 6 pour le réacteur b ou encore prélèvement 1 pour le réacteur b.

Temps (jours)	prélèvement	Biomasse	PLA	CO ₂	total
Réacteur a					
Début	0	0	100	0	100
7,5	1	10,66	139,97	5,57	156,21
14,2	2	8,42	124,03	8,70	141,15
20,7	3	10,61	79,68	16,75	107,04
27,5	4	13,99	79,54	29,75	123,28
34,4	5	14,39	27,46	46,40	88,24
45	6	33,22	11,29	59,81	104,32
Réacteur b					
Début	0	0	100	0	100
7,5	1	nd	nd	nd	nd
14,2	2	9,41	106,37	7,97	123,76
20,7	3	23,46	102,09	16,15	141,70
27,5	4	14,98	52,84	29,64	97,46
34,4	5	52,65	17,48	47,80	117,94
45	6	16,27	59,05	56,52	131,85
Réacteur c					
début	0	0	100	0	100
7,5	1	11,90	125,30	5,55	142,75
14,2	2	33,18	98,82	8,31	140,31
20,7	3	11,35	87,43	16,46	115,25
27,5	4	15,96	76,78	29,01	121,74
34,4	5	nd	28,08	44,89	nd
45	6	16,97	nd	57,92	nd

Tableau 22 : Proportions de carbone du PLA sous forme de CO₂, de biomasse et de PLA non dégradé.

L'hétérogénéité observée pour l'évolution du carbone du PLA non dégradé (cf. Figure 39) peuvent être une conséquence du protocole d'extraction lui-même. Il est possible que la solubilisation de l'échantillon dans le chloroforme provoque également la solubilisation d'une partie plus ou moins importante de la biomasse présente dans le milieu. Les micro-organismes du lexiviat peuvent être d'origine très diverses et la proportion de ces différentes souches au sein de la flore microbienne est aussi susceptible de varier au cours du test. Il en résulte donc une résistance plus ou moins importante de la biomasse au chloroforme (qui peut solubiliser les acides gras des parois cellulaire par exemple). Malgré le fait que nous ayons réduit au minimum (10 minutes) le contact biomasse/chloroforme lors de l'étape de solubilisation du chloroforme, ce procédé n'est peut être pas adapté car il a trop de conséquence sur la mesure de la biomasse.

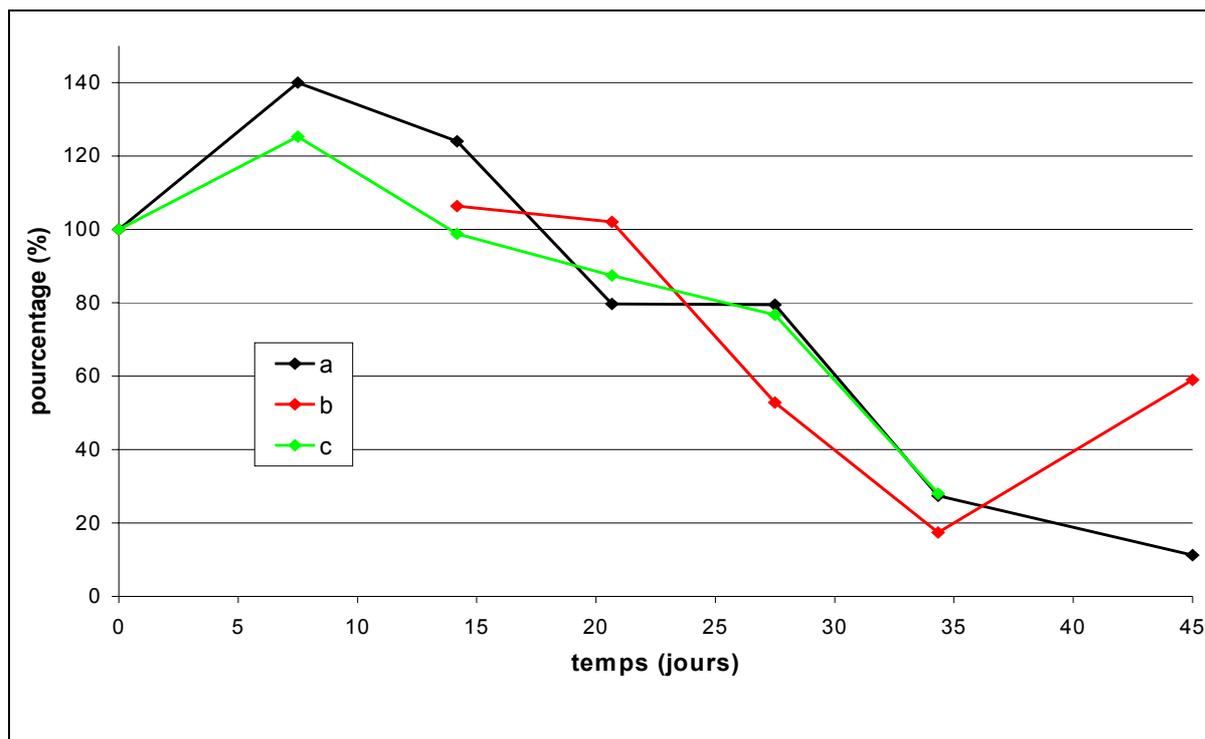


Figure 39 : Evolution de la proportion de PLA dans les trois réacteurs a, b et c, protocole 1.

D'après le protocole d'extraction 1 (cf. figure 29), on sait que la détermination des proportions de biomasse et de PLA résiduel dans le milieu sont indirectement liées. En effet, de la quantité de carbone obtenue dans le culot R, on déduit, par différence avec la quantité de PLA déterminé par solubilisation dans le chloroforme, la quantité de carbone présente dans la biomasse. La surestimation que l'on constate d'après les valeurs de « total » dans le tableau 22 et la figure 38 est donc du à l'analyse élémentaire du culot R et pas à la mesure du PLA résiduel dont les valeurs sont particulièrement élevées, notamment lors des deux premiers prélèvements.

Nous avons volontairement écourté la phase d'activation à un jour pour ce test dans le but de favoriser la survie des micro-organismes et ainsi améliorer la minéralisation du PLA pour mieux simuler sa biodégradation dans le compost (Figure 40). En comparaison du bilan carbone établi avec l'amidon, nous avons donc augmenté la quantité de carbone introduite pour la phase d'activation et raccourci la période durant laquelle celle-ci est dégradée avant que le test commence. On peut supposer qu'une quantité résiduelle suffisamment importante de carbone issue de la dose d'activation reste dans le milieu. Ors nous avons négligé cette quantité de carbone dans le calcul de notre bilan carbone, ce qui peut être la cause des résultats obtenus sur le total du carbone recouvré.

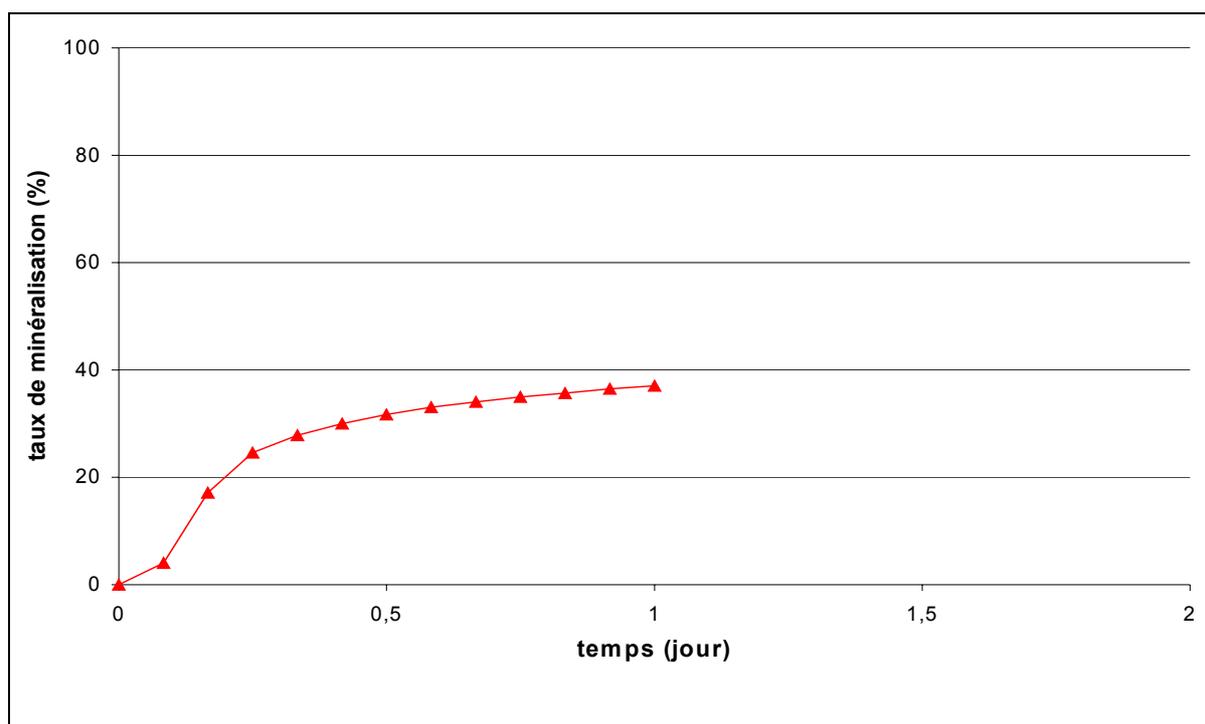


Figure 40 : Minéralisation durant la phase d'activation avec la dose 1.

Pour améliorer la précision du bilan carbone sur la biodégradation du PLA, nous avons donc appliqué deux nouveaux protocoles d'extraction/quantification avec de nouvelles méthodes d'estimation du PLA et des paramètres différents pour tendre vers une meilleure répétabilité des résultats (cf. tableau 21).

III.2.3 protocole 2

D'après la figure 40, On remarque que le total du carbone recouvré est particulièrement élevé lors des deux premiers prélèvements (environ 140 et 130% pour les bilans carbone établis respectivement pour les jours 10 et 17). On observe également des écart-types assez élevés concernant les proportions de carbone comprises dans le PLA résiduel et la biomasse. On obtient une proportion moyenne de carbone incluse dans le biomasse négative lors du jour 25 parallèlement à une proportion de PLA résiduel qui augmente du jour 17 au jour 25. Ces résultats mettent donc en évidence un problème au niveau de la quantification globale du carbone présent dans le milieu ainsi que pour l'estimation de la

quantité de PLA résiduel, puisqu'il n'est normalement pas possible que celle-ci augmente au cours du test comme c'est le cas pour le bilan au jour 25.

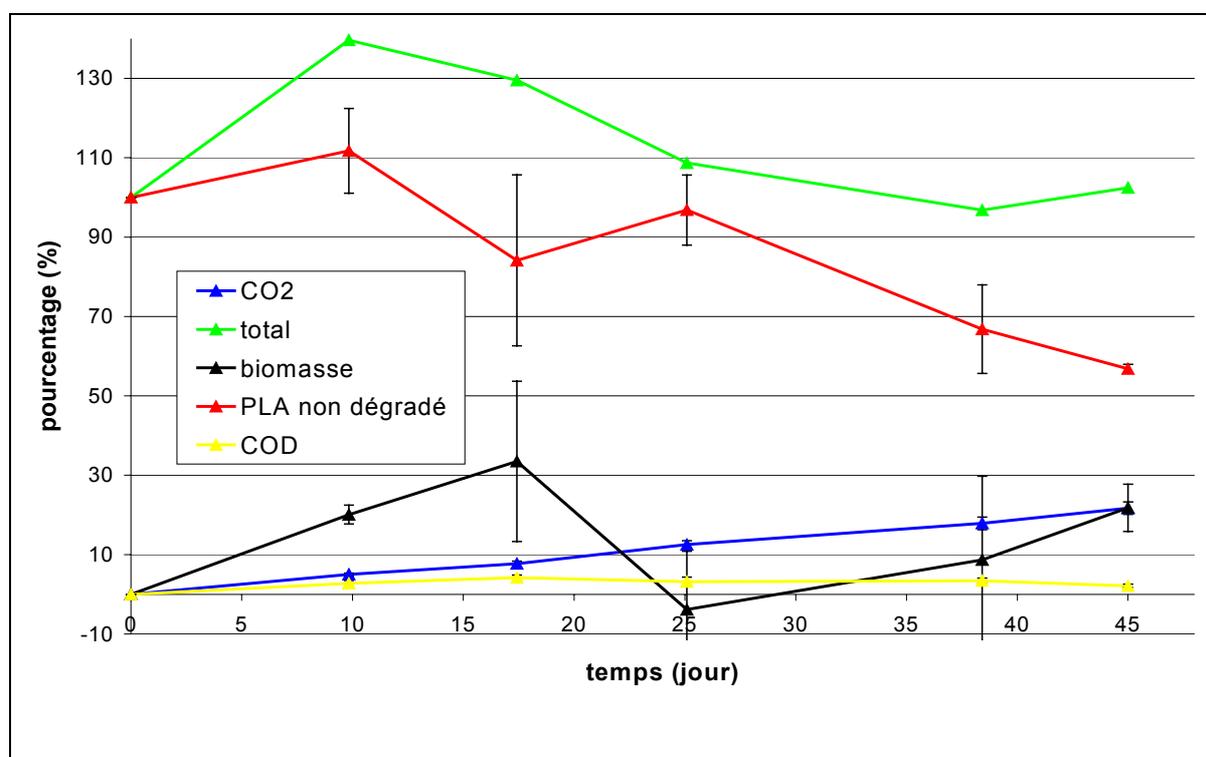


Figure 41 : Evolution du bilan carbone au cours de la biodégradation du PLA avec le protocole 2.

Si l'on observe l'évolution de l'analyse élémentaire du culot R (voir § XII.2.2.2.1 et Figure 42), on voit que la principale source de surestimation de la quantité de carbone totale n'est pas l'analyse HPLC du PLA non dégradé. Comme observé pour le bilan carbone avec le protocole 1, une phase d'activation plus longue de 3 jours n'a pas permis de corriger l'erreur observée en début de test de biodégradation (déjà pour le protocole 1). Il semble qu'une quantité encore non négligeable de carbone résiduel de la dose d'activation entraîne une surestimation du carbone présent dans le culot R. De plus le bilan observé obtenus (figure 41 ou figure 42) ne sont pas corrigés avec les analyses d'échantillons prélevés en fin de phase d'activation juste avant que le test ne commence.

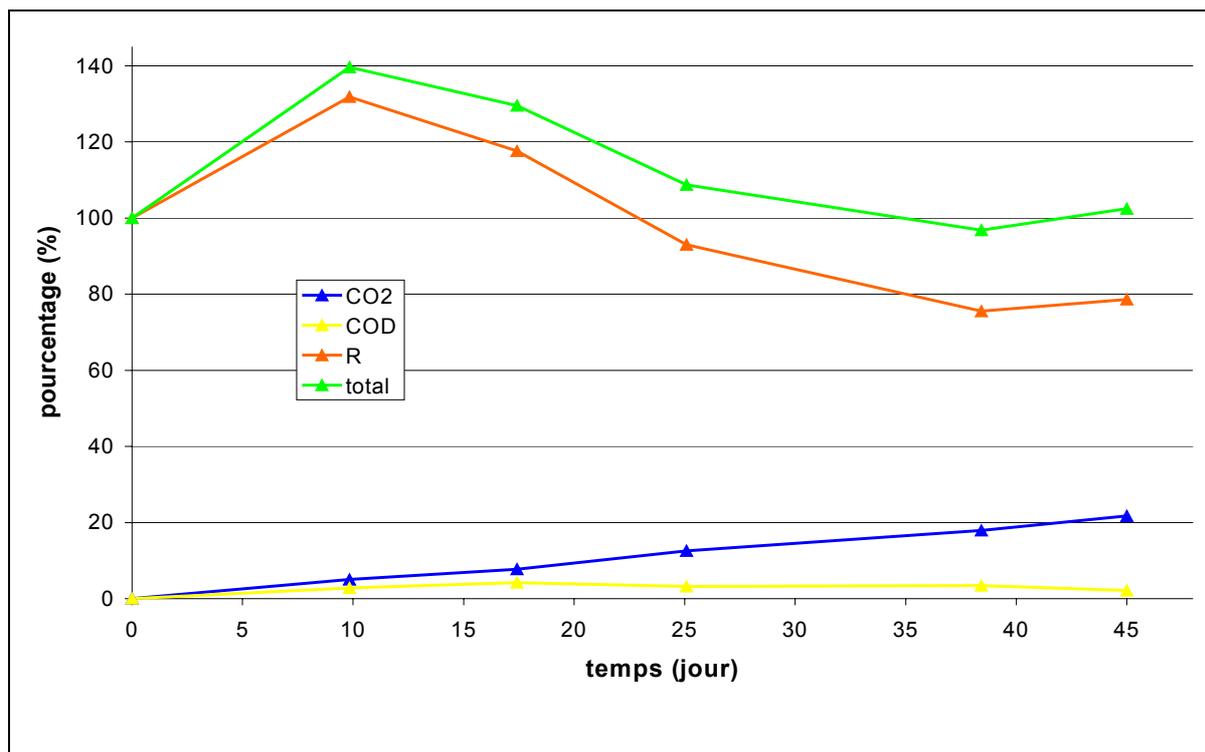


Figure 42 : bilan carbone avec le protocole 2 avec l'analyse élémentaire du culot R.

En effet, il est difficile de prendre en compte ces analyses si, comme tel est le cas, la quantité de carbone restante est importante, car on ne peut savoir si ce carbone va être inclus dans la biomasse ou minéralisé rapidement en dioxyde de carbone dans les premiers jours du test de biodégradation. L'erreur induite par une phase d'activation trop courte n'a donc principalement d'influence que sur le bilan carbone établi dans les 20 premiers jours du test. On peut d'ailleurs voir que le total lors des trois derniers bilans est proche des 100 % théorique que l'on doit obtenir.

La proportion de carbone comprise dans les composés solubles (courbe jaunes sur la figure 41) reste toujours faible, ne dépassant jamais la barre des 5%. Ces valeurs semblent plausibles car ce phénomène a déjà été observé pour des travaux antérieurs (Gattin, thèse, 2001) également conduit dans un milieu solide inerte. Le PLA étant la principale et la seule source de carbone (lorsque la dose d'activation est complètement consommée dans notre cas), les composés solubles dans l'eau libérés par les réactions abiotiques lentes de dégradation du PLA, doivent être immédiatement consommés par la flore microbienne. Pour l'amidon, qui est directement hydrolysé par les enzymes extracellulaires, on avait au contraire observé un pic dans la proportion de carbone soluble (environ 35 % du carbone introduit) parallèlement à la disparition rapide de l'amidon. Cette proportion était ensuite redevenue très

faible dans les derniers jours du test comme pour le PLA. La flore microbienne avait donc assimilé les composés solubles plus lentement que leur apparition dans le milieu.

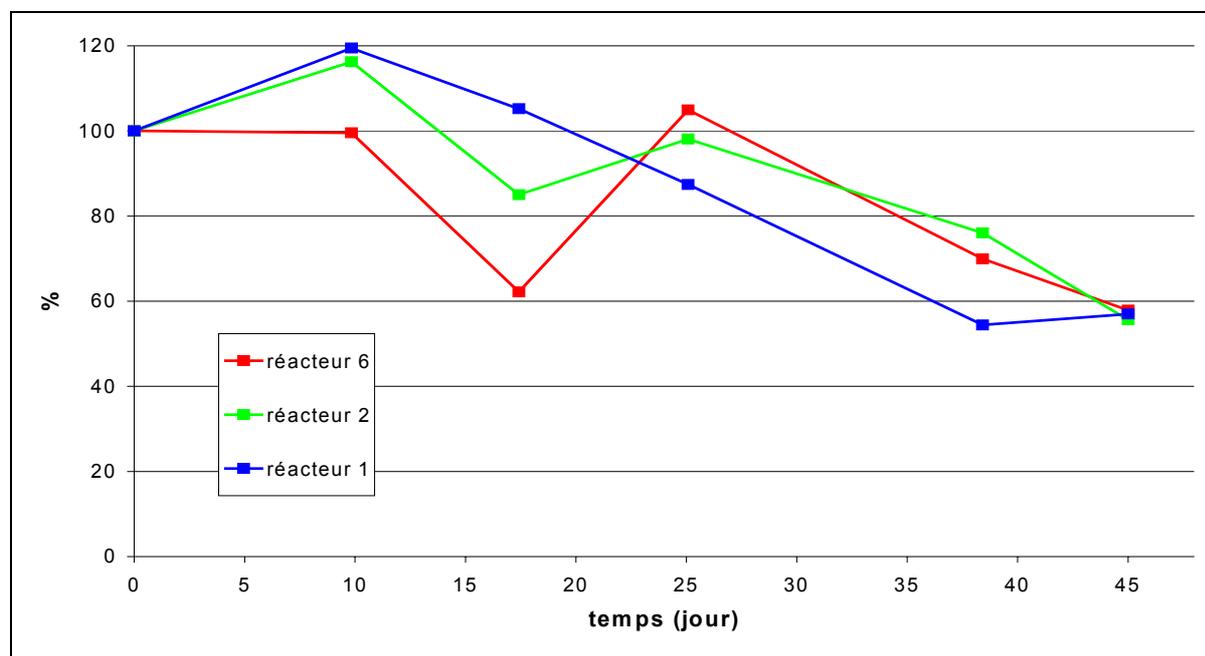


Figure 43 : Evolution de la proportion de PLA dans chaque réacteur.

L'analyse CLHP du PLA résiduel du milieu n'a pas permis de mettre en évidence de manière satisfaisante la disparition du polymère du milieu. Nous avons préalablement vérifié sur un échantillon prélevé à la fin de la phase d'activation que la flore microbienne du milieu ne produisait pas d'acide lactique qui pourrait fausser l'analyse CLHP de l'hydrolysate de PLA. Il est possible qu'un composé ayant le même temps de rétention que l'acide lactique ait pu perturber nos analyses. Cependant si l'on observe l'évolution de la proportion de PLA non dégradé dans chaque réacteur (figure 43), on remarque une irrégularité importante des mesures qui n'est pas le seul fait de l'analyse CLHP.

En effet, les augmentations de cette proportion que l'on observe pour les jours 25 et à la fin ne sont pas effectives pour tous les réacteurs (figure 43). Comme il est impossible que la quantité de PLA dans le milieu augmente dans de telles proportions, cette hétérogénéité des résultats peut être la conséquence de prélèvements non représentatifs. La masse des échantillons sur lesquels sont réalisés les analyses peut être également trop faibles pour être ensuite ramenés à la masse sèche du milieu total. Il serait donc opportun de réduire le nombre de prélèvements pour augmenter la masse de ceux-ci de manière à améliorer la

représentativité des résultats obtenus sur une petite partie du milieu total contenu dans un réacteur.

Si l'augmentation de la durée de la phase d'activation a permis de réduire un peu l'excès sur le carbone total recouvert observé avec le protocole 1 (cf. tableau 22), le taux de minéralisation plus faible amplifie sans doute les divers problèmes de précision et que nous avons rencontré. En effet si le dégagement de dioxyde carbone est élevé dès le début du test, le dégagement endogène dû au carbone résiduel de la dose d'activation devient négligeable. De même, si le PLA est dégradé plus facilement et il est plus aisé de mettre en évidence la diminution de sa concentration dans le milieu car elle sera beaucoup plus franche. Dans le cas de l'amidon ou le taux de minéralisation est très élevé nous n'avons pas rencontré de problème du même type alors que nous avons travaillé sur des masses d'échantillons plus faibles. De manière générale, plus la variation d'une des fractions du bilan sera importante et plus il sera facile de l'observer.

Dans le protocole suivant, ces remarques ont été pris en compte pour optimiser le bilan carbone du PLA. La masse des échantillons a été augmentée. De plus, l'estimation du PLA non dégradé a été modifiée, l'étape d'hydrolyse dans la soude est toujours présente mais l'acide lactique libéré sera dosé par électrophorèse capillaire de zone (CZE).

III.2.4 Protocole 3

III.2.4.1 Bilan carbone

D'après la figure 44, on observe une diminution régulière de la proportion de carbone du PLA non dégradé dans le milieu (courbe rouge) jusqu'à environ 50% (cette diminution est valable pour les trois réacteurs), malgré une faible surestimation pour la valeur au jour 8/9 (proportion de carbone du PLA de 108%). La proportion de carbone dans les composés solubles dans l'eau est toujours très faible atteignant la valeur maximale de 1,34% lors du deuxième prélèvements. L'évolution de la proportion de carbone dans la biomasse (courbe noire) est plus régulière que celle obtenue avec le protocole 2 avec une valeur moyenne finale de 15,3 % pour une écart type sur trois valeurs qui est satisfaisante (3,08). On obtient toujours un excès significatif pour le carbone total recouvert dans le milieu en début de test (courbe verte, 123, 9%) puis il diminue jusqu'à atteindre 85,5 % en fin de test (pour une valeur théorique de 100%).

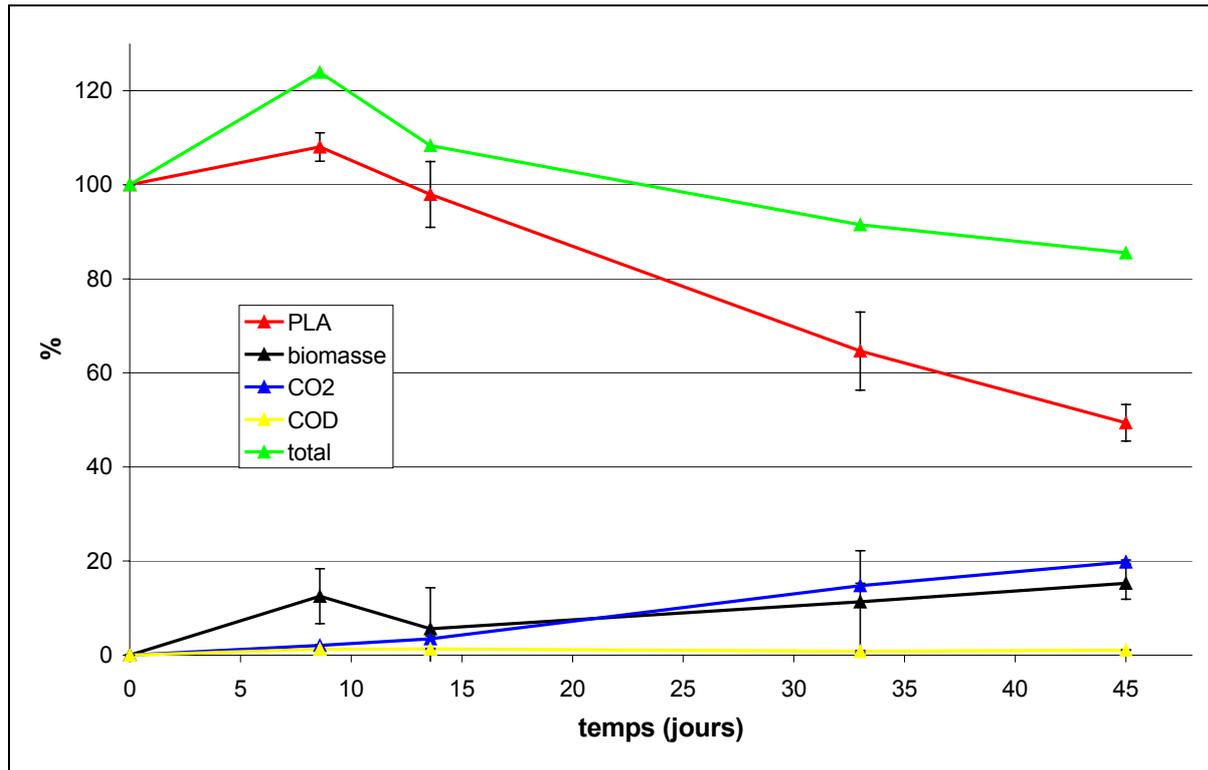


Figure 44 : Evolution du bilan carbone au cours de la biodégradation du PLA avec le protocole 3.

Ici nous nous avons affiné le bilan carbone en fonction des valeurs obtenues pour l'analyse élémentaire et l'analyse du carbone organique dissous en fin de phase d'activation. En effet l'analyse élémentaire d'un échantillon de milieu nous permet de connaître la quantité de carbone restante en fin de phase d'activation. Suivant l'hypothèse que l'ensemble du carbone de la dose d'activation est consommé au bout de 7 jours d'activation, nous avons considéré que la quantité de carbone contenu dans les composés solubles retranchée à la quantité de carbone contenu dans le milieu (obtenue par l'analyse élémentaire précédente) nous donnait la quantité de carbone contenu dans la biomasse formée à la fin de la phase d'activation. Cette biomasse formée au cours de la phase d'activation ne doit pas être prise en compte lors de l'élaboration du bilan carbone du PLA car elle ne contient pas de carbone issu du polymère test. Donc les proportions de carbone du PLA inclus dans le biomasse ont été minorées, pour chaque réacteur et chaque jour, de la quantité de biomasse en fin de phase d'activation.

- Evolution des différentes fractions du bilan :

La réduction du nombre de prélèvement au cours du test (3 pour le protocole 3 contre 4 pour le protocole 2) nous a permis d'augmenter la masse des échantillons sur lesquels nous avons réalisé les bilans carbone (de 3 grammes pour le protocole 2 à 4 grammes pour le protocole 3). Ainsi, en parallèle de l'utilisation de l'électrophorèse capillaire nous avons amélioré de manière significative la quantification du PLA dans le milieu et nous n'avons plus de résultats illogiques comme pour le protocole 2 (augmentation de la proportion de PLA dans le milieu).

Pour l'établissement du bilan carbone à la fin du test, comme nous disposions d'une grande quantité de milieu, nous avons utilisés des masses de milieu plus importantes encore (nous avons travaillé sur 6 grammes de milieu congelé au lieu de 4 pour les prélèvements en cours de test). Or on remarque que les écarts types observés sur trois mesures sont plus faibles pour les bilans carbone réalisés en fin de test, que ce soit pour l'estimation de la biomasse ou du PLA résiduel (Figure 44). Il semble donc que la masse de l'échantillon sur lequel on réalise le bilan carbone soit un facteur essentiel de la précision de ce dernier.

Les résultats obtenus pour la proportion de carbone contenu dans les composés solubles confirment ceux obtenus avec le protocole 2. Les oligomères solubles libérés par l'hydrolyse abiotique du PLA sont immédiatement consommés par la flore microbienne. Il n'y a donc pas d'accumulation d'acide lactique dans le milieu susceptible de provoquer une variation de pH. Aucune variation de pH n'a été observée pour la biodégradation d'un PLA dans du compost jusqu'à une proportion de PLA de 30% en masse (Ghorpade et coll., 2001).

- Allongement de la phase d'activation :

L'allongement de la phase d'activation de 3 à 7 jours a-t-il permis de diminuer nettement l'excès de carbone recouvert dans le milieu que nous observions en début de test pour le protocole 2 (courbe verte, figure 41 et 44). L'excès est passé de 40% pour le protocole 2 à 23 % avec le protocole 3 et la courbe totale retrouve une valeur satisfaisante (108,3 %) dès le deuxième prélèvement à la moitié du jour 13. Manifestement le carbone résiduel de la phase d'activation est moins important et si l'erreur en début de test est significativement plus faible, elle n'en demeure pas moins encore trop élevée pour être satisfaisante. La correction de la proportion de biomasse permet également de réduire l'excès en début de test.

L'écart en fin de test, même s'il n'excède pas les 15 %, est relativement important. Cela met en évidence les limites d'une phase d'activation courte comme celles des tests de

biodégradation avec les protocoles 1 et 2, car la quantité de carbone résiduel importante à la fin des phases d'activation avait sans doute permis de « masquer » cet écart, en augmentant anormalement les proportions de carbone dans la biomasse et également le taux de minéralisation dans une moindre mesure.

III.2.4.2 Analyses physico-chimiques

- Evolution de la masse molaire moyenne du PLA non dégradé (Figure 45) :

On constate une diminution drastique de la masse molaire moyenne en poids (M_w) au jour 8 (de 168000 à 47000, la masse molaire de départ est celle du PLA après broyage). Le M_w tout comme le M_n continue de diminuer plus lentement au jour 15 pour se stabiliser lors des deux dernières semaines du test de biodégradation à une masse molaire moyenne de 4800 et 5900 g/mol. L'indice de polydispersité est très proche de 1 pour les deux derniers prélèvements, 1,36 et 1,24 respectivement pour le jour 33 et la fin du test.

Ce profil d'évolution est assez représentatif du mode de biodégradation du PLA qui a été mis en évidence en milieu liquide (Li et coll., 1990). Les ruptures de chaîne d'origine abiotique par hydrolyse des liaisons ester au hasard des longues chaînes de polymères fait rapidement chuter la masse molaire du polymère. Cette première étape a lieu préférentiellement dans les parties amorphes du polymère, il reste donc vers la fin du test des fragments de PLA hautement cristallins de masse molaire assez faible relativement monodisperse qui sont beaucoup plus résistant aux réactions de dégradation biotiques et abiotiques. Le PLA aurait donc le même mode de dégradation dans le compost et en milieu liquide, soulignant ainsi l'importance du taux d'humidité du milieu dans lequel il se trouve si on souhaite obtenir son élimination complète. Cependant on peut noter que l'on observe pas d'épaulements sur les chromatogrammes de SEC, montrant que l'on a pas de distribution bimodal de la masse molaire moyenne du polymère, comme observé pour la dégradation d'échantillons plus volumineux en milieu liquide (Grizzi et coll, 1995). Dans notre cas, le PLA est dégradé sous forme de poudre assez fine (granulométrie de 0,5 mm), la taille des particules n'est sans doute pas assez importante pour observer une différenciation « cœur/peau » (Gattin, thèse, 2001).

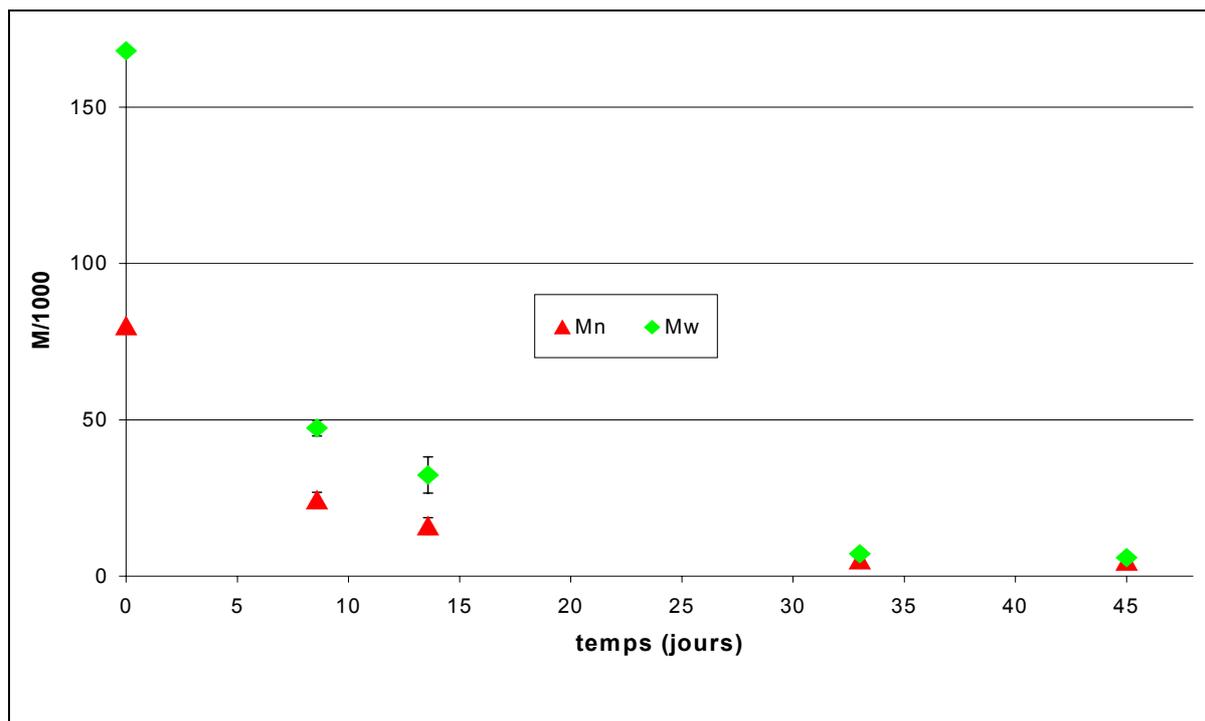


Figure 45 : évolution du poids moléculaire moyen en nombre et en poids du PLA non dégradé dans le milieu solide inerte. Les valeurs sont la moyenne de résultats de trois réacteurs.

La superposition de l'évolution de la masse molaire moyenne avec celle des différents termes du bilan carbone permet de mieux mettre en évidence la suite du processus de biodégradation du PLA (figure 46). Pendant les deux premières semaines du test on voit que le taux de minéralisation n'augmente que très faiblement, mais après diminution brutale de Mw, le taux de minéralisation augmente significativement et régulièrement jusqu'à la fin du test. Les jours 12 et 13 doivent correspondre au moment où des chaînes courtes et solubles de PLA sont disponibles pour la flore microbienne qui les dégradent en dioxyde de carbone et en biomasse (la courbe noire représentant la proportion de carbone dans la biomasse augmente également à partir de ce moment). La diffusion de ces oligomères solubles de la matrice du polymère vers le milieu a pour conséquence de faire diminuer la proportion de carbone dans le PLA que l'on voit clairement chuter entre le deuxième et le troisième prélèvement.

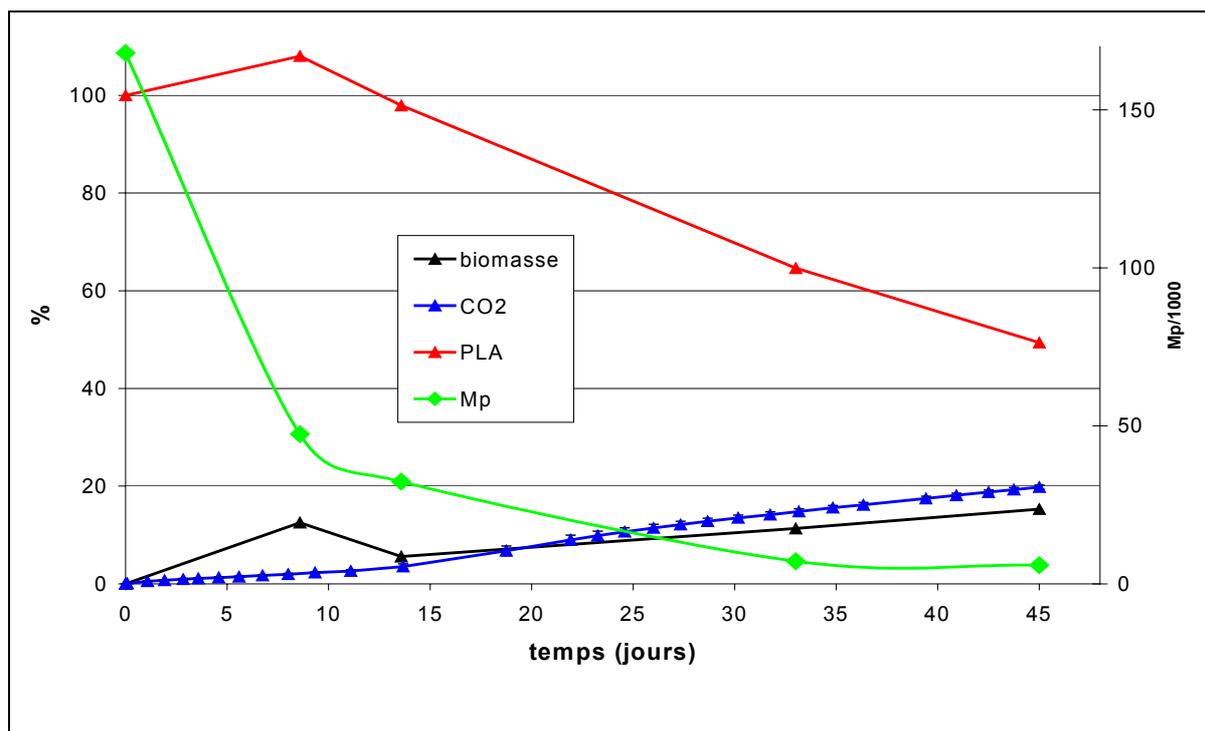


Figure 46 : Evolution de la masse molaire du PLA non dégradé en fonction du bilan carbone.

On peut par contre s'interroger sur l'augmentation de la proportion de biomasse que l'on observe dès le début du test car il n'y a théoriquement à ce moment la pas de substrat disponible dans le milieu. Cette accroissement pourrait donc être la conséquence de carbone résiduel de la dose l'activation déjà évoqué plus haut. Il est possible que l'étape de broyage du PLA pour le réduire en poudre avant le test, fournisse une petite quantité de substrat disponible immédiatement pour les micro-organismes.

On voit donc bien que dans les deux premières semaines du test le bilan carbone ne montre pas de signes évidents de la biodégradation du PLA (pas de diminution de la proportion de PLA dans le milieu, faible minéralisation, cf. figure 46), la chromatographie d'exclusion stérique sur le PLA extrait du milieu montre une profonde modification de la structure chimique du matériau preuve d'une activité de dégradation due au facteurs abiotiques du milieu.

- Evolution de la température de transition vitreuse du PLA non dégradé :

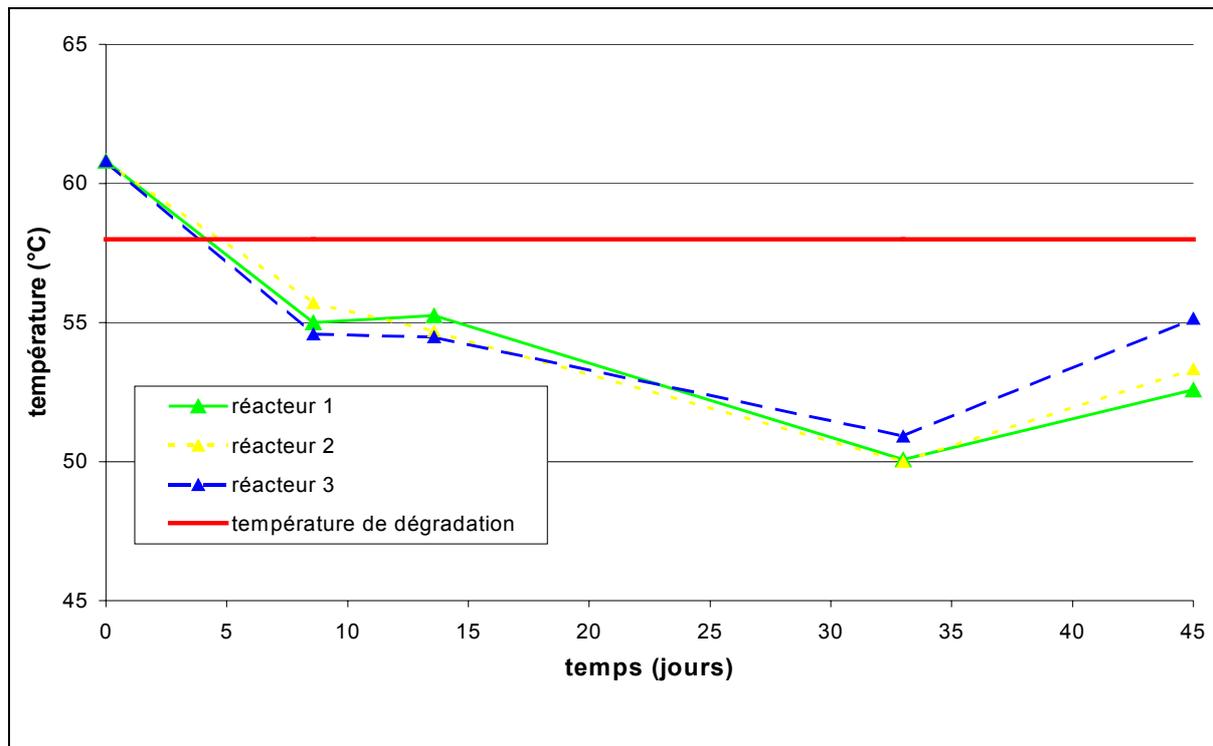


Figure 47 : Evolution de la température de transition de transition vitreuse (la limite rouge représente la température dans les réacteurs pendant le test, 58°C).

On observe tout d'abord une nette diminution de la température de transition vitreuse du matériau dès les premiers quinze jours du test puis elle continue de baisser plus lentement jusqu'au jour 33 (Figure 47). Ce phénomène est consécutif aux ruptures de chaîne mis en évidence par les chromatographie d'exclusion stérique un peu plus haut. Mais le fait que la température de transition vitreuse passe en dessous de la température de dégradation est également un élément important qui va favoriser la dégradation abiotique du PLA dans un premier temps puis indirectement l'assimilation des oligomères par les micro-organismes dans un deuxième temps. En effet certains auteurs (Agarwall et coll., 1998) ont montré en étudiant la dégradation du PLA à 40 50 et 60°C que cette condition était déterminante car les pertes de masses les plus importantes ont été observées pour les expériences menées à 60°C. Le passage du PLA à l'état caoutchoutique permet une meilleur absorption de l'eau dans la matrice du polymère. De plus, une fois les oligomères solubles libérés par les hydrolyses, leur diffusion dans le milieu est également favorisée par l'état du polymère.

Une interrogation subsiste néanmoins quand à l'augmentation de la Tg observée en fin de test. Même si celle-ci est faible elle est observée dans les trois réacteurs. la température de transition de transition vitreuse étant le reflet de la mobilité des chaînes dans les zones amorphes du matériau, Les facteurs qui influencent la Tg sont la masse molaire moyenne du matériau, la présence de composés agissant comme plastifiants en facilitant la mobilité des chaînes ou au contraire une réticulation des chaînes de polymères.

A la fin du test, le Mn est relativement faible et le Mw ne diminue que très faiblement, ce qui ne peut pas avoir pour conséquence une augmentation de la Tg. La présence de molécules d'eau tenant le rôle de plastifiant dans la matrice est également une hypothèse à écarter car le PLA est extrait du milieu par solubilisation dans le chloroforme et le protocole inclus également une étape de séchage de l'échantillon prélevé. Cela signifierait qu'il y aurait donc une réticulation de chaînes de PLA ou de manière plus générale une réorganisation de la structure chimique de celui-ci. Cependant nous n'avons pas trouvé de référence dans la littérature rapportant un phénomène semblable à celui-ci et le PLA, du fait de sa structure relativement simple ne propose pas beaucoup d'opportunité pour d'éventuels réarrangements. La valeur de la Tg que nous avons déterminé peut également avoir été perturbé par la présence avec le PLA d'une petite quantité de biomasse, car nous avons vu lors de l'utilisation du protocole 1 qu'une partie de la biomasse avait sans doute été dissoute dans le chloroforme lors de la quantification du PLA.

Quelque soit l'origine de ce résultat obtenu pour le PLA en poudre, il devra être confirmé par une analyse DSC d'un block de PLA dans les même conditions et au bout du même temps de dégradation, de manière à extraire le PLA du milieu sans avoir besoin de le solubiliser dans un solvant. Ainsi, on pourrait déterminer si cette augmentation de Tg est le fait de l'état même du PLA dans le milieu ou de la présence de biomasse dans l'échantillon. Si la Tg continuait d'augmenter au delà des 45 jours de présence dans le compost jusqu'à repasser au dessus de la température de test (58°C), on pourrait alors avoir des résidus de PLA particulièrement résistants aux hydrolyses chimiques, qui pourraient perdurer longtemps dans le compost, ce qui n'est évidemment pas souhaitable pour la viabilité commerciale de celui-ci.

De manière générale, le suivi de la masse moléculaire moyenne du matériau et de sa température de transition vitreuse a permis de mettre en évidence le mécanisme de dégradation du PLA en milieu solide qui est le même qu'en solution, les facteurs abiotiques jouant un rôle déterminant. On peut également constater que le polymère a effectivement subi une altération profonde de sa structure chimique qui doit normalement précéder une activité

de minéralisation beaucoup plus importante que celle que nous avons obtenu (seulement 20 % de carbone transformé en dioxyde de carbone). Les causes de ce faible taux se situent donc clairement au niveau de l'activité de la flore microbienne dont l'intensité n'a pas été aussi importante que dans un milieu solide inerte avec une phase d'activation courte

IV> CONCLUSION

La minéralisation du PLA dans le compost a été simulé dans un milieu solide inerte à base de vermiculite. Le taux de minéralisation observé est satisfaisant et du même ordre de grandeur que celui obtenu dans le compost, pour une phase d'activation de 1 jour. Si l'augmentation de la durée de la phase d'activation nous a ensuite permis d'améliorer sensiblement la précision du bilan carbone obtenue, nous avons pu voir que le taux de minéralisation en fin de test est par contre beaucoup plus faible. Cela étant la conséquence d'une moins bonne viabilité de la flore microbienne obtenue grâce à la phase d'activation.

L'utilisation de plusieurs protocoles d'extraction/séparation du carbone a permis d'établir un premier bilan carbone de la biodégradation du PLA en milieu solide. La précision du bilan a été amélioré avec la modification du protocole mais le carbone total recouvert notamment en début et en fin de test doit encore être amélioré. L'estimation de la quantité de PLA résiduel dans le milieu par hydrolyse dans le soude et quantification par électrophorèse capillaire donne satisfaction car elle permet d'observer la disparition régulière du matériau test au cours du test. Nous avons également pu observé que pour la biodégradation du PLA, les oligomères solubles libérés par les hydrolyses chimiques, sont immédiatement consommés par les micro-organismes car la proportion de carbone contenue dans les composés solubles reste toujours très faible.

La principale source de problème concernant le bilan carbone réside dans l'estimation de la proportion de carbone inclus dans la biomasse. En effet cette valeur peut être faussée par une quantité de carbone résiduel de la dose d'activation qui serait trop conséquente. Il est donc important de garder une phase d'activation relativement longue et de ne pas augmenter la quantité de carbone présente dans la dose d'activation. Si l'augmentation de la masse des échantillons sur lesquels sont réalisées les analyses du protocole 1 au protocole 3, a permis de réduire les erreurs, la prise en compte du carbone résiduel et de manière général la caractérisation du milieu en fin de phase d'activation apparaît comme un élément rédhibitoire de la précision des bilans carbone en milieu solide inerte.

Le suivi de la température de transition vitreuse et de la masse molaire moyenne permet de mettre en évidence les preuves que le matériau subit une dégradation malgré une activité de minéralisation négligeable. Le mode de dégradation du PLA en milieu solide a été mis en évidence dans un milieu simulant le compost. Nous avons ainsi pu vérifier que la première étape de la biodégradation du PLA avait bien eu lieu (hydrolyse chimique des longues chaînes de PLA en oligomères solubles qui migrent dans le milieu de biodégradation, provoquant une chute de la masse molaire moyenne et une diminution de la Tg), et donc que le faible taux de minéralisation obtenu était plutôt dû à une limitation de l'activité des micro-organismes.

Chapitre II : Biodégradation du poly(acide 3-hydroxybutyrique)

I> MATERIEL ET METHODE

I.1 Poly(acide 3-hydroxybutyrique)

Le Poly(acide 3-hydroxybutyrique) (PHB) que nous avons utilisé a été obtenu au près de Sigma-Aldrich. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche très fine. Son point de fusion est d'environ 170°C et sa température de transition vitreuse proche de 0°C. Nous l'avons utilisé sous cette forme poudreuse pour la réalisation de nos tests de dégradation, car nous pouvons ainsi avoir une meilleure répartition du substrat dans le milieu et une minéralisation plus rapide.

I.2 Tests de biodégradation

Ce PHB est constitué de 55,52 % de carbone en masse (proportion déterminée par analyse élémentaire) et nous introduisons 7,7 grammes de carbone dans chaque réacteur pour un test de biodégradation. La masse de PHB introduite dans un réacteur pour tous les tests est donc de 14 grammes.

Tous les autres produits et équipements utilisés pour la réalisation des tests de biodégradation (banc automatisé, composés présents dans les doses d'activation, vermiculite) ainsi que le mode calcul du taux de minéralisation sont les mêmes que pour les tests de biodégradation de l'amidon.

Test	PHB (g)	Dose d'activation	Durée activation	Extrait de compost (ml)	Vermiculite (g)	Solution minéral (ml)
1	14	Dose 1	2 jours	15	180	410
2	14	Dose 1	7 jours	15	180	410

Tableau 23 : composition d'un réacteur pour les tests de biodégradation du PHB en milieu solide inerte

- en milieu solide inerte :

Nous avons donc gardé la dose 1 (les premiers tests de biodégradation avec le PLA ayant été plus satisfaisant avec cette dose, tableau 23) pour la phase d'activation et des durées de 1 et 7 jours. Le mode de calcul du taux de minéralisation est le même que pour les tests avec l'amidon.

I.3 Bilan carbone

I.3.1 Protocole d'extraction du carbone

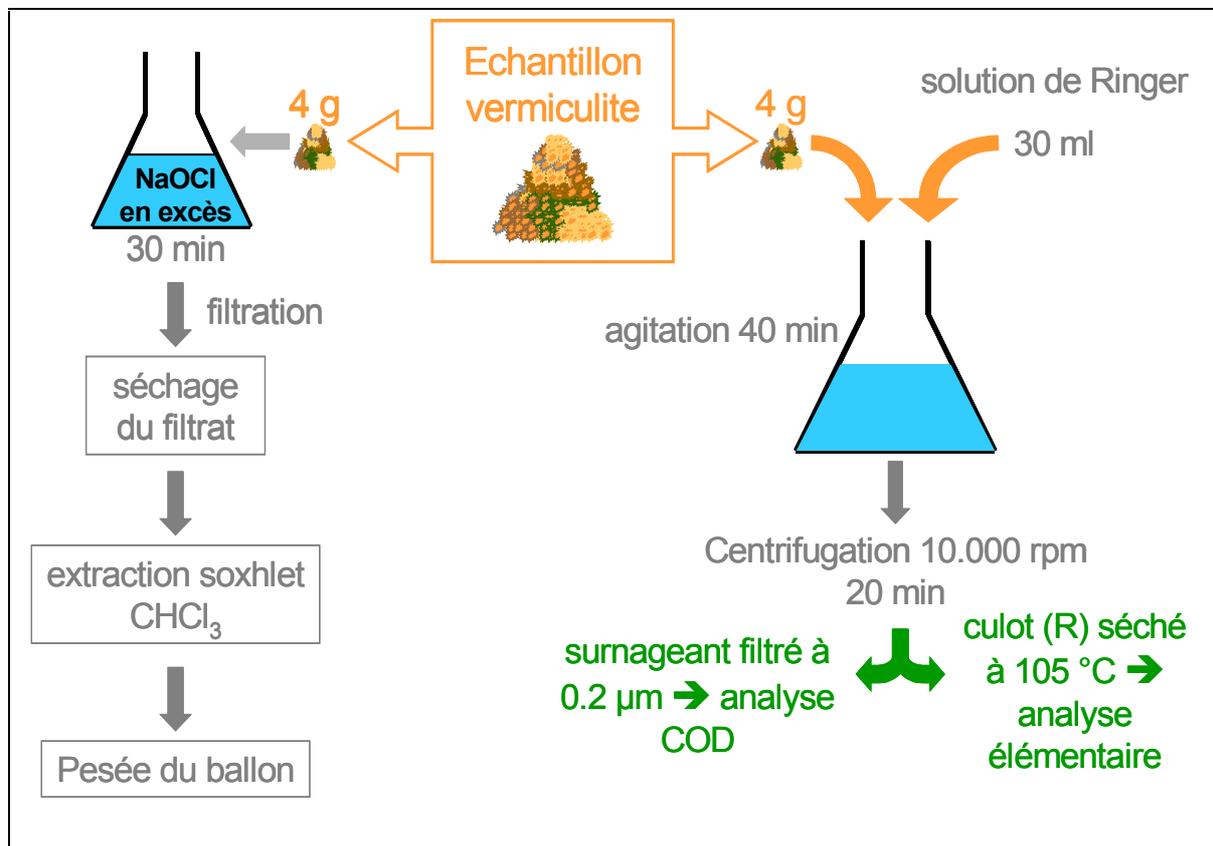


Figure 48 : Protocole d'extraction du carbone pour la biodégradation du PHB

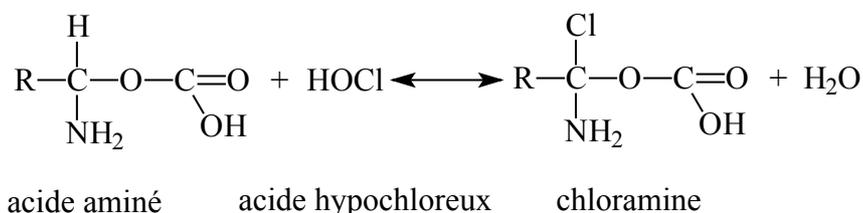
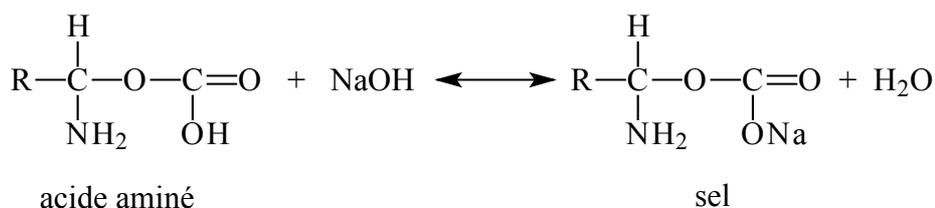
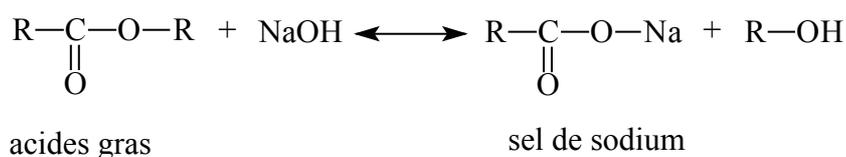
L'étape du protocole qui consiste à homogénéiser l'échantillon dans le liquide de Ringer ainsi que les analyses qui en découlent, ont déjà été décrites pour les protocoles d'extraction utilisés lors des tentatives de bilan carbone de la biodégradation du PLA (cf. § XI.4.1).

La quantification du PHB non dégradé est inspirée des travaux de Urstadt et coll, 1995 et repose en partie sur l'action de l'hypochlorite de sodium sur les micro-organismes du milieu (Figure 48). Cette étape permet d'oxyder sélectivement la biomasse et donc de la dissoudre dans la solution.

L'action de l'hypochlorite de sodium sur les micro-organismes est connu car c'est un agent anti-microbien très largement répandu (Radcliffe et coll., 2004 ; Shikanai-yasuda et coll., 1991). De plus, il est aussi utilisé pour l'extraction du PHB contenu dans les micro-organismes capables de le synthétiser associé à une extraction par le chloroforme (Williamson et coll., 1958). En solution l'hypochlorite de sodium se comporte suivant l'équation suivante :



Les différentes espèces ioniques formées peuvent réagir avec les acides gras ou les aminoacides des cellules suivant les réactions suivantes :



l'hypochlorite de sodium agit comme un solvant des acides gras contenus dans les parois membranaire des micro-organismes en les transformant en sels et glycérol. Cette réaction a pour conséquence de solubiliser les parois cellulaire et le contenu de la cellule est

libéré . L'acide hypochloreux présent dans la solution d'hypochlorite de sodium agit également sur les acides aminés des protéines de la cellule, provoquant leur neutralisation et leur hydrolyse par la formation de chloramine.

Nos échantillons à partir des prélèvements effectués sont donc traités comme suis : 4 grammes d'échantillons humides sont placés dans 40 ml d'une solution d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes. La solution est obtenue en mélangeant 100 ml d'hypochlorite de sodium contenant 13% de chlore actif (Sigma-Aldrich) avec 800 ml d'eau distillée. La solution est ensuite filtrée sur filtre acétate de cellulose de porosité 0,2 μ m (osmonics, USA). Le retentât est ensuite lavé et filtré sur le même filtre quatre fois avec de l'eau distillé. Le retentât est ensuite séché à l'étuve puis l'échantillon est placé dans un soxhlet pour extraire le PHB non dégradé pendant 3 jours. A la fin de l'extraction, le solvant contenu dans le ballon est évaporé à sec et le ballon est pesé pour connaître la masse de PHB extraite par différence avec la masse du ballon vide. Nous avons utilisé l'extraction au soxhlet car la PHB que nous avons utilisé n'est soluble dans le chloroforme froid. De plus cette méthode nous permet de récupérer le PHB dans le ballon utilisé pour l'extraction sans inclure d'étape de filtration supplémentaire.

Nous avons vérifié que le temps d'action et le volume de l'hypochlorite de sodium que nous avons utilisé étaient suffisant. Après 30 minutes dans 40 ml d'hypochlorite de sodium, 99,3% \pm 0,46 d'un échantillon de biomasse sèche est solubilisé (la biomasse a été obtenu par culture en milieu liquide à partir d'un extrait de compost, la masse utilisée est largement supérieure à la quantité que l'on peut trouver dans 4 grammes de milieu humide).

L'action de l'hypochlorite de sodium sur le PHB peut provoquer une réduction de la masse molaire (Urstadt et coll., 1995) mais les pertes de masses sont normalement très faibles. Nous avons vérifié cette hypothèse en mesurant la perte de masse sur un échantillon de PHB de masse connue après action de l'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes. La perte de masse que nous avons obtenu est de 2,83% \pm 0.3.

I.3.2 Calcul du bilan carbone

Comme pour le PLA, la première partie du protocole d'extraction permet de connaître la quantité de carbone contenue dans les composés solubles dans l'eau (C_d) ainsi que celle contenue dans la biomasse et le PHB non dégradé pour l'échantillon étudié (analyse élémentaire du culot R).

Date (jours)	Réacteur 1 (g)	Réacteur 2 (g)	Réacteur 3 (g)
0	175,88	175,88	175,88
2,8	191,00	190,98	190,92
18,5	190,09	190,08	189,69
31,75	189,67	189,68	189,20
45	189,20	189,38	188,74

Tableau 24 : Masse sèche corrigées de chaque réacteur pour le calcul du bilan carbone

L'extraction soxhlet permet de connaître la masse de PHB non dégradé contenue dans l'échantillon (C_{nd}) et la quantité de carbone dans la biomasse (C_b) est obtenu suivant la formule suivante :

$$C_b = R - C_{nd}$$

Les quantités obtenues pour chaque prélèvements sont ramenées à la masse sèche totale du milieu en utilisant les masses sèches corrigées du milieu au moment où les prélèvements sont effectués. (tableau 24).

II> RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Minéralisation du PHB

II.1.1 Dans le compost

La minéralisation du PHB dans le compost est immédiate et rapide, il n'y a pas de phase de latence notable et une phase plateau définitive est atteinte au bout de 10 jours pour un taux de minéralisation final de 62%. On observe quelques variations anormales du taux de minéralisation pendant la phase plateau (diminution de quelques %). Les écart-types observés sont relativement conséquents surtout lors de la phase plateau.

A la différence du PLA, pour lequel on observe une phase où l'activité de minéralisation est très faible jusqu'au jour 15 (cf. figure 49), le PHB peut être directement

dégradé par les enzymes synthétisées par les micro-organismes du compost, les souches capables de dégrader ce polymère à diverses températures étant assez largement représentées dans beaucoup de milieux naturels tels que le compost ou les sols (Tokiwa et coll., 2001 ; Jendrossek et coll., 1996). L'étape de dégradation abiotique du PLA déjà évoqué précédemment n'est donc pas nécessaire (cf. § XII.2.2.3.3.2), des travaux ont d'ailleurs montré la faible part des facteurs abiotiques du milieu dans le processus de biodégradation du PHB dans le compost (Eldsäter et coll., 1999).

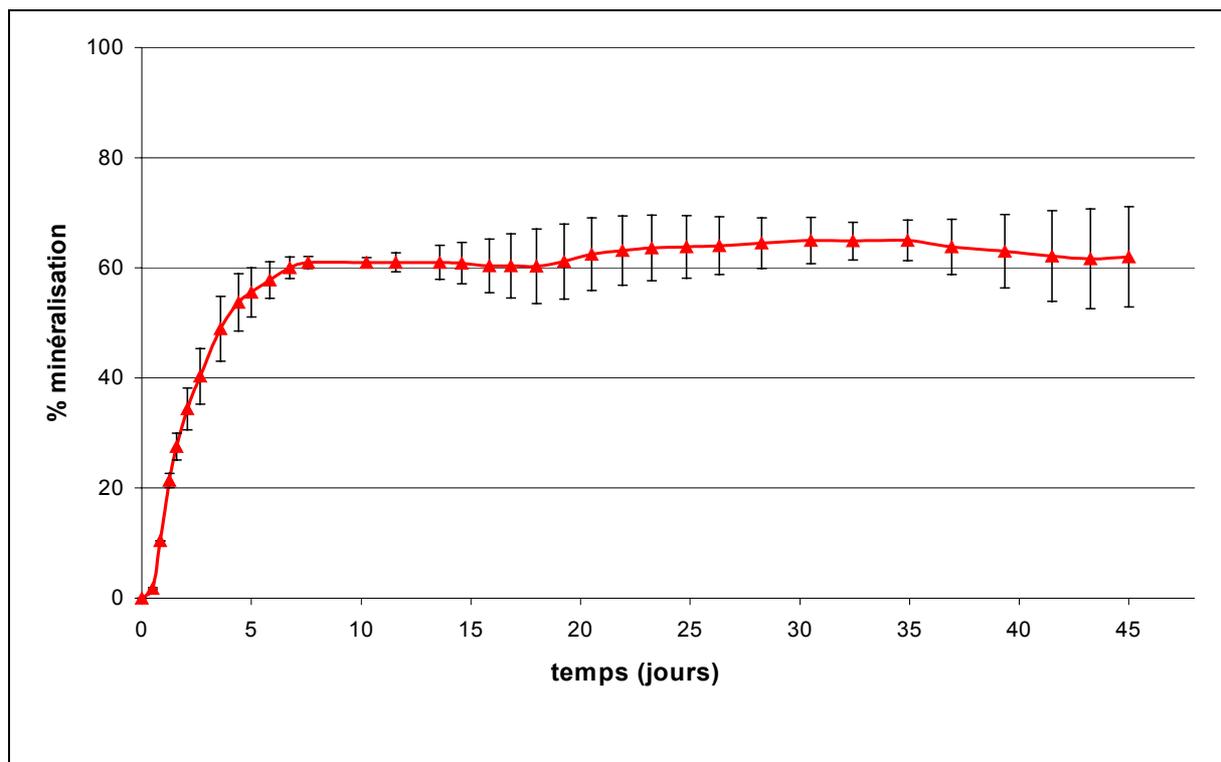


Figure 49 : Minéralisation du PHB dans le compost (les valeurs présentées sont la moyenne de valeurs obtenues sur trois répétitions).

Le taux de minéralisation obtenu en fin de test est du même ordre de grandeur que d'autres résultats de la littérature. Jung et coll., 1999 donne un taux de minéralisation d'environ 70 % dans un compost frais à 55°C pour un poly(β -hydroxyalcanoate) similaire contenant des unités β -hydroxyvalerates.

On note néanmoins que si le PHB est connu pour être un polymère facilement biodégradable, d'après nos résultats seulement 62% du carbone est minéralisé sous forme de CO₂ sans que l'on puisse attendre une minéralisation plus importante après 45 jours, car la phase plateau est déjà atteinte au bout de 10 jours. Ce matériau, d'après la norme ISO/CEN

14855 serait donc tout juste considéré comme effectivement biodégradable (le taux de minéralisation pour cette norme est fixé à 60% au bout de 45 jours).

Les quelques anomalies observées durant la phase plateau sont la conséquence du dégagement de CO₂ endogène du compost qui est très important. En effet, il est connu que l'ajout dans le compost d'une nouvelle source de carbone peut stimuler le métabolisme des composés carbonés du compost en même temps que la dégradation de ce composé (shen et coll, 1996). De ce fait, les réserves de carbone naturellement présentes s'épuise plus vite dans le compost utilisé pour le test que dans le compost utilisé pour le témoin qui nous donne le dégagement endogène de CO₂. En conséquence, en fin de test lorsque le substrat est épuisé, le dégagement de dioxyde de carbone du compost utilisé pour le test est plus faible que celui utilisé pour le témoin et le taux de minéralisation diminue anormalement.

II.1.2 En milieu solide inerte

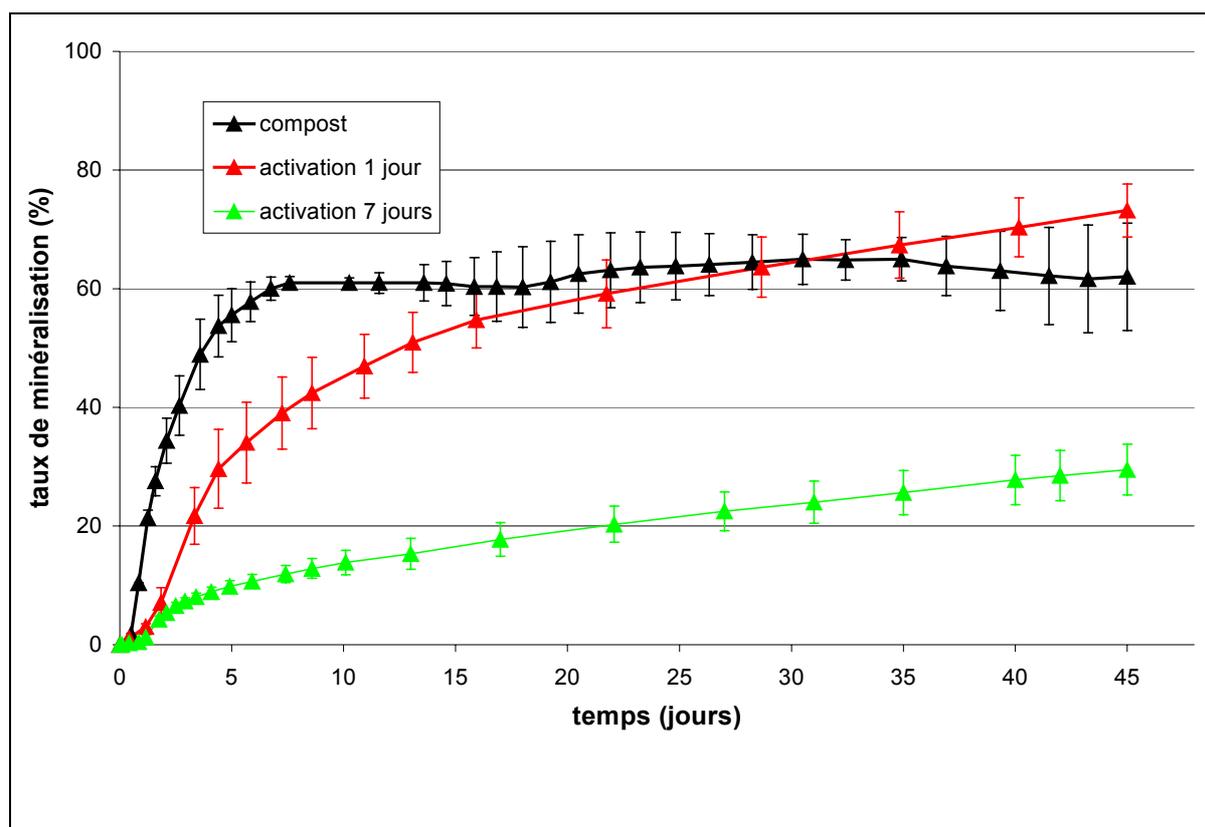


Figure 50 : Courbe de minéralisation du PHB en milieu solide inerte activé (pour les deux références de vermiculite) et dans le compost (valeurs obtenues pour 3 répétitions).

Pour une phase d'activation de 1 jour (Figure 50, courbe rouge), on voit que le taux de minéralisation du PHB augmente rapidement après une phase de latence toujours très courte. Dès le deuxième jour, la production de dioxyde carbone instantanée (Figure 51) augmente rapidement jusqu'à atteindre un pic à 6,2 mmoles au cours du jour 3. Comme dans le compost on a donc une minéralisation directe du substrat par les micro-organismes sans étape intermédiaire de réduction des longues chaînes de polymères.

A partir du cinquième jour, la minéralisation ralentit jusqu'au jour 20, la production instantanée de CO₂ (figure xx) diminue puis oscille faiblement autour des 0,3 mmoles au cours des 20 derniers jours du test. il n'y a donc pas de « réelle » phase plateau comme dans le compost et le taux de minéralisation continue d'augmenter faiblement mais régulièrement pour atteindre la valeur moyenne de 73,8 % en fin de test.

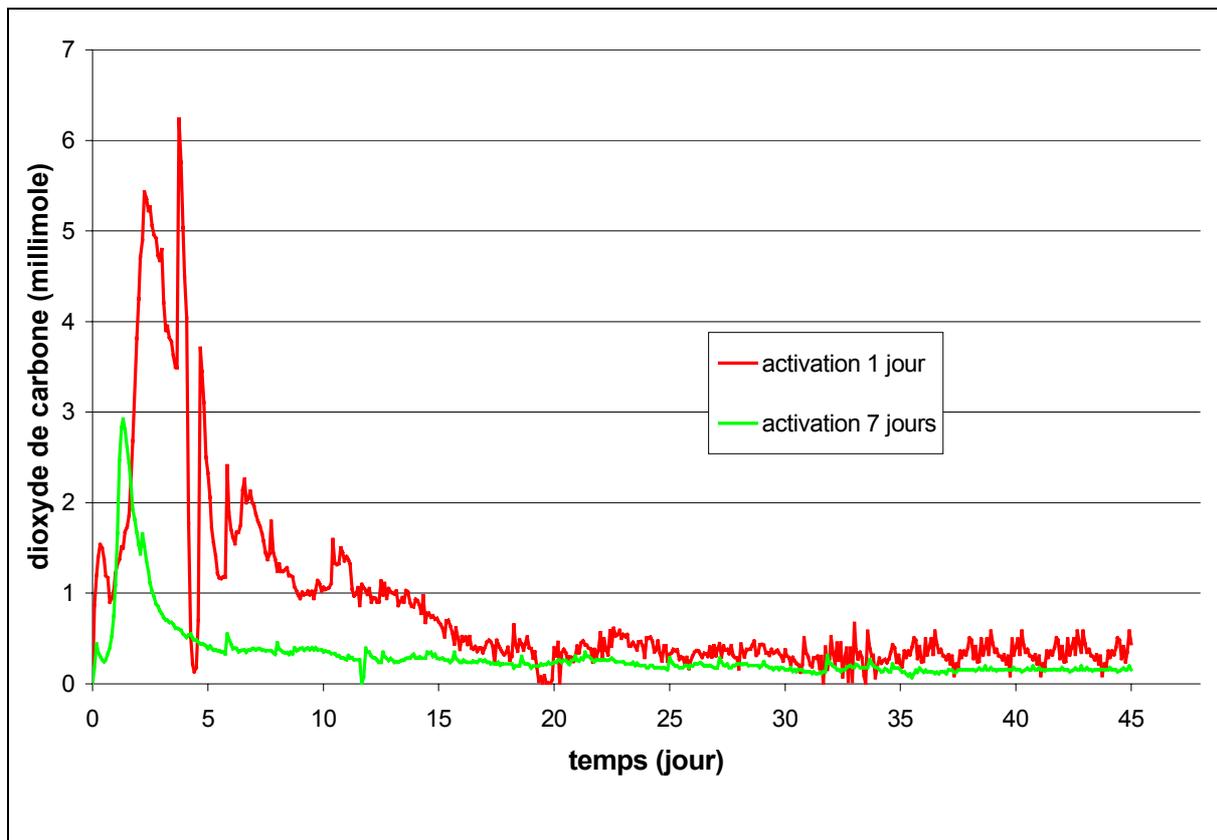


Figure 51 : Production instantanée de CO₂ durant la biodégradation du PHB en milieu solide inerte pour un réacteur (avec la vermiculite 1, un point toutes les 2 heures).

Le taux de minéralisation atteint en fin de test est du même ordre de grandeur que celui obtenu dans le compost (62 %). Cependant, d'après le profil de la courbe, il semble que

ce taux de minéralisation soit encore susceptible d'augmenter et on peut penser que tout le PHB introduit n'est pas encore été complètement dégradé. Ce décalage peut également être dû aux anomalies évoqués plus haut pour la minéralisation PHB dans le compost (cf. § XV.1.1). La phase plateau (après la phase de ralentissement pour le test en milieu vermiculite, à partir du jour 20), est atteinte moins rapidement que dans le compost (jour 8) ou la flore microbienne est sans doute encore plus importante que dans le milieu solide inerte malgré l'activation.

Pour une activation de 7 jours (figure 50, courbe verte), on ne constate pas non plus de phase de latence très prononcée, mais la phase de minéralisation intense que l'on observait après une activation de 1 jour, est beaucoup plus courte et beaucoup moins prononcée (cf. figure 51). Après une phase de ralentissement qui commence dès le deuxième jour, on observe, comme pour la courbe rouge (figure 50), une phase où le taux de minéralisation augmente lentement mais régulièrement jusqu'à atteindre la valeur finale de 29,5%. La production instantanée reste stable autour d'une valeur moyenne de 0,19 mmol (± 0.05) (courbe verte, figure 51).

Le taux de minéralisation obtenu est donc beaucoup plus faible que celui dans le compost, environ deux fois moins important. La durée de la phase d'activation a la même influence sur la minéralisation du PHB en milieu solide inerte que pour le PLA. Cependant la différence observée entre compost et vermiculite avec activation de 7 jours est moins importante pour le PHB que pour le PLA. Le PHB étant directement hydrolysable par les enzymes extracellulaires produit par les micro-organismes, il n'y a pas d'étapes de dégradation abiotique comme pour le PLA. Le substrat est donc disponible plus tôt et la flore microbienne souffre moins longtemps d'un manque de substrat.

II.2 Bilan carbone de la biodégradation du PHB

Le bilan carbone de la biodégradation du PHB a été réalisé lors du test avec une phase d'activation de 7 jours pour éviter qu'il soit perturbé par une quantité trop importante de carbone résiduel de la dose d'activation. Comme pour la réalisation du bilan carbone sur le PLA avec le protocole 3 les valeurs de biomasse ont été corrigées avec les analyses élémentaires et de carbone organique dissous réalisées sur un échantillon de milieu en fin de phase d'activation (cf. § XII.2.4.1).

Le proportion de carbone du PHB non dégradé (courbe rouge, figure 52) diminue rapidement dès le deuxième jour de test jusqu'à 27 % puis plus lentement jusqu'à 20 % en fin

de test. Cette disparition rapide du PHB correspond à une augmentation de la proportion de carbone incluse dans la biomasse (jusqu'à 77 %) pour ensuite redescendre à 20 % (courbe jaune, figure 52). Comme pour le PLA, le proportion de carbone contenu dans les composés solubles dans l'eau reste faible tout au long des 45 jours de test, la valeur la plus élevée est de 1,42 % au jour 2. On observe un léger excès sur la courbe du total du carbone recouvert (somme des 4 autres courbes, courbe verte, figure 52) lors du deuxième jour (111 %) puis ce total diminue régulièrement jusqu'à 71 % en fin de test.

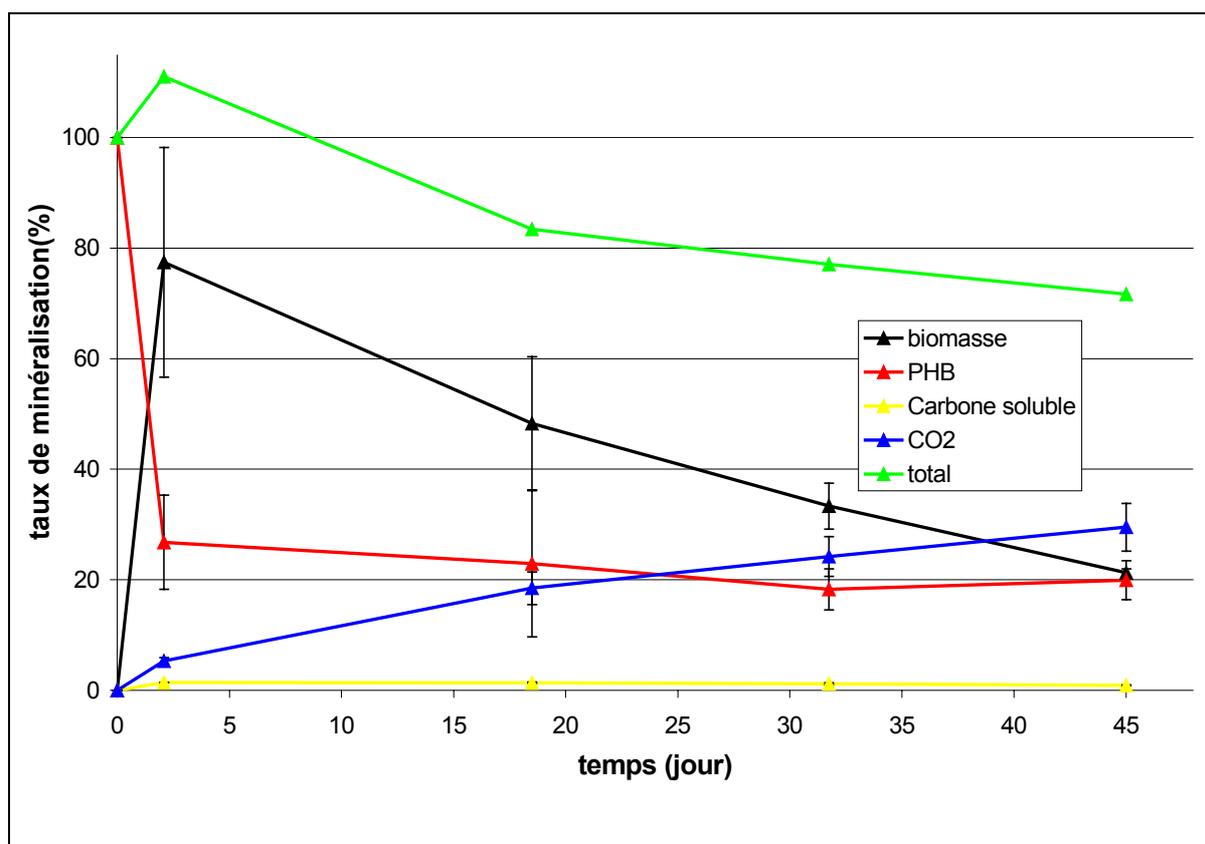


Figure 52 : Evolution du bilan carbone au cours de la biodégradation du PHB

Une diminution rapide de la proportion de carbone du PHB a déjà été observé pour la biodégradation du PHB en milieu liquide (Urstadt et coll., 1995). Les auteurs avaient observé un diminution de 90 % en 2 jours $\frac{1}{2}$ pour un test en présence d'une seule souche (*Acidovorax facilis*) et de 80 % en présence d'un extrait de compost toujours en milieu liquide. Nous obtenons donc des résultats du même ordre, dans notre cas le proportion de carbone du PHB non dégradé passant de 100 à 27% au cours des deux premiers jours du test en milieu solide inerte.

L'augmentation de la proportion de biomasse que l'on observe en début de test peut sembler surprenante, Les auteurs déjà cités n'observent jamais une augmentation de cette proportion supérieure à 20 % en milieu liquide, que ce soit avec la souche pure ou avec l'extrait de compost. Une surestimation de la proportion de biomasse peut provenir de deux étapes du protocole d'extraction que nous avons utilisé : la masse de carbone présente dans le culot R ou bien la quantification du PHB non dégradé par extraction au soxhlet (la quantité de biomasse étant obtenue par différence entre le carbone contenu dans le culot R et la quantité de PHB présente dans le même culot, cf. § XIV.3.2). La quantité de carbone contenue dans le culot R ne semble pas anormale car sinon on aurait un excès sur la courbe de total qui serait beaucoup plus important, hors ici il reste acceptable. De plus nous avons vérifié que l'extraction au soxhlet était suffisamment longue pour extraire le maximum de PHB qu'un échantillon de milieu peut contenir. Par contre, ce premier prélèvement a été effectué très tôt lors du test, le deuxième jour, période pendant laquelle l'activité microbienne de dégradation est la plus intense dans le milieu (dégagement de CO₂ très important, cf. figure 51, courbe verte). Ainsi les écarts importants qu'on observe pour la proportion de carbone de la biomasse au jour 2 montre qu'effectuer un prélèvement homogène représentatif de l'ensemble du milieu contenu dans le réacteur à ce moment là est sans doute difficile et ce malgré l'agitation. On peut supposer qu'il existe à ce moment là des endroits dans le réacteur où le PHB disparaît plus vite que d'autre et l'agitation effectuée ne suffit pas à le répartir uniformément dans le réacteur.

Les faibles valeurs observées pour la proportion de carbone organique dissous (courbe jaune) montre que, comme pour le PLA, les longues chaînes de polymères hydrolysées par les enzymes extra-cellulaires sont immédiatement consommées par les micro-organismes du milieu, on n'observe donc pas d'accumulation de composés solubles dans le milieu de dégradation.

Pour les prélèvements effectués sur les 20 derniers jours de test on constate que la courbe verte du total de carbone recouvré passe en dessous des 75 %. Nous avons toujours une surestimation en début de test mais elle reste acceptable, car elle ne dépasse pas les 15 %. Comme pour le protocole 3 avec le PLA (cf. § XII.2.4.1), l'écart par rapport aux 100 % théoriques est excessif sur la fin du test. La quantité de PHB présente dans le milieu à ce moment là est apparemment assez faible (plus que 20 % du carbone présent encore sous cette forme) et son extraction au soxhlet et surtout les nombreuses manipulations de l'échantillon qu'elle entraîne, sont peut être préjudiciables pour la précision du bilan carbone à la fin du test.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION GENERALE

Le but des travaux que nous avons effectués était de montrer l'intérêt des milieux solides inertes quand à la caractérisation de la biodégradation des polymères dans le compost. en simulant d'une part la biodégradation des matériaux dans le compost et d'autre part en établissant un bilan carbone par le calcul de chaque terme de celui-ci. Nous avons donc étudié les méthodologie à envisager séparer et extraire le carbone d'un polymère réparti dans les différents sous produits de dégradation afin de les quantifier. Cela doit permettre de connaître le destin ultime d'un polymère une fois qu'il est placé dans le compost ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors du processus de biodégradation.

Nous avons choisi d'utiliser le vermiculite comme support solide inerte. Dans un premier temps, l'amidon a été utilisé comme polymère biodégradable modèle pour appréhender facilement les paramètres importants de la biodégradation en milieu solide inerte. Afin de simuler au mieux la dégradation de l'amidon dans le compost, plusieurs milieux ont été testés en faisant varier deux paramètres importants :

- Le volume de lexiviat de compost qui sert d'inoculum microbien
- La composition de la dose d'activation

Les résultats ont montrés une différence manifeste de comportement entre les milieux activés et non activés. Le minéralisation de l'amidon est beaucoup plus rapide lorsque le milieu est activé et les taux de minéralisation atteints en fin de test sont généralement beaucoup plus élevés. Nous n'avons pas noté d'influence majeure du volume de lexiviat de compost sur la minéralisation de l'amidon. Il semble donc que la phase d'activation soit un éléments important pour obtenir un milieu solide inerte simulant correctement la comportement d'un polymère dans le compost.

Le profil de la courbe de minéralisation obtenu avec le milieu solide inerte activé avec la dose $\frac{1}{2}$ est particulièrement satisfaisant car il se rapproche en tout point de celui obtenu pour la biodégradation de l'amidon dans le compost. Les taux de conversion et les taux de minéralisation en phase plateau sont également très proches. Pour ce test de biodégradation, un bilan carbone a été établi par l'utilisation d'un protocole d'extraction/séparation du carbone contenu dans le milieu ainsi que des méthodes d'analyses simples.

Ce protocole nous a permis de suivre l'évolution des différentes fractions du bilan carbone de l'amidon au cours du test. L'amidon disparaît rapidement du milieu par hydrolyse

des longues chaînes provoquant une accumulation dans le milieu de composés solubles qui sont ensuite métabolisés par les micro-organismes, provoquant ainsi une augmentation de la proportion de carbone de l'amidon inclus dans la biomasse. Au bout de 8 jours, le taux de minéralisation reste stable, signifiant que tout l'amidon introduit a été dégradé. Si le total du carbone recouvré n'est pas toujours égal à 100 %, la précision est néanmoins satisfaisante pour observer le déroulement de la biodégradation de l'amidon dans le compost.

Ces premiers tests en milieu solide inerte avec un polymère biodégradable modèle, nous ont permis de faire un premier choix entre milieu solide inerte activé et non activé, le processus de biodégradation étant beaucoup plus intense dans le cas des milieux activés. L'utilisation de l'amidon comme polymère modèle nous préserve d'éventuels problèmes liés à la résistance du matériau au phénomènes abiotiques et biotiques de dégradation. Ainsi nous avons pu montrer qu'il était possible d'établir un bilan carbone pour la dégradation d'un polymère en milieu solide et ce en quantifiant chaque terme du bilan carbone. S'il existait de tels résultats pour des tests de biodégradation en milieu liquide, c'est à notre connaissance la première fois que ce type de résultats est obtenus en milieu solide et ce grâce à l'utilisation d'un milieu solide inerte activé. Les précédentes tentatives d'établissement de bilan carbone que l'on trouve dans la littérature ne déterminaient pas directement chaque terme du bilan. Le terme biomasse (compte tenu de la difficulté d'estimer la biomasse) était en général obtenu par différence entre le total théorique de carbone recouvré qui doit être égal à 100 % et la somme des trois autres termes estimés analytiquement.

Dans un deuxième temps nous avons appliqué la méthode mise au point avec l'amidon à l'étude de la biodégradation du PLA en milieu compost. Des tests de biodégradation préliminaires ont permis de choisir la dose d'activation adéquate pour simuler en milieu solide inerte la minéralisation du PLA dans le compost. Les profils des courbes obtenues sont moins satisfaisants que ceux de la biodégradation de l'amidon mais un taux de minéralisation de 60% a été atteint avec l'utilisation de la dose d'activation 1 et une phase d'activation de 1 jour. De plus, les résultats sont beaucoup plus homogènes et répétables en milieu solide inerte. En effet, les écart-types de 15 % que l'on observe habituellement pour la biodégradation d'un polymère synthétique dans le compost ont été considérablement réduits.

Les travaux concernant la mise au point de bilan carbone en milieu solide pour des polymères synthétiques étant très peu nombreux, nous avons tenté de mettre au point la méthodologie permettant d'extraire et séparer le carbone contenu dans les différents sous produits de dégradation. La principale difficultés réside dans la séparation du polymère non

dégradé de la biomasse présente dans le milieu. Le carbone contenu dans les composés soluble est facilement extrait du milieu et quantifié par analyse du carbone organique dissous.

Les différents protocoles utilisés ont permis la mise au point d'une méthode satisfaisante pour observer la disparition du PLA du milieu. Celle-ci est basée sur l'hydrolyse du PLA contenu dans le milieu par une solution de soude. L'acide lactique libéré est ensuite quantifié par électrophorèse capillaire, on peut ainsi revenir à la masse de PLA initialement présente dans le prélèvement.

Comme il n'est pas possible de séparer physiquement la biomasse du polymère non dégradé, l'analyse élémentaire du milieu après extraction des composés solubles permet de connaître la quantité de carbone présente dans le milieu sous la forme de biomasse et de PLA. Connaissant la quantité de carbone encore sous la forme de PLA nous avons donc pu calculer le terme du bilan correspondant à la biomasse.

Le bilan carbone de la biodégradation du PLA avec le protocole 3 donne des résultats encourageants mais la précision doit encore en être améliorée. Ainsi nous avons pu noter que la phase d'activation et la masse des échantillons sur lesquels sont réalisés les analyses ont une importance primordiale :

- L'allongement de la phase d'activation a permis d'améliorer la précision des bilans carbone. De cette manière, la quantité de carbone résiduel (issus de la dose d'activation) est réduite et induira d'autant moins d'erreur sur le calcul du bilan. Cependant on sait que l'allongement de la phase d'activation a aussi pour conséquence de réduire le taux de minéralisation. La simulation de la minéralisation du PLA dans le compost est donc moins bonne.
- La masse des échantillons pour les analyses doit être suffisante pour être représentative de l'ensemble du réacteur ou à lieu le test. Nous avons montré que l'augmentation de la masse des prélèvements permet une amélioration de la répétabilité des résultats.

L'extraction du PLA avec le chloroforme ne permet pas de le quantifier de manière satisfaisante mais il est possible de suivre l'évolution de la masse molaire moyenne du polymère résiduel ainsi que sa température de transition vitreuse. Ainsi nous avons mis en évidence les phénomènes de dégradation abiotiques que le PLA subit avant de pouvoir être minéralisé par les micro-organismes. Ce mode de biodégradation particulier n'avait jusqu'à présent été mis en évidence qu'en milieu liquide. La modification de la structure du polymère

avait déjà été observé en milieu solide mais pour des échantillons de format beaucoup plus important afin que le PLA puisse être prélevé dans le milieu. De ce fait la dégradation abiotique du PLA n'avait pas pu être mis en parallèle avec le taux de minéralisation, la minéralisation de gros fragments de PLA en milieu solide étant très faible. L'utilisation d'un milieu solide inerte a donc permis de dégrader le PLA sous forme de poudre (pour permettre une minéralisation suffisante) et de l'extraire du milieu avec un solvant organique adéquate.

Nous avons observé pour la minéralisation du PHB le même effet du à l'allongement de la phase d'activation que pour le PLA. Une méthode a également été proposée pour établir un bilan carbone de la biodégradation du PHB en milieu solide inerte simulant le compost. Le PHB étant résistant à l'hydrolyse en solution alcaline, nous avons choisi de l'extraire du milieu par extraction Soxhlet après avoir solubiliser la biomasse par oxydation sélective dans l'hypochlorite de sodium. La proportion de carbone comprise dans les composés solubles est toujours déterminée par analyse du carbone organique dissous après homogénéisation d'un échantillon de milieu dans le liquide Ringer.

Le protocole utilisé montre une dégradation rapide du PHB par les micro-organismes du milieu. La proportion de carbone dans les sous produits de dégradation solubles reste faible tout au long du test. La proportion de carbone inclus dans la biomasse semble excessive particulièrement en début de test. Le protocole d'extraction du PHB n'a pas encore été optimisé mais peut être une alternative intéressante pour extraire et séparer le carbone pour la biodégradation de polymère qui, comme le PHB, sont résistants aux hydrolyses et pour lesquels on ne peut pas utiliser la même méthodologie que pour le PLA.

Suite au travaux sur l'amidon, le PLA et le PHB on peut voir que le protocole d'extraction sera devra donc être sélectif de chaque polymère en fonction de ses propriétés physico-chimiques. Soit le polymère peut être dépolymérisé facilement et on pourra doser le monomère constitutif ou alors ce n'est pas possible et il faut passer par une étape d'oxydation de la biomasse avant d'extraire le polymère avec un solvant adapté.

PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis de mettre en évidence les potentialités des milieux solides inertes quand à la simulation de la minéralisation des polymères dans le compost. Nous avons pu montrer que la répétabilité des résultats est bien meilleure que dans le compost. Nous pourrions maintenant comparer la minéralisation du même substrat dans des milieux solides inertes qui ont été inoculés avec des lexiviats préparés à partir de composts d'origines différentes. Il serait très intéressant de montrer qu'un test de biodégradation en milieu solide inerte est indépendant de l'origine géographique du compost ou de la nature des déchets qui le composent. C'est une perspective intéressante dans l'optique d'une normalisation de ce type de test.

Nous avons également abordé pour la première fois la méthodologie nécessaire à l'établissement de bilan carbone en milieu solide inerte pour des polymères synthétiques. Pour nos travaux, nous avons voulu suivre l'évolution du bilan carbone au cours du test, et nous avons vu qu'il peut être difficile de connaître la répartition du carbone dans le milieu lors des premiers jours d'un test de biodégradation. Cependant, l'objectif principal de ces protocoles d'extraction reste le bilan carbone du polymère en fin de test de biodégradation et nous avons vu que c'est la que nous obtenons les meilleurs résultats. Néanmoins la précision des bilans carbone que nous avons obtenu peut sans doute améliorer en optimisant certains paramètres qui sont apparus comme primordiaux :

- Tout d'abord il serait important de mieux caractériser le milieu en fin de phase d'activation afin de pouvoir quantifier la biomasse formée et éventuellement de le carbone qui n'a pas été dégradé. De plus si une phase d'activation plus longue réduit cette quantité de carbone résiduel, elle a aussi pour conséquence de diminuer la minéralisation du PLA. De ce fait le premier objectif du test en milieu solide inerte, qui est de simuler la minéralisation dans le compost, n'est pas atteint. Des efforts devront donc être faits pour déterminer le compromis au niveau de la quantité de carbone introduit et de la durée de la phase d'activation pour obtenir une minéralisation satisfaisante sans que cela n'ait de conséquence sur la qualité du bilan carbone.
- Pour améliorer la répétabilité des résultats et la représentativité des prélèvements, nous pensons qu'il serait intéressant d'augmenter la masse des échantillons sur

lesquels sont appliqués les protocoles d'extraction. De plus, nous avons utilisés une quantité arbitraire de 7,7 grammes de carbone contenu dans le substrat test. Nous pensons que doubler ou tripler cette quantité permettrait d'une part de négliger la carbone résiduel de la phase d'activation et d'autre part de travailler sur une quantité de carbone plus importante et mieux réparti dans le réacteur.

Après ces travaux complémentaires visant à finaliser la méthodologie, les tests en milieu solide inerte peuvent devenir un outil de mesure particulièrement efficace en raison du caractère synthétique de ces milieux. En effet, les paramètres de biodégradation sont modifiables à volonté et on peut donc reproduire les paramètres physico-chimiques d'un compost ou d'un sol particulier. Il est donc possible d'étudier l'influence d'un facteur limitant ou également d'orienter la synthèse et la structure d'un nouveau matériau en fonction du type de milieu ou l'on souhaitera le voir disparaître.

Il serait également intéressant d'observer la biodégradation d'un polymère dans un milieu solide inerte ou un test similaire a déjà eu lieu, ou d'utiliser un inoculum microbien obtenu à partir de ce milieu. On pourrait observer si il n'y a pas de phénomène d'adaptation de la part de la flore microbienne, ce qui donnerait une meilleur minéralisation du polymère utilisé.

Ces milieux peuvent également faciliter l'étude des polymères dont la biodégradabilité est particulièrement faible ou est encore sujet à désaccord. Il est possible de mettre en évidence une éventuelle minéralisation très faible, alors que dans le compost le dégagement endogène du milieu peut la cacher. De plus, Il est possible avec ce type de milieu (nous l'avons montré avec le PLA) d'extraire la polymère non dégradé à condition de trouver un solvant adéquate. On peut donc mettre en évidence, si la minéralisation est trop faible, une dégradation du au facteurs abiotiques du milieu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agarwal, M. ; Koelling, K. W. ; Chalmers, J. J. ; Characterization of the degradation of polylactic acid polymer in a solid substrate environment. *Biotechnologies Progress* **1998**, vol. 14, 517-526.

Ahn, B. D.; Kim, S. H., Kim, Y. H., Yang, J. S.; synthesis and characterization of the biodegradable copolymers from succinic acid and adipic acid with 1,4-butanediol. *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, vol. 82, 2808-2826.

Albertsson, A-C.; Varma, I. K. ; Aliphatic polyesters: synthesis, properties and applications. *Advances in Polymer Science* **2002**, vol. 157 (Degradable Aliphatic Polyesters), 1-40.

Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B.; A review of biodegradable polymers: Uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, **1998**, vol. 47, 89-144.

American Standard ASTM D-5338-92 Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions. *Annual book of ASTM standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa*, **1994**, vol. 8(3), 406-411.

Avella, M. ; La Rota, G. ; Martuscelli, E. ; Raimo, M. ; Sadocco, P. ; Elegir, G. ; Riva, R. ; Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and wheat straw fibre composites : thermal, mechanical properties and biodegradation behaviour. *Journal of materials science* **2000**, vol. 25, 829-836.

Bellia, G. ; Tosin, M. ; Floridi, G. ; Degli-innocenti, F. ; Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions. *Polymer degradation and stability* **1999**, vol. 66, 65-79.

Bellia, G. ; Tosin, M. ; Degli-innocenti, F. ; The test method of composting in vermiculite is not affected by the priming effect. *Polymer degradation and stability* **2000**, vol. 69, 113-120.

Bonhomme, S.; Cuer, A.; Delort, A-M.; Lemaire, J.; Sancelme, M.; Scott, G.; Environmental degradation of polyethylene. *Polymer degradation and stability* **2003**, vol.81(3), 441-452.

Botines, E.; Rodriguez-Galan, A.; Puiggali, J.; Poly(ester amide)s derived from 1,4-butanediol, adipic acid and 1,6-amidohexanoic acid : characterization and degradation studies. *Polymer* **2002**, vol.43, 6073-6084.

Braud, C.; Capillary zone electrophoresis as a tool to monitor the last stages of the degradation of water-sensitive polymers. *Journal of biomaterials science, Polymers Edition* **2004**, vol.15(4), 423-447.

Calmon, A.; Silvestre, F.; Bellon-Maurel, V.; Roger, J-M.; Feuilloley, P.; Modelling easily biodegradability of materials in liquid medium – relationship between structure and biodegradability. *Journal of environmental polymer degradation* **1999**, vol. 7(3), 135-144.

Calmon, A.; Dusserre-Bresson, L.; Bellon-Maurel, V.; Feuilloley, P.; Silvestre, F.; An automated test for measuring polymer biodegradation. *Chemosphere* **2000**, vol. 40, 645-651.

Clamon-Decriaud, A.; Bellon-Maurel, V.; Sylvestre, F.; Standards methods for testing the aerobic biodegradation of polymeric materials. Review and perspectives. *Advances in Polymer Science*, **1998**, vol.135, 207-226.

Chiellini, E.; Corti, A.; Solaro, R.; Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based blown films under different environmental conditions. *Polymer degradation and stability* **1999**, vol. 64, 305-312.

Chiellini, E.; Corti, A.; Politi, B.; Solaro, R.; Adsorption/desorption of polyvinyl alcohol on solid substrates and relevant biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment* **2000**, vol.8(2), 67-69.

Day, M.; Shaw, K.; Cooney, D.; Watts, J.; Harrigan, B.; Degradable polymers : the role of the degradation environment. *Journal of Environmental Polymer degradation* **1997**, vol. 5(3), 137-150.

Degli-innocenti, F. ; Tosin, M. ; Bastioli, C. ; Evaluation of the biodegradation of Starch and cellulose under controlled composting conditions. *Journal of Environmental Polymer degradation* **1998**, vol. 6(4), 197-202.

Degli-innocenti, F. ; Bellia, G. ; Tosin, M. ; Kapanen, A. ; Itävaara, M. ; Detection of toxicity released by biodegradable plastics after composting in activated vermiculite. *Polymer degradation and stability* **2001**, vol. 73, 101-106.

De Oliveira, A.; Tanchette, J-B. ; La valorisation des emballages biodégradable par le compostage. Rapport de projet tutoré, licence « agrotechniques végétales », université de Reims Champagne-Ardennes, **2004**

Doi, Y.; Kanesawa, Y.; Kunioka, M.; Biodegradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **1990**, vol.23, 26-31

Dupret, I. ; David, C. ; Daro, A. ; Biodegradation of polyester-amides using a pure strain of micro-organisms or papain, I Model compounds. *Polymer degradation and stability* **2000**, vol. 67, 497-504.

Dupret, I. ; David, C. ; Daro, A. ; Biodegradation of polyester-amides using a pure strain of micro-organisms or papain, II Polymer. *Polymer degradation and stability* **2000**, vol. 67, 505-513.

Eldsäter, C. ; Karlsson. S. ; Albertsson, A-C. ; effect of abiotic factors on the degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in simulated and natural composting environments. *Polymer degradation and stability* **1999**, vol. 64, 177-183.

Eldsäter, C. ; Erlandsson, B. ; Renstadt, R. ; Albertsson, A-C. ; Karlsson, S. ; the biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown polycaprolactone. *Polymer* **2000**, vol. 41, 1297-1304.

Fambri, L.; Migliaresi, C.; Kesenci, K.; Piskin, E.; Biodegradable polymers

Farrel, R. E. ; Adamczyk, T. J. ; Broe, D. C. ; Lee, J. S. ; Briggs, B. L. ; Gross, R. A. ; McCarthy, S. P. ; Goodwin, S. ; Biodegradable bags comparative performance study : a multi-tired approach to evaluating the compatibility of plastic materials. *ACS Symp. Ser* **2001**, 786 (biopolymers from polysaccharides and agroproteins).

Garlotta, D.; A litterature review of poly(lactic acid), *Journal of polymer and the environment* **2002**, vol. 9(2), 63-84.

Gattin, R. ; Poulet, C. ; Copinet, A. ; Couturier, Y. ; Comparison of minéralization of starch in liquid, inert solid and compost media according to ASTM and CEN norms for the composting of packaging materials. *Biotechnology letters* **2000**, vol. 22, 1471-1475.

Gattin, R. ; Copinet, A. ; Bertrand, C. ;Couturier, Y. ; Biodegradation study of a starch and poly(lactic acid) co-extruded material in liquid, composting and inert mineral media. *International biodeterioration & biodegradation* **2002**, vol. 50, 25-31.

Ghorpade, V. M.; Gennadios, A.; Hanna, M. A.; Laboratory composting of extruded poly(lactic acid) sheets. *Bioresource Technology* **2001**, vol. 76, 57-61.

Grigat, E.; Koch, R.; Timmermann, R.; BAK 1095 and BAK 2195: completely biodegradable synthetic thermoplastics. *Polymer Degradation and Stability* **1998**, vol. 59(1-3), 223-226.

Grima, S.; Biodégradation de matériaux polymères à usage agricole : Etude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental. *Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse*, **2002**.

Grima, S.; Bellon-Maurel, V.; Feuilloley, P.; Silvestre, F.; Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: A review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations. *Journal of Polymers and the Environment*, **2000**, vol.8(4), 183-195.

Grima, S.; Bellon-Maurel, V.; Silvestre, F.; Feuilloley, P.; A new test method for determining biodegradation of plastic material under controlled aerobic conditions in soil-simulation solid environment. *Journal of Polymers and the Environment*, **2002**, vol.9(1), 39-48.

Grizzi, I.; Garreau, H.; Li, S.; Vert, M. ; Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependance. *Biomaterials*, **1995**, vol.16(4), 305-311.

Gross, R.A.; Kalra, B.; Biodegradable polymers for the environment. *Science*, **2002**, vol.297(5582), 803-807.

Gu, J-D.; Eberiel, D.T.; McCarthy, S.P.; Gross, R.A.; Cellulose acetate biodegradability upon exposure to simulated aerobic composting and anaerobic bioreactor environments. *Journal of Environment Polymer Degradation.*, 1993, vol. 1(2), 143-153.

Hakkarainen, M.; Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products. *Advances in Polymer Science* **2002**, vol.157(Degradable Aliphatic Polyesters), 113-138.

Ho, K.-L. G. ; Pometto, A. L. ; Temperature effects on soil mineralization of poly (lactic acid) in laboratory respirometers. *Journal of Environmental Polymer degradation* **1999**, vol. 7, 101-107.

Hocking, P. J.; The classification, preparation and utility of degradable polymers. *J.M.S. REV. MACROMOL. CHEM. PHYS.*, **1992**, vol. C32 (1), 35-54.

International Standard ISO/CEN 14855. Plastics. Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of plastic material under controlled composting conditions. Method by analysis of released carbon dioxide. **1998**.

Itävaara, M. ; Vikman, M.; An overview of methods for biodegradability testing of biopolymers and packaging materials. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 1996, vol. 4(1), 29-36

Itävaara, M. ; Karjomaa, S. ; Selin, J.-F. ; Biodegradation of polylactide in aerobic and anaerobic thermophilic conditions. *Chemosphere* **2002**, vol. 46, 879-885.

Jakubowicz, I.; Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). *Polymer degradation and stability*, **2003**, vol. 80(4), 39-43.

Jayasekara, R.; Lonergan, G. T.; Harding, I.; Bowater, I.; Halley, P.; Christie, G. B.; An automated multi-unit composting facility for biodegradability evaluations. *Journal of chemical technology and biotechnology*, **2001**, vol. 76, 411-417.

Jendrossek, D.; Schirmer, A.; Schlegel, H.G.; Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1996**, vol. 46 (5/6), 451-463.

Jung, Eun Joo ; Pyong Kyun Shin ; Hee Kyung Bae ; Effects of temperature and compost conditions on the biodegradation of degradable polymers. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1999**, vol. 9(4), 464-468.

Kleeberg, I.; Hertz, C.; Kroppenstedt, R.M.; Müller, R-J.; Deckwer, W-D.; Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by thermomonospora fusca and other thermophilic compost isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **1998**, vol. 64(5), 1731-1735.

Kim, Y. D. ; Kim, S. C. ; Effect of chemical structure on the degradation of polyurethanes under composting conditions. *Polymer degradation and stability*, **1998**, vol. 62, 343-352.

Lenz, R. W.; Biodegradable polymers. *Advances in Polymer Science*, **1993**, vol. 107, 1-40.

Li, S. M.; Garreau, H.; Vert, M.; Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxyacids) in aqueous media, part 3 Influence of the morphology of poly(L-lactic acid). *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, **1990**, 198-206.

Li, S. M.; Vert, M.; Biodegradation of aliphatic polyesters. *In Degradable Polymers: Principles and Application*, Scott G. and Gilead D. (eds), Chapman & Hall **1995**, 44-87.

Li, S. M.; Mc Carthy, S.; Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials*, **1999**, vol. 20, 35-44.

Li, S. M.; Girard, A.; Garreau, H.; Vert, M.; Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant D-lactyl contents. *Polymer degradation and stability* **2001**, vol. 71, 61-67.

Lindblad, M.S. ; Liu, Y. ; Albertsson, A-C.; Ranucci, E.; Karlsson, S.; Polymers from renewable resources

Lindström, A.; Albertsson, A-C.; Hakkarainen, M.; Quantitative determination of degradation products an effective means to study early stage of degradation in linear and branched poly(butylene adipate) and poly(butylene succinate). *Polymer degradation and stability* **2004**, vol.83, 487-493.

Longieras, A.; Copinet, A.; Bureau, G. ; Tighzert, L. ; An inert solid medium for simulation of material biodegradation in compost and achievement of carbon balance. *Polymer degradation and stability* **2004**, vol. 83(2), 187-194.

Luo, S.; Netravali, A.N.; A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. *Polymer degradation and stability* **2003**, vol. 80(1), 59-66.

Manna, A. ; Paul, A.K. ; degradation of microbial polyester poly(3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture. *Biodegradation* **2000**, vol. 11, 323-329.

Mergaert, J. ; Anderson, C. ; Wouters, A. ; Swings, J. ; Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost. *Journal of Environmental Polymer degradation*, **1994**, vol. 2(3), 177-183.

Mergaert, J. ; Anderson, C. ; Wouters, A. ; Swings, J. ; Kersters, K. ; Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS microbiology reviews* **1992**, 317-322.

Mohanty, A.K.; Mishra, M.; Hinrichsen, H.; Biofibres, Biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromolecules Materials and Engineering* **2000**, vol. 276/277, 1-24.

Müller, R.-J. ; Kleeberg, I. ; Deckwer, W.-D. ; Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of biotechnology* **2000**, vol. 86, 87-95.

Müller, R.-J. ; Biodegradability of polymers: Regulations and Methods for testing
.....

Nere, C.K.; Jagtap, R-N; Biodegradable polymers – latest developments. *Popular Plastics & Packaging* **2001**, July, 57-68

Nishide, H. ; Toyota, K. ; Kimura, M. ; Effects of soil temperature and anaerobiosis on degradation of biodegradable plastics in soil and their degrading microorganisms. *Soil Sci. Plant Nutr.* **1999**, vol. 45(1), 963-972.

Nishioka, M. ; Tuzuki, T. ; Wanajyo, Y. ; Oonami, H. ; Horiuchi, T. ; Biodegradation of Bionolle. *Biodegradable plastics and polymers* **1994**, 584-590.

Othaki, A. ; Akakura, N. ; Nakasaki, K. ; Effects of temperature and inoculum on the degradability of polycaprolactone during composting. *Polymer degradation and stability* **1998**, vol. 62, 279-284.

Othaki, A. ; Nakasaki, K. ; Comparison of the weight-loss degradability of various kind of biodegradable plastics under laboratory composting conditions. *Journal of material cycles and waste management* **2000**, vol. 2, 118-124.

Othaki, A. ; Nakasaki, K. ; Ultimate degradability of various kind of biodegradable plastics under controlled composting conditions. *Waste Manage. Res.* **2000**, vol. 18, 184-189.

Pagga, U.; Biodegradability and compostability of polymeric materials in the context of the European packaging regulation. *Polymer degradation and stability* **1998**, vol. 59, 371-376.

Pagga, U. ; Beimborn, D.B.; Yamamoto, M.; Biodegradability and compostability of polymers-test methods and criteria for evaluation. *Journal of Environmental Polymer degradation*, **1996**, vol. 4(3), 173-178.

Pagga, U. ; Schafer, A. ; Muller, R.-J. ; Pantke, M. ; Determination of the biodegradability of polymeric material in aquatic batch tests. *Chemosphere* **2001**, vol. 42, 319-331.

Poliakoff, M.; Fitzpatrick, J.M.; Farren, T.R.; Anastas, P.T.; Green chemistry: Science and politics of change. *Science*, **2002**, vol.297(5582), 807-810.

Ponsart, S.; Coudane, J.; Saulnier, B.; Morgat, J-L.; Vert, M.; Biodegradation on [³H]poly(ε-caprolactone) in the presence of active sludge extracts. *Biomacromolecules*, **2001**, vol. 2, 373-377.

Rowe, L.; Howard, G.T.; Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethane-lipase enzyme. *International biodeterioration and biodegradation*, **2002**, vol.50(2), 33-40.

Rutkowska, M.; Krasowska, K.; Heimowska, A.; Smiechowska, M.; Janik, H.; The influence of different processing additives on biodegradation of poly(ε-caprolactone). *Iranian polymer journal* **2000**, vol. 9, 221-227.

Siparsky, G. L.; Voorhees, K. J.; Miao, F.; Hydrolysis of polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) in aqueous acetonitrile solutions: Autocatalysis. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, **1998**, vol. 6(1), 31-41.

Shen, J.; Bartha, R.; Priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation tests. *Applied Environmental Microbiology*, **1996**, vol. 62(4), 1428-.

Solaro, R.; Corti, A.; Chiellini, E.; A new respirometric test simulating soil burial conditions for evaluation of polymer biodegradation. *Journal of Environmental Polymer degradation* **1998**, vol. 6(4), 203-208.

Spitzer, B.; Menner, M.; Simulation of a compost environment in a mono-substrate fixed-bed system. *DECHEMA Monographs* **1996**, vol. 113, 681-688.

Spitzer, B.; Mende, C.; Menner, M.; Luck, T.; Calculation of carbon balances for evaluation of the biodegradability of polymers. *Journal of Environmental Polymer degradation*, **1995**, vol.3(3), 121-131.

Starnecker, A. ; Menner, M. ; Assessment of biodegradability of plastics under simulated composting conditions in a laboratory test system. *International Biodeterioration & biodegradation*, **1996**, 85-92.

Teeraphatpornchai, T. ; Nakajima-Kambe, T. ; Shigeno-Akutsu, Y. ; Nakayama, M. ; Nomura, N. ; Nakahara, T. ; Uchiyama, H. ; Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnology letters*, **2003**, vol. 25, 23-28.

Tiwari, M.; Verma, S.S.; Starch based biodegradable polymers. *Popular plastics and packaging*, **2002**, octobre, 83-84.

Tokiwa, Y.; Pranamuda, H.; Microbial degradation of aliphatic polyesters. *Biopolymers*, **2001**, vol.3(b), 85-103.

Torres, A. ; Li, S. M. ; Roussos, S. ; Vert, M. ; Degradation of L-lactic acid and DL-lactic acid oligomers in the presence of fusarium moniliforme and pseudomonas putida. *Journal of Environmental Polymer degradation* ,**1996** vol.4(4), 213-223.

Torres, A. ; Li, S. M. ; Roussos, S. ; Vert, M. ; Screenin of microorganisms for biodegradation of poly (lactic acid) and lactic acid-containing polymers. *Applied and Environmental Microbiology*, **1996**, vol.62(7), 2393-2397.

Tosin, M. ; Degli-innocenti, F. ; Bastioli, C. ; Effect of the composting substrate on biodegradation of solid materials under controlled composting conditions. *Journal of Environmental Polymer degradation*, **1996**, vol. 4(1), 55-63.

Tosin, M. ; Degli-innocenti, F. ; Bastioli, C. ; Detection of a toxic product released by a polyurethane-containing film using a composting film using a composting test method based on a mineral bed. *Journal of Environmental Polymer degradation* **1998**, vol. 6(2), 79-90.

Urstadt, S.; Augusta, J.; Müller, R.-J.; Deckwer, W.-D.; Calculation of carbon balances for evaluation of the biodegradability of polymers. *Journal of Environmental Polymer degradation*, **1995**, vol. 3(3), 121-131.

Vert, M.; Dos Santos I.; Ponsart S.; Alauzet N.; Morgat J.L.; Coudane J.; Garreau H.; Degradable polymers in a living environment: Where do you end up? *Polymer International*, **2002**, vol. 51, 840-844.