

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE Présentée par
M^{lle} MEDJEBER NACERA
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES
Option : Microbiologie appliquée et moléculaire

Thème

**Isolement, Identification et production des
Polyhydroxyalcanoates (PHAs) chez le genre *Bacillus*.**

Soutenu Devant le Jury

Président :

Mr. BENALI Mohamed

Professeur, Université de Sidi Bel Abbès

Examineurs :

Mr. BELABID Lakhdar

Professeur, Université de Mascara

Mr. ABDELOUWAHED Djamel Eddienne

Professeur, Université de Tlemcen

Mr. BACHIR RAHOU Ghalem

MCA, Université de Mascara

Directeur de thèse :

Mr. ABBOUNI Bouziane

Professeur, Université de Sidi Bel Abbès

Année universitaire 2015/2016

Table des Matières

Table des Matières

Remerciements

Résumé
Liste d'abréviation
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction I

Synthèse Bibliographique

I. Les *Bacelliaceae*

I.1. Historique.....	01
I.2. Classification.....	01
I.3. Ecologie.....	03
I.4. Caractères Bactériologiques.....	04
I.5. Opéron ribosomal.....	05
I.5.1. Le gène 16S.....	05
I.5.2. Le gène 23S	05
I.5.3. Le gène 5S.....	06
I.5.4. Les régions inter génique (ITS).....	06
I.6. Certaines espèces du genre <i>Bacillus</i>	06
I.6.1. <i>Bacillus subtilis</i>	06
I.6.2. <i>Bacillus licheniformis</i>	07
I.6.3. <i>Bacillus cereus</i>	07
I.6.4. <i>Bacillus anthracis</i>	07
I.6.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>	08
I.6.6. <i>Bacillus megaterium</i>	08
I.6.6.1 Historique.....	08
I.6.6.2. Les applications de <i>B. megaterium</i>	09

II. Déchets agroalimentaires.....

II.1. Généralité	10
II.2. Définition des déchets.....	10
II.3. Classification des déchets	11
II.4. Intérêt de la valorisation des déchets	11
II.4.1. Intérêt économique	11
II.4.2. Intérêt	11

environnementaux

Table des Matières

II.4.3. Intérêt Sociaux	12
II.5. Différents déchets agroalimentaires	12
II.6. Déchets utilisés pour la production des PHAs	12
II.6.1 Rebut de datte.....	13
II.6.1.1. Définition.....	13
II.6.1.2. Composition biochimique de la pulpe	14
II.6.1.3. Mise en valeur des déchets.....	15
II.6.2. Les mélasses.....	17
II.6.2.1. Compostions des mélasses.....	17
II.6.2.2. Différents types de mélasse.....	18
II.6.2.3. Utilisation des mélasses	20
III. Les Polyhydroxyalcanoates	20
III.1 Généralité.....	20
III.2. Historique et la découverte des Polyhydroxyalcanoates	21
III.3. Définition.....	22
III.4. Structure des PHAs	22
III.5. Caractéristiques des PHAs.....	24
III.6. Production des PHA par fermentation bactérienne.....	25
III.7. Biosynthèse des PHAs.....	26
III.8. Les gènes et les enzymes essentiels pour la formation de PHA	27
III.9. Méthodes d'extraction et de récupération de PHA	29
III.9.1. Extractions par solvants	30
III.9.1.1. Extractions par solvants sans chauffage.....	30
III.9.1.2. Extractions par solvants avec chauffage.....	31
III.9.2. Méthodes de rupture de la membrane plasmique	31
III.9.2.1. Rupture mécanique	31
III.9.2.2. Digestion chimique	31
III.9.2.3. Lyse enzymatique	32
III.9.3. Méthodes combinées	32
III.9.4. Méthodes de purification.....	32
III.10. Production industrielle de PHA.....	33
III.11. Domaines d'application des PHAs.....	34
III.11.1. En médecine et pharmacie	34

Table des Matières

III.11.2. Agriculture.....	35
III.12. Biodégradabilité des polymères	36
III.13. Autres attractifs des ressources renouvelables.....	36

Partie Expérimentale

I. Matériaux et techniques expérimentales

I.1. Problématique et objectif.....	38
I.2. Echantillonnage.....	38
I.3. Isolement.....	39
I.4. Purification et identification primaire	39
I.4.1. Aspect macroscopique.....	39
I.4.2. Recherche de la catalase.....	39
I.4.3 Aspect microscopique	40
I.5. Le criblage et sélection des souches qui accumulent les <i>Polyhydroxyalcanoates</i>	40
I.5.1. Coloration sur boîtes.....	40
I.5.2. Coloration sur frottis.....	40
I.6. Identification biochimique des souches productrices	41
I.6.1. Recherche de la cytochrome-oxydase.....	41
I.6.2. Type respiratoire	41
I.6.3. Mannitol mobilité	41
I.6.4. Milieu TSI.....	42
I.6.5. Etude de l'hémolyse.....	42
I.6.6. Détermination de l'activité amylolytique.....	42
I.6.7. Test de Lécithinase	43
I.6.8. Test de tolérance de salinité.....	43
I.6.9. Plaque API 20 E.....	43
I.7. Optimisation de la production des PHAs.....	44
I.7.1. Matériel végétale.....	45
I.7.1.1. Les rebuts de datte	45
I.7.1.2. Les mélasses	46
I.7.1.3. Analyses physico-chimiques des sous produits utilisés.....	46
I.7.1.3.1. pH.....	46
I.7.1.3.2. Densité.....	46
I.7.1.3.3. Teneur en matière sèche.....	47

Table des Matières

I.7.1.3.4. Teneur en eau.....	47
I.7.1.3.5. Taux de cendre	48
I.7.1.3.6. Taux de sucre.....	48
I.7.2. Sélection du milieu de production et la souche productrice de PHA.....	49
I.7.2.1. Caractérisation génotypique de la souche sélectionnée	49
I.7.3. Préparation de la pré-culture	50
I.7.4. Optimisation des sources de carbones, d'azote et la période d'incubation	50
I.7.5. Détermination du poids sec cellulaire.....	51
I.7.6. Extraction des PHAs.....	51
I.7.7. Purification des PHAs.....	52
I.7.8. Estimation de la quantité du polymère dans la biomasse.....	52
I.7.9. Cinétique bactérienne et utilisation des sucres	52
I.7.10. Caractérisation des PHAs purifiés par Spectromètre Raman	54
II. Résultats	
II.1. Isolement.....	56
II.2. Purification et identification du genre.....	56
II.2.1. Aspect macroscopique	56
II.2.2. Mise en évidence de la catalase	57
II.2.3 Aspect microscopique.....	57
II.3. Criblage des souches productrices de polyhydroxyalcanoate.....	58
II.4. Identification des espèces	59
II.5. Analyse physicochimique des mélasses et du moût des rebuts de datte	65
II.6. Sélection du milieu de production et la souche productrice de PHA.....	68
II.6.1. Identification génotypique de la souche D9 sélectionnée l'optimisation	68
II.7. Optimisation des paramètres de production de PHA.....	68
II.7.1. Effet du substrat carboné sur la croissance et la production des PHAs....	69
II.7.2.Effet de la variation de la concentration des sous produits	69
II.7.3. Effet du substrat azoté	70
II.7.4. Effet de la durée d'incubation.....	73
II.8. Dosage des sucres et cinétique de croissance.....	75
II.8.1. Culture dans le milieu contenant le glucose.....	75
II.8.2. Culture dans le milieu contenant les mélasses.....	75
II.8.3. Culture dans le milieu contenant le moût des rebuts des dattes	75

Table des Matières

II.9. Analyse des PHAs synthétisés par spectrométrie Raman.....	78
II.9.1. Polymère I obtenue en présence de glucose.....	78
II.9.2 Polymère II obtenue en présence de mélasse de betterave.....	79
II.9.3. Polymère III obtenue en présence de mélasse de canne et le polymère	81
IV en présence des rebuts de datte	
III. Discussion.....	84
Conclusion.....	94
Références bibliographiques	
Annexe	

Remerciement



REMERCIEMENT

Avant tout je remercie ALLAH le Tout Puissant de m'avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mon encadreur M ABBOUNI Bouziane Professeur à la faculté des sciences de l'université de Sidi Bel-Abbés pour la confiance, l'encouragement et le soutien qu'il m'a apporté tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier M. BENAALI M Professeur à la faculté des sciences de Sidi bel Abbes pour avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie Mr. ABDELOUAHED D.E Professeur à la faculté des sciences de Tlemcen, Mr. BELABID L Professeur à la faculté des sciences de Mascara et Mr. BACHR R.G Maitre de conférence « A » à la faculté des sciences de Mascara d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Mr MENASRIA T Maitre assistant à l'université de Tébessa et Mr BENSaid W Maitre de conférence à l'université de Tiaret pour leurs aides précieuses.

D'autre part je remercie tout le personnel de Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la faculté de Médecine à Valence Espagne.

*Un **Enorme** Merci à mes chers parents, pour leurs aides, leurs soutiens durant mon travail, et à toute ma famille, mes amies et collègues.*

Enfin, je remercie tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail.



Résumé

Résumé

Les impacts environnementaux néfastes causés par les déchets plastiques est une préoccupation mondiale. Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) semblent être des candidats potentiels pour remplacer certains plastiques conventionnels.

Dans la présente étude, des souches du genre *Bacillus* caractérisées par leurs capacités de synthétiser des lipides intracellulaires ont été isolées à partir de quatorze (14) échantillons de sol et d'eau usée. Dans l'ensemble quatre-vingt-deux (82) isolats sont criblés avec une coloration spécifique au Noir Soudan B, 17 souches sont révélées positives pour le PHA, identifiées comme étant *Bacillus cereus* (8 souches), *B. megaterium* (8 souches) et *B. mycoides* (1 souche).

Dans le cadre de la valorisation des déchets agroalimentaires, et la réduction des coûts de production de bioplastique ; la mélasse de canne, la mélasse de betterave et le moût des rebuts de datte ont été testés comme source de carbone. Une production maximale de polyhydroxyalcanoates (PHAs) a été observée chez la souche D9 après 48h d'incubation en présence de 2% de glucose puis 3% de Mélasse de betterave (50% et 41% par mg de MSC respectivement). Cependant le maximum de croissance (0,98g/l) était observé avec 5% de moût des rebuts de datte. Sur la base des propriétés morphologique et physiologique ainsi sur l'amplification du gène 16S rDNA, la souche D9 a été reconnue comme étant *Bacillus megaterium*. Après extraction des polymères au chloroforme, une analyse quantitative/qualitative par gravimétrie et spectrométrie Raman indique les groupements chimiques des PHB.

Mots clé : Bioplastique, Polyhydroxyalcanoates, déchets agroalimentaire, *Bacillus megaterium*.

Abstract

The impact of plastic waste for environment emerge as a world wide problem and a global challenge, *Polyhydroxyalkanoates* (PHAs) present potential candidates to replace some conventional plastics.

In this study, *Bacillus* strains able of synthesizing intracellular lipids were isolated from fourteen (14) samples of soil and waste water, identified and selected based on Sudan Black B stain. Overall, eighty-two (82) isolates were screened, 17 strains revealed positive for PHA, classified as *Bacillus cereus* (8 strains), *B. megaterium* (8 strains) and *B. mycoides* (1 strain).

As part of the enhancement of agro-food waste and the reduction of bioplastic production costs; cane molasses, beet molasses and must date scrap were tested as a carbon source. Maximum production polyhydroxalcanoates (PHA) was observed with the D9 strain after 48 hours incubation in the presence of 2% glucose and 3% beet molasses (50% and 41% per mg DCM respectively). However, the maximum growth (0.98 g / l) was found with 5% must of dates scrap. Based on morphological properties, physiological characteristics and the amplification of the 16S rDNA gene, the D9 strain has been identified as *Bacillus megaterium*. After chloroform extraction, a quantitative / qualitative analysis by gravimetric and Raman spectroscopy indicates the chemical groups of PHB.

Keywords: Bioplastic, polyhydroxyalkanoates, food waste, *Bacillus megaterium*.

ملخص

الأثار البيئية السلبية الناجمة عن النفايات البلاستيكية هي مصدر قلق عالمي. تظهر حاليا البوليبيديروكسي الكانوات (PHAs) من بين المرشحين لتحل محل بعض المواد البلاستيكية التقليدية. في هذه الدراسة قد تم عزل، تحديد وفحص سلالات من جنس العصيات *Bacillus* جمعت من بيئات مختلفة. 82 سلالة من نوع *Bacillus* تم الحصول عليها، اما اختيار البكتيريا القادرة على تخزين الدهون داخل الهيولي الخلوية كان بالاستناد على استعمال صبغة اسود سودانى ب ، من بينها 17 سلالة فقط يمكنها انتاج الدهون داخل الخلايا ، *Bacillus Cereus* (8 سلالات)، *Bacillus megaterium* (8 سلالات)، *Bacillus mycoides* (سلالة واحدة) .

لنتمين بقايا الأغذية الزراعية والحد من تكاليف انتاج البلاستيك الحيوي، تم اختبار مولاس القصب السكري، مولاس البنجري و التمر الغير مستهلك كمصدر للكربون. وقد لوحظ ان الحد الأقصى لإنتاج (PHAs) عند السلالة D9 بعد 48 ساعة في وجود 2% جلوكوز ثم 3% بوجود المولاس البنجري (50% و 41% مقارنة بالوزن الجاف الخلوي على التوالي). لوحظ ايضا ان الحد الأقصى للنمو (0.98 غ/ل) قد تم الحصول عليه مع 5% من الخليط التمري. استنادا على الخصائص المورفولوجية والفسولوجية ودراسة الجينات rDNA16 S، قد تم التعرف على ان السلالة D9 تمثل *Bacillus megaterium*. بعد استخلاص المادة بالكلوروفورم، و التحليل النوعي و الكمي ال PHAs تم التعرف عليه كيميائيا بأنه ينتمي الي ال PHB.

Abréviations

AAC	Agriculture et agroalimentaire canada
ADEME	Agence de l'Environnement et de Maitrise de l'Energie
ATCC	American Type Culture collection
BN	Bouillon nutritif
C/N	Rapport carbone, azote
DO	Densité optique
DSMZ	Deutsch Sammlung von Microorganism
GN	Gélose nutritif
MS	Milieu synthétique
MCL	Chaîne de longueur moyenne de polyhydroxyalkanoates PHA
SCL	Chaîne à courte longueur de polyhydroxyalkanoates PHA
PHA	Polyhydroxyalcanoate
PHB	Polyhydroxybutyrate
PHBV	Polyhydroxybutyrate-valerate
P (3HO-3HH)	Poly (3hydroxyoctanoate- co-3-hydroxyhexanoate)
P (3HB-4HB)	Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)
P (3HB-3HV)	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
PHV	poly -3-hydroxyvalérate (3HV)
PP	Polypropylène
MSC	Matière Sèche Cellulaire
<i>P. mirabilis</i>	<i>Pseudomonas mirabilis</i>
<i>P.studzei</i>	<i>Pseudomonas studzei</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>A. beijerinckii</i>	<i>Azotobacter beijerinckii</i>
DCM	Dry cells matter
CHCl₃	Chloroforme
G+C	Guanine+cytosine

Listes des figures

Figure 01 : Caractéristiques morphologiques des <i>Bacillus</i> (A : Cellules végétatives, B : Spores).....	4
Figure 02 : Technologie de la datte (Boukhiar., 2009).....	16
Figure 03 : Diagramme de la production de sucres et de la mélasse à partir de la canne et la betterave (Seabra., 2008).....	19
Figure 04 : Unité monomérique (HA) des PHA, et homopolymère, PHB et PHV et leur copolymère, PHBV (Betancourt., 2008).....	23
Figure 05 : Structure d'un granule de PHA et les différentes voies de biosynthèse des PHBs et des PHAs.....	27
Figure 06 : (A) Les 3 enzymes de biosynthèse de PHB sont codé par les gènes de l'opéron <i>phbCAB</i> , le promoteur en aval du gène <i>phbC</i>	28
Figure 07 : Application des biopolymères : libération contrôlée des principes actifs	35
Figure 08 : Diagramme des étapes de l'optimisation.....	44
Figure 09 : Dattes sèches.....	45
Figure 10 : Processus de diffusion de la lumière par la matière (Himmel, 2005).....	54
Figure 11 : Dispositif du système d'acquisition des spectres images, de stockage et de Traitement des données (Himmel, 2005).....	55
Figure 12 : Observation macroscopique de la souche B5 : forme circulaire aspect lisse (A) et de la souche F5 : irrégulière d'aspect rugueux (B).....	56
Figure 13 : La coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche B4 avec un grossissement de 100	57
Figure 14 : Coloration de la souche T1 (A) productrice, F ₆ (B) non productrice avec le noir Soudan B.....	58
Figure 15 : Pourcentages relatifs d'identification des souches T4, T6, T7, B1, B4, B5, M3, M5, U1	63
Figure 16 : Pourcentages relatifs d'identification des souches T1, F2, F6, K1, K2, D8, D9, PC7, PC9 et PP4	64
Figure 17 : Fréquence d'apparition des souches appartenant au genre <i>Bacillus</i> productrices de PHA.....	64
Figure 18 : Profil Electrophorétique de l'amplification du fragment d'ADN du gène Ribosomal 16S sur gel d'agarose à 1%. La ligne D9 : fragment ADN amplifié de la souche	

sélectionnée productrice de PHA, La ligne M : les marqueurs de taille 1,5 Kb DNA ladder (500-1500 pb).....	68
Figure 19: Influence du substrat carboné sur la croissance et la production des PHAs chez <i>B. megaterium</i> D9 (MB : Mélasse de betterave, MC : Mélasse de canne, MD : Moût des rebuts de datte).....	70
Figure 20 : Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et la production des PHAs chez la souche <i>B. megaterium</i> D9.....	71
Figure 21: Effet de la concentration des sous produits sur la croissance et la production des PHAs chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9 (A) en présence : de mélasse de canne, (B) de mélasse de betterave, (C) de moût de rebuts de datte.....	72
Figure 22: La cinétique de croissance et la production de PHA chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9, en présence de 3% de mélasse de betterave et 0,05% NH ₄ Cl dans le milieu de production....	73
Figure 23: La cinétique de croissance et la production de PHA chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9 en présence de 2% de mélasse de canne et 0,05% NH ₄ Cl dans le milieu de production.....	74
Figure 24: La cinétique de croissance et la production de PHA chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9, en présence de 3% de moût de datte, 0,05% NH ₄ Cl sur milieu de culture de production.....	74
Figure 25 : Cinétique de la croissance et la consommation du glucose chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9, en présence du glucose dans le milieu de production.....	76
Figure 26 : Cinétique de croissance et consommation des Sucres totaux chez <i>Bacillus gaterium</i> D9, en présence de la mélasse de canne dans milieu de production.....	76
Figure 27 : Cinétique de croissance et la consommation du sucre chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9, en présence de la mélasse de betterave dans le milieu de production.....	77
Figure 28: La cinétique de croissance et le taux de consommation des sucres totaux chez <i>Bacillus mégaterium</i> D9, en présence du moût des rebuts de datte	77
Figure 29: Spectre Raman des PHA de <i>B. megaterium</i> obtenu sur milieu glucosé.....	78
Figure 30 : Spectre Raman de PHA de <i>B. megaterium</i> obtenus (Polymère II) obtenue sur milieu de culture synthétique en présence de la mélasse de betterave.....	80
Figure 31 : Spectre Raman de PHA de <i>B. megaterium</i> (Polymère III) obtenu sur milieu synthétique en présence de la mélasse de canne.....	81
Figure 32 : Spectre Raman de PHA de <i>B. megaterium</i> (Polymère IV) obtenu sur milieu synthétique en présence du moût des rebuts de datte.....	82

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition chimique des mélasses de betterave et de canne (Archimed et al., 2011).....	18
Tableau 02 : Structure générale des PHA (homopolymères). n et R, (Doi., 1990)	24
Tableau 03 : les propriétés physiques des principaux polymères (Poirier et al., 1995).....	25
Tableau 04 : Les quatre classes de polyester synthèses (selon Rehm., 2010).....	29
Tableau 05 : Aperçu de la famille des biopolymères d'origine naturel (1993 ; Betancourt 2008).....	37
Tableau 06 : Origine des prélèvements et la codification des souches isolées.....	58
Tableau 07 : Les tests morphologiques et biochimiques des souches B1, B4, B5, M3, M5, T4, T6, T7, U1	60
Tableau 08 : Les tests morphologiques et biochimiques des souches D8, D9, F2, T1, K1, K2, PC7, PP4, F6 et PC9	61
Tableau 09 : Illustration du Profil biochimique des souches isolées, par l'utilisation de la galerie API 20E	62
Tableau 10 : Caractéristiques physicochimique des sous produits analysés.....	65
Tableau 11 : Les cultures de certaines souches testées sur les deux milieux de production..	66
Tableau 12 : Coloration au noir soudan B sur frottis et sur boîte de Pétri sur les deux milieux synthétique pour la souche U1, B5, T7 et D9.....	67
Tableau 13 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de <i>B. megaterium</i> récupéré sur milieu de culture glucosé.....	79
Tableau 14 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de <i>B. megaterium</i> récupéré sur milieu au mélasses de betterave.....	80
Tableau 15 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de <i>B. megaterium</i> récupéré sur milieu de culture au mélasses de canne.....	82
Tableau 16 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de <i>B. megaterium</i> récupéré sur milieu de culture en présence du moût des rebuts de datte.....	83

Introduction

Le recours massif aux plastiques traditionnels d'origine fossile, dérivées de ressources non renouvelables pour la fabrication d'objets à usage unique ou à courte durée de vie et le manque de collecte systématique se traduisent par une accumulation de plastiques dans l'environnement. Les déchets plastiques inondent la planète, ils ruinent la biodiversité avec des extrêmes allant jusqu'à décimer une grande partie de l'environnement, jonchés sur terre, mer et planant parfois au sommet des arbres, le mal est tentaculaire (**Santimano et al., 2009**). Va-t-on vers une asphyxie programmée ?

Les polymères synthétiques (connus sous le nom des matières plastiques) sont devenus importante depuis 1940, ils ont remplacés le verre, le bois et d'autres matériaux de construction, et même des métaux dans de nombreuses industries, domestiques et applications environnementales (**Poirier et al., 1995**). Ces applications ne sont pas seulement en raison de leur favorable propriétés mécaniques et thermiques, mais surtout en raison de leur stabilité et leur durabilité (**Rivard et al., 1995**). D'autre part, le plastique joue également un rôle important dans nombreuses applications telles que l'emballage et ceux-ci représentent la majeure partie des déchets plastiques (**Muller et al., 2001**). Ces produits peuvent restés jusqu'à 200 ans dans l'environnement et leur dégradations libère de la dioxine et du cyanure d'hydrogène et le chlorure de polyvinyle à partir de leurs substances de base. La prise de conscience de cette pollution à long terme et les coûts élevés du retraitement de tous les déchets plastiques ont conduit à la mise en place de cadres législatifs contraignants et d'initiatives de réduction de l'utilisation de plastiques (**Ademe., 2012**).

Le développement scientifique et technologique dans le domaine de la biodégradation et biopolymères a connu une progression significative. Les bioplastiques proviennent en grande majorité de ressources renouvelables et plusieurs d'entre eux se biodégradent, deux caractéristiques utilisées comme arguments promotionnels d'un point de vue environnemental (**Lapointe., 2012**).

Il existe une très grande diversité de polymères issus de ressources renouvelables, parmi lesquels on trouve les polyhydroxyalcanoates (PHAs) qui sont produite naturellement par de nombreux microorganismes à partir de sources de carbone variées (**Gerard., 2013**). Les déchets agricoles, agro-industriels et ménagers, constituent une nuisance certaine pour l'environnement et un gaspillage de matière organique utile. De nombreuses études ont démontré que ces déchets, riches en matières organiques étaient des produits nobles et constituaient de nouvelles matières premières pour de nombreuses industries, notamment les

PHAs. Par ailleurs, la valorisation des sous produits provenant de l'agriculture ou de l'industrie par les procédés biotechnologiques représente une solution de choix dans la mesure où elle contribue à l'élimination de la pollution que subit l'environnement, permet de produire des substances à forte valeur ajoutée (produit dont la transformation augmente de façon considérable la valeur commerciale) et contribue enfin au développement industriel et agricole (**Kaidi et Touzi., 2001**).

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont connus comme des inclusions lipidiques intracellulaires accumulées chez certaines bactéries, placées dans la limitation des éléments nutritifs et l'excès de source de carbone (Laure., 2009). Ces micro-organismes peuvent être considérés comme de minuscules usines qui convertissent les sources de nourriture renouvelable telle que le sucre de canne et de dextrose (glucose) en bio-plastique. Différentes études ont montré qu'ils pouvaient être utilisés dans le domaine médical tel que la fabrication d'implants, de vaisseaux sanguins artificiels ou de fils de suture. Par ailleurs, il a également été montré que le poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) permettait l'encapsulation de principes actifs ; cependant, leur vitesse de libération s'est avérée trop rapide en raison de la grande cristallinité du PHB (Julien Babinot., 2012).

Le premier objectif de cette étude vise l'isolement des bactéries de genre *Bacillus* à partir des différents échantillons du sol et d'eaux usées afin de cribler et identifier des souches capable d'accumuler les polyhydroxyalcanoates.

Le second objectif c'est l'optimisation de la production de bioplastique dans le but de pouvoir diriger la fermentation vers la production accrue de PHA. Malgré les avantages écologiques des Polyhydroxyalcanoates, le coût élevé de la production a limité ses applications, la recherche et l'utilisation des déchets agroalimentaires comme substrats carbonés dans ce travail a pour but de réduire les montants de production. L'extraction de ces biomolécules intracellulaire, se fait par des techniques classiques. L'analyse quantitative et qualitative du polyester a été effectuée par gravimétrie et spectrométrie Raman.

La première partie de ce travail est consacrée à une revue bibliographique présentant les principales connaissances sur les PHAs, bactérie et les déchets agro-alimentaires utilisés. La deuxième partie, résume matériels et méthodes mis en œuvre, résultats et discussion qui décrivent les techniques utilisées et les principaux résultats obtenus.

Synthèse

Bibliographique

I- Les *Bacillaceae*

I-1- Historique

En 1676 Van Leeuwenhoek (1632 -1723) découvrit les micro-organismes qu'il appela à l'époque « animalcules » (Prescott *et al.*, 1995). Suite à ses travaux se développa alors une très importante controverse à propos de la génération spontanée de la vie. Il faudra attendre 1861 et les travaux de Louis Pasteur (1822-1895) pour admettre que l'air contient des germes qui contaminent les solutions qui y sont exposées. C'est au cours de recherches sur ce sujet que John Tyndall (1820-1893) mit en évidence l'existence de formes bactériennes exceptionnellement résistantes à la chaleur, et c'est enfin Ferdinand Cohn (1828-1898) qui découvrit l'endospore bactérienne. L'importance de ces spores fut démontrée par Robert Koch (1843-1910) qui remarqua leur implication dans la maladie du charbon provoquée par *Bacillus anthracis*. Certaines bactéries possèdent donc la capacité de se transformer en petites unités ovoïdales ou sphériques douées d'une extraordinaire résistance (Leclerc *et al.*, 1995). Ces spores issues de bactéries gram positives existent chez quatre genres bactériens, les genres *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* et *Sporolactobacillus*. Chez ces bactéries, le cycle sporal caractérise les transformations où alternent les phases végétatives de croissance, la sporulation, la dormance et la germination (Stephens, 2003).

I.2. Classification

Les bactéries qui produisent des endospores résistantes à la chaleur sont classées en plusieurs genres de la famille *Bacillaceae*. À l'exception des bactéries anaérobies, formant des endospores, le genre *Bacillus* est le plus grand et le plus connu membre de cette famille, qui inclut également les *Sporosarcina* et les *Sporolactobacillus* (Berkeley et Goodfellow., 1981). La morphologie des spores a été traditionnellement un principal facteur dans leurs classifications et identification.

L'intérêt des secteurs médical, industriel et agronomique face aux *Bacillaceae* a vite révélé un énorme besoin de classification pour distinguer et identifier les différentes espèces. Dans un premier temps, les *Bacillaceae* ont été classifiés en utilisant des approches phénétiques telles que les caractères morphologiques, physiologiques (composition des cellules), biochimiques (test API) et nutritionnels (Gordon *et al.*, 1973, Logan et Berkeley 1984). Puis, dans un deuxième temps, d'autres approches moléculaires basées sur l'hybridation ADN-ADN (Priest *et al.*, 1981) et la composition d'ADN, (Fahmy *et al.*, 1985) ont aussi été utilisées, puis la classification s'est orienté sur les séquences du gène 16S (Ash *et*

al., 1991 ; Acinas *et al.*, 2004). L'insuffisance de la classification surtout du genre *Bacillus* a été soulignée par des études moléculaires. La large gamme de la composition de base de l'ADN chromosomique indique la diversité génétique (Priest., 1981 ; Fahmy *et al.*, 1985).

Le genre *Bacillus* est extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique (le pourcentage G + C) que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi...). L'étude des ARNr 16S et 23S confirme cette hétérogénéité et montre que le genre *Bacillus* doit être scindé en plusieurs genres. Ainsi, en 1991, l'analyse des séquences des ARNr 16S de 51 espèces permettait à Ash *et al.*, (1991) de caractériser cinq groupes phylogénétiques. La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles (Wisotzkey *et al.*, 1992). Plusieurs genres qui rassemblent au moins une espèce initialement incluse dans le genre *Bacillus* ont été proposés et validement publiés.

La classification du genre *Bacillus* selon Bergey's Manual of systematic Bacteriology (2^{ème} ed 2004) est :

- Règne : *Bacteria*
- Embranchement : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Bacillaceae*
- Genre : *Bacillus*

L'ancienne taxonomie des bacilles était très confuse, ce qui donne la nomenclature de plus de 150 espèces, souvent décrite selon des caractéristiques physiologiques ou écologiques simples. Dans une étude comparative de plus de 1000 souches, Smith *et al.*, (1952) ont utilisé la forme, la taille et l'emplacement des spores comme un moyen de différencier les groupes dans le genre et de réduire le nombre d'espèces à 19. Ces divisions morphologiques sont restées en usage général (Hobbs *et Cross*., 1983). Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes selon la morphologie de la spore et du sporange (Gordon *et al.*, 1973) :

➤ **Le groupe I** est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes : le groupe IA constitué des bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm et contenant des

inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*) ; et le groupe IB rassemblant des bacilles d'un diamètre inférieur à 1 μm et dépourvus d'inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*...).

➤ **Le groupe II** est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*...).

➤ **Le groupe III** est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*...).

I.3. Ecologie

Les *Bacillus* sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires. Les *Bacillus* sont presque invariablement isolés à partir des échantillons de l'environnement par la destruction thermique des cellules végétatives (généralement par incubation des échantillons à 80 ° C pendant environ 10 min) ou d'autres procédures telles que l'inactivation par l'éthanol. Les spores sont ensuite mises à germer. Ce processus simple est absolument spécifique pour les aérobies, formant des endospores (**Priest, 1993**).

La résistance des spores, constitue un problème majeur en médecine, l'épidémiologie de certaines infections repose sur la sporulation. Dans le domaine industriel (**Logan et al., 1999**) (industries agro-alimentaires, industries du médicament, production de matériel stérile à usage unique) se surajoutent au phénomène de résistance les problèmes posés par l'adhésion des spores. En effet, certaines espèces de *Bacillus* produisent des spores dont la surface est hydrophobe ce qui leur permet d'adhérer fortement à divers matériaux et de résister aux procédés de nettoyage. C'est le cas notamment des spores de *Bacillus cereus* qui s'attachent très bien aux surfaces en acier inoxydable et qui posent de graves problèmes dans les industries alimentaires.

I.4. Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes (ou presque rectilignes), à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,5 µm), sporulés, Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*Bacillus anthracis* et *Bacillus mycoides*) sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* et *B. subtilis*) peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique, aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (Priest., 1993). La culture de ces germes peut s'avérer difficile car certaines espèces exigent de nombreux facteurs de croissance. L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable et les phénomènes de dissociation sont fréquents (Prokop et al., 1985).

Bacillus anthracis, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis* donnent des colonies de grande taille (2 à 7 mm de diamètre), mates ou granuleuses et dont la forme est variable (circulaires ou non, à bords réguliers ou crénelés ou filamenteux).

Bacillus subtilis produit des colonies de formes irrégulières (contours ondulés ou pouvant présenter des filaments), de consistance crémeuse et dont le diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Dans les vieilles cultures, les colonies prennent un aspect sec, rugueux et elles s'incrument dans la gélose.

Bacillus circulans donne des colonies qui envahissent les milieux gélosés (essaimage).

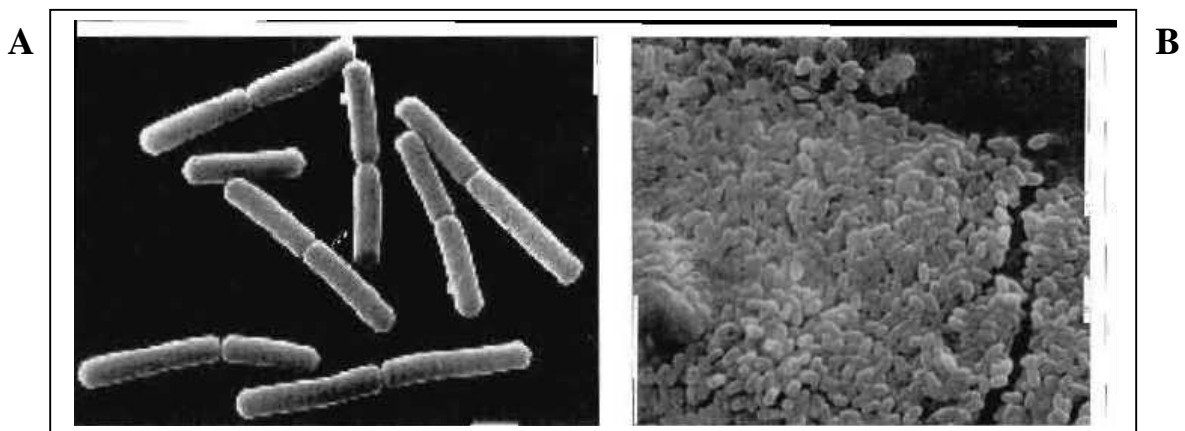


Figure 1 : Caractéristiques morphologiques des *Bacillus* (A : Cellules végétatives, B : Spores) (Cheikh Rouhou., 2006)

1.5. L'opéron ribosomal

Les ribosomes sont des organites cellulaires résultant d'un assemblage complexe de diverses protéines ribosomiques avec des ARN ribosomaux (ARNr).

Le ribosome comprend deux sous-unités de tailles différentes:

- La grande sous-unité 50S constituée des deux types de molécules: l'ARN 23S composé de 2900 nucléotides et l'ARN 5S composé de 120 nucléotides.

- La petite sous-unité 30S constituée par la molécule d'ARN 16S composée, en moyenne, de 1500 nucléotides.

Généralement, chez les bactéries, l'opéron ribosomal est organisé dans l'ordre suivant: le gène 16S, une région inter génique (ITS) contenant parfois des gènes d'ARN de transfert (ARNt), le gène 23S, une seconde région inter génique (ITS) et le gène 5S (**Mears *et al.*, 2002**).

Chez les bactéries, on retrouve plusieurs copies de l'opéron ribosomal dont le nombre est proportionnel à la taille et à la vitesse de croissance de la bactérie. Chez la famille des *Bacillaceae*, ce nombre varie entre 8 et 13 copies (**Johansen *et al.*, 1996 ; Lechner *et al.*, 1998**). L'opéron ribosomal est un bon marqueur moléculaire, fréquemment utilisé pour le traçage des rapports génétiques et même l'identification des nouvelles souches.

1.5.1. Le gène 16S

Pour l'étude des rapports phylogénétiques et la comparaison des diverses souches bactériennes, on s'est basé généralement sur la comparaison des séquences du gène d'ARNr 16S. Ce dernier est très abondant dans les cellules bactériennes ce qui facilite son extraction et sa purification (**Amann *et al.*, 1995**). De plus, il évolue lentement ce qui permet de comparer des espèces assez éloignées. Cependant, ce critère est insuffisant pour certaines espèces (**Bavykin *et al.*, 2004**). En effet, la classification des espèces bactériennes étroitement proches peut être très difficile puisque les gènes ARNr 16S sont hautement conservés.

1.5.2. Le gène 23S

Le gène 23S est composé de régions présentant une évolution rapide qui renferment un taux de mutations très élevé. Il est utilisé, lui aussi, dans la distinction et la différenciation des espèces notamment les plus proches pour lesquelles l'étude du gène 16S ne permet pas d'en déduire des conclusions quant à leur classification phylogénétique.

1.5.3. Le gène 5S

L'ARN 5S est un composant intégral de la grande sous-unité du ribosome. Sa petite taille et son association avec les protéines ribosomales font de lui une molécule modèle pour les études des interactions ARN-protéines.

1.5.4. Les régions inter géniques (ITS)

Les ITS sont des régions qui séparent les différents gènes de l'opéron ribosomal : 16S-23S et 23S-5S. Ce sont les régions les plus variables indépendamment des substitutions, des suppressions et des insertions qui peuvent exister au sein de l'opéron ribosomal. La taille des ITS est, elle aussi, très variable notamment d'une espèce à une autre. Chez les bactéries il existe plusieurs types d'ITS qui diffèrent selon la présence ou non de gènes d'ARNt et selon l'identité de l'ARNt encodé. (**Huybens et al., 2009**).

Les ITS (16S-23S) représentent un bon marqueur moléculaire pour analyser les rapports phylogénétiques et la diversité des procaryotes contrairement aux ITS (23S-5S) qui sont beaucoup moins utilisées par manque de données sur les séquences du gène 5S (**Casanova et al., 2001**).

1.6. Certaines espèces du genre *Bacillus*

1.6.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis et *Escherichia coli* sont parmi les espèces les mieux connues du point de vue génétique et biochimique. *B. subtilis* est une bactérie qui forme des spores capables de survivre dans des conditions extrêmes. C'est une bactérie inféodée aux plantes et retrouvée à la surface du sol. Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. (**Kunst et al., 1997**).

B. subtilis constitue un excellent modèle pour l'étude de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Bacillus anthracis* responsable de la maladie du charbon, *Listeria monocytogenes* causant de graves infections alimentaires et *Streptococcus pneumoniae* à l'origine d'infections nosocomiales sévères. Plusieurs secteurs industriels s'intéressent à *Bacillus subtilis*. Cette bactérie est une source d'enzyme tel que les amylases utilisés dans l'industrie du pain, les protéases et les cellulases employés dans les industries agroalimentaires et des détergents. L'industrie pharmaceutique exploite la capacité de *B.*

subtilis à produire des antibiotiques, comme la bacitracine, pour fabriquer des médicaments pour les maux de gorge (**Kunst et al., 1997**).

1.6.2. *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis se retrouve principalement dans le sol et les plantes (**Sneath et al., 1986**). Cette espèce peut causer occasionnellement des toxi-infections alimentaires et des infections oculaires. Certaines souches de *B. licheniformis* possèdent un pouvoir dénitrifiant (élimination des nitrates). Cette propriété, très intéressante, est utilisée dans la dépollution de l'environnement (**Alexander., 1977**).

B. licheniformis présente un intérêt pour le secteur industriel où elle est utilisée pour la production à grande échelle de coenzymes (**Schallmey et al., 2004**) et particulièrement de protéases pour les industries du textile et des détergents (Erickson, 1976). Le domaine agricole utilise cette bactérie dans la lutte contre certains microorganismes fongiques pathogènes attaquant les récoltes de maïs. Finalement, *B. licheniformis* suscite l'intérêt du monde médical grâce à sa capacité de produire de la proticine et de l'acide poly-glutamique (**Neyra et al., 1996**).

1.6.3. *Bacillus cereus*

B. cereus est une bactérie qui appartient au groupe *cereus* au sens large (sensu lato). Les membres de ce groupe présentent à la fois de grandes similarités génétiques et une grande diversité de virulence et de pathogénicité (**Helgason et al., 2000 ; Patra et al., 2002**). *B. cereus* est un micro-organisme qui est généralement retrouvé dans la nourriture telle que le lait, les céréales et le riz (**Jackson et al., 1995**). De plus en plus d'études montrent que cette bactérie produit une toxine émétique et des entérotoxines qui causent plusieurs types d'infections chez l'homme dont la pneumonie et la méningite (**Drobniewski, 1993; Logan et Turnbull, 1999**).

1.6.4. *Bacillus anthracis*

B. anthracis est un autre membre du groupe *cereus* au sens large. Elle a été identifiée comme non hémolytique, non mobile, sporulante, aérobie, sensible à la pénicilline et encapsulée. Elle est l'agent étiologique de la maladie du charbon ou anthrax. Cette maladie est une zoonose (maladie animale contagieuse) touchant principalement les mammifères (y compris l'homme). Certaines souches de *B. anthracis* sont très virulentes et sont considérées

comme des armes biologiques (Mock & Fouet., 2001; Jernigan *et al.*, 2002). Les spores de *B. anthracis* sont hautement résistantes à la sécheresse, la chaleur, les rayons ultra-violet, les rayons gamma et à de nombreuses substances désinfectantes. La virulence de *B. anthracis* provient de la synthèse de toxines composées de trois protéines distinctes et de la formation d'une capsule qui lui permet d'échapper à la phagocytose.

1.6.5. *Bacillus thuringiensis*

Bt est l'abréviation de *B. thuringiensis*. Cette bactérie fait partie du groupe *cereus* au sens large (Joung et Côté., 2001). *Bacillus thuringiensis* a été isolé en 1901 à partir du ver à soie. On le retrouve dans l'air, l'eau, le feuillage des végétaux et dans pratiquement tous les sols.

Il se distingue des autres *Bacillus* du groupe *cereus* par sa capacité à synthétiser des cristaux formés de multiples protéines. Ces dernières présentent certaines propriétés insecticides pour certains lépidoptères, coléoptères et diptères. Ces protéines agissent en détruisant les cellules de l'intestin moyen de la larve de l'insecte.

Bacillus thuringiensis pathogène des insectes, a une importance économique considérable car certaines souches de cette espèce sont utilisées dans la lutte biologique contre les insectes. On l'appelle un biopesticide et elle représente à ce titre 90 % du marché mondial des biopesticides. Plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont efficaces dans le biocontrôle de divers champignons phyto-pathogènes.

1.6.6. *Bacillus megaterium*

1.6.6.1. Historique

La bactérie *B. megaterium* ; était d'abord décrite par **De Bary (1884)** il ya plus d'un siècle, caractérisée par sa taille pommée, dérivée de la langue Grec « gros animal ».

En **1960** avant *B. subtilis* ; *B. megaterium* était l'organisme modèle pour des études intensives sur la sporulation. Cette bactérie du sol est également trouvée dans divers environnements : l'eau de mer ; les sédiments ; les poissons ; les rizières et même dans le miel d'abeille (**Vary, 1994**). De point de vue taxonomique le *B. megaterium* est placé dans le groupe de *B. subtilis* (**Priest, 1993 ; Vary, 1994**).

C'est l'une des plus grosses bactéries rencontrées dans le sol ; sa taille dépasse 5 µm avec un volume d'environ 100 fois celle de *Escherichia coli*. Ces bactéries forment souvent des chaînes au sein desquelles les cellules sont jointes par des polysaccharides issus de leur

paroi. *Bacillus megaterium* est capable de survivre dans des environnements extrêmes comme les déserts grâce à sa capacité de sporuler. Parfois cette bactérie peut être retrouvée sur des surfaces communes que l'on touche régulièrement.

B. megaterium est impliqué dans le cycle du phosphore et la minéralisation microbienne du phosphore organique nécessaire pour les végétaux. En effet, le phosphate passant d'un état organique à un état inorganique, il sera libéré et utilisé par les végétaux. Dans ce cycle, les bactéries du type *Pseudomonas* et *Bacillus subtilis*, ainsi que les mycètes du genre *Aspergillus* sont aussi impliquées dans ce phénomène de minéralisation (De Bary., 1884).

I.6.6.2 Les applications de *Bacillus megaterium*

La bactérie *Bacillus megaterium* a reçu récemment de plus en plus d'importance aussi bien dans les applications industrielles que scientifiques. L'espèce *B. megaterium* capable de croître sur une large variété de sources carboniques, et il est par conséquent trouvé dans plusieurs niches écologiques tel que le déchet de l'industrie de transformation des viandes ou des effluents pétrochimiques. En outre la dégradation des insecticides permanents par *B. megaterium* a été prouvé (Saxena et al., 1987), offrent des applications potentielles comme un agent désintoxiquant.

Dû à son application pour la production de différentes substances biotechnologique, *B. megaterium* est d'un intérêt général pour l'industrie. Il est entièrement non pathogène. Contrairement aux organismes de Gram négatif comme *E. Coli*, il ne produit pas d'endotoxine associée avec les membranes extérieures, ces caractéristiques rendent la bactérie bien appliquée dans l'alimentation et même dans l'industrie pharmaceutique. L'utilisation d'une large variété de source carbonique permet à cet organisme de croître sur des substances moins chères, la souche *B. megaterium* ne possède pas de protéase alcaline évidente dégradant les produits de gène recombinant. Par conséquent une large quantité des protéines fonctionnelles intactes avec seulement un peu ou pas de produit de dégradation sont produites (Von Terschet Robbins, 1990 ; Kim, 2003). Cela présente une autre raison qui favorise l'application de *B. megaterium* pour la production des protéines recombinantes. Un autre avantage est sa capacité de sécréter des protéines directement dans le milieu de croissance. Elle est utilisée pour la production de plusieurs α - et β -amylases qui sont utilisés pour la modification de l'amidon dans l'industrie du pain, dans la production de la pénicilline par pénicilline-amidase (Panbangred et al., 2000).

Cette bactérie produit aussi des enzymes modifiant des corticostéroïdes ainsi que divers aminoacides déshydrogénases. Les protéases neutres, qui sont employés dans l'industrie de préparation de cuire en Indonésie, sont également produites et secrété par l'espèce *B. megaterium*. De plus, elle est connue pour sa capacité de synthétiser la vitamine B₁₂ en aérobiose et anaérobiose (**Raux et al., 1998**).

Elle peut croître dans des milieux simples sur plus de 62 sources de carbone (**Suga et al., 1990**), elle est aussi utilisée pour la synthèse de la glucose-déshydrogénase (**Nagao et al., 1992**) qui est responsable de la régénération des cofacteurs NADH / NADPH dans les réactions biochimiques.

La bactérie *B. megaterium* peut aussi croître dans un milieu minimale sans ajouter de facteurs de croissance la majorité sont mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45°C (**Kenneth, 2005**). En effet la capacité de *Bacillus megaterium* d'accumuler des bioplastiques est tellement dominante, la teneur en PHAs dans les cellules pourrait atteindre jusqu'à 70% du poids sec de la cellule (**Hori et al., 2002**). Le PHAs fournit une réserve de carbone et d'énergie accumulée comme granule intracellulaire qui peuvent être extraite d'une large série de bactérie.

II. Déchets agro-alimentaires

II-1- Généralité

Les activités agricoles et agro-industrielles génèrent des quantités importantes de déchets qui peuvent constituer de nouvelles matières premières pour de nombreuses industries agroalimentaires. A cet effet, leurs valorisations par des procédés biotechnologiques représentent une solution de choix dans la mesure où elle permet de produire des substances à haute valeur ajoutée. (**Acourene et al., 2008**).

II-2- Définition des déchets

Un déchet est « tout résidu d'un processus de production, de transformation, ou d'utilisation ; toute substances, matériau, produit ; ou plus généralement tout bien, meuble abandonné ou que son détenteur destiné à l'abandon » (**La loi du 15 juillet 1975**). Autrement dit, tout élément qui est abandonné est un déchet. Ce n'est pas pour autant que cet élément est inutilisable, en l'état ou après modification. Seuls les déchets qualifiés d'ultimes sont

réellement inutilisables et doivent être stockés pour éviter des pollutions de l'environnement (Balet., 2005).

II-3- Classification des déchets

Les déchets sont classifiés selon :

- l'origine (activité urbaine - activité industrielle - activité agricole),
- la nature (solide - liquide - pâteux- boueux),
- la composition (matières organiques - matières minérales),
- critère de danger et de risque (déchets putrescibles - déchets inertes - déchets spéciaux : toxique, explosifs, inflammables) .

II-4 - Intérêts de la valorisation des déchets

II-4-1- Intérêts économiques

La valorisation énergétique à partir des déchets permet de diminuer le recours aux ressources fossiles. Il a été démontré que les coûts de traitements par compostages sont très réduits, couplé à une unité de méthanisation, le projet permet d'élargir son domaine de rentabilité en compost, électricité et biogaz. Cette rentabilité permet de réduire les coûts de traitements des déchets (Orgavalor , 2010).

II-4-2- Intérêts environnementaux

L'élimination des déchets par un traitement biologique permettant une valorisation, présente des intérêts environnementaux, que l'on parle de méthanisation, de compostage ou de récupération du biogaz de décharge. Chacun des procédés présente une liste d'intérêts :

- Pour le compostage

C'est un mode de traitement respectueux de l'environnement par le fait qu'on ne constate pas de rejets incontrôlés des lixiviats qui sont envoyés en station d'épuration ou rejetés sur les tas de compost. Ensuite, la production d'un amendement organique en vue de l'épandage permet de rendre au sol ce qui y a été puisé. La boucle est ainsi bouclée et par ce biais, les utilisations annexes d'amendement chimique sont réduites. La préservation de nos sols est alors assurée (CNR., 2000).

- Pour la méthanisation

L'exploitation du potentiel énergétique contenu dans les déchets organiques, c'est-à-dire la valorisation du biogaz permet l'économie de gaz fossile, de carburant ou d'électricité selon l'utilisation. La production de compost dont les intérêts ont été démontrés représente un intérêt environnemental supplémentaire (CNR., 2000).

- Pour la récupération du biogaz en décharge

La forte contribution du biogaz à l'effet de serre justifie à lui seul l'intérêt primordial de le capter. La production et les émissions de ce biogaz dans l'atmosphère peuvent durer jusqu'à trente ans après la fermeture de la décharge. Il ne s'agit donc pas de capter un gisement anodin mais bien de limiter une menace pour l'environnement. L'énergie produite grâce à la valorisation du biogaz permet aussi des économies d'énergies fossiles (Energie plus., 2000).

II-4-3- Intérêts sociaux

La mise en place d'un système de collecte et de traitement des déchets organiques dévoile plusieurs aspects sociaux d'un intérêt non négligeable. Ainsi, création d'emplois et impact sur le schéma global de collecte et de traitement des déchets sont enregistrés parallèlement à la création de cette filière (Energie plus., 2000).

II.5. Différents déchets agroalimentaires

Le déchet agro-alimentaire représente l'ensemble de déchet produit au niveau du stockage, du conditionnement, et de la transformation des produits agricoles. Quelques exemples de déchets générés :

- Industrie de la viande : graisses, sang, os, abats, cuir, poils, plumes...
- Industrie du poisson : arêtes, peaux...
- Laiterie, fromagerie : lactosérum, eau de lavage...
- Sucrierie, distillerie : mélasse, pulpes, marcs, déchets de filtration, effluents...
- Transformation des oléoprotéagineux : tourteaux, coques...
- Fruit et légumes : retraits des invendus, effluents de conserverie.

II-6- Déchets utilisés pour la production de PHA

D'un point de vue économique, le coût du substrat (principalement la source de carbone) contribue de façon très significative à l'ensemble du coût de production de PHA, il a

été estimé à environ 40% du total des coûts de production de PHA (Choi et Lee., 1997). Durant la dernière décennie, une grande variété de substrats de carbone à faible coût (par exemple, les sources renouvelables de carbone), telles que les eaux usées, les déchets municipaux, agricoles et industriels, des résidus ou produits (par exemple, de l'amidon, de tapioca hydrolysé, lactosérum, xylose, de mélasse, de malt, de soja et de déchets), le brut carboné (déchets alimentaires ou produits) ont été testés pour la production de PHA par des cultures pures de microbes en raison de leur faible prix et de la disponibilité potentielle. Deux sources bon marché de carbone et d'azote sont disponibles à partir de sources industrielles ou agricoles, les déchets et l'excédent des matériaux permettant d'apporter une contribution substantielle à la réduction des coûts de production de PHA (Koller et al., 2005). De cette façon, les déchets municipaux, industriels ou agricoles, tout en abaissant le coût de leur élimination, sont convertis en bioplastiques à valeur élevée (Koller et al., 2005). Par conséquent, les déchets sont prometteurs en tant que sources de carbone pour la croissance bactérienne et leur utilisation peut résoudre le problème environnemental de leur élimination tout en réduisant simultanément le coût de production des PHAs.

II.6.1. Rebutts de datte

II.6.1.1 Définition

En Algérie, la phoeniciculture constitue le pivot de l'agriculture saharienne avec une prédominance du palmier dattier d'environ 22 % de la superficie totale de plantations, le nombre du palmier dattier étant de 11,6 millions. (Ministère de l'agriculture., 1998) Cependant, des milliers de tonnes de dattes restent non utilisées et peuvent dépasser les 30 % de la production, soit environ 120.000 tonnes qui pourraient être valorisées (récupérées et transformées), la production dattier algérienne est estimée à 261 000 tonnes/an pour une campagne normale, avec 53% de variétés communes. (Ould el hadj et al., 2012). Par ailleurs, le secteur phoenicole, malgré les richesses qu'il procure dans les zones désertiques très difficiles, accuse un retard technologique (Messar., 2010). En effet, dans le domaine de la technologie de la datte et sa valorisation, les systèmes pratiqués sont restés archaïques.

Les dattes impropres à la consommation de bouche se prêtent tout particulièrement à la valorisation des sucres qu'elles contiennent en raison de leur faible coût, puisqu'elles sont généralement considérées comme un déchet.

Il peut s'agir des dattes sèches, des dattes endommagées, des écarts de triage, des dattes trop molles et collantes pour pouvoir être conditionnées correctement.

La richesse de ces dattes en sucres offre à celles-ci la possibilité d'être valorisées en divers produits (sirop, vinaigre, alcool, levure....) (**Acourene et Tama, 2001**).

Aujourd'hui, grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de mettre sur le marché local et même international, une nouvelle génération de produits. Effectivement, les produits et sous-produits du palmier dattier, riche en sucres fermentescibles (65%), constituent des substrats de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée dont l'impact socio-économique est considérable tant du point de vue de la création d'emplois que de la mise à la disposition des consommateurs de substances stratégiques fortement prisées et souvent importées à coup de devise forte.

De nombreux micro-organismes, bactéries, champignons filamenteux et levures sont susceptibles d'être produits en masse à partir de différents substrats carbonés (**Bessah et Touzi, 2001**).

Les rebuts de dattes ou écarts de tri de dattes représentent les fruits du palmier dattier non consommables par l'être humain et qui sont destinés, traditionnellement, à l'alimentation du bétail. Ils sont composés par une grande gamme de catégories, représentés principalement par : H'chef : dattes déshydratées, Sich : dattes non fécondées. Ces deux catégories de rebuts de dattes représentent la gamme la plus importante de point de vue tonnage, et qui sont liées directement, au manque d'eau d'irrigation pour le H'chef et à la mauvaise qualité ou l'indisponibilité du (pollen) pour le Sich.

II.6.1.2. Composition biochimique de la pulpe

Le sucre et l'eau sont les constituants les prédominants de la chair. C'est leurs proportions qui déterminent la consistance de la datte. La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie généralement entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche. Les sucres sont le constituant le plus prédominant de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélée essentiellement la présence de trois types de sucres : le saccharose, le glucose et le fructose (Acourene et Tama., 1997). Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faibles proportions tels que : le galactose, la xylose...). Les dattes constituent une source de prédilection de sucres avec une teneur de 60 et 80 % (Decloux., 2008, Rémésy., 2008). En plus de ces deux composés, la pulpe renferme : des fibres, des éléments minéraux, des protéines, des lipides, des poly phénols, des vitamines... (**Khalil et al., 2002 ; Besbes et al., 2009**).

II.6.1.3 Mise en valeur des déchets

Les dattes abîmées et de faibles valeur marchande peuvent être utilisées en raison de leur forte teneur en sucre pour la production de :

- **Biomasse et protéines unicellulaires**

La production de protéines reste un objet essentiel afin de subvenir aux besoins mondiaux. A cet égard des essais de production de protéines d'organismes unicellulaires par culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu à base de dattes ont été réalisés. Selon (Kendri, 1999), l'analyse des biomasses produites montre leur richesse en protéines à raison de 32 à 40 % de poids sec.

- **Alcool**

Les dattes constituent un substrat de choix pour la production de l'alcool éthylique. Selon Touzi, (1997), l'alcool éthylique a été produit au laboratoire avec un rendement de 87%.

- **Vinaigre**

Les dattes peuvent être utilisées pour l'élaboration de nombreux produits alimentaires parmi lesquels le vinaigre (Ould el hadj *et al.*, 2001 ; Benahmed, 2007). Ce dernier a été produit par culture de la levure *Saccharomyces uvarum* sur un extrait de dattes.

- **Aliments de bétail**

Les rebuts et les noyaux de dattes constituent des sous produits intéressants pour l'alimentation du bétail. La farine des noyaux de dattes peut être incorporée avec un taux de 10 % dans l'alimentation des poulets sans influencer négativement leurs performances (Gualtieri et Rappaccini, 1994).

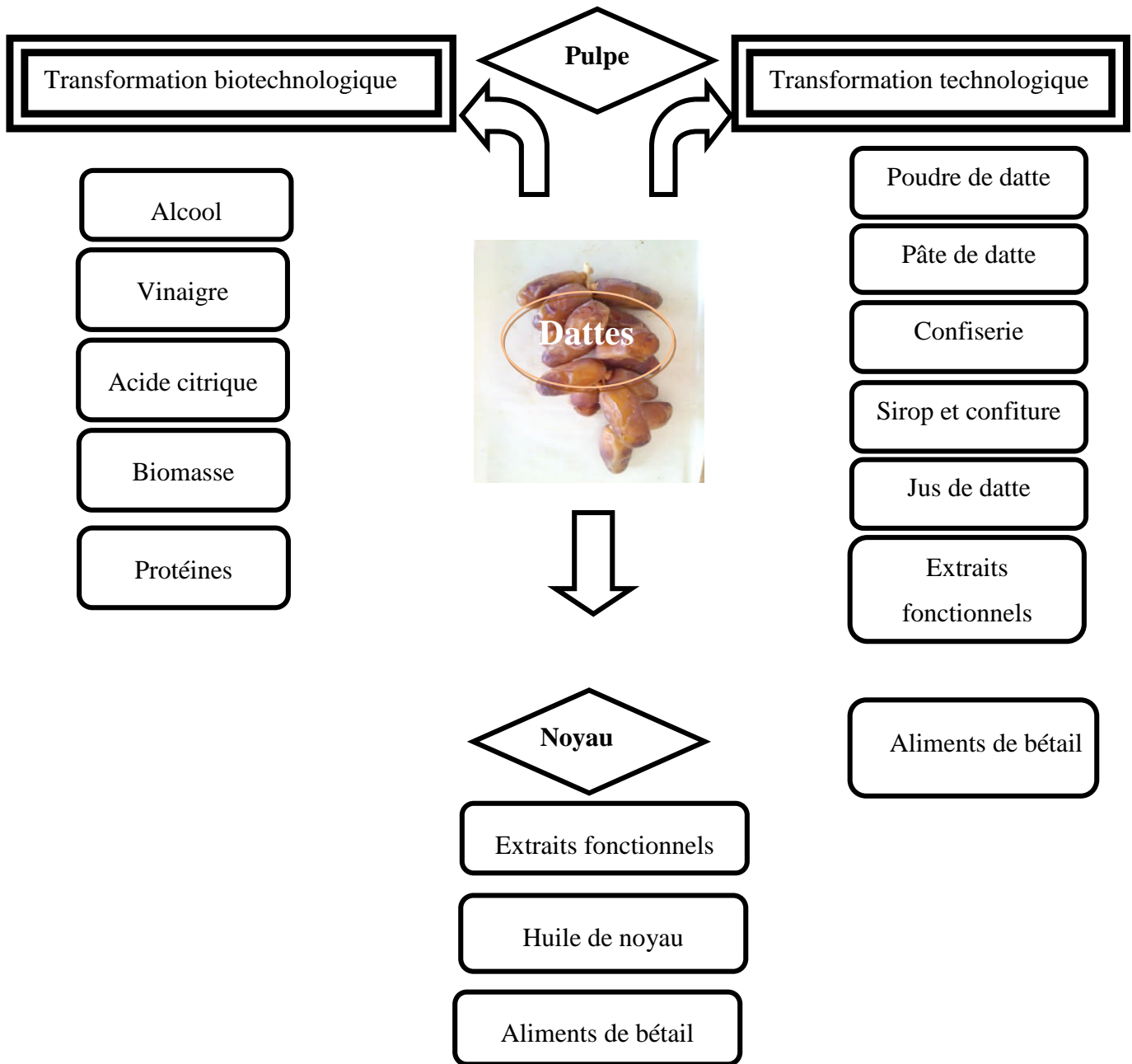


Figure 2 : Technologie de la datte (Boukhiar , 2009)

II.6.2. Les mélasses

La mélasse est un coproduit constitué par le résidu sirupeux recueilli lors de la fabrication ou du raffinage du sucre provenant de la betterave sucrière ou de la canne à sucre. La mélasse, C'est un produit agricole dont la composition change en fonction de la variété de la plante, des conditions climatiques durant la période de végétation et de la qualité des sols. Le processus de fabrication de la sucrerie peut aussi faire varier la composition des mélasses. C'est un liquide visqueux contenant plus de 40 % de sucres, non cristallisable, de couleur foncée et qui contient une quantité variable de particules en suspension, de matières colloïdales et de micro-organismes.

Markel., (2014) évoque que la mélasse présente des qualités nutritionnelles exceptionnelles en tant que source d'énergie naturelle. Les caractéristiques physiques et chimiques de la mélasse la rendent utile dans un grand nombre de processus industriels. C'est un substrat de fermentation incontournable pour la production d'alcool, de glutamate, d'acide citrique, d'acides aminés, de levures de panification et de vitamines (**Archimède et al., 2011**).

La mélasse est couramment utilisée dans l'alimentation des ruminants et des chevaux, en mélange avec de la paille ou d'autres aliments celluloseux tels que le son, ou comme liant dans les rations complètes ou encore pour favoriser l'ingestion d'aliments peu appétant (spathes, cannes de maïs, foin moyen, paille...)

Elle possède des qualités écologiques appréciées dans le domaine de l'agglomération industrielle (fines de charbon, d'aciérie, etc...), du traitement des eaux et de la dépollution des sols.

II.6.2.1. Composition des mélasses

La composition des diverses formes de mélasse offre des différences importantes selon le processus de fabrication, la saison et les conditions de stockage.

La mélasse est un aliment hautement énergétique en raison de la haute teneur en sucre, c'est une excellente source de carbone et d'énergie. Elle contient environ 25 % d'eau, du saccharose non cristallisé (30 % de la matière sèche), des sucres réducteurs (25 % de la matière sèche) et d'autres substances glucidiques. La mélasse est particulièrement pauvre en azote : 25 g de N par kilo de mélasse brut. La teneur en fibres de la mélasse étant négligeable (**Archimède et al., 2011**), on trouve aussi des éléments sous forme de traces et des stimulateurs de croissance.

D'autre part, il n'est pas rare que la mélasse contienne à différentes concentrations des matières nuisibles aux cellules (Nitrite, Acide formique,...etc.).

Dans la mélasse de betterave, la plus grande partie de sucre assimilable est le saccharose, tandis que dans la mélasse de canne on trouve aussi des proportions appréciables de glucose et de fructose, en outre, le taux de biotine est assez élevé dans la mélasse de canne.

Le Taux de micro-organismes totaux de la mélasse est généralement assez élevé, ce nombre peut augmenter dans le cas d'un mauvais stockage. La mélasse est une source de calcium et elle est riche en magnésium et en fer.

Tableau 1 : Composition chimique des mélasses de betterave et de canne (Archimed et al., 2011).

<i>Composition</i>	<i>Mélasse de betterave</i>	<i>Mélasse de canne</i>
Matière sèche (%)	73	73
Matières minérales (% MS)	13	14
Matières azotées totales (% MS)	15	6
Sucres totaux (% MS)	64	64
Calcium (g/kg MS)	3,7	7,4
Phosphore (g/kg MS)	0,3	0,7
Potassium (g/kg MS)	82	40

II.6.2.2 Différents types de mélasse

Il existe trois types de mélasse :

➤ **Mélasse de raffinage :**

Elle provient du raffinage des sucres roux de canne. Sa teneur en sucre particulièrement élevée (50 à 60 %) et ses caractéristiques organoleptiques la rendent susceptible (dans certaines conditions) d'être utilisée dans la fabrication de produits alimentaires (confiserie, biscuiterie, etc...) (Markel.,2014).

➤ **Mélasse de betterave**

Elle provient de la fabrication du sucre extrait de la betterave. Elle se présente sous la forme d'un liquide visqueux et homogène de couleur marron. Le saccharose, est le composant le

plus important de la mélasse de betterave (de 45 à 50%). Elle contient aussi 10 à 12 % de protéine brute dont 5 à 7% de bétaine (Markel., 2014).

➤ Mélasse de canne :

Elle provient de la fabrication du sucre extrait de la canne à sucre. Elle se présente sous la forme d'un liquide (un sirop) très visqueux incristallisable et homogène de couleur marron foncé à noir, d'odeur et de saveur caractéristiques de la réglisse. La teneur en sucres (environ 45%) constituée de saccharose (2/3) et de sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (1/3) (Markel, 2014).

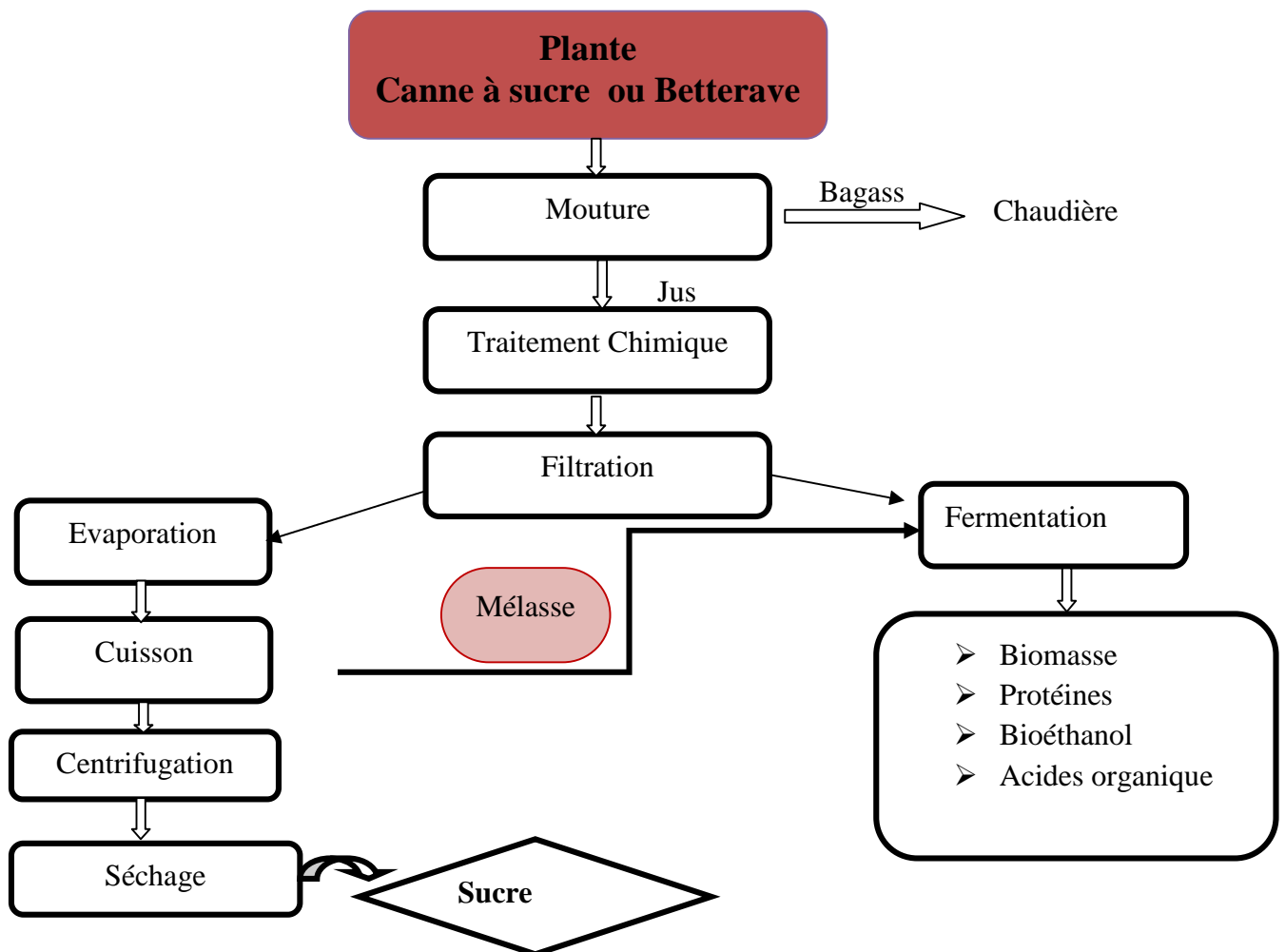


Figure 03 : Diagramme de la production de sucres et de la mélasse à partir de la canne et la betterave (Seabra., 2008).

II.6.2.3. Utilisation des mélasses

Les utilisations de la mélasse sont multiples. Elle donne à certains sucres bruns leur couleur et leur goût caractéristiques. Elle entre dans la composition de desserts et friandises. Mais elle est surtout utilisée pour la production d'alcool (rhum industriel), et pour l'alimentation du bétail, souvent en mélange avec la bagasse. **(Sprumont et Delahay., 2010).**

Elle peut aussi nourrir des levures ou bactéries dans des fermenteurs.

- Une levure rouge (*Phaffia rhodozyma*) cultivée sur un substrat contenant 7 à 10 % de mélasse industrielle, produit deux à trois fois plus d'astaxanthine que la normale, ce qui lui donne un rendement industriel deux fois plus élevé qu'avec du glucose en mélange équivalent **(Haard., 1988).**

- La souche *Pseudomonas aeruginosa GS3* en culture dans un substrat enrichi en mélasse produit des biosurfactants (rhamnolipide ; rhamnose capable de réduire la tension interfaciale du pétrole brut permettant de former des émulsions stables avec des n-alcanes, des aromatiques, du pétrole brut ou de l'huile d'olive, ce qui laisse penser que des ressources renouvelables, relativement peu coûteuses et disponibles peuvent être utilisées pour ce type de production. **(Patel et Desai., 2003, Abouseuoud et Medea., 2008).**

Plus récemment, on lui a trouvé des usages énergétiques.

- De plus en plus dans certains pays comme le Brésil, elle est utilisée pour la production de bioéthanol ou d'autres types de biocarburant.

- Elle pourrait aussi devenir une source industrielle d'hydrogène, produite en continu par des bactéries (expériences faites avec une souche d'entérobactérie ; (*Enterobacter aerogenes* ; souche E. 82005) cultivée dans un fermenteur à 37 °C **(Tanishoa et Ishiwataa., 1994).**

III. Les Polyhydroxyalcanoates

III.1. Généralité

Les plastiques ou polymères peuvent être d'origine naturelle, obtenus par modification chimique d'un polymère naturel, ou entièrement synthétisés par voie chimique ou enzymatique par une réaction de polymérisation. Les polymères sont souvent classés d'après leurs propriétés thermomécaniques. Citons notamment: les thermoplastiques, qui deviennent malléables quand ils sont chauffés permettant ainsi leur mise en forme, les thermodurcissables, qui durcissent sous l'action de la chaleur ou par addition d'un additif et les élastomères, qui sont déformables de manière réversible. Les polymères industriels peuvent être fabriqués à

partir d'un seul type de monomère, ce sont des homopolymères, comme par exemple le polystyrène, ou à partir de plusieurs types de monomères pour donner des copolymères, comme par exemple l'acrylonitrile butadiène styrène (**Chee et al., 2010**).

Selon leur provenance, les polymères sont classés en deux catégories: polymères pétrochimiques conventionnels et polymères issus de ressources renouvelables.

Afin de répondre aux multiples défis auxquels nous sommes confrontés en ce début de millénaire, tels que la disparition progressive des ressources fossiles, la limitation des rejets des gaz à effet de serre, la valorisation des déchets ou la pollution causée par les plastiques, le développement des biopolymères a subi une forte accélération au cours des dernières années (**Chen., 2009**). Parmi les candidats majeur des plastiques biodégradables, les PHA ont attiré beaucoup d'attention en raison de leurs propriétés similaires aux matériaux plastiques conventionnels et avec une biodégradabilité complète (**Steinbüchel et Valentin., 1995, chee et al., 2010**).

Les Polyhydroxyalcanoates (PHA) sont une classe de composés de polyester linéaires produites naturellement par de nombreux organismes bactériens, notamment les bactéries du sol. Les PHA ont des propriétés analogues à de nombreux plastiques conventionnels, mais peuvent être fabriqués à partir de ressources renouvelables et facilement biodégradés (**Thellen et al., 2008**). Il y a actuellement un grand intérêt dans l'utilisation des PHA comme une alternative aux plastiques conventionnels. Cependant, le coût élevé de la production empêche l'application à l'échelle industrielle (**Allen, 2010**).

III.2. Historique et la découverte des Polyhydroxyalcanoates (PHAs)

Le Poly (3-hydroxybutyrate) [P (3HB)] est le plus courant PHA a été décrit au début chez *B. megaterium* par **Lemoigne** ; un scientifique français dans les années **1926**. Aussi, diverses souches bactériennes chez les archaebactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif et les bactéries photosynthétiques y compris les cyanobactéries, ont été identifiés à accumuler le P (3HB) de même les aérobie et les anaérobie. La reconnaissance du rôle de P (3HB) comme polymère de stockage bactérien qui possède une fonction presque semblable à l'amidon et le glycogène a été acceptée en 1973. **Macrae et Wilkinson, (1958)** ont remarqué que *Bacillus megaterium* commencent l'accumulation de P (3HB) lorsque le rapport de glucose et de l'azote dans le milieu de culture a été élevé et la dégradation intracellulaire ultérieure (également dénommé mobilisation) de P (3HB) est produite en absence de sources de carbone et d'énergie. Le monomère 3HB en tant que le seul

constituant de ce polymère a été modifié après un an de son acceptation comme un matériau de stockage bactérien pendant les autres types de monomères ont été découverts.

En 1974, Wallen et Rohwedder ont signalé la découverte d'autres constituants monomères à côté de monomère 3HB à partir des boues d'épuration activées. Parmi les polymères extraits de la boue : 3-hydroxyvalérate (3HV), 3-hydroxyhexanoate (3HHx) et 3-hydroxyheptanoate (3HHp), des monomères existés en tant que constituants majeurs et mineurs respectivement. En l'an 1983, a été identifié le 3HHp chez *B. megaterium*. Dans la même année, De Smet et ses collègues ont identifié un nouveau monomère, 3-hydroxyoctanoate (3HO) avec des traces de 3HHx à partir du *Pseudomonas oleovorans*.

L'enquête a révélé que la production de PHA de différents monomères dépend du substrat.

III.3. Définition

Les Polyhydroxyalcanoates sont des polyesters d'hydroxyalkanoates, ils sont des polymères de carbone, d'oxygène et d'hydrogène avec la structure générale formulée comme le montre la figure 4, (Steinbüchel, 1991 ; Ojumu et al., 2004). Plusieurs bactéries synthétisent et accumulent le PHA comme matériaux de stockage de carbone et d'énergie à condition de limitation de nutriments, et d'un excès de source de carbone (Tokiwa and Ugwu., 2007). Le PHA stockée peut être dégradée par Dépolymérase intracellulaire et métabolisé en carbone et d'énergie.

III.4. Structure des PHAs

À l'heure actuelle, environ 150 différents constituants des PHAs ont été identifiés soit des homopolymères ou des copolymères (Steinbüchel et al., 2001). La principale raison de la formation possible de ces divers types de PHA est due à la grande spécificité de substrat du PHA synthèses ainsi que à cause des types de sources de carbone pris par les micro-organismes et les voies métaboliques qui sont actifs dans la cellule (Luengo et al., 2003). La majorité des PHAs sont des monomères composés d'acide R(-)-3-hydroxyalcanoïques allant de C3 à C14 atomes de carbone avec diverses chaînes saturées ou insaturées, et à chaîne linéaire ou ramifiée contenant des groupes latéraux aliphatiques ou aromatiques (Doi et al., 1990). Le poids moléculaire du polymère est dans l'intervalle de 2×10^5 à 3×10^6 daltons, en fonction du type de micro-organisme et de son état de croissance (Alias et Tan., 2005).

Les PHA peuvent être divisée en deux grands groupes en fonction du nombre d'atomes de carbone dans les unités de monomères; la chaîne à courte longueur de polyhydroxyalkanoates PHA (SCL), qui se composent de C3-C5 atomes, et chaîne de longueur moyenne de polyhydroxyalkanoates PHA (MCL) composé de C6-C14 atomes. Ce regroupement est dû à la spécificité de substrat synthétique de PHA qui n'accepte que 3-hydroxyalkanoates (3HAs) d'une certaine gamme de longueur de carbone (**Anderson et Dawes., 1990**). Un grand nombre de PHA (MCL) contenant plusieurs groupes fonctionnels tels que des oléfines, des alkyle ramifiés, des halogènes (**Tan et al., 2014**).

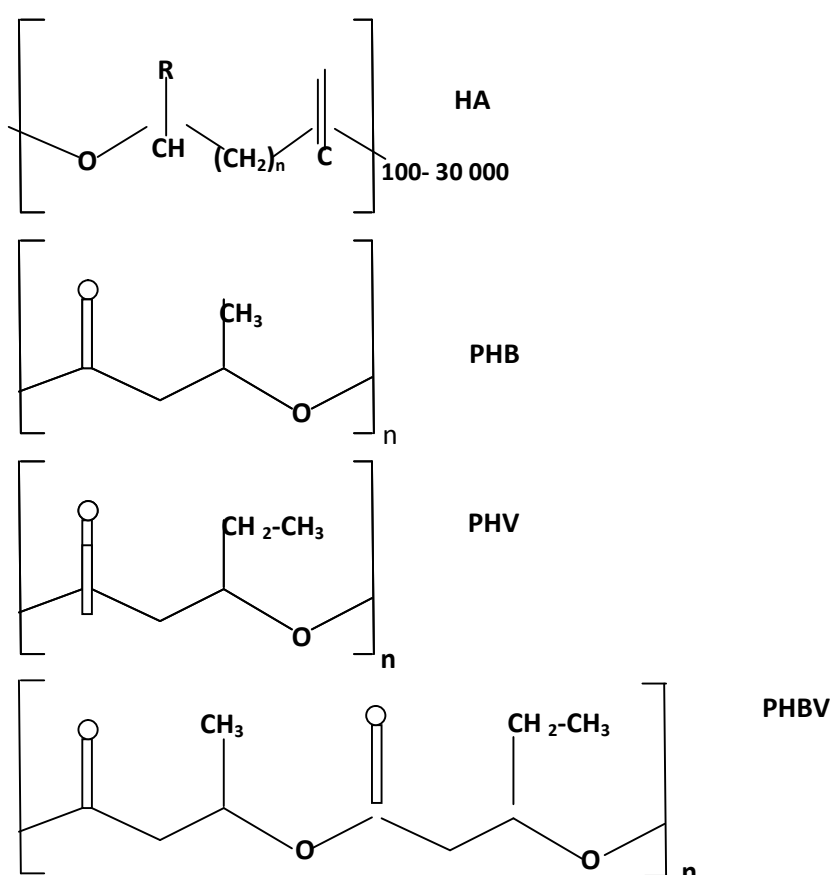


Figure 4 : Unité monomérique (HA) des PHA, et homopolymère, PHB et PHV et leur copolymère, PHBV (**Betancourt., 2008**).

Tableau 2 : Structure générale des PHA (homopolymères). **n** et **R**, (Doi., 1990).

n	R	Homopolymère	Acronyme
1	Hydrogène	poly -3-hydroxypropionate (3HP)	PHP
	Méthyle	poly-3-hydroxybutyrate (3HB)	PHB
	Ethyle	poly -3-hydroxyvalérate (3HV)	PHV
	Propyle	Poly-3-hydroxyhéxanoate (3HH)	PHH
	Pentyle	Poly-3-hydroxyoctanoate (3HO)	PHO
	Hexyle	Poly-3-hydroxynonanoate (3HN)	PHN
	Heptyle	Poly-3-hydroxydécanoate (3HD)	PHD
	Octyle	Poly-3-hydroxyundécanoate(3HUD)	PHUD
	Nonyle	Poly-3-hydroxydodécanoate(3HDD)	PHDD
2	Hydrogène	Poly -4-hydroxybutyrate (4HB)	P4HB
3	Hydrogène	poly -5-hydroxyvalérate (5HV)	P5HV

III.5. Caractéristiques des PHAs

Les Polyhydroxyalcanoates (PHA), sont une classe de polymères biosourcés avec des propriétés qui ressemblent étroitement aux propriétés des plastiques synthétiques qui dominent actuellement le marché (Verlinden ., 2007).

Les PHAs et les matières plastiques synthétiques sont des thermoplastiques, malléable, et pourraient être faites pour de nombreuses applications allant des produits d'emballage rigide a des matériaux hautement élastiques pour les revêtements. En outre, la qualité qui distingue les plastiques conventionnels des PHA est la biodégradabilité complète des PHA dans l'environnement (Bentancourt., 2008).

Au même temps, les PHA sont renouvelable par nature, ils pourraient être produits à partir de ressources renouvelables telles que les huiles végétales (Arshad., 2007) ; les sucres, et le dioxyde de carbone.

Tableau 3: Les propriétés physiques des principaux polymères (Poirier et al., 1995)

Propriété	PET	PP	PHB	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	P(3HB-3HV)	P(3HB-3HV)
				16% 4HB ^a	11% 3HH ^b	3 % ^c	25 % ^c
Tf (C°)	267	176	177-180	150	61	170	137
Tg (C°)	69	-10	4	-7	-36	8	-6
Cristallinité (%)	30-50	50-70	60-80	45	30	-	40 ^d
Densité (gcm ⁻³)	1,385	0,905	1,250	-	-	-	-
A (%)	100	400	6	444	300	-	-
RRT (MPa)	70	38	40	-	-	38	30
A-éq (%)	0,40	0,01	0,20	-	-	-	-
MY (GPa)	2,9	1,7	3,5	-	-	2,9	0,7

Tf: Température de fusion; Tg : Température de transition vitreuse; A : Allongement à la rupture en traction; RRT : Résistance à la rupture en traction; A-éq : Absorption d'eau - équilibre; MY Module de Young; (c): pourcentage en mol de 3HV; (-) : non disponible; (a) et (b), P(3HB-3HV) : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3HB-4HB) : poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), P(3HO-3HH):poly(3hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate).(Betancourt.,2008).

III.6. Production des PHA par fermentation bactérienne

La fermentation, que les hommes utilisent depuis des centaines d'années, devient encore plus évoluée lorsqu'elle est associée aux nouvelles techniques biotechnologiques. Ce procédé consiste à faire appel à des microorganismes pour transformer des substances organiques en absence d'oxygène. La fermentation productrice de polyesters bactériens peut conduire, en moins de 40 h, à une solution contenant de l'eau, des sels et des cellules renfermant jusqu'à 90% de poids sec en polymère (Doi., 1990).

Plus de 250 souches bactériennes, des espèces à gram-négatives et à gram-positives, sous leur forme sauvage ou recombinante, sont capables de stocker des lipides sous forme d'acides polyhydroxyalcanoates (Doi, 1990 ; Steinbüchel et al., 1992 ; Ojumu et al., 2004).

Les micro-organismes utilisent une source de carbone (alcane, alcool, saccharose, amidon, etc..) comme substrat. Il a été montré qu'il est possible de produire du PHA à partir de 137 substrats différents (Gillis et al., 1995).

Plusieurs de ces polymères sont en effet produits à partir de matières premières agricoles, comme la canne à sucre, le maïs, le soja, la betterave à sucre, le riz, des huiles

végétales ou le tourteau de tournesol. Les déchets alimentaires et les eaux usées, peuvent également servir comme source de carbone. Plusieurs entreprises de transformation des aliments envisagent ainsi de traiter des sous-produits, comme les pelures de pommes de terre et le son de riz blanc, afin de les réacheminer vers la production de divers polymères biodégradables.

III.7. biosynthèse de PHA

Les PHA sont accumulés dans les cellules sous forme de granules discrètes, la taille et le nombre par cellule varie en fonction des différentes espèces. Selon **(Byrom., 1994)**, environ 8 à 13 granules par cellule ayant un diamètre de 0,2 à 0,5 μm . Les granules apparaissent comme des inclusions réfractives sous microscope électronique. Les micro-organismes qui accumulent les PHA sont facilement identifiables par coloration au Soudan noir ou bleu du Nil **(Schlegel et al., 1970)**.

Salgaonkar et al., (2013) ont démontré que plusieurs souches de *Bacillus* ont pu accumuler des PHA dans des conditions de limitation de source de carbone et d'azote (C/N). Suite à cette étude d'optimisation, les différentes sources de carbone ont été testées pour une accumulation accrue de PHA dans un processus de fermentation à petite échelle.

La biosynthèse des PHA est un ensemble complexe de réactions impliquant différentes enzymes. Des bactéries comme *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas oleovorans*, etc., possèdent des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse: la bêta-cétothiolase, l'acétoacétylCoA réductase et la polyhydroxyalcanoate synthase (PHA synthase).

La biosynthèse du poly3-hydroxybutyrate (PHB) et du poly3-hydroxybutyrate-3hydroxyvalérate (PHBV), débute avec la condensation de deux molécules de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) avec l'acétoacétyl-CoA en présence de l'enzyme 3cétothiolase (*3-ketothiolase*). Ceci est suivi de l'action de la réductase de l'acétoacétyl-CoA qui réduit l'acétoacétyl-CoA à R (-)-3-hydroxybutyryl-CoA. La PHA-synthase polymérise alors le R (-) - 3-hydroxybutyryl-CoA pour former le PHB et/ou le R (-) - 3-hydroxyvalerylCoA pour obtenir le copolymère, noté PHBV ou *P(3HB-co-3HV)* **(Doi, 1990 et Lee., 1996)**.

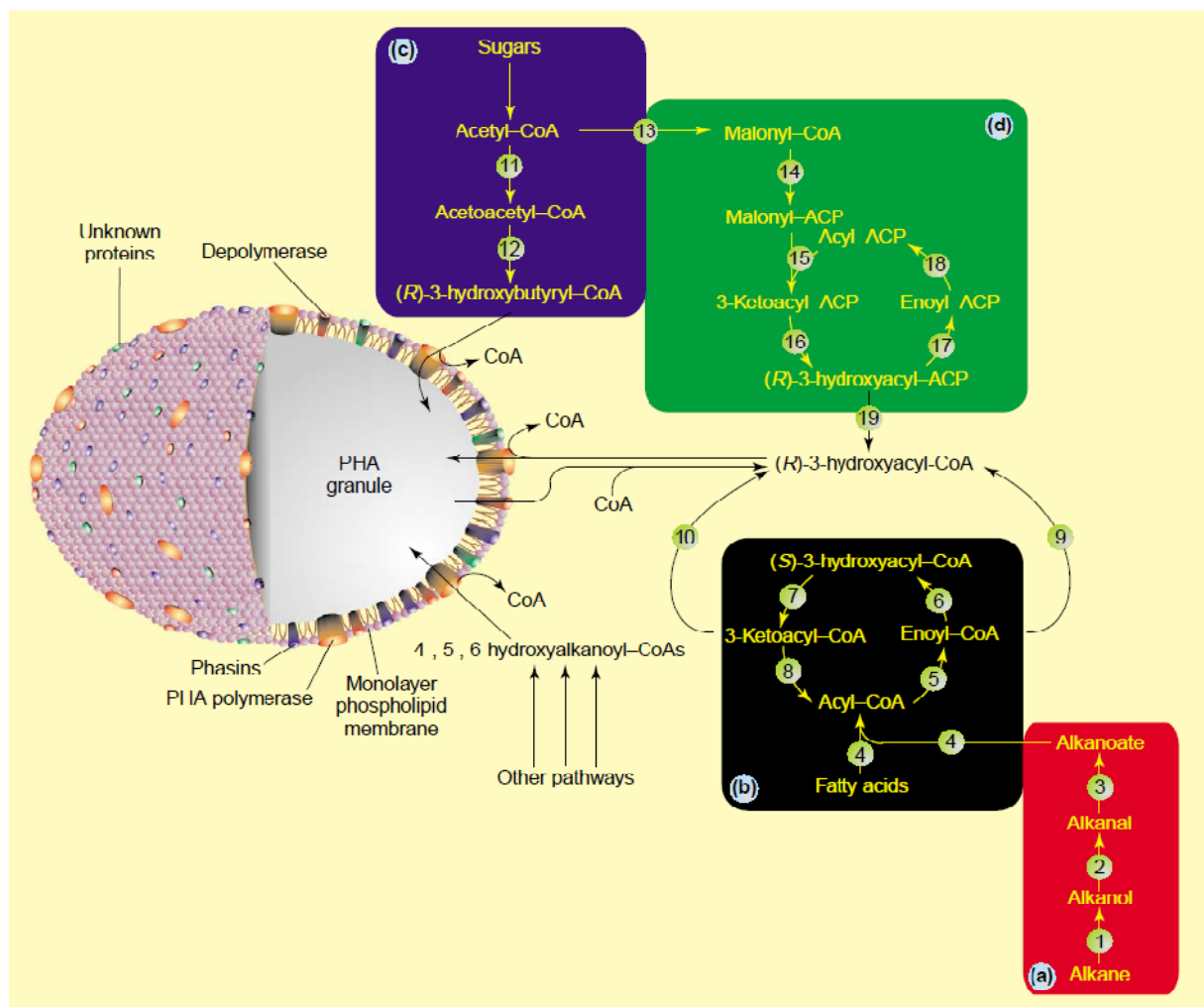


Figure 5 : Structure d'un granule de PHA et les différentes voies de biosynthèse des PHBs et des PHAs. (a) Alkane oxidation pathway. (1) Alkane 1-monooxygenase, (2) alcohol dehydrogenase, (3) aldehyde dehydrogenase. (b) Fatty-acid β -oxidation. (4) acyl-CoA ligase, (5) acyl-CoA dehydrogenase, (6) enoyl-CoA hydratase, (7) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, (8) 3-ketothiolase, (9) (R)-enoyl-CoA hydratase, (10) 3-ketoacyl-CoA reductase. (c) Biosynthesis from carbohydrates. (11) β -ketothiolase, (12) NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase. (d) De novo fatty acid synthesis. (13) acetyl-CoA carboxylase, (14) ACP-malonyltransferase (15) 3-ketoacyl-ACP synthase, (16) 3-ketoacyl-ACP reductase, (17) 3-hydroxyacyl-ACP reductase, (18) enoyl-ACP reductase, (19) 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase. (Luengo et al., 2003)

III.8. Les gènes et les enzymes essentiels pour la formation de PHA

De nombreux gènes codent pour des enzymes impliquées dans la formation de PHA ont été clonés et caractérisés à partir d'une variété de micro-organismes.

Les études ont montré que les gènes *phbA* et *phbB* forme un opéron, tandis que le *phbC* peut se trouver sur le même opéron ou écarté selon l'espèce (Figure 06). (Libergesell et al., 1993 ; Sato et al., 2006) Pour l'enzyme PHA synthase on distingue 4 classes majeures selon le nombre et la composition des sous unités, et la spécificité du substrat, qui sont illustrés dans le tableau 02.

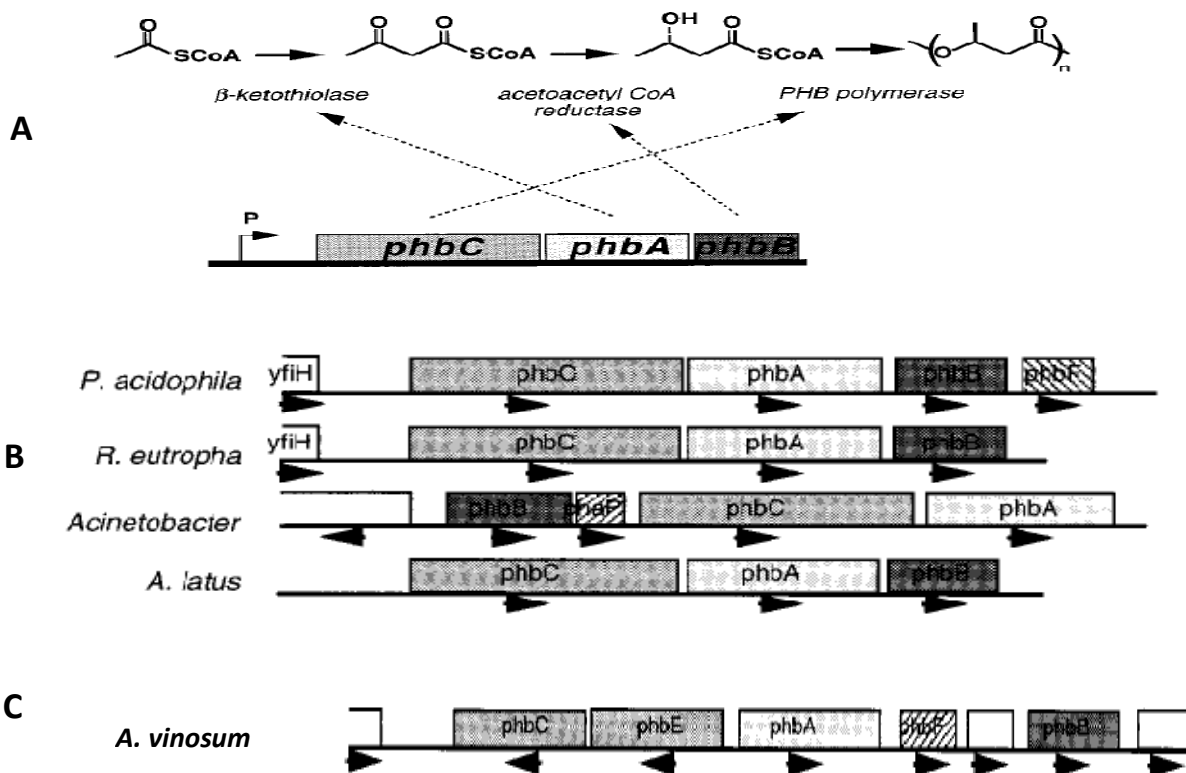






Figure 6: (A) Les 3 enzymes de biosynthèse de PHB sont codé par les gènes de l'opéron *phbCAB*, le promoteur en aval du gène *phbC*. (B) l'opéron *phbCAB* entier. (C) *phb* locus des organismes qui codent pour deux sous unités de P(3HB) polymérase. (Lara et al., 1999).

Tableau 4 : Les quatre classe de polyester synthases (selon **Rehm , 2010**).

Classe	Sous-unités	Espèces	substrat
I	 PhaC ~60-73 KDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCL} -COA (~C3-C5) 4HA _{SCL} -COA, 5HA _{SCL} -COA,3MA _{SCL} -COA
II	 PhaC ~ 60-65 KDa	<i>pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -COA (~ ≥C5)
III	 PhaC PhaE ~40 KDa ~40 KDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{MCL} -COA (3HA _{MCL} -COA(~C6-C8), 4HA-COA,5HA-COA)
IV	 PhaC PhaR ~40 KDa ~ 22 KDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -COA

III.9. Méthodes d'extraction et de récupération de PHA

La dernière étape de la production du PHB implique la séparation du polymère des cellules. Cette étape peut être réalisée à l'aide d'un solvant organique ou en milieu aqueux. Dans le processus aqueux, les parois des cellules sont rompues: rupture chimique, mécanique ou enzymatique (**Maia et al., 2004**). Le polymère est alors relâché, extrait et purifié. Les processus par rupture sont écologiquement durables, ceux qui utilisent la digestion chimique ou les méthodes de séparation mécaniques sont moins chers, mais produisent des dommages aux polymères suite à une réduction de leur poids moléculaire. Par exemple, l'extraction par solvants peut produire des poids de 1 000 000 daltons, tandis que les poids moléculaires typiques des PHA extraits par digestion chimique sont dans la gamme 600 000 daltons.

Les PHA ne sont solubles que dans peu de solvants, notamment dans les solvants halogénés. De plus, ils nécessitent de grandes quantités de solvant en raison de la forte viscosité des solutions résultantes. Afin de récupérer les PHA, avec des taux de rendement très élevés, un haut degré de pureté, et à des prix concurrents et en équilibre avec

l'environnement, plusieurs techniques de purification ont été développées durant ces dernières années. Les plus importantes sont résumées ci-après.

III.9.1 Extractions par solvants

Différentes techniques d'extraction par solvants ont été proposées dans la littérature : les ultrasons, l'agitation, l'extraction au Soxhlet, l'extraction par micro-ondes, le système ASE (*Accelerated Solvent Extraction*). La récupération des PHA par cette technique nécessite l'usage de solvants organiques dont le chloroforme, le chlorure de méthylène, le carbonate de propylène (PC), le dichloro-1,2éthane sont comptés parmi eux (**Doi., 1990; Ramsay et al., 1994**).

III.9.1.1 Extractions par solvant sans chauffage

L'extraction par solvant à basses températures ou extraction par solvant à froid est une technique qui permet la récupération des PHA pratiquement intacts avec une pureté aussi élevée que 99 % (**Ramsay et al., 1994 ; Ghatnekar et al., 2001**). Pourtant, opérant à la température ambiante, il est nécessaire d'utiliser des quantités très grandes de solvants, souvent de chloroforme, ce qui n'est ni économique ni écologique.

Afin d'accroître l'efficacité de l'extraction, différentes techniques ont été explorées dont le prétraitement à l'acétone pour dissoudre les résidus d'eau et de bactéries et favoriser l'extraction ultérieure (**Ramsay et al., 1994; Hahn et al., 1995**).

Il ya aussi d'autres techniques conçues pour maximiser ce taux de diffusion dont le broyage, l'agitation, la sonication et la centrifugation. Les flux de liquides à contre-courant contribuant à maximiser la concentration des composés, les températures élevées servant à maximiser les coefficients de diffusion et parfois des pressions très élevées sont aussi utilisés, pour rendre les liquides supercritiques afin de surmonter les limitations des coefficients de diffusion.

III-9.1.2 Extractions par solvant avec chauffage

L'extraction liquide-solide avec du chloroforme chaud a été largement utilisée pour l'isolation des PHA de la biomasse (**Doi, 1990; Ramsay et al., 1994...**).

En utilisant un extracteur Soxhlet, l'extraction est réalisée en continu, et de manière optimale, en recourant à des quantités nettement moindres de solvants (**Omar et al., 2001; Ghatnekar et al., 2001**). Ceci s'explique par le fait que le solvant qui arrive au contact du solide est

toujours frais, ce qui joue sur le gradient de concentration à l'interface solide-liquide et permet de diminuer la résistance au transfert de masse.

III.9.2 Méthodes de rupture de la membrane plasmique

Les organismes unicellulaires (microorganismes) sont constitués d'une paroi cellulaire externe semi-perméable, solide et rigide, entourant la membrane protoplasmique (cytoplasmique) et le cytoplasme. Le cytoplasme est constitué d'acides nucléiques, protéines, glucides, lipides, enzymes, ions inorganiques, vitamines, pigments, inclusions, et d'environ 80 % d'eau. Pour isoler et extraire les produits intracellulaires, il est nécessaire de briser la paroi cellulaire et la membrane protoplasmique.

Il existe différentes méthodes pour rompre les membranes cellulaires (lyse): les méthodes physiques (mécaniques), chimiques ou enzymatiques, selon les types de cellules. Les méthodes mécaniques sont plutôt dévolues aux cellules et aux tissus, les méthodes enzymatiques sont réservées aux bactéries, aux levures et aux virus afin de dissoudre des structures (capsides, membranes bactériennes...) inaccessibles à la rupture mécanique (Bentancourt., 2008).

III.9.2.1 Rupture mécanique (méthodes physiques pour la lyse de cellules)

Il existe différentes méthodes de lyse cellulaire mécaniques dont, broyage, broyage à l'azote liquide, agitation rapide, sonication, choc osmotique, congélations décongélations successives, pressage et ultracentrifugation. Les fluides supercritiques, tel que le dioxyde de carbone, sont aussi utilisés pour rompre les membranes cellulaires et « libérer » les produits intracellulaires.

III.9.2.2 Digestion chimique

Les principaux agents chimiques utilisés pour rompre les membranes cellulaires (lyse) sont: 1) des oxydants, l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), 2) des bases: l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium (KOH), l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH), 3) les acides, chlorhydrique (HCl) et sulfurique (H₂SO₄), 4) des chélates: acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), 5) des agents tensio-actifs: le di(éthylhexyl) sulfosuccinate de sodium (AOT), le sodium dodécyl sulfate (SDS) et l'éther de polyéthylèneglycol et d'octylphénol (Triton X-100). Ils agissent en déstabilisant les édifices

lipido-protéiques des enveloppes bactériennes et en sensibilisant les micro-organismes aux traitements lytiques (**Bentancourt., 2008**).

III.9.2.3 Lyse enzymatique

Dès lors que les enzymes lytiques sont capables de détruire la paroi des cellules des bactéries, la lyse ou digestion enzymatique a aussi été ciblée comme technique de récupération des biopolymères. Les premiers traitements enzymatiques appliqués à la récupération des PHA avec des enzymes ont été brevetés dans les années 80. Ceux-ci étaient, des traitements combinés impliquant le lysozyme comme enzyme lytique conduisant à la libération des granules PHA intracellulaire d'*Alcaligenes eutrophus* (**Holmes., 1982**) et l'utilisation, entre autres, de l'alcalase, la neutrase et la lecitase pour la récupération de PHB et PHBV d'*Alcaligenes eutrophus* et le PHB du *Methlobacterium organophilum* (Holmes et Lim, 1989). D'autres auteurs ont aussi rapporté des applications du lysozyme comme enzyme lytique, combiné à d'autres agents chimiques (**Harrison et al., 1991 a., Lee et al., 1993**).

III.9.3 Méthodes combinées

La plupart des travaux qui ont été reportés, combinaient l'extraction au CHCl_3 avec la digestion chimique ou enzymatique. La combinaison de l'hypochlorite de sodium avec chloroforme a été utilisé par plusieurs auteurs (**Hahn et al., 1995., Yu et al., 2001**). Cette approche est moins « agressive » que l'exposition unique à l'hypochlorite et dans bien des cas, il est possible d'abaisser la demande en solvant. Elle peut également être effectuée à basse ou hautes températures ou en continu dans un extracteur Soxhlet (**Bentacourt., 2008**).

III.3.4 Méthodes de purification

La dernière étape de l'obtention des PHA, consiste à les séparer des autres substances organiques, de sorte qu'ils puissent être purifiés. Après l'extraction par un solvant organique la phase de séparation du PHA est indissociable de la phase de contact car elle permet, le plus souvent par simple filtration, la séparation de la biomasse en épuisée du solvant en enrichi. Nonobstant, la filtration peut uniquement être utilisée pour séparer le PHA dissous des résidus insolubles. Les PHA dans le filtrat peuvent être récupérés par leur précipitation sélective dans le méthanol, l'éthanol, l'hexane ou l'éther diéthylique (**Doi., 1990, Chaijamrus and Udpuay 2008**).

III.10. Production industrielle de PHA

Durant les années 70 suite à une crise mondiale du pétrole le prix du combustible fossile a beaucoup augmenté. Dans ce contexte, les recherches autour des PHA ont fleuri. À la fin des années 1980, ICI Zeneca a commercialisé des PHA. Cette société a développé un processus pour la production à l'échelle industrielle du *P(3HB-co-3HV)* obtenu par fermentation microbienne, qui a été commercialisé sous le nom de « Biopol ».

En 1994, *Monsanto Chemical* achète le droit de brevet de « Biopol ». Cependant le procédé ne serait pas commercialement viable tant que la teneur n'atteindrait pas 20 % w/w. En 1998, le projet de perfectionnement du « Biopol » a été abandonné et plus tard, en 2001, la propriété intellectuelle a été vendue à *Metabolix, Inc.*

Metabolix a mis au point une voie de polymérisation qui donne des PHA très purs, ayant des applications biomédicales. Les gènes codant les enzymes responsables de la biosynthèse des PHA dans *A. eutrophus* ont été exprimés dans *E. coli* pour comprimer les coûts de production et simplifier la purification. En 2006, Metabolix a formé *Telles™*, un *joint-venture* 50-50 en participation avec *Archer Daniels Midland Company (ADM)*, pour commercialiser la production des biopolymères sous le nom de *Mirel™*, fait par fermentation microbienne à partir de sucre de maïs, sucre de canne ou d'huiles végétales.

Procter & Gambie ont créé une famille de PHA fabriqués par des *Pseudomonas sp*, appelée *Nodax*

Au Québec, *BioMatera Inc* se spécialise dans la mise au point de biopolymères de type PHA, en employant des bactéries pour la fermentation de sirop de glucose. Les matières actuellement envisagées englobent les gels et les crèmes pour les systèmes de médicaments injectables et des matrices pour la fabrication de produits cosmétiques et la génération des tissus.

Le projet *BLUECOPHA* (2015-2017) fait suite aux projets *BIOCOMBA* (2010-2011) et *PHAPACK* (2012-2014). L'objet de ces 2 projets successifs était l'obtention d'un polyester biosourcé et biodégradable, polyhydroxyalcanoate (PHA), issu d'une synthèse bactérienne et pouvant être utilisé en plasturgie pour la réalisation d'emballages pour l'agroalimentaire. L'obtention d'un tel matériau implique l'utilisation de substrats carbonés issus ici spécifiquement de déchets de l'industrie agroalimentaire. Ces derniers sont intégrés dans le procédé de production de PHA réalisé par fermentation bactérienne à partir de souches isolées en milieu marin.

Les perspectives de développement des matériaux biodégradables sont encourageantes et les spécialistes prévoient une production de plusieurs millions de tonnes par an. Mais, pour atteindre de telles productions, il faut, tout d'abord, réduire le coût des matériaux biodégradables qui à l'heure actuelle reste de 2 à 10 fois supérieur à celui des plastiques d'origine pétrochimiques.

III.11. Domaines d'application des PHAs

En plus de résoudre les problèmes de déchets, les plastiques biodégradables ont d'autres avantages. En général, les propriétés des PHA comme plastiques trouvent des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'emballage, du textile, de l'agriculture, de la pharmacie, de l'électronique, de la médecine, de l'automobile, etc.

III.11.1 En médecine et pharmacie

Les PHA sont des polymères biocompatibles et biorésorbables, deux propriétés recherchées pour des applications médicales et pharmaceutiques. En tant que matériau biocompatible, les PHA sont capables d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner. Pour des applications médicales spécifiques, en plus de la biocompatibilité, on recherche également des matériaux biorésorbables pouvant se décomposer tout naturellement dans l'organisme.

Les matériaux biorésorbables sont dégradés naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse enzymatique et libèrent des molécules assimilables et non toxiques. En pharmacie, les médicaments à libération contrôlée (figure 07) sont des exemples d'application où la biorésorbabilité des polymères joue un rôle important (**Bernd et Rehm 2006; Rabetafika et al; 2006., Zribi-Maaloul et al., 2013**),

Pour les implants médicaux, les matériaux inertes tels que les céramiques sont de plus en plus remplacés par des polymères d'origine naturelle (**Liu et al., 2001**).

Le PHA est utilisé dans la fabrication de bandages chirurgicaux, de fils de suture, de poudre médicale dans des sacs d'ostomie, dans le remplacement d'os, etc (**Lam et Wang 2002**).

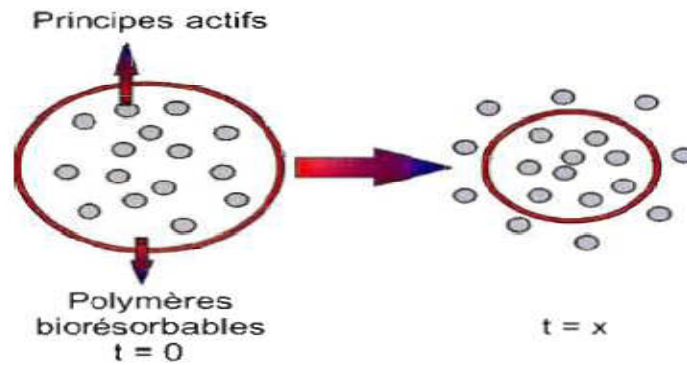


Figure 7 : Application des biopolymères : libération contrôlée des principes actifs

III.11.2. Agriculture

Où la propriété de biodégradabilité des biopolymères est essentielle. Dans ce domaine, les films de paillage à base de biopolymères s'imposent progressivement en remplacement des paillis en polymères conventionnels (**Rabetafika et al., 2006**).

Les applications sont presque infinies, en voici quelques exemples :

- Emballages alimentaires
- Sacs
- Films
- Pièces d'automobiles
- Enduit pour carton
- Bouteilles d'eau
- Pellicules agricoles
- Ustensiles

Le Développement de PHA comme matériau de substitution potentiel de certains plastiques conventionnels a attiré beaucoup d'attention en raison des propriétés biodégradables et biocompatibles de PHA. Les applications potentielles de PHA dans diverses industries et dans le domaine médical sont encourageantes. Néanmoins, le coût de production de PHA a été un inconvénient majeur. En conséquence, les scientifiques ont montré d'immenses progrès dans la recherche de nouvelles souches bactériennes, en créant de nouveaux types de souches recombinantes et d'adapter différents types de PHA pour réduire le coût de production. Les activités de commercialisation dans plusieurs pays en cours sont censées à mettre PHA disponibles pour des applications dans divers domaines bientôt.

III.12. Biodégradabilité du polymère

Le PHB, P (HB-HV) et les autres sont des polyhydroxyalcanoates produits par les micro-organismes en tant que sources d'énergie. P (HB-HV) est biodégradé en milieu microbien actif (**Poirier et al., 1995 et Lee., 1996**). Les micro-organismes colonisent la surface du polymère et sécrètent des enzymes qui dégradent le P (HB-HV) en HB et unités de HV, ces unités sont ensuite utilisées par la cellule comme une source de carbone pour leur croissance. Le taux de polymère biodégradé dépend d'une variété de facteurs, y compris l'aire de la surface, l'activité microbienne du milieu, le pH, la température, l'humidité et la teneur en matières nutritives. Le P (HB-HV) est insoluble dans l'eau, n'est pas affecté par l'humidité, ne se dégrade pas sous des conditions normales de stockage et il est stable dans l'air (**Chee et al., 2010**).

Les produits finaux de la dégradation de PHA en milieu aérobie sont le dioxyde de carbone et l'eau, tandis que le méthane est également produit dans des conditions anaérobies.

III.13. Autres attractifs des ressources renouvelables

Actuellement, l'utilisation de sources de carbone bon marché dans la biosynthèse des PHA est prévu pour réduire son coût de production. Des études sur d'autres sources de carbones tels que le lactosérum, la xylose, la mélasse de betterave et le sirop de datte ont été utilisé par différentes bactéries

Tableau 5 : Aperçu de la famille des biopolymères d'origine naturel (**Betancourt 2008**).

<p>Polyesters PLA (polymères d'acides lactiques) PHA (polyhydroxyalcanoates)</p>	<p>Polysaccharides (plantes/algues) Amidon, Cellulose, Pectine, Agar, Alginate Carraghénane, Konjac, Gommés</p>
<p>Protéines Zéine, Gluten, Polyacides aminés Silks, Collagène/gélatine, Élastine Résiline, Adhésives, Sérum d'albumine Soya, caséine</p>	<p>Polysaccharides (animal) Acide hyaluronique, Chitine / chitosane</p>
<p>Polysaccharides bactériens Gellane, Dextrane, Xanthane Curdlane, Lévané, Polygalactosamine Celluloses bactériennes</p>	<p>Lipides / surfactants Acétoglycérides, cires, Emulsion</p>
<p>Polysaccharides fongiques Glucane de levure Pullulane, Elsinane</p>	<p>Polyphénols Lignines, Tannins, Acides humiques</p>
	<p>Autres polymères Shellac PGA (poly-gamma-glutamique) Polymères synthétisés à partir de graisses et d'huiles (ex : nylon à partir de l'huile de ricin)</p>

Partie

Expérimentale

I. Matériaux et Techniques Expérimentales

I.1 Problématique et Objectif

Le recours massif aux plastiques traditionnels d'origine fossile, dérivées de ressources non renouvelables (pétrole et le gaz naturel) pour la fabrication d'objets à usage unique ou à courte durée de vie et le manque de collecte systématique se traduisent par une accumulation de plastiques dans l'environnement, source de nuisance visuelle et de pollution des sols et des milieux maritimes. Y a-t-il une solution pour réduire cette pollution ? Le développement scientifique et technologique dans le domaine de la biodégradation et biopolymères a connu une progression significative.

Il existe une très grande diversité de polymères issus de ressources renouvelables, parmi lesquels on trouve les polyhydroxyalcanoates (PHAs) qui sont produites naturellement par de nombreux microorganismes à partir de sources de carbone variées. Le problème majeur de développement de ces bioplastiques c'est leur coût qui est très élevé, l'exploitation des déchets est l'une des solutions pour réduire les coûts de production.

La présente étude a pour but ; l'isolement des espèces du genre *Bacillus* à partir du sol d'eau et d'eaux usées afin de cribler et identifier des souches capables d'accumuler les polyhydroxyalcanoates, puis tester l'effet de différents paramètres de production de bioplastique basés surtout sur le rapport C/N dans le milieu de culture. Cette étude vise également l'évaluation de certains déchets agroalimentaires voire la mélasse de canne, mélasse de betterave et les rebuts de dattes comme source de carbone dont l'objectif est de réduire les coûts de production.

I.2 Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés dans différents lieux de la Wilaya de Tiaret et de Sidi Bel Abbès effectués entre 2013 et 2015. Les prélèvements ont été effectués à partir de onze sols différents, la technique de prélèvement consiste à enfoncer une spatule stérile à une profondeur de 5-15 cm, puis les échantillons sont placés dans des boîtes pétries stériles. Les prélèvements d'eau usée, et de oueds (oued Mina et oued Mekerra) sont collectés à une profondeur de 10 à 15 cm, dans des flacons en verre stérile. Les échantillons sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière et conservés à 4°C.

I.3 Isolement

Une pesée de chaque 10 gramme de sol ou 10ml d'eau a été introduite dans 90 ml d'eau distillée stérile. Des dilutions décimales 10^{-1} à 10^{-7} ont été préparées à partir de la solution mère. L'isolement sélectif des *Bacillus* met à profil la résistance de leurs spores à la chaleur, la littérature scientifique préconise un chauffage pendant 10 minutes à 70-80°C (sélection thermique). (Yilmaz et al; 2005). Ces échantillons et leurs dilutions ont subi un traitement thermique. L'ensemencement consiste à étaler 0,1 ml de chaque dilution sur gélose nutritive (GN) puis les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48h.

I.4 Purification et identification primaire

La purification est nécessaire par l'utilisation de la technique classique de repiquage-étalement sur gélose. Après purification si les cultures sont constituées de même type de colonie après 24h à 30°C, l'identification primaire du genre *Bacillus* peut être entamée sur la base de l'aspect macroscopique et microscopique des bactéries, et recherche d'une catalase.

I.4.1. Aspect macroscopique

Les colonies des *Bacillus* sont de grosses colonies de 3 à 7mm de diamètre. Les autres critères pris en considération sont ; la forme de la colonie, aspect de la surface, l'opacité et la couleur.

I.4.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui intervient dans la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Sur une lame propre on dépose une goutte d'eau oxygénée (30 Volume) puis on écrase une parcelle de culture bactérienne. Si la bactérie possède cette enzyme, alors un dégagement gazeux sera observé (Leyral et Vierling , 2007).



Après une caractérisation macroscopique, les colonies qui ont des aspects, couleurs, formes, tailles différents et qui possède une catalase positif ; seront isolé une deuxième fois sur la gélose nutritive et incubé pendant 24 à 48h à 30°C pour effectuer une coloration de Gram.

I.4.3 Aspect microscopique

L'examen microscopique des souches est basé sur la coloration de Gram. Cette technique de coloration décrite par Christian Gram (1884) permet de différencier entre deux grands groupes de bactéries ; les Gram positif et Gram négatif. La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram de l'isolat sont déterminés, ainsi que l'endospore peut être mis en évidence dans le corps bactérien par sa réfringence sur des cultures âgées.

I.5 Le criblage et sélection des souches qui accumulent les PHAs

Le dépistage de PHA s'effectue sur milieu de culture de production MSI (Annexe 2). Deux méthodes sont utilisées pour la sélection des bactéries capable d'accumuler les lipides intracellulaires :

- Coloration des colonies cultivées sur des boîtes de Pétri par le noir soudan B.
- Coloration des frottis après fixations par le noir soudan B.

I.5.1 Coloration sur boîte

Le criblage des bactéries productrices de PHA s'effectue directement par coloration des colonies isolées sur boîte de Petri avec le noir soudan B (0,02 dans 96% d'éthanol). La technique consiste à transférer les colonies sur un milieu de culture de production coulée sur boîtes de Pétri,ensemencées en zig-zag en double répliques, incubées à une température de 30°C pendant 48h. La lecture est effectuée par coloration de la moitié des boîtes par le noir soudan B et l'autre moitié est utilisée comme référence pour sélectionner les bactéries à PHA+. La réaction est réalisée pendant un intervalle de temps de 15 min. Des lavages successifs ont été effectués avec l'éthanol (96%).

I.5.2 Coloration sur frottis

Les frottis bactériens séchés et fixés sur lames propre sont colorés avec le noir soudan B (0,3% dans l'éthanol 70%) pendant 15 mn, puis lavé avec l'éthanol ensuite Rinçage et recoloration avec la Fushine pendant 1mn. La présence des vésicules de PHA intracytoplasmiques est effectuée par examen microscopique des frottis.

Les souches bactériennes du genre *Bacillus* individualisées et choisies pour l'identification ont été conservées sur milieu de conservation et dans du glycérol à -20°C.

I.6 Identification biochimique des souches productrices de PHA

Les souches sélectionnées productrices de PHA sont capable d'accumuler des vésicules lipidiques dans leurs cytoplasmes étaient revivifiées sur gélose nutritif puis identifier selon la galerie classique et compléter par la galerie API system 20^E (**Gordon et al., 1973., Logan et al., 2009**).

I.6.1 Recherche de la cytochrome-oxydase

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques «Ox» dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure. A partir d'un milieu solide, une quantité de culture bactérienne a été déposée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée sur un disque oxydase placé sur une lame, La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Joffin et Leyral., 2006**).

I.6.2 Type respiratoire

Ce test a été effectué selon les recommandations de **Marchal et al., (1982)**. La gélose viande foie (VF) répartie en tube et régénérée par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement, le milieu est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

I.6.3 Mannitol mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se manifeste par un virage du milieu au jaune après 24h d'incubation à 30°C. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt et al., 1994**).

La mobilité a été étudiée aussi par observation microscopique à l'état frais sur cultures en phase de croissance dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle.

I.6.4 Milieu TSI

Le milieu de culture gélosé Triple Sugar Iron est utilisé pour la différenciation des micro-organismes sur la base de la fermentation de trois sucre et de production de sulfure d'hydrogène. Ce milieu contient les ingrédients suivants : le dextrose, lactose et du saccharose, lorsque ces hydrates de carbone sont fermentés, Le virage de la couleur du milieu de culture en présence de l'indicateur de pH le rouge de phénol, au jaune gras, indique la production d'acide. La production du gaz se manifeste par l'apparition des bulles d'air dans le culot et formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre signifie la production d'H₂S (**Marchal et al., 1982**).

Ce test a été réalisé par l'ensemencement d'une culture pure avec une pipette Pasteur par piqure centrale dans le culot et des stries serrées sur toute la surface de la pente. Les tubes ensemencés sont incubés à une température de 30°C pendant 24 h.

I.6.5 Etude de l'hémolyse

L'hémolyse, est mise en évidence par l'ensemencement des colonies sélectionnées en spots sur la surface de la gélose au sang frais et l'incubation à une température 30°C à un intervalle de temps de 5 jours. Le milieu utilisé contient 10% de sang de cheval défibrinés et stérile. L'ajout est effectué par incorporation du sang dans le milieu en surfusion avec une bonne homogénéisation (**Marchal et al., 1982**). Une lecture positive se traduit par disparition de la couleur rouge et l'apparition d'une zone claire (hémolyse partielle), voir incolore (hémolyse complète), indique d'hémolyse β . L'apparition des produits verdâtres ou marron autour de la colonie, est expliquée par une digestion incomplète hémolyse α .

I.6.6 Détermination de l'activité amylolytique

La Détermination de l'activité amylolytique est réalisée par ensemencement en spot des souches sélectionnée productrices sur une gélose nutritive contenant une concentration de 10% d'amidon, puis incubées à une température de 30°C pendant 5 jours. Les cultures sont ensuite recouvertes d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De VOS et al., 2009**).

I.6.7 Test de la Lécithinase

La présence de la Lécithinase chez les souches testées est réalisée par l'ensemencement en spots sur le milieu de culture de trypticase soja agar contenant une concentration de 10% l'émulsion du jaune d'œuf stérile (annexe 02), incubées à une température de 30°C pendant 5 jours. La production de phosphoryle-choline, diester d'acide gras et de glycérol à partir de lécithine se traduit par l'apparition d'une zone opalescente autour de la colonie. (De VOS et *al.*, 2009).

I.6.8 Test de tolérances de salinité

Dans le but d'explorer l'effet de la concentration de NaCl sur la croissance des souches productrices de PHA, les souches sont ensemencées en strie sur une gélose nutritive additionnée de 7% et 10% de NaCl, incubées à une température de 30°C pendant 24h. La lecture positive se manifeste par la présence d'une croissance bactérienne due à la tolérance des souches au NaCl, l'absence de la biomasse bactérienne indique l'intolérance à la salinité (Joshi et *al.*, 2008).

I.6.9 Plaque API 20E

La réalisation des autres tests biochimiques tels que la β -galactosidase (ONPG), l'Ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H₂S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres ont été réalisés en utilisant la plaque **API 20E**. La galerie **API 20E** comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans l'API médium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation de 24 heures à 30°C se traduisent par des virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Biomérieux., 2006) (Annexe 03).

Pour les calculs à effectuer, en vue, de l'identification probabiliste de chacune des souches obtenues, nous avons eu recours à la matrice d'identification des *Bacillus* selon la galerie API 20E établie par **Michel Cavalla en 2003**, en utilisant le tableur Excel, et d'autres tests complémentaires tels que la mise en évidence de la lécithinase, de l'amylase et de l'hémolyse ont été réalisés respectivement sur gélose au jaune d'œuf, gélose à l'amidon et gélose au sang.

I.7. Optimisation de la production des PHAs

Après identification et criblage des souches qui sont capable de synthétiser les lipides intracellulaire dans le milieu de production, une seule souche a été sélectionnée pour l'optimisation de la production des PHAs qui dépendent surtout du rapport C/N dans le milieu de culture. Un diagramme récapitulatif des différentes étapes de l'optimisation est représenté dans la Figure 8.

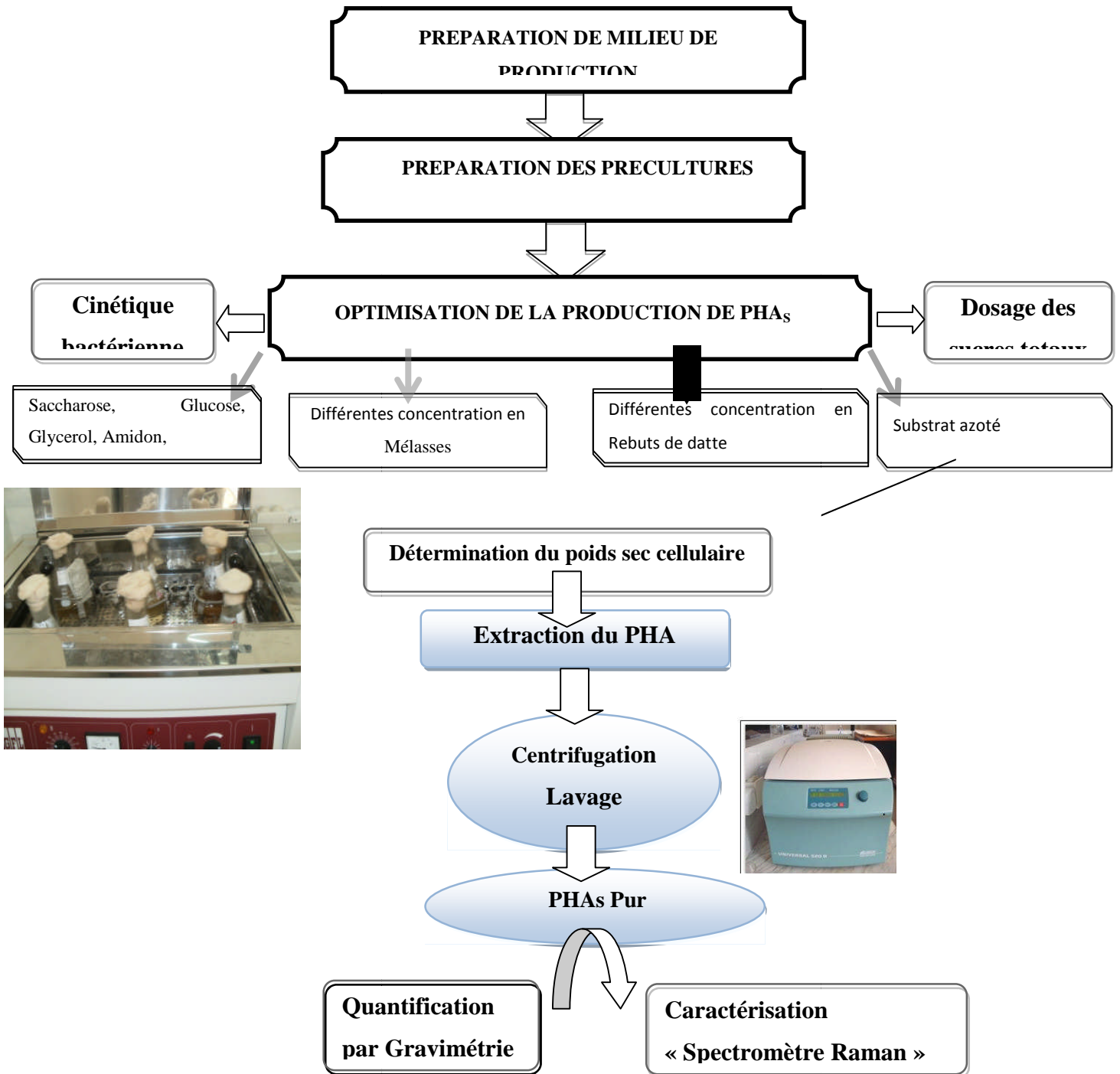


Figure 8 : Diagramme des étapes de l'optimisation

I.7.1. Matériel végétal

Les mélasses (de canne à sucre et de betterave) et les rebuts de datte sont utilisés comme sous-produits dans ce présent travail pour réduire les coûts de production de bioplastique.

I.7.1.1. Les rebuts de dattes

Une variété de datte destinée à l'alimentation animale et qui est très connue au niveau de la wilaya de Bechar et même au niveau national (**Khal., 1982**), appelé Degla-Beïda (dattes sèches) a été utilisée. Ce choix est orienté par leur faible valeur marchande, leur richesse en sucre et leur disponibilité.



Figure 09 : Dattes sèches

Préparation de moût des rebuts de datte (MD)

Le moût est un liquide sucré servant de matière première dans les industries de fermentation. Dans cette étude, le moût de datte a été utilisé comme source de carbone.

Pour sa préparation, nous avons procédé successivement au :

- **Lavage**: est effectué à l'eau de robinet, permet de débarrasser les dattes de poussières, du sable et une éventuelle diminution de la charge microbienne.

Le lavage est une opération nécessaire pour obtenir un produit de qualité hygiénique relative.

- **Egouttage**: permet de débarrasser les dattes de l'eau de lavage, réalisé à l'aide d'un tamis.

- **Dénoyautage**: réalisé manuellement, les pulpes de dattes sont ensuite découpées en petits morceaux.

- **Hydratation** : les pulpes de datte sont immergées dans de l'eau distillée, le tout est porté au bain marie à une température de 80°C pendant 45 minutes, avec une agitation continue. À raison de 1Kg/2,5L d'eau distillée (**Acourene et al., 2008**).

- **Filtration**: Un pressurage permet d'extraire le maximum de jus et donc un maximum de sucre.

- **Stérilisation**: Réalisé à l'autoclave, à une température de 121°C pendant 10 minutes. Ce traitement est largement suffisant pour réduire la charge microbienne du moût avec une diminution de la compétition entre les souches bactérienne présentes sans provoquer la dégradation et la caramélisation des sucres (**Zergat., 1996**).

1.7.1.2 Les mélasses

Deux origines de mélasse ont été testées dans cette étude : la mélasse de canne et de betterave il s'agit d'un résidu du raffinage du sucre extrait de la canne à sucre ou de Betterave (**Raffinerie Mostaganem. Algérie**). Ce choix a été orienté par leur richesse en sucre et leur disponibilité. La stérilisation elle a été effectuée à une température de 120°C pendant 10mn.

1.7.1.3. Analyses physico-chimiques des sous-produits utilisés

1.7.1.3.1. La valeur du pH

La valeur du pH est mesurée à l'aide d'un pH- mètre, dont sa valeur est en fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution (**Geoffrey, 2011**). La détermination du pH s'effectue par une lecture directe à l'aide d'un pH mètre étalonné avec des solutions tampons (de 4 et 7). La lecture s'effectue directement sur l'afficheur numérique de l'appareil à une température de 20°C. (**Boulal et al., 2010**).

1.7.1.3.2. La densité

La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre. Cette technique permet la détermination du rapport du poids d'un volume connue de liquide étudié sur le poids d'un même volume d'eau **dans les mêmes conditions de température** (**Rodier, 1992**).

Elle est déterminée par la méthode **AFNOR (1984)**.

$$d = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0}$$

d : La densité.

P₀ : La masse du pycnomètre vide;

P₁ : La masse du pycnomètre rempli d'eau distillée;

P₂ : La masse du pycnomètre rempli du produit à tester.

I.7.1.3.3. Teneur en matière sèche

Les échantillons des sous-produits utilisés sont séchés jusqu'à l'obtention d'une masse constante à (105 ± 5) °C. La différence de masse avant et après séchage sert de mesure pour la teneur en matière sèche. Ces teneurs sont exprimées en pourcentage de masse, est donné par la formule suivante :

$$MS = [P_3 - P_1 / P_2 - P_1] \cdot 100$$

P₁ : poids du creuset vide.

P₂ : poids du creuset + la prise d'essai.

P₃ : poids du creuset vide+ matière sèche.

I.7.1.3.4. Teneur en eau

La teneur en eau est mesurée par détermination de la perte de poids de l'échantillon après son séchage dans l'étuve. Dans des creusets préalablement pesés et tarés, une pesée de 5g de sous-produit est ajoutée, puis ces creusets sont placés dans l'étuve à une température 105°C. Après 3 heures de séchage. Les creusets sont retirés, placés dans un dessiccateur et pesés après refroidissement. L'opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un poids constant (AOAC., 2002).

La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$TE = [P_1 - P_2 / P_0] \times 100$$

TE : Teneur en eau (%).

P₀ : Poids de la prise d'essai.

P₁ : Poids du creuset plus échantillon avant étuvage(g).

P₂ : Poids du creuset plus échantillon après étuvage(g).

I.7.1.3. 5. Taux de cendres

Les cendres totales permettent de juger la richesse en éléments minéraux (**Barkatov et Elissev., 1979**). Une pesée de 5-10 g de produit à analyser est introduite dans un creuset de porcelaine calciné, chauffée prudemment jusqu'à ce que l'échantillon devient noir et sec et qu'il n'y ait plus de risque de perte. Ensuite, l'échantillon est calciné dans un four à moufle à une température de 600°C pendant 1h30` jusqu'à l'obtention de cendre grisâtre ou blanchâtre. L'échantillon est refroidi dans un dessiccateur et le creuset est pesé. Le procédé est réalisé plusieurs fois jusqu'à obtention d'un poids constant (**AOAC., 2000**). Les résultats sont exprimés en pourcent de la substance sèche, calculés par la formule suivante :

$$M_m(\%) = [(M_2 - M_1) / M_0] \cdot 100$$

D'où :

M_m : Teneur en cendre (%).

M_0 : Masse initiale du MC (g) ;

M_1 : Masse du creuset vide (g) ;

M_2 : Masse du creuset + cendre (g).

I.7.1.3.6. Taux de sucres

Le phénol en présence d'acide sulfurique est employé pour la micro-détermination colorimétrique quantitative des sucres et de leurs dérivés méthylés, des oligosaccharides et des polysaccharides, selon la méthode originalement développée par **Dubois et al., (1956)**.

La réaction entre le phénol et les sucres implique la déshydratation des sucres (hexoses) en 5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde (HMF), en présence d'acides forts. La réaction subséquente du phénol avec HMF mène à la formation d'un chromogène inconnu. En présence de ces deux réactifs, les sucres donnent une couleur jaune crème, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux. La densité optique est déterminée à 490 nm (**Imbeaul., 1997**).

Dans un tube à essai, un volume de 1 ml de l'échantillon à tester est ajouté à un volume de 1 ml de phénol (5%) et de 5 ml d'acide sulfurique concentré (96%). Le mélange est rapidement homogénéisé à l'aide d'un vortex, puis placé dans un bain marie pendant 20 minutes à une température 25-30°C, la solution reste stable pendant plusieurs heures à la température ambiante (**Dubois., 1956**). La lecture de l'absorbance s'effectue à une longueur de 490 nm et la

concentration en sucres totaux est mesurée à partir de la courbe d'étalonnage de solution standard de saccharose (Annexe 04).

I.7.2. Sélection du milieu de production et de la souche productrice de PHA

Afin d'évaluer la croissance bactérienne et la production des lipides chez les souches sélectionnées productrices de PHA, deux cultures ont été effectuées sur deux milieux synthétique additionnés d'agar (MS1, MS2) (la composition est donnée dans l'Annexe 02), l'incubation se fait à une température 30°C pendant 48 heures. La présence des vésicules lipidique est déterminée par coloration des colonies et des frottis avec le noir du Sudan B (Phanse *et al.*, 2011).

1.7.2.3 Identification génotypique de la souche sélectionnée productrice de PHA

L'identification génotypique de la souche sélectionnée productrice de PHA par la technique d'amplification de la région ADN_r 16S a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée et moléculaire de la Faculté de Pharmacie Valence Espagne. Découverte en 1983 et mise au point par K.Mullis en 1985, la PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de répllication ciblée *in vitro*, qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant d'ADN, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures.

Extraction et purification de l'ADN génomique

Une colonie bactérienne de 24h, sélectionnée productrice de PHA est suspendue dans un volume de 5 ml de bouillon nutritif, incubée à une température 37°C pendant 24 heures. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à une vitesse de 6000 rpm pendant 5 min. L'extraction est procédé selon le protocole décrit par Sambrook *et al.*, (1989).

La biomasse récupérée est ensuite suspendu complètement dans un volume de 200 µl d'une solution tampon contenant .Tris-EDTA (50 mM Tris-HCl ; 2,5mM EDTA ; pH 8,0). Un volume de 500 µl d'une solution de lyse est ajouté. Le mélange est homogénéisé d'une manière inversée, placé ensuite dans un bain marie, chauffé à une température de 55°C pendant 30 min. Un volume de 700 µl de phénol-chloroforme-isoamylol est ajouté au lysat, le

phénol permet la dénaturation des protéines. Cependant, le chloroforme et l'alcool isomylé permet l'élimination des traces de phénol dans la phase aqueuse du lysat.

Le mélange est soumis à une agitation pour l'obtention d'une suspension laiteuse stable, centrifugé à une vitesse de 10 000 g pendant 15min. Des volumes de 200 µl d'acétate de sodium et 400µl d'alcool isopropylique sont ajoutés à un volume de 600 µl récupéré de la phase aqueuse dans des tubes Eppendorf. Le mélange est soumis à une température de -20°C pendant 30 min, centrifugé à une vitesse de 10 000 g pendant 15min, pour récupérer l'ADN génomique. Celui-ci est lavé deux fois avec l'éthanol 70% puis séché dans des Vacu-speed, et conservé à une température -20°C. La pureté et la qualité de l'ADN génomique est déterminée par lecture photométrique à deux longueurs d'onde différentes 260, 280 nm. .

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant en grand nombre de fois grâce à une polymérase.

L'ADN génomique de la souche en question a été extrait selon le protocole décrit précédemment. Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié en utilisant de l'ADN chromosomique isolé comme matrice. Les amorces utilisées pour l'amplification étaient Bact-SD-0011-AS-17 5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3' comme avant et S - * - Univ-1392-b-A-15 5'-ACGGGCGGTGTGTTC-3' comme amorce anti sens (**Alm et al., 1996**). Toutes les réactions PCR ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 100 µl de volume total en utilisant 1 µg d'ADN matrice. L'amplification était réalisée dans un Thermocycleur réglé à une température de dénaturation de 95°C pour 5 minutes puis 30 cycles d'amplification (chaque palier est contrôlé à 1min à 94°C, 1min à 55°C et 1 min à 72°C). En fin, la température d'incubation était de 5 minutes à 72°C.

Le produit de la PCR était analysé par électrophorèse sur 1% de gel d'agarose. Les fragments d'ADN amplifiés ont été visualisés par la lampe UV et les images ont été prises à l'aide d'une image Hero LAB analyseur (Wiesloch, Allemagne).

I.7.3. Préparation de pré-culture

La bactérie sélectionnée productrice de PHA, est inoculée à raison de 10^6 bactéries/ml, dans des Erlenmeyers contenant un volume de 100 ml de milieu de production avec une concentration de 2% de source de carbone (Glucose, mélasse de canne, mélasse de betterave

et moût des rebuts de datte), incubées dans un bain marie agitateur à une température de 30°C pendant 24h.

I.7.4. Optimisation des sources de carbone, d'azote et la période d'incubation

Dans le but d'optimiser la croissance et la production des PHAs chez la souche productrice sélectionnée, l'effet de certains facteurs tels que les sources de carbone, sources d'azote, périodes d'incubation sur milieu de production ont été étudié.

Le glucose utilisé dans le milieu synthétique est remplacé par d'autres sources de carbones telles que l'amidon, le glycérol, saccharose à une concentration de 2%. La mélasse de betterave, la mélasse de canne et le moût des rebuts de datte à différentes concentrations ont été utilisé avec un rapport C/N élevé. L'effet des sources d'azote suivantes : l'extrait de levure, peptone, asparagine, tryptone et l'extrait de viande avec une concentration de 0,05%, sur la croissance et la production de PHA chez la souche sélectionnée ont été évalué. Par ailleurs, le taux croissance et la production des PHAs au cours des phases de développement (8h, 24h, 48h, 55h, 72h) de la souche sélectionnée a été aussi déterminé.

I.7.5. Détermination du poids sec cellulaire

L'estimation de la biomasse bactérienne est effectuée par mesure du poids sec. Les cellules bactériennes de la souche sélectionnée productrice sont centrifugées à une vitesse de 6000 rpm pendant 20 minutes, lavées avec l'eau distillée. Le culot est séché à une température 100-110°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, exprimé en gramme matière sèche par litre (Al-Obaidi., 1987).

I.7.6. Extraction des PHAs

Le PHA est extrait de la biomasse bactérienne par la méthode d'extraction Solide/Liquide au chloroforme. Cette technique permet la perméabilisation de la membrane et la solubilisation des PHA (Jacquel *et al.*, 2007). Des volumes de 3 ml, 5 ml et 10 ml de chloroforme, sont ajoutés à une biomasse bactérienne de 20 mg préalablement broyée dans un mortier et introduite dans des tubes à essais, soumis à une agitation au vortex pendant 1 minute, les échantillons sont ensuite portés au bain marie à une température de 50°C pendant 30 minutes. A la fin et à la moitié du temps d'extraction les solutions on été agitées pendant une minute. Après leur refroidissement, elles ont été filtrées avec du papier filtre Whatman

n°1. Par fois la filtration est très lente et une partie du solvant s'évaporait avant de traverser le papier, une quantité de solvant ont été alors ajoutés. Puis laissés les échantillons pendant 24h et 48 à la température ambiante (Doi, 1990 ; Betancourt, 2008).

I.7.7. Purification des PHAs

La purification de PHA est effectuée par l'élimination des autres substances organiques. L'extraction de PHA est réalisée dans un milieu aqueux par la destruction de la paroi bactérienne par de lyse mécanique, L'élimination de la biomasse est effectuée à l'aide d'une filtration sur papier Watman. Le PHA dans le filtrat est récupéré par précipitation avec l'éthanol concentré à 96%. Le PHA est récupéré par centrifugation à une vitesse de 10 000 rpm, à une température de 10°C pendant 20 mn, lavé deux fois avec l'éthanol puis séché à température ambiante (Chaijamrus et al ; 2008).

I.7.8. Estimation de la quantité du polymère dans la biomasse

La quantité du polymère produite est déterminée par gravimétrie. Après l'évaporation du solvant, le PHA récolté sous forme d'une poudre blanche en tubes Eppendorf préalablement séchés et pesés, puis exprimée en pourcentage par rapport au poids sec cellulaire (Salazar et al., 2014).

I.7.9. Cinétique bactérienne et utilisation des Sucres

L'étude du suivi de la croissance de la souche sélectionnée productrice de PHA a été réalisé sur milieu de production à une température de 30°C pendant 48 heures. Des prélèvements stériles ont été effectués à un intervalle de temps régulier afin de déterminer la densité optique à une longueur d'onde de 650 nm (Zergat., 1996).

La consommation du sucre dans le milieu de production contenant les sous-produits comme substrat carboné est mesurée par la technique de Dubois, cependant, sur le milieu de culture contenant le glucose est déterminé par méthode enzymatique GOD-PAP : Méthode enzymatique au glucose oxydase couplée à la réaction de « Trinder ».

Technique de DUBOIS

Les échantillons liquides sont prélevés à partir des surnageant des cultures de la souche sélectionnée productrice de PHA, inoculée sur un milieu de production contenant les déchets agroalimentaire comme source de carbone. Des prélèvements stériles ont été effectués

I.7.10. Caractérisation des PHAs purifiés par spectromètre Raman

La spectrométrie Raman est basée sur le processus inélastique de l'interaction de la lumière avec la matière. En éclairant un échantillon au moyen d'un rayonnement monochromatique (faisceau laser), la quasi-totalité des photons constituant le faisceau lumineux est réémise sans interaction avec la matière. Cependant, une petite quantité de ces photons rentre en interaction avec la matière et est diffusée dans toutes les directions de l'espace. Dans cette fraction de particules d'énergie lumineuse, la majorité des photons sont émis à la même fréquence que le rayonnement incident et constituent la diffusion Rayleigh. Pour seulement une infime partie (moins de $1/100000^{\text{ème}}$) de ces photons diffusés, un changement de fréquence résultant d'un échange d'énergie entre les photons et la matière est observé lequel constitue la diffusion Raman. La diffusion Raman est très faible comparée à la diffusion Rayleigh et à la diffusion de fluorescence. Elle s'est avérée difficilement utilisable jusqu'au développement de sources laser puissantes et de filtres holographiques très sélectifs (filtre Notch) permettant de supprimer le fort signal de diffusion Rayleigh (Figure 10).

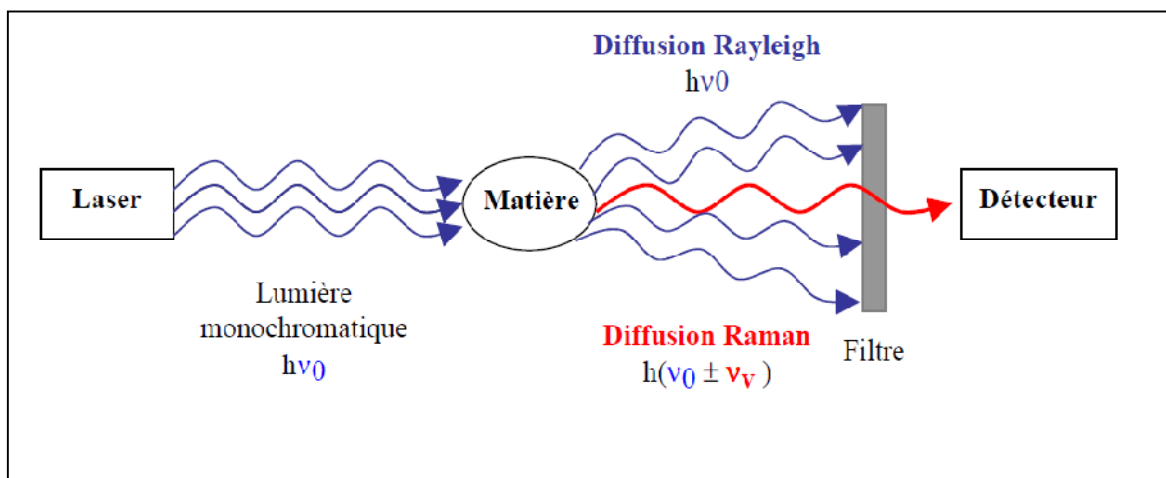


Figure 10: Processus de diffusion de la lumière par la matière (Himmel, 2005).

Mécanisme

Le mode d'acquisition d'une image spectroscopique consiste en l'acquisition de spectres Raman point par point. Cette technique nous permet d'avoir le suivi d'un élément en 3 dimensions (x, y, z). Chacun des éléments de l'image de coordonnées (x, y) sera appelé Spixel (pixel spectroscopique). Selon l'information recherchée, les spectres images seront analysés et traités afin d'obtenir une distribution de l'élément recherché (Figure 11).

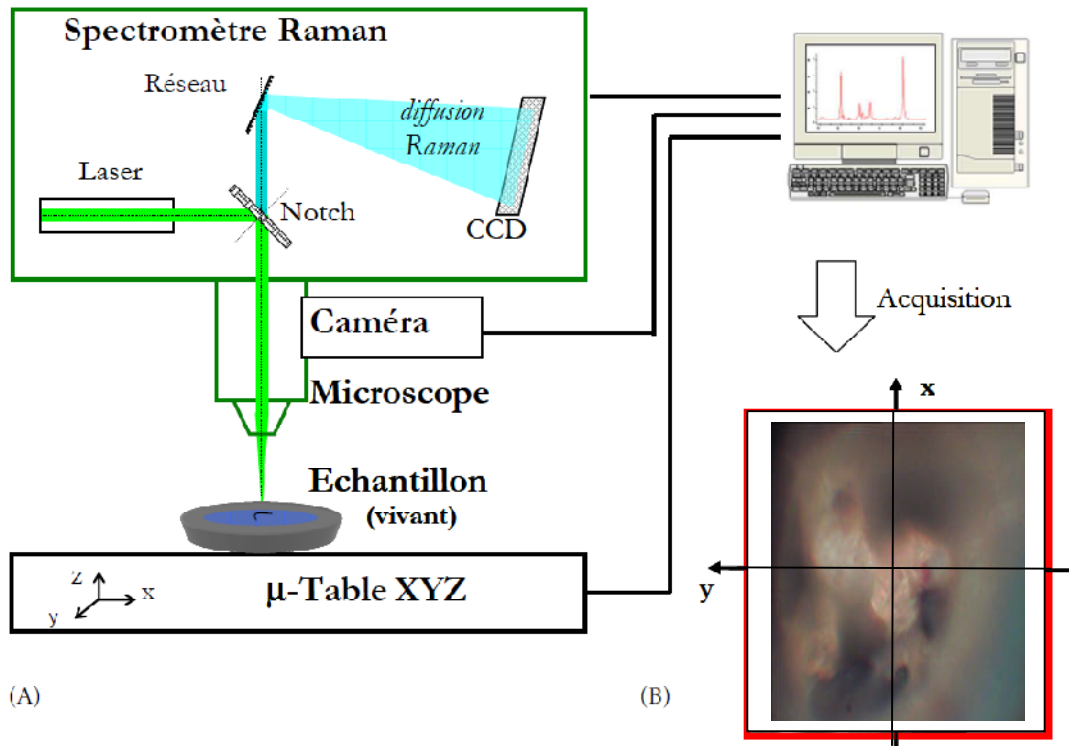


Figure 11 : Dispositif du système d'acquisition des spectres images, de stockage et de Traitement des données (Himmel, 2005). (A) Microscope optique couplé au spectromètre Raman permettant de choisir la position du laser sur l'échantillon. Le contrôle et l'acquisition des données sont informatisés. (B) Image en microscopie optique du contact entre la sonde Raman et le Polymère.

Les spectres Raman ont été acquis à l'aide d'un Spectromètre HR800 HORIBA (Jobin Yvon Microspectrometer) associé à un microscope optique **confocal**. Un rayonnement monochromatique de longueur d'onde égal à **532nm** a été émis à 50mW par un laser NdYAG solid (Spectra-Physics Millennia Pro 5 sJS). L'objectif **100x** du microscope a été utilisé afin de faire la mise au point sur l'échantillon et de cibler le point d'analyse du laser dont la sonde a un diamètre de **10 μm**. Un réseau de 300 tr/mm et de 600 tr/mm a été utilisé permettant d'enregistrer chaque acquisition spectrale dans une gamme de nombre d'ondes allant de **100 cm⁻¹ à 3800 cm⁻¹**. La fente d'entrée du spectromètre était de 500μm permettant une résolution de 3cm⁻¹. Les spectres images des différents polymères récupérés de la biomasse bactérienne sont acquis avec un pas selon x et y de 5,6μm.

Les PHAs sont analysés par spectromètre Raman sans aucune préparation préalable, d'où l'intérêt de cette technique.

Résultats

II.1. Isolement

Sur les 14 échantillons effectués à partir de différents sites de prélèvements, plus de 200 souches ont été isolées sur la gélose nutritive, milieu de culture non sélectif pour les bactéries appartenant au genre *Bacillus*. L'utilisation d'une sélection orientée par le traitement thermique des suspensions bactériennes avant de procéder à l'ensemencement sur milieu de culture gélosé, augmente considérablement la prolifération des bactéries sporulées. Le traitement thermique constitue un moyen qui favorise la sélection des souches appartenant aux genres *Bacillus* et *Thermoactinomyce*

II.2. Purification et identification du genre

L'examen macroscopique, la coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées ont montré des cellules de forme rectangulaires, légèrement arrondies à leurs extrémités avec une réaction positive à la catalase et la présence de l'endospore, visualisée grâce à leur réfringence à la lumière, ce qui indique leur appartenance au genre *Bacillus*.

Gordon et al (1973), Claus et Berkely (1986) et Logan et al (2009) ont rapporté que ces quatre critères recherchés sont largement suffisants pour indiquer l'appartenance des souches isolées, au genre *Bacillus*. Les souches sélectionnées sont purifiées à travers des repiquages successifs, inoculées sur gélose nutritive additionnée de $MnSO_4$, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures et conservées à 4°C.

II.2.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des souches sélectionnées, inoculées sur gélose nutritive et incubées à une température de 30°C pendant 24 heures a permis de visualiser des colonies assez grosses, mates ou granuleuses à un contours irréguliers, lisse, filamenteux ou rhizoïdes adhérentes à la surface de la gélose.

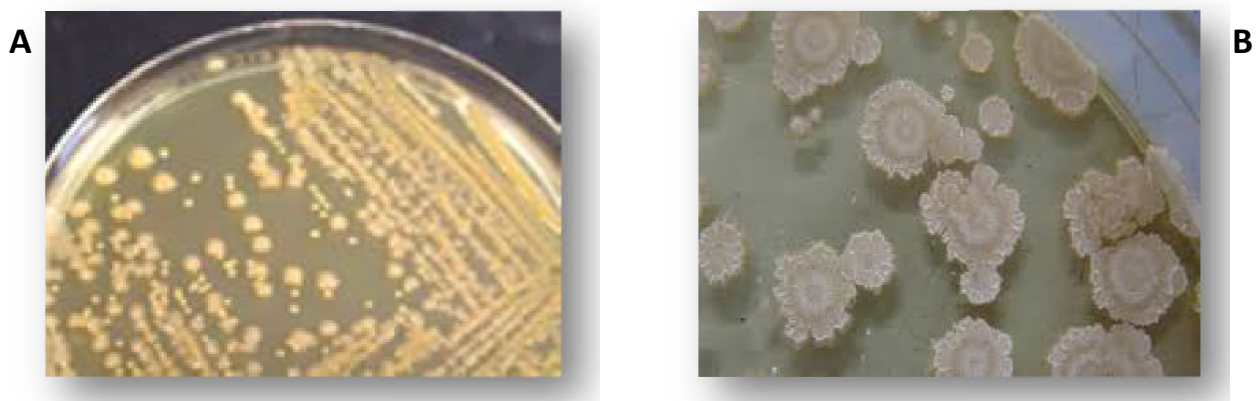


Figure 12: Observation macroscopique de la souche **B5** : forme circulaire aspect lisse (A) et de la souche **F5** : irrégulière d'aspect rugueux (B).

II.2.2. Mise en évidence de la catalase

La mise en évidence de la présence de l'enzyme responsable de la dégradation de l'eau oxygénée chez les souches isolées, a montré la présence d'une réaction positive chez 82 isolats. Par ailleurs, les souches manifestant une réaction négative de la catalase ont été exclues de cette étude.

II.2.3. Aspect microscopique

La coloration de Gram, la détermination morphologique, l'organisation des cellules ont été réalisées sur les 82 isolats, inoculées sur la gélose nutritive, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. A l'opposé, la mise en évidence de la présence des endospores a été effectuée sur des cultures âgées. La coloration de Gram des isolats a montré la présence d'une forme bacillaire des cellules avec un mode de regroupement isolé ou en chaînettes avec présence d'une endospore chez des cultures âgées.

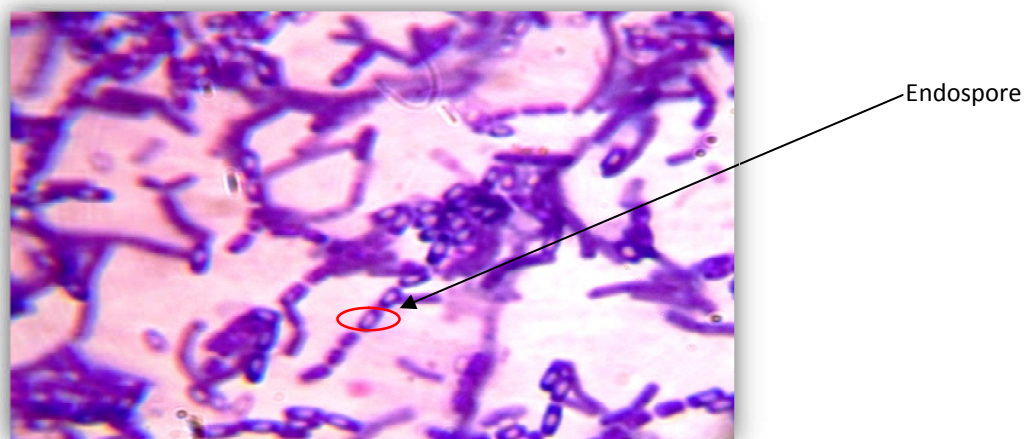


Figure 13 : La coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche **B4** avec un grossissement de 100.

Les résultats des prélèvements effectués, l'examen macroscopique, la coloration de Gram positive, les tests du catalase positifs, la présence des spores et l'organisation des souches isolées, sous forme bâtonnet ont permis d'identifier l'appartenance des 82 souches au genre *Bacillus*. Les différents sites de prélèvements et la codification des souches isolées sont illustrés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Origine des prélèvements et la codification des souches isolées.

Origine	Code	Région
Sol de blé	B1 à B5	T
Sol de maïs	M1 à M5	T
Sol contaminé par essence	E1 à E4	T
Sol contaminé par gazole	G1 à G4	T
Eau usée	U1 à U4	T
Eau d'oued Mina	O1 à O3	T
Culture de Luzerne	D1 à D9	SBA
Sol herbé (Institut de biologie)	F1 à F8	SBA
Sol Forêt	T1 à T7	T
Oued Makerra	K1 à K4	SBA
Culture de lentille	T1 à T7	SBA
Culture de petit pois	PP1 à PP6	SBA
Culture de pois chiche	PC1 à PC9	SBA
Culture petit pois fourragère	PP1 à PP7	SBA

T : Tiaret, *SBA* : Sidi Bel Abbas

II.3. Criblage des souches productrices de Polyhydroxyalcanoate

La sélection des souches productrices de PHA est basée sur la coloration des colonies et la coloration des frottis avec le noir soudan B à des concentrations de 0,02 et 0,3 % respectivement.

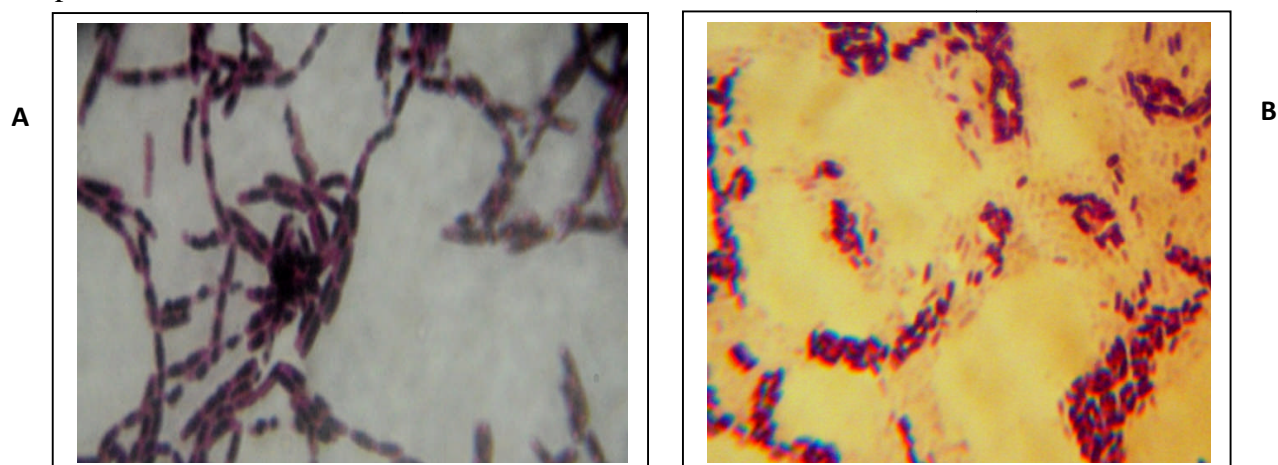


Figure 14 : Coloration de la souche T1 (A) productrice, F₆ (B) non productrice avec le noir Soudan B. ×100.

II.4. Identification des espèces

Les résultats obtenus de la coloration sur boîte et frotti avec le noir du soudan B, ont montré que parmi les 82 souches isolées, appartenant au genre *Bacillus*, 17 souches sont fortement productrices de PHA (**B1, B4, B5, M3, M5, T4, T6, T7, U1, D8, D9, F2, T1, K1, K2, PC7 et PP4**), deux souches non productrices de PHAs **F6, PC9** ont été aussi retenu.

Des tests biochimiques ont été mis en œuvre pour l'identification des 17 souches productrices des lipides intracellulaires et les deux souches non productrices comme témoin négative (**Tableaux 7, 8, 9**).

Les résultats d'identification ont montré que les 19 souches sélectionnées possèdent du cytochrome oxydase, l'enzyme qui oxyde le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine. La fermentation du mannitol traduite par le virage de l'indicateur du pH du milieu de culture au jaune orangé est observée chez les souches U1, B4, B5, K2, D8, D9, PC7, PC9 et PP4, une diffusion dans la gélose a eu lieu pour les 18 isolats, indique ainsi leurs mobilités, sauf la souche T4. Treize souches sont capables de se proliférer à la surface du milieu de culture viande foie et tout au long du tube ; sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives. Cependant, les autres bactéries sélectionnées sont aérobies strictes (**Tableau 7 et 8**).

Les souches ont manifesté une croissance sur milieu de culture à une concentration de 7% NaCl, sauf U1, F2, K1, PP4. Un développement considérable est observée chez les souches F6, K2, D8, D9, PC7 et PC9, inoculées dans un milieu de culture contenant 10% de NaCl, une faible croissance a été observée chez les souches : B1, B4, T6 et une absence totale de développement chez les souches : B5, M3, M5, U1, T1, F2, K1, T3, T7 et PP4.

Les résultats obtenus de la culture des souches **M3, M5, B1, B5, T4, T1, F2, T6, T7 et K1** (α -hémolytiques), inoculées sur milieu de culture contenant du sang frais a donné des colonies verdâtres, due principalement à l'accumulation de la biliverdine, composé issu de la dégradation partielle des globules rouges par l'hémolysine alpha. Les autres souches sont γ -hémolytiques; caractérisées par l'absence d'éclaircissement autour des colonies, ce qui explique l'absence d'hémolysine.

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est traduite par la formation d'un halo clair autour de la colonieensemencée. Une solution de Lugol est ajoutée à la surface du milieu de culture par inondation, afin de clarifier la zone d'hydrolyse formée. Les résultats obtenus de la dégradation de l'amidon ont révélé la présence de l'enzyme α -amylase chez la totalité des souches sélectionnées. La mise en évidence de la production des Lécithinase est effectuée sur un milieu de culture à base de jaune d'œuf. La lecture positive de l'hydrolyse de la lécithine

se manifeste par la présence d'un halo opaque autour des souches (**B1, B4, B5, M3, M5, T1, T4, T6, T7, U1, F₂ et K₁**).

Les autres testes biochimiques ont été réalisés sur plaques API 20 E. Les 19 souches sélectionnées ont été identifiées sur la base de leurs réponses aux différents tests physiologiques et biochimiques.

Logan et berkeley (1989) ont rapporté que seulement les 12 premiers tests de la galerie API 20 E sont pris en considération pour l'identification du genre *Bacillus*. Les résultats des tests biochimiques sont récatitulés dans les Tableaux 7,8 et 9.

Tableau 7 : Les tests morphologiques et biochimiques des souches (B1, B4, B5, M3, M5, T4, T6, T7, U1).

Isolats		T4	T6	T7	B1	B4	B5	M3	M5	U1
Les cellules	Forme	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille
	Taille en µm	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
	Regroupement	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch
	Endospore	C/ND	C/ND	C/ND	C/ND	C/ND	C/ND	C/ND	C/ND	C/ND
Coloration de Gram	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test de catalase	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Noir soudan B sur frottis	<	+	++	+++	++	++	+++	+	++	+
Noir soudan B sur boîte	/	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+
Test d'oxydase	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tests Classiques	Croissance anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mannitol	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	Mobilité	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	NaCl à 7 %	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	NaCl à 10%	-	+-	-	+-	+-	-	-	-	-
	Lécithinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hémolyse	α	α	α	α	γ	α	α	α	γ
Amylases	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 8: Les tests morphologiques et biochimiques des souches (D8, D9, F2, T1, K1, K2, PC7, PP4, F6 et PC9).

Isolats		T1	F2	F6	K1	K2	D8	D9	PC7	PC9	PP4
Les cellules	Forme	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacill	Bacill	Bacille
	Taille en µm	> 1	> 1	< 1	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1	< 1	> 1
	Regroupement	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch
	Endospore	ST/ND	CT/ND	C/ND	C/ND	ST/ND	C/ND	ST/ND	ST/N	C/ND	ST/ND
Coloration de Gram	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test de catalase	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Noir soudan B sur frottis	/	+	+	-	+	+	++	+++	+	-	+
Noir soudan B sur boîte	/	+	++	-	+	++	++	+++	+	-	+
Test d'oxydase	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tests Classiques	Croissance anaérobiose	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	Mannitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NaCl à 7 %	+-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	NaCl à 10%	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	Licéthinase	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	Hémolyse	α	α	γ	α	γ	γ	γ	γ	γ	γ
Amylases	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+: résultat positive, -: résultat négative, C : Spore centrale, ST : Spore Sub-Terminale, ND : Spore non déformante.

Tableau 9 : Illustration du Profil biochimique des souches isolées, par l'utilisation de la galerie API 20E (Annexe 3)

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	Urée	TDA	IND	VP	GEL	0GLU
Isolat												
T4	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
T6	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
T7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
B1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
B4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M3	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
M5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
U1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
T1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
F2	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
F6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
K1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
K2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
D8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
D9	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
PC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PC9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
PP4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-

+ : la couleur du milieu a complètement changé, - : la couleur du milieu n'a pas changé

Les 17 souches isolées, sélectionnées accumulatrices des lipides intracellulaires dans leurs cytoplasmes se présentent sous formes de cellules de grande taille et appartiennent au groupe IA selon **Gordon et Berkeley(1984)** dans la classification du genre *Bacillus*,

A l'opposé, les souches **F6 et PC9** sont de taille cellulaire inférieure à 1 µm et incapable d'accumuler les polyesters dans leurs cytoplasmes et appartiennent au groupe IB de la classification du genre *Bacillus*.

L'identification probabiliste des souches retenues, lors de l'utilisation de la matrice d'identification des *Bacillus* établie par **Michel Cavalla (2003)** ; reposée sur les résultats de la galerie API 20E rajoutés à ceux du type respiratoire, de la mobilité, de l'hémolyse et de la Lécithinase ont permis de différencier dix neuf profils biochimiques. L'utilisation de la méthode probabiliste numérisée, les pourcentages relatifs d'identification obtenus pour chaque profil (figures 15 et 16) a montré que les souches **T1, T6, T7, F2, B1, M3, M5, K1** correspondent au profil de *B. cereus* par contre les souches (**D8, D9, B4, B5, U1, PC7, PP4 et K2**) appartiennent au profil de l'espèce *B. megaterium*, **F6** c'est *B. subtilis*, **PC9** se rapproche plus au moins à *B. licheniformis* et en fin **T4** coïncide avec *B. mycoïdes*.

La fréquence d'apparition des différentes souches identifiées et sélectionnées comme étant des bactéries appartenant au genre *Bacillus* productrices des PHAs est illustrée dans la figure 17.

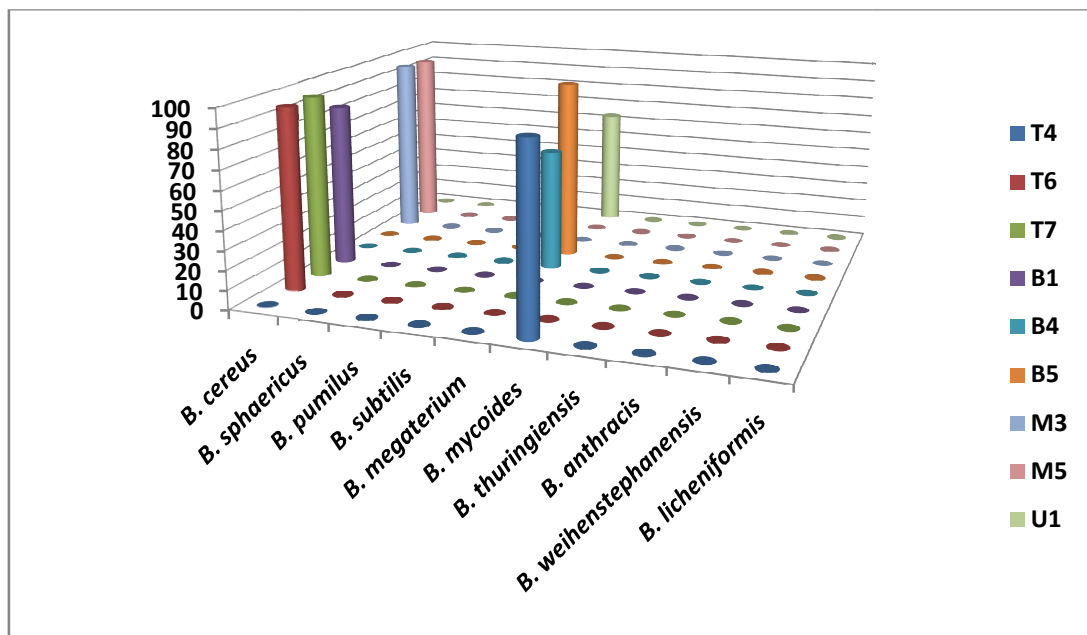


Figure 15: Pourcentage relatif d'identification des souches (**T4, T6, T7, B1, B4, B5, M3, M5, U1**).

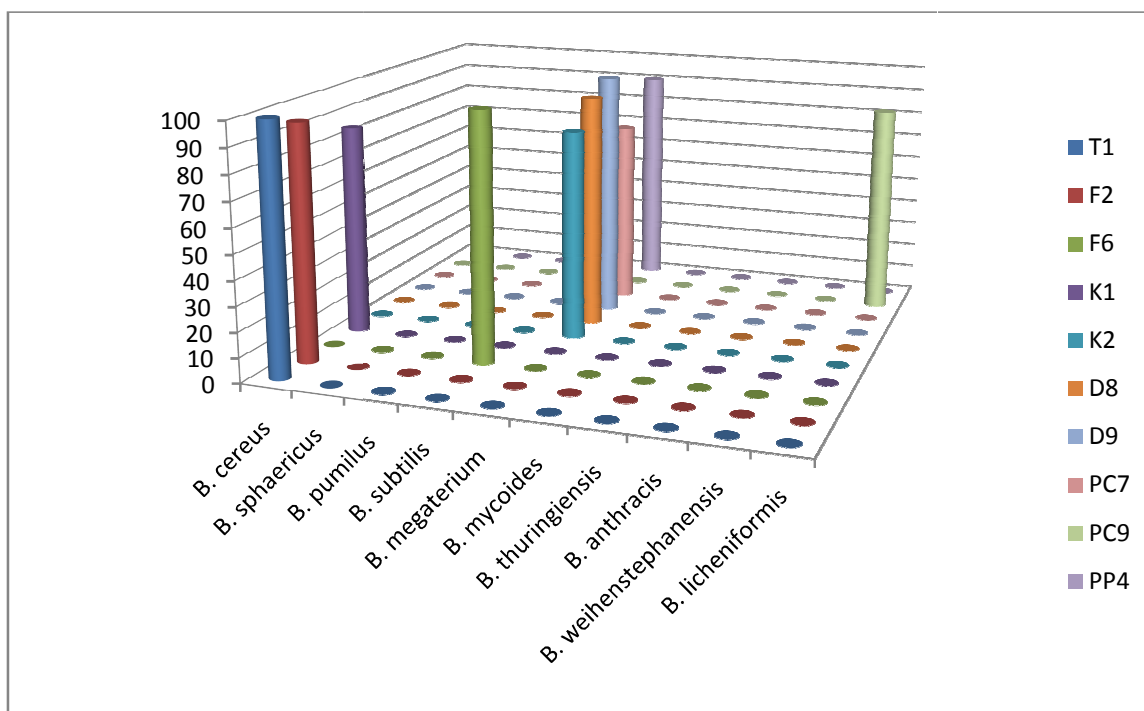


Figure 16: Pourcentage relatif d'identification des souches (T1, F2, F6, K1, K2, D8, D9, PC7, PC9 et PP4).

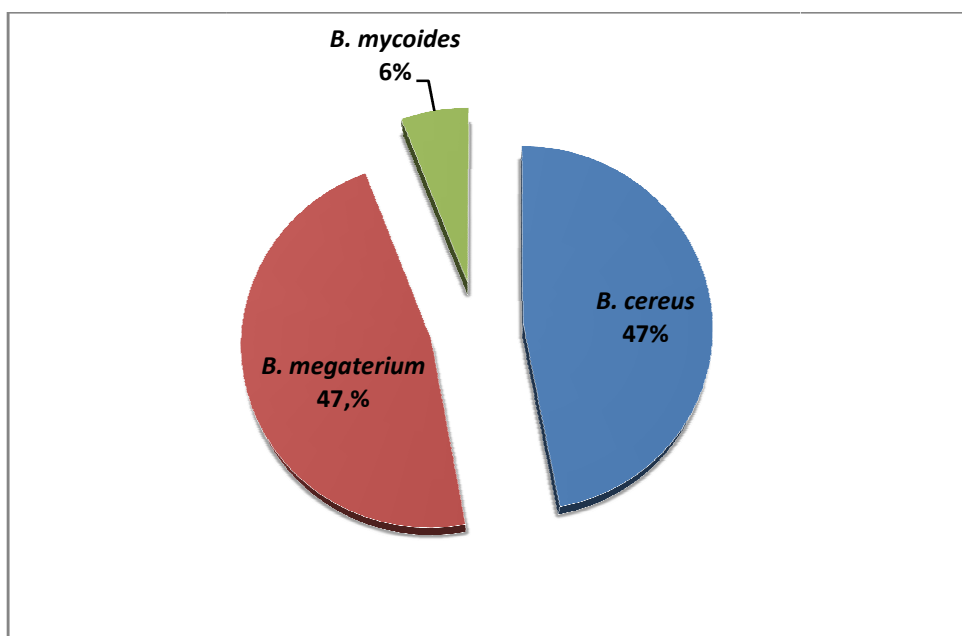


Figure 17 : Fréquence d'apparition des souches appartenant au genre *Bacillus* productrices de PHA.

II.5. Analyse physicochimique des Mélasses et du moût des rebuts de datte

La mélasse de canne, la mélasse de betterave et le moût des rebuts de dattes ont fait l'objet d'une série d'analyses physico-chimiques : pH, densité, matière sèche, teneur en cendre, taux des sucres totaux. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Caractéristiques physicochimiques des sous-produits analysés.

Paramètre	Mélasse de canne	Mélasse de betterave	Moût des rebuts de datte
Densité (20°C)	1,30± 0,01	1,19± 0,06	1,10± 0,1
Taux de matière Sèche %	66,75± 0,5	71,34± 0,36	34± 0,45
Teneur en eau %	15± 1,12	17± 2,66	61± 1,50
Taux de cendres %	6,44± 0,05	8,55± 0,06	1,05± 0,05
Sucres Totaux %	32,38± 3,34	40,12± 2,45	25,43± 1,16
pH	5,42± 0,53	6,20± 0,32	5,50± 0,12

II.6. Sélection du milieu de production et de la souche productrice de PHA

Les cultures obtenues sur les deux milieux de production MS1 et MS2, incubées pendant 48h a montré que l'ensemble des souches testées ont manifesté une excellente croissance sur le milieu de culture MS1 et une faible croissance sur MS2 (**Tableau 11**), ceci peut être due probablement à la composition du milieu de culture. Le milieu MS1 a été retenu pour l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production des PHAs.

La sélection de la souche la plus productrice de PHA est focalisée sur l'intensité de la coloration produite au noir soudan B sur boîte de Pétri et sur frotti. Les résultats de la coloration sur les boîtes de Pétri ont montré que les colonies riches en PHA retiennent le colorant et apparaissent noir ou bleu foncé. Cependant la coloration sur frotti des différentes souches productrices a montré la présence des vésicules noires correspond au PHA, le choix de la souche était fondé sur l'intensité de ces vésicules.

L'observation macroscopique et microscopique après coloration au Noir soudan B (**Tableau 12**) ont montré que les cellules de la souche **D9** sont de taille volumineuse et renferment une richesse phénoménale en vésicules noires intracellulaires.

La souche **D9**, sélectionnée productrice de PHA, identifiée comme étant *Bacillus megaterium* a été retenue pour l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production des PHAs.

Tableau 11 : Les cultures de certaines souches testées sur les deux milieux de production.



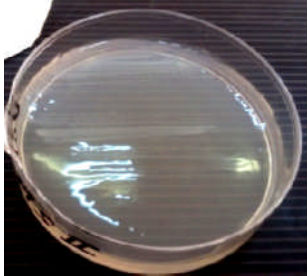


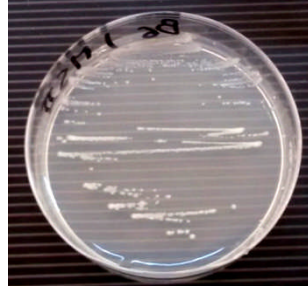


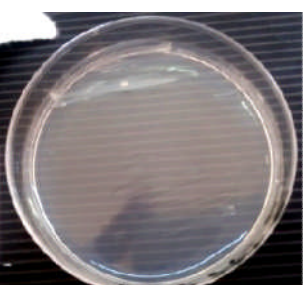
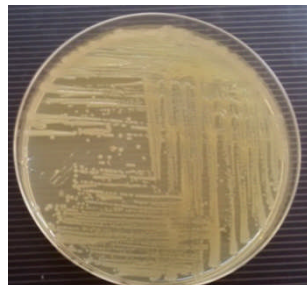
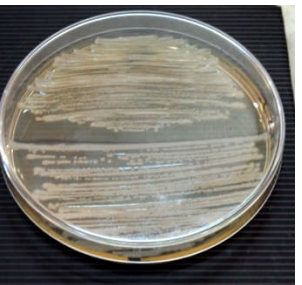
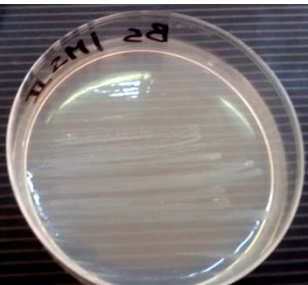
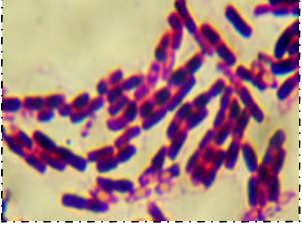

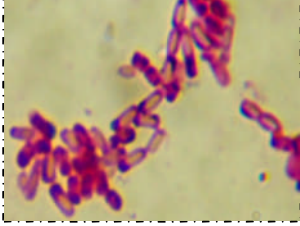
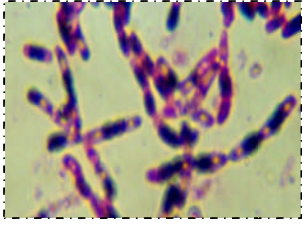


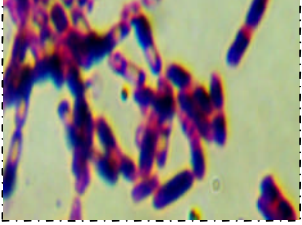
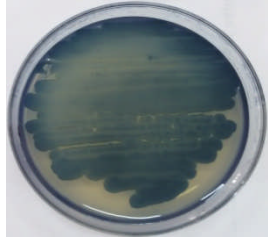
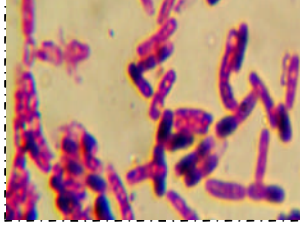
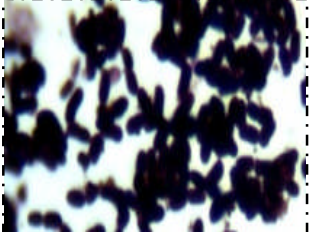

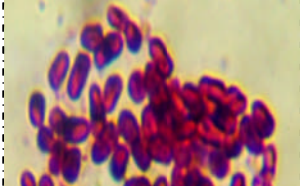
Les souches	Culture sur GN	Culture sur MS1	Culture sur MS2
U1			
D9			
T7			
B5			

Tableau 12: Coloration au noir soudan B sur frotti et sur boîte de Pétri sur les deux milieux synthétique pour les souches U1, B5, T7 et D9

Les souches	Sur MS1		Sur MS2
U1			
B5			
T7			
D9			

II.6.1. Identification génotypique de la souche D9 sectionnée

Le gène 16S rDNA est composé de régions conservées permettant l'appariement d'amorces (Baker *et al.*, 2003) ainsi permettant la distinction de l'espèce.

La PCR réalisée sur l'ADNr 16S a permis d'amplifier le gène 16S de la souche étudiée.

Les résultats montrent la présence d'une seule bande d'ADN pour l'échantillon étudié, sans la présence d'un smear, il n'y a donc pas de contamination, ni de dégradation de l'ADN extrait.

Le produit de la PCR (amplicon) a été évalué visuellement par comparaison au marqueur utilisé, la taille de la bande correspond au poids moléculaire de 840 pb (Figure 18).

Sur la base de la caractérisation phénotypique génotypique et par comparaison théorique aux résultats d'amplification de l'ADNr 16S effectuée par (Nimali *et al.*, 2010), la souche D9 forme un groupe associé à la souche *Bacillus megaterium*, une bactérie aérobie, capables de se développer jusqu'à 10% de NaCl.

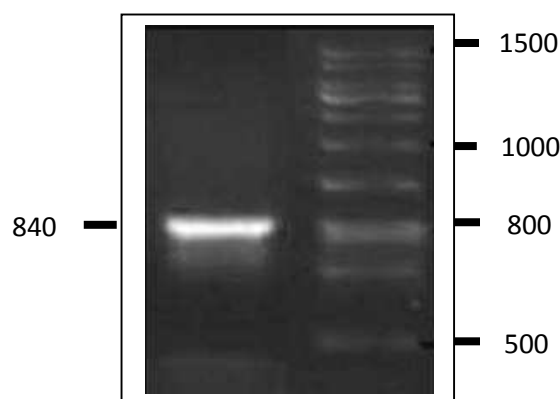


Figure 18 : Profil électrophorétique de l'amplification du fragment ADN du gène Ribosomal 16S sur gel d'agarose de 1%.

La ligne **D9** : fragment ADN amplifié de la souche sélectionnée productrice de PHA,

La ligne **M** : les marqueurs de taille 1,5 Kb DNA ladder (500-1500 pb)

II.7. Optimisation des paramètres impliqués dans la production des PHAs

Dans le but d'optimiser les différents paramètres impliqués dans la production des PHAs chez *Bacillus megaterium* (D9) sélectionnée ; le milieu de production (**MS1**) a été utilisé. L'optimisation est effectuée sur des cultures en batch, inoculées dans des Erlenmeyers contenant un volume de 100 ml de milieu synthétique, incubées à une température de 30°C, avec une agitation de 130 rpm pendant 48 heures. La biomasse bactérienne est ensuite

recupérée par centrifugation et la quantité des PHAs extraite est estimée par rapport à la matière sèche cellulaire (MSC).

II.7.1. Effet du substrat carboné sur la croissance et la production des PHAs

L'effet de différentes sources de carbone sur la croissance et production de PHA chez *Bacillus megaterium* (D9) est mis en évidence.

L'amidon, le glucose, le saccharose, le glycérol, la mélasse de betterave, mélasse de canne et le moût des rebuts de datte ont été ajouté avec une concentration de 2% dans le milieu de production. La quantité de PHA produite et le taux de croissance de *Bacillus megaterium* (D9), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures, sont déterminés.

Les résultats obtenus (**Figure 19**) ont montré que le glucose constitue une excellente source de carbone pour la production des PHAs, le rendement était de 50% par rapport au poids sec cellulaire, ensuite les mélasses de betterave et de canne à sucre avec une productivité de 28% et 30% respectivement. L'utilisation du glycérol dans le milieu de culture a donné aussi des bons rendements en PHAs, mais avec une faible biomasse bactérienne (0,09g/l). Par ailleurs, la meilleure production de la biomasse (0,815 g/l) est observée lors de l'utilisation de l'amidon comme source de carbone, accompagné avec un faible rendement en PHA (5% seulement par MSC).

II.7.2. Effet de la variation des concentrations des sous-produits

L'effet de la concentration des sous-produits utilisés tels que la mélasse de canne, mélasse de betterave et le moût des rebuts de datte dans le milieu de production MS1 sur l'accumulation des lipides intracellulaires et la production de la biomasse bactérienne chez *B. megaterium* (D9) est déterminé.

Les résultats obtenus (**Figure 21**) indiquent que la concentration des sous-produits a influencé considérablement le rendement des PHAs et la croissance de *B. megaterium* (D9). Une excellente production de la biomasse est observée en présence d'une concentration de 5% de rebuts de datte (0,98g/l). Cependant, les rendements maximaux de PHAs ont été obtenus en présence des concentrations de 3% de mélasse de betterave et 2% de mélasse de canne (41% et 30% par mg de MSC respectivement), toutefois une diminution considérable de la biomasse bactérienne a été remarquée lors de l'augmentation de la concentration des substrats carbonés au-delà de 4%.

II.7.3. Effet du substrat azoté

L'effet de la source d'azote sur l'accumulation de PHA et la production de la biomasse bactérienne chez *B. megaterium* (D9) a été étudié.

Les résultats obtenus (**Figure 20**) ont montré que la variation du substrat azoté dans le milieu de production en présence de 3% de mélasse de betterave comme source de carbone, incubée à une température de 30 ° C avec une agitation pendant 48 heures a un impact important sur la production de bioplastique et la croissance de *B. megaterium* (D9). Un excellent rendement en PHA (41% par MSC), est observée en présence chlorure d'ammonium, suivi par l'ajout de l'extrait de viande puis l'extrait de levure 34% et 25% par MSC respectivement. Cependant, l'utilisation du tryptone, de l'asparagine ou l'acétate d'ammonium dans le milieu de production a diminué considérablement le rendement en PHA.

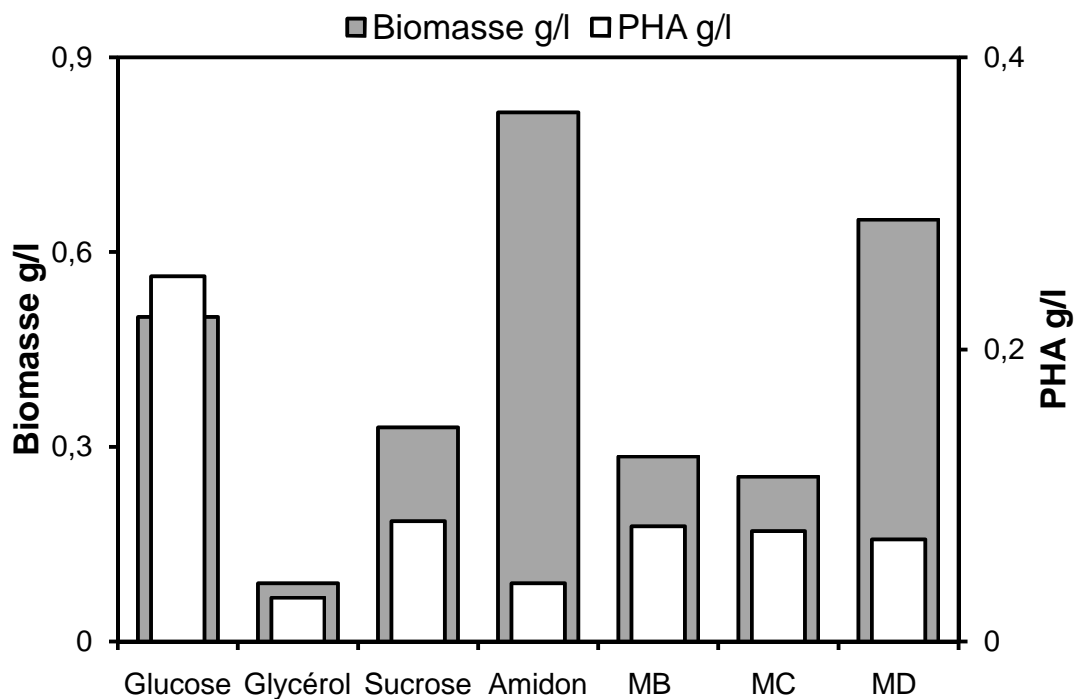


Figure 19 : Influence du substrat carboné sur la croissance et la production des PHAs chez *B. megaterium* D9 (MB : Mélasse de betterave, MC : Mélasse de canne, MD : Moût des rebuts de datte).

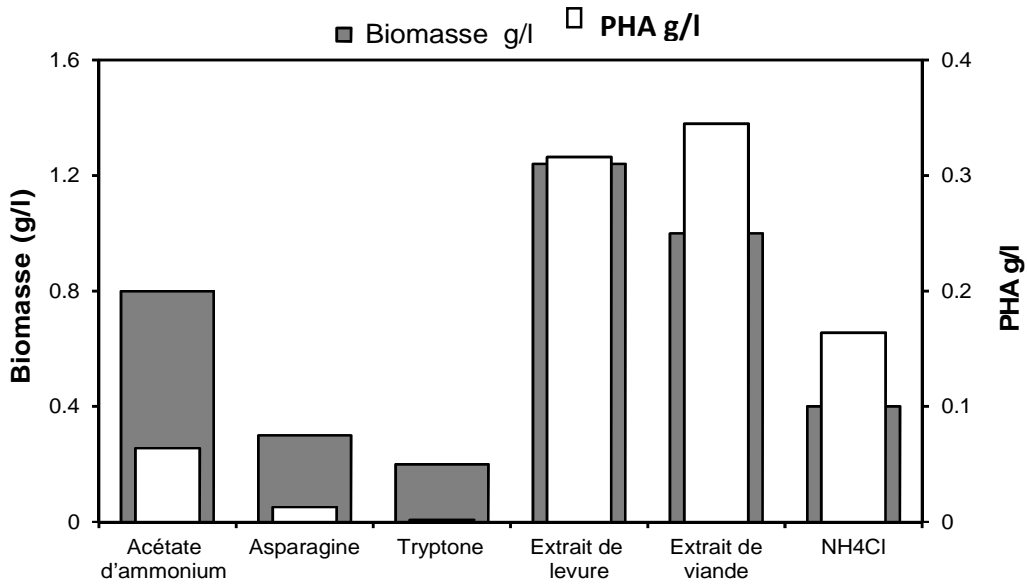
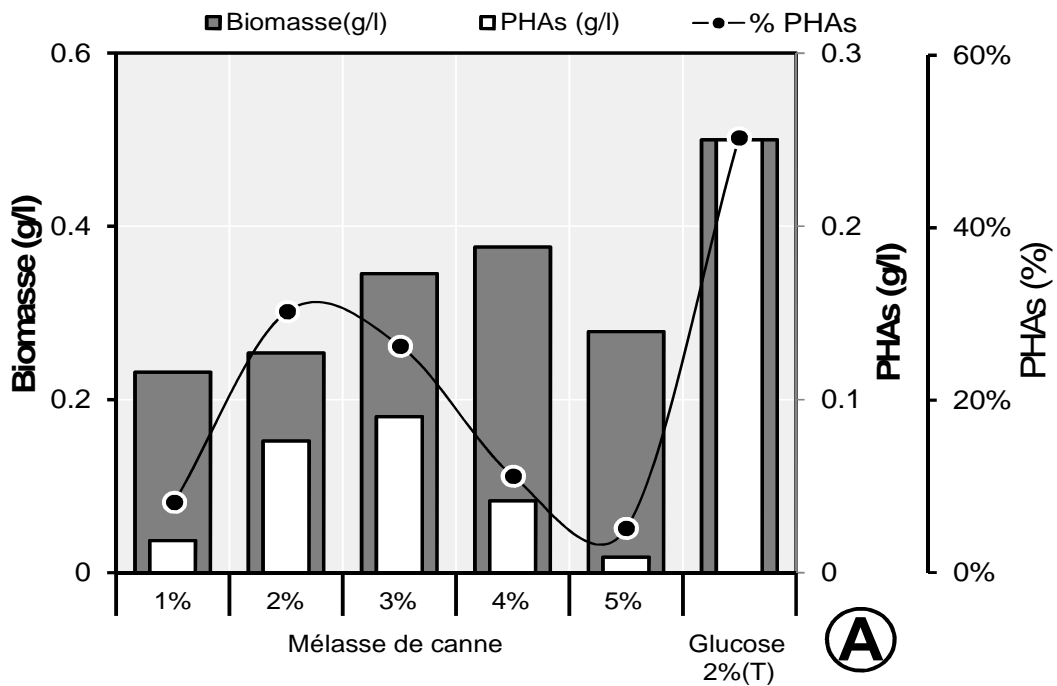


Figure 20 : Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et la production des PHAs chez *B. megaterium* D9.



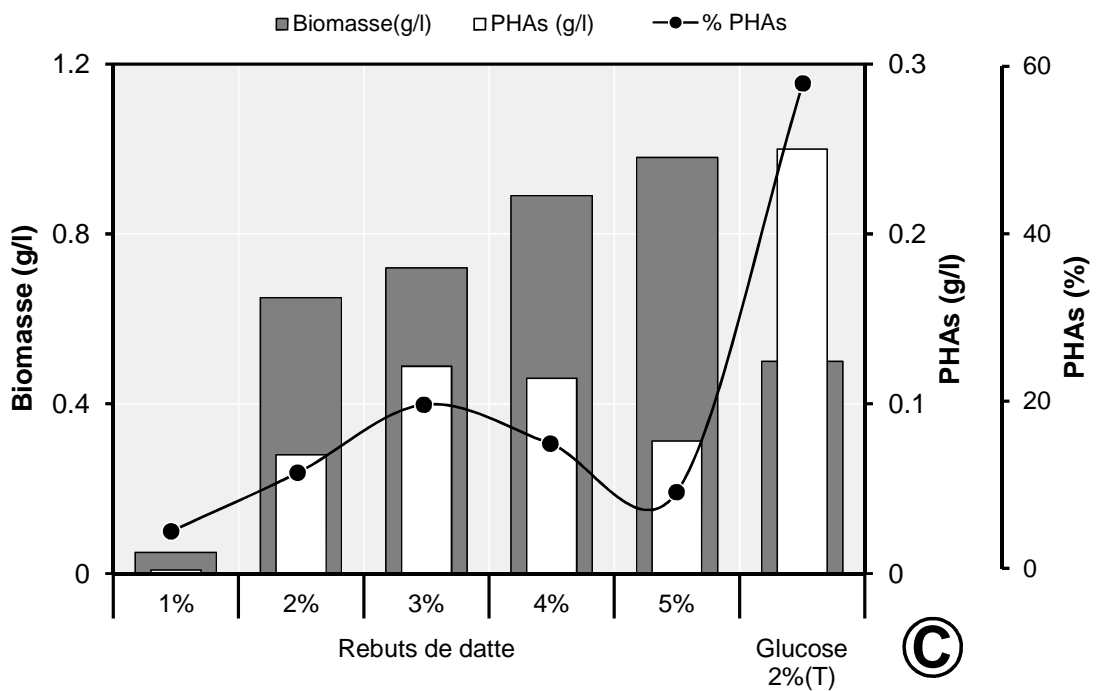
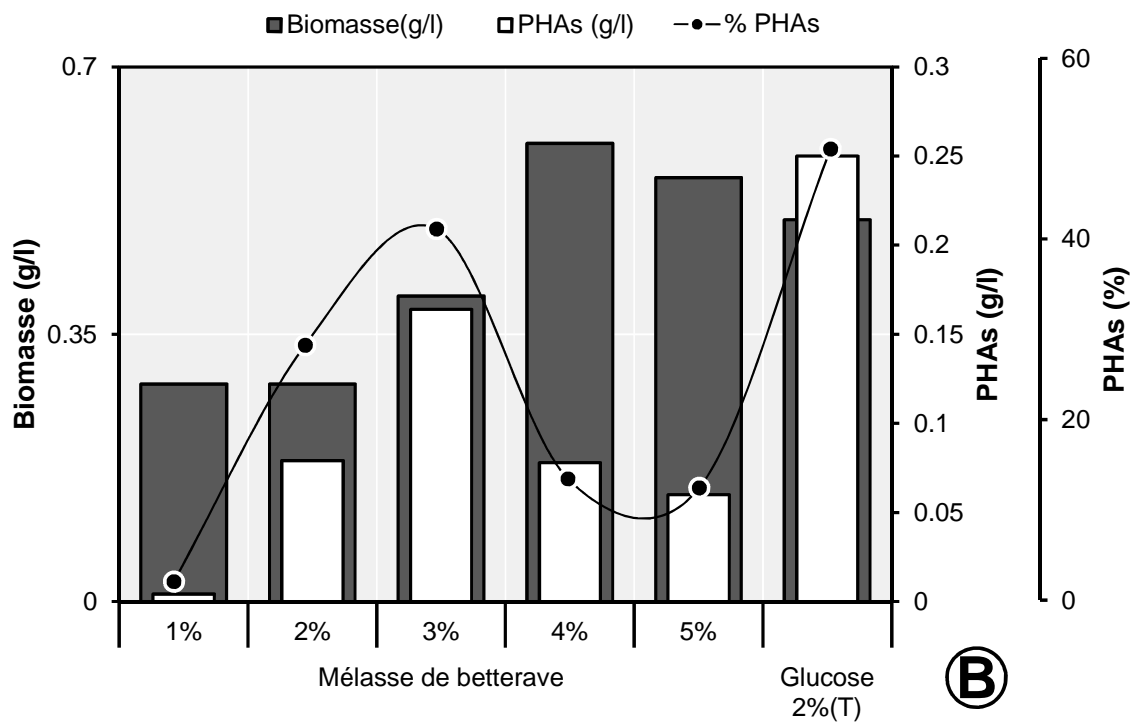


Figure 21 : Effet de la concentration des sous produits sur la croissance et la production des PHAs chez *Bacillus megaterium* D9 (A) en présence : de mélasse de canne, (B) de mélasse de betterave, (C) de moût de rebutts de datte.

II.7.4. Effet de la durée d'incubation

Dans le but d'explorer l'effet de la durée d'incubation sur l'accumulation des PHAs et la production de la biomasse bactérienne chez *B. megaterium* (D9) avec les différents sous produits ; les milieux de production contenant les sources de carbone suivantes à des concentrations de 3% mélasse de betterave, 2% de mélasse de canne et 3% de moût des rebuts de datte et NH_4Cl comme source d'azote sont ensemencés.

Les résultats obtenus (**Figure 22, 23, 24**) ont montré que les taux de production sont non significatif dans les premières heures de croissance dans les trois cas, ils varient entre (1% et 7% de PHA par MSC). Le rendement maximal des PHAs a été obtenu après 48h de culture en présence de 3% de mélasse de betterave (41% de PHA par MSC), et un rendement de 30% en présence de Mélasse de canne et de 17% en présence de MD. Cependant, une réduction importante du rendement en PHA est observée après 72 heures d'incubation.

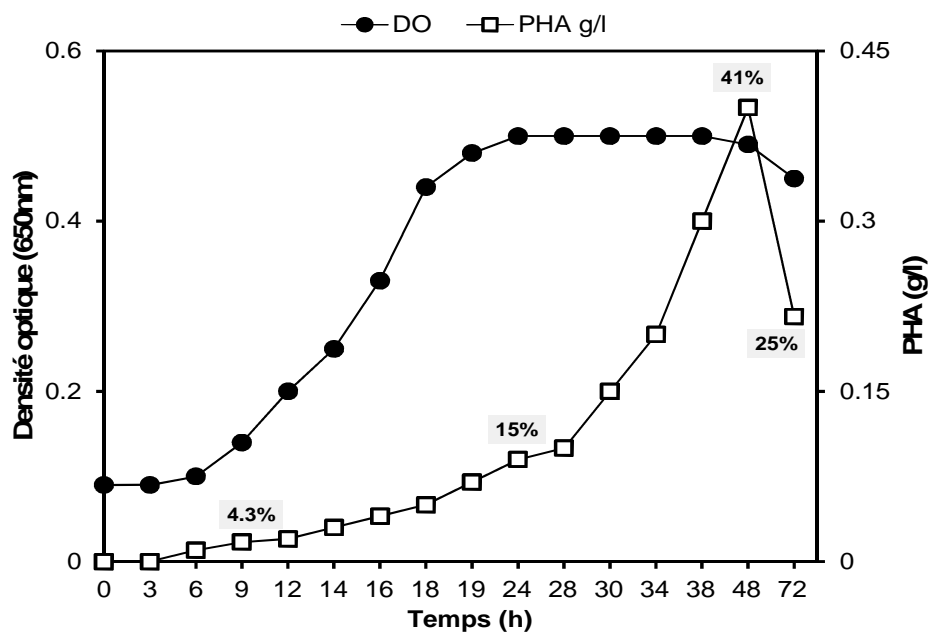


Figure 22: La cinétique de croissance et la production de PHA chez *Bacillus megaterium* D9, en présence de 3% de mélasse de betterave et 0,05% NH_4Cl dans le milieu de production.

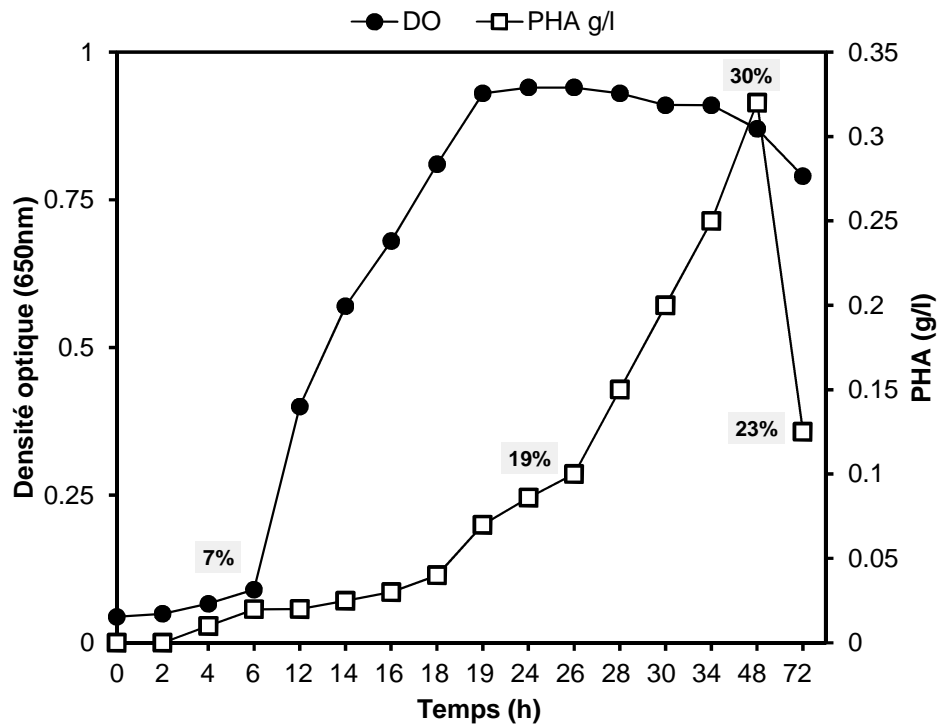


Figure 23: La cinétique de croissance et la production de PHA chez *Bacillus megaterium* D9 en présence de 2% de mélasse de canne et 0,05% NH₄Cl dans le milieu de production.

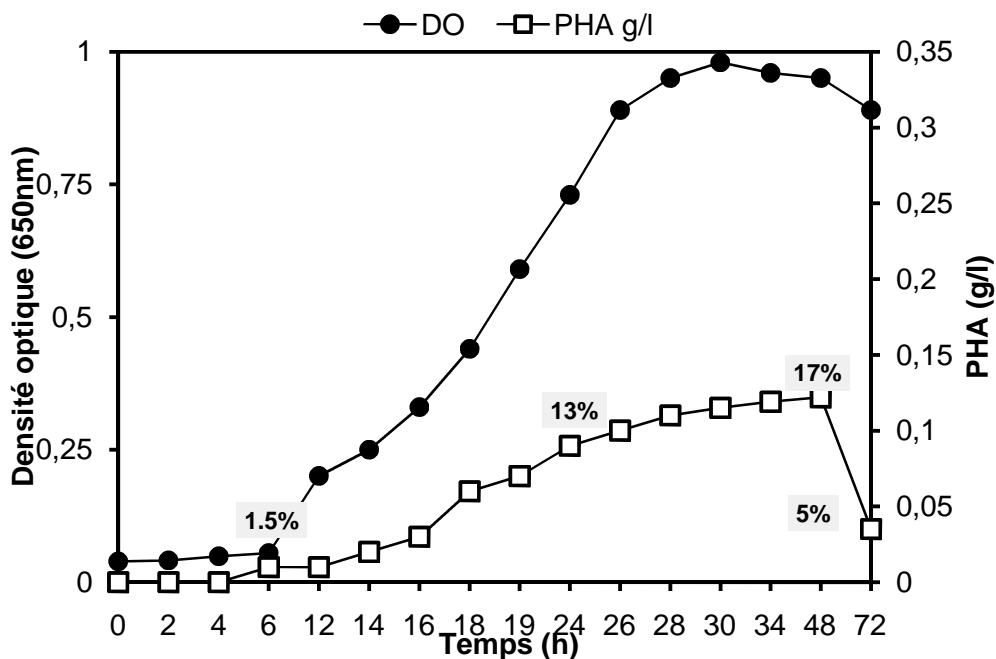


Figure 24: La cinétique de croissance et la production de PHA chez *Bacillus megaterium* D9, en présence de 3% de moût de datte, 0,05% NH₄Cl sur milieu de culture de production.

II.8. Dosage des sucres et cinétique de croissance de *B. megaterium*

L'étude du suivi cinétique de croissance bactérienne de *B. megaterium* D9, inoculée dans le milieu synthétique en présence de quatre sources de carbones telles que le Glucose, mélasse de betterave, mélasse de canne, le moût des rebuts de datte, incubée à une température de 30 °C avec une agitation pendant 48 heures a été déterminé (*chaque substrat carboné est testé individuellement*). Des prélèvements à des intervalles de temps réguliers ont été effectués. La croissance bactérienne est déterminée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**JENWAY 7305**) et la consommation du substrat carboné est évaluée par des méthodes enzymatique GOD-PAP ou chimique (**Dubois**).

II.8.1. Culture dans le milieu contenant le glucose

L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne et la consommation du glucose chez *B. megaterium* a montré que la concentration du glucose dosée par la méthode enzymatique GOD-PAP, a diminué progressivement dans le milieu (de 19.50 à 0.27g/l), accompagnée avec une augmentation considérable de la biomasse bactérienne. Les résultats obtenus (**Figure 25**) ont montré que la phase exponentielle de la souche *B. megaterium* est caractérisée par une évolution rapide de nombre de bactéries et une consommation considérable du glucose a duré 24h, la phase stationnaire (de 26-40 h) et à partir de 48 heures d'incubations, les bactéries entrent dans la phase de déclin.

II.7.2. Culture dans milieu contenant les mélasses

L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne et la dégradation des sucres des mélasses chez *B. megaterium*, inoculée dans milieu de culture synthétique en présence de mélasse de canne d'une part et en présence des mélasses de betterave d'autre part, a montré que la quantité du substrat carboné a diminué progressivement, suivie d'une augmentation considérable de la biomasse (**Figures 26, 27**). La concentration en sucres totaux mesurée a baissé de 8.42 à 1,11 g/l /éq saccharose sur le milieu de culture à base des mélasses de canne et de 10,45 à 1,02 dans le milieu à base des mélasses de betterave.

II.8.3. Culture dans le milieu contenant le moût des rebuts de datte

La croissance bactérienne et la fermentation sur le milieu de production contenant le moût de datte comme source de carbone chez *B. megaterium* ont été étudié. Les résultats obtenus (**Figure 28**) ont montré que la concentration en sucres totaux dosée par la méthode

de Dubois, a diminué rapidement durant la phase exponentielle, avec une augmentation considérable de la biomasse bactérienne et lentement dans la phase stationnaire (De 6.69 à 1.31 g /l/ équivalent saccharose).

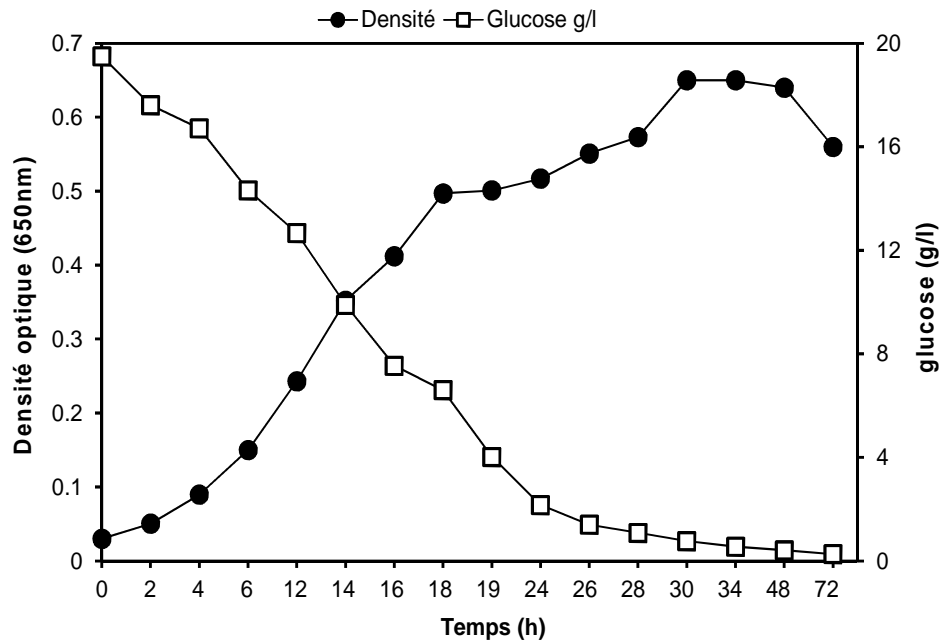


Figure 25 : Cinétique de la croissance et la consommation du glucose chez *Bacillus megaterium* D9, en présence du glucose dans le milieu de production.

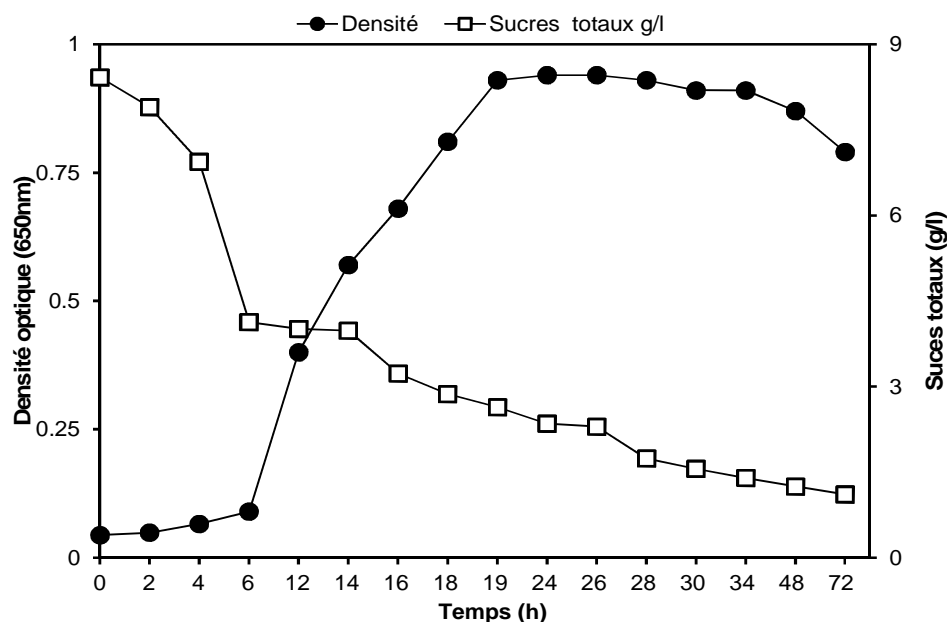


Figure 26: Cinétique de croissance et consommation des Sucres totaux chez *Bacillus megaterium* D9, en présence de la mélasse de canne dans milieu de production.

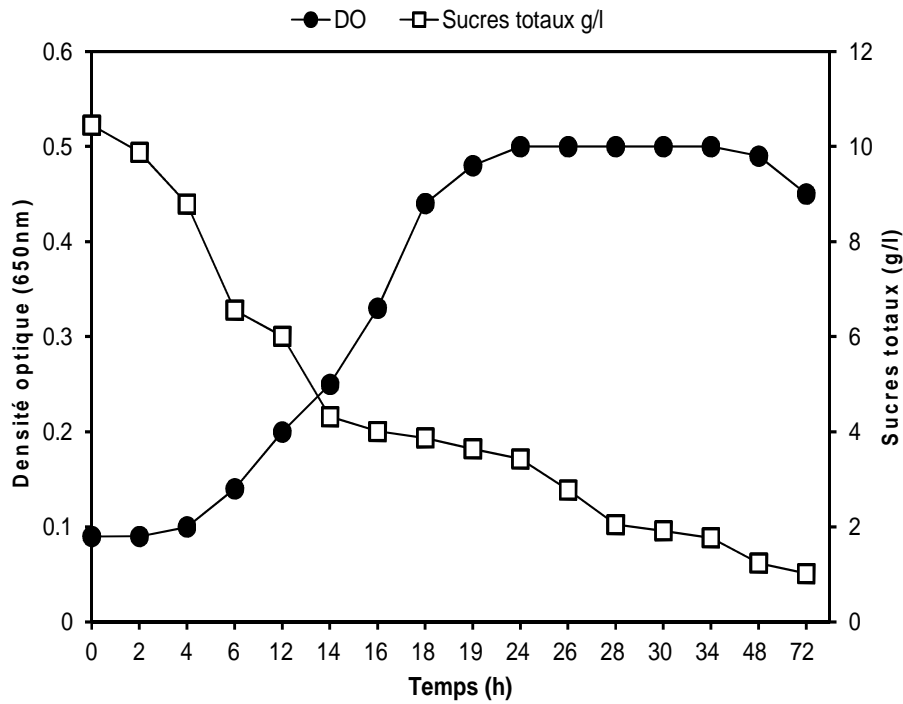


Figure 27 : Cinétique de croissance et la consommation du sucre chez *Bacillus megaterium* D9, en présence de la mélasse de betterave dans le milieu de production.

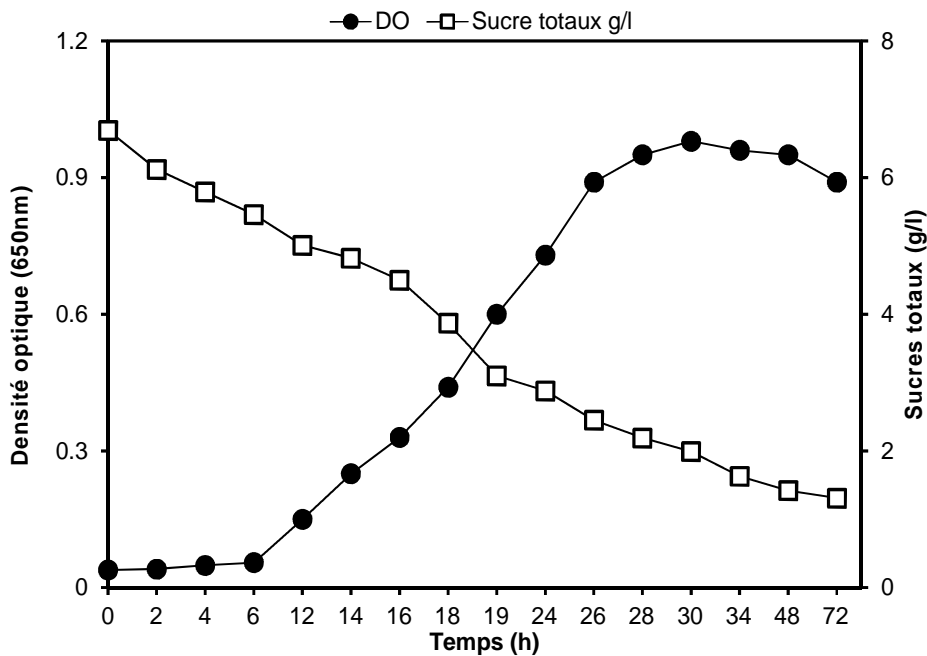


Figure 28: La cinétique de croissance et le taux de consommation des sucres totaux chez *Bacillus megaterium* D9, en présence du moût des rebuts de datte.

II.9. Analyse des PHAs synthétisés par spectrométrie Raman

Les spectres Raman correspondant à chaque Biopolymère (I, II, III, IV), récupéré à partir des cultures de *B. megaterium* sur des milieux de culture contenant le glucose et les différents sous-produits sont illustrés dans les Figures 29, 30, 31 et 32. Les bandes identifiées sont regroupées dans les tableaux 13, 14, 15 et 16.

II.9.1- Polymère I obtenu en présence de glucose

L'analyse du spectre Raman du polymère I obtenus en présence de glucose comme substrat carboné (**Figure 29**) a montré la présence des bandes de transition Raman intenses à 3049 et 2892 cm^{-1} relatives aux élongations des liaisons C-H. Les vibrations remarquées dans la région 2250- 1875 cm^{-1} correspondent le plus souvent à des fractions non polymérisées du polymère. La bande observés à 1748 cm^{-1} désigne le mode d'élongation du groupement carbonyle C=O du RCOA, les pics enregistrés à 1474 cm^{-1} indique une déformation asymétrique de la liaison C-H dans le groupement CH_2 , tandis que celui observé à 1377 cm^{-1} est équivalent au groupement méthyle CH_3 , les vibrations dans la région situé entre 1200- 1100 cm^{-1} correspond à l'élongation de la liaison C-O-C de la fonction ester. La région 510- 430 signale une déformation des liaisons CCO et CCH.

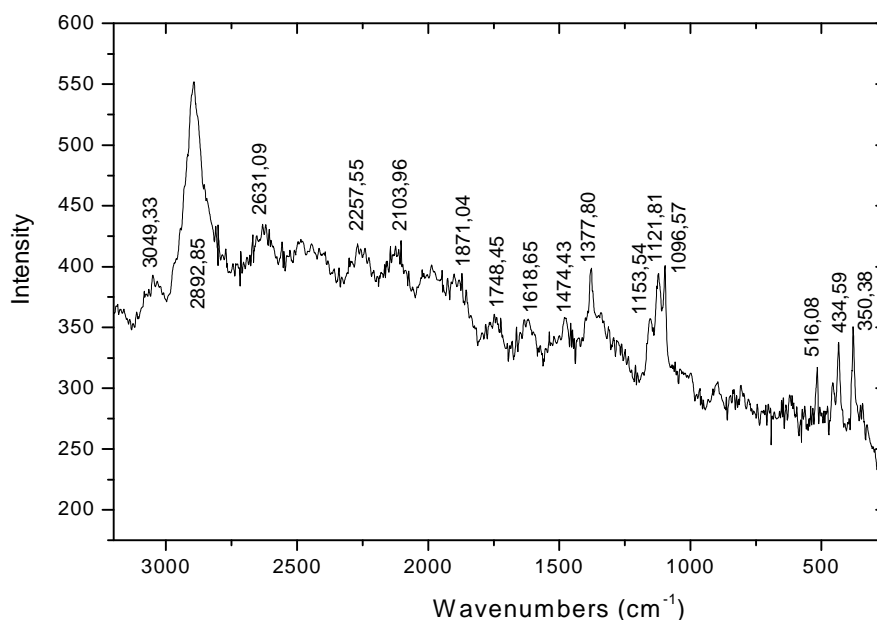


Figure 29 : Spectre Raman du PHA (Polymère I) de *B. megaterium* D9 obtenu sur milieu de culture glucosé.

Tableau 13 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de *B. megaterium* récupéré sur milieu de culture glucosé.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Assignements
3049.33	ν (C-H)
2892.85	ν (C-H)
2257.55	ν (C≡C)
2103.96	ν (C≡C)
1871.04	ν (C=C)
1748.45	ν (C=O)
1474.43	δ (CH ₂) δ(CH ₃) asym
1377.80	δ(CH ₃)
1153.54	ν (C-O-C) asym
1121.81	ν (C-O-C) asym
1096.57	ν (C-O-C) asym
516.08	δ(C-C-O) & δ(C-CH ₃)
434.59	δ(C-C-O) & δ(C-CH ₃)

II.9.2 Polymère II obtenu en présence de mélasse de betterave

Les bandes obtenues par spectromètre Raman du polymère II, récupéré à partir d'une biomasse de *Bacillus megaterium*, cultivée sur un milieu de culture synthétique en présence des mélasses de betterave (**Figure 30**) ont permis l'identification des mêmes bandes caractéristiques avec celles obtenues lors de l'utilisation du glucose (Tableau 14). Les bandes situées dans la région 3000-2877 cm⁻¹ sont associées au groupement C-H des groupements méthyle et méthylène et le mode d'élongation du groupement carbonyle est localisé à 1725 cm⁻¹. Les bandes de la région 1485-1440 cm⁻¹ correspondent aux déformations C-H des groupements méthyle et méthylène. La région située entre 1000-830 cm⁻¹ correspond aux élongations symétrique et asymétrique des groupements C-O-C. Cependant, la bande 430 cm⁻¹ indique une déformation des liaisons CC.

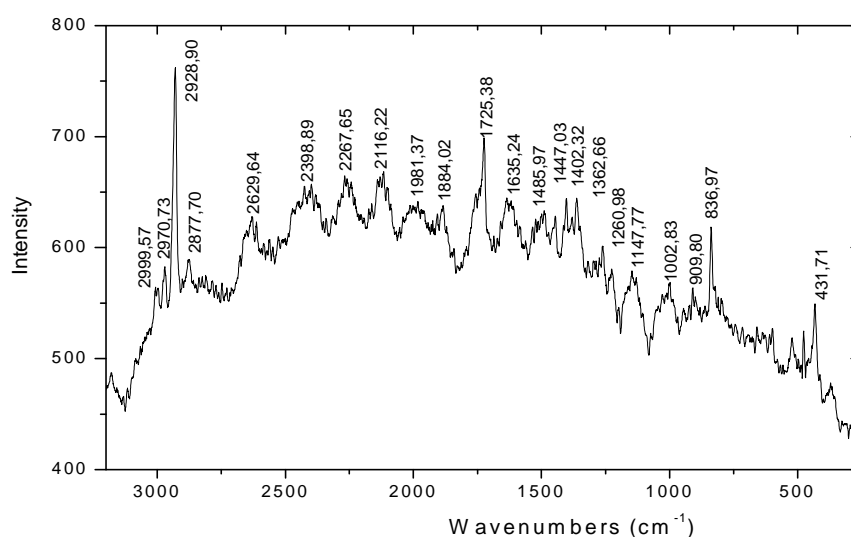


Figure 30 : Spectre Raman de PHA de *B. megaterium* D9 (Polymère II) obtenu sur milieu de culture synthétique en présence de la mélasse de betterave.

Tableau 14 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de *B. megaterium* D9, récupéré sur milieu de culture au mélasse de betterave.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Assignements
2999.57	ν (C-H)
2970.73	ν (C-H)
2928.90	ν (C-H)
2877.70	ν (C-H)
2398.89	ν (C \equiv C)
2267.65	ν (C \equiv C)
2116.22	ν (C \equiv C)
1981.37	ν (C \equiv C)
1884.02	ν (C=C)
1725.38	ν (C=O)
1485.97	δ (CH ₂) δ (CH ₃) asym
1447.77	δ (CH ₂) δ (CH ₃) asym
1002.83	ν (C-O-C) asym
909.80	ν (C-O-C)
836.97	ν (C-O-C)
431.71	δ (C-C-O)

II.9.3 Analyse du polymère III obtenu en présence des mélasses de canne et le polymère IV en présence des rebuts de datte

L'analyse des deux spectres Raman du polymère III et IV obtenus chez *B. megaterium* D9 cultivée sur milieu de production en présence des mélasses de canne (**Figure 31**) et le moût des rebuts de datte (**Figure 32**) comme substrats carbonés respectivement, a montré des groupements fonctionnels caractéristiques des PHAs.

Les tableaux 15 et 16 illustrent les différentes bandes détectées. Des pics correspondent aux élongations (stretching) (dans la région 3030-2830 cm^{-1}) ou bien déformations (1450-1360 cm^{-1}) ainsi balancement (wagging) et Torsion (twisting) (1260 cm^{-1}) des groupements méthyle/méthylène, les bandes qui indiquent des fonctions ester C-O-C (1146 cm^{-1}) et les bandes carbonyles caractéristiques du polymère (1750 cm^{-1}) sont obtenus avec des vibrations plus moins caractéristiques.

Des bandes supplémentaires ont été identifiées et qui correspondent aux groupements (S-H, C=C, C=N), dont leur présence est due probablement à la contamination des polymères par les débris cellulaires et les solvants lors de leur purification.

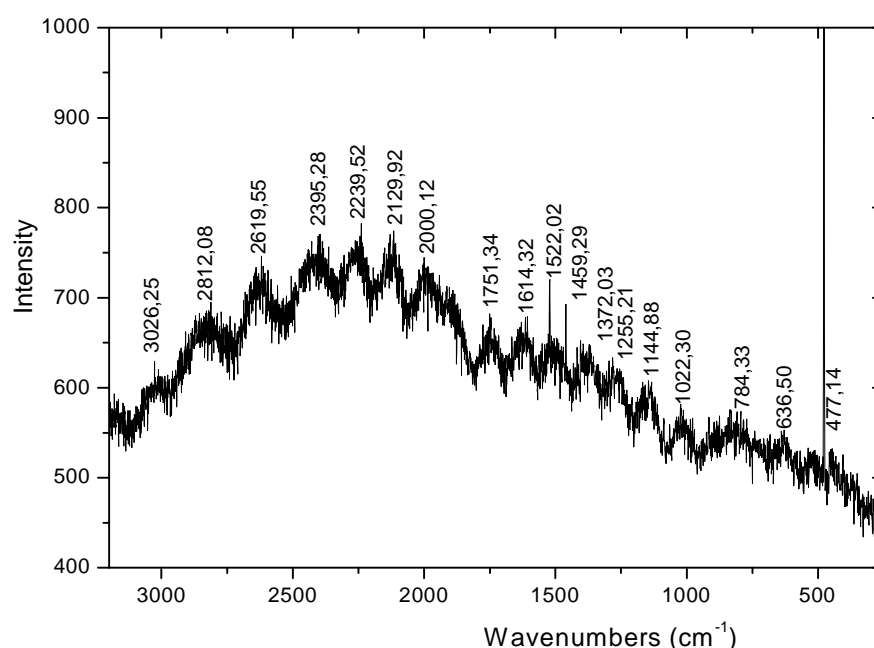


Figure 31 : Spectre Raman de PHA de *B. megaterium* D9 (Polymère III) obtenu sur milieu synthétique en présence de la mélasse de canne.

Tableau 15 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de *B. megaterium* récupéré sur milieu de culture au mélasse de canne.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Assignements
3026.25	ν (C-H)
2812.08	ν (C-H)
2619.55	ν (-S-H)
2395.28	ν (-S-H)
2239.52	ν (C≡C)
2129.92	ν (C=C)
2000.12	ν (C=C)
1751.34	ν (C=O)
1614.32	ν (C=N)
1522.02	ν (C=C)
1459.29	δ(CH ₂) δ(CH ₃) asym
1372.03	δ(CH ₃)
1255.21	ω(CH ₂) τ(CH ₂)
1144.88	ν (C-O-C) asym
1022.30	ν (C-O-C) asym
784.33	ν (C-O-C)
636.50	δ(C-C-O)
477.14	δ(C-C-O) & δ(C-CH ₃)

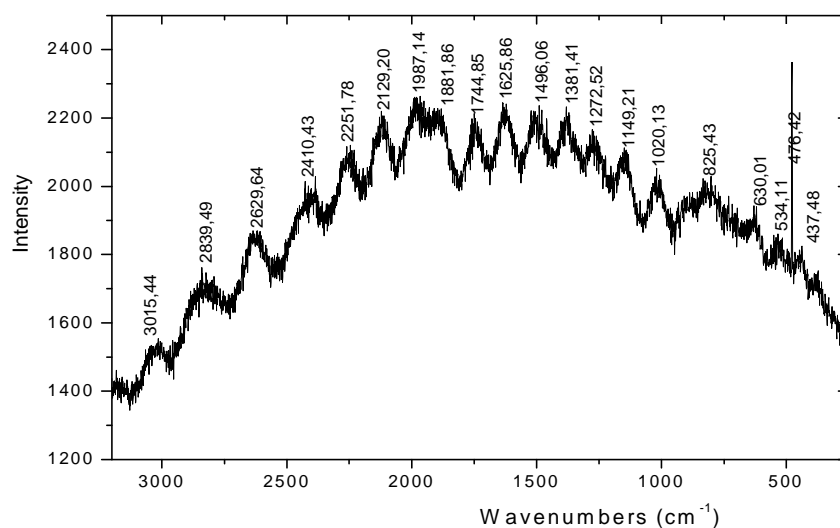


Figure 32 : Spectre Raman de PHA de *B. megaterium* D9 (Polymère IV) obtenu sur milieu synthétique en présence du moût des rebuts de datte.

Tableau 16 : Groupements fonctionnels caractéristiques de PHA de *B. megaterium D9*, récupéré sur milieu de culture en présence du moût des rebuts de datte.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Assignements
3015.44	ν (C-H)
2839.49	ν (C-H)
2629.64	ν (-S-H)
2410.43	ν (-S-H)
2251.78	ν (C≡C)
2129.20	ν (C≡C)
1987.14	ν (C=C)
1881.86	ν (C=C)
1744.85	ν (C=O)
1625.86	ν (C=N)
1496.06	ν (C=C)
1272.52	ω(CH ₂) τ(CH ₂)
1149.21	ν (C-O-C) asym
1020.13	ν (C-O-C) asym
825.43	ν (C-O-C)
534.11	δ(C-C-O) & δ(C-CH ₃)
470.42	δ(C-C-O) & δ(C-CH ₃)
437.48	δ(C-C-O) & δ(C-CH ₃)

III. Discussion

En l'espace d'un siècle, les polymères sont devenus incontournables dans notre vie quotidienne. Ils sont utilisés dans une multitude d'applications et il serait désormais difficile de s'en passer. La plupart des matériaux plastiques sont élaborés à partir du pétrole. Cependant, cette ressource est limitée et l'on atteindra dans les prochaines décennies un pic pour lequel la demande, tirée à la hausse par le développement des pays émergents, sera supérieure à l'offre, faisant grimper toujours plus haut les cours de l'or noir. En outre, en ce début de siècle, les enjeux sociétaux et environnementaux liés au changement climatique sont très importants. Dans ce contexte, le concept de développement durable est apparu à la fin du XX^{ème} siècle. C'est pourquoi les matériaux issus de ressources renouvelables reçoivent un intérêt grandissant auprès du monde académique et industriel. Ils sont de nature très variée et présentent souvent des caractéristiques intéressantes. Cependant, certaines propriétés importantes des polymères biosourcés ne rivalisent pas encore avec celles des polymères pétrochimiques classiques tels que le polyéthylène et le polypropylène. Pour pouvoir remplacer à l'avenir une part non négligeable des polymères d'origine fossile par des polymères biosourcés, de nombreux défis sont à relever. De très nombreuses études ont été conduites lors de la dernière décennie afin de développer des matériaux issus de ressources renouvelables plus performants, mais il reste encore du chemin à parcourir afin qu'ils puissent trouver leur place sur le marché concurrentiel des polymères.

Les Polyhydroxyalcanoates (PHAs) forment une alternative intéressante pour les plastiques pétrochimiques, ces polyesters sont biodégradables qui s'accumulent chez diverses bactéries comme matériaux de réserves énergétiques.

La première partie de ce mémoire a été consacré à isolement, identification et criblage des souches du genre *Bacillus* qui ont la capacité de synthétiser et d'accumuler des réserves énergétique sous forme de vésicule lipidique intracellulaire. 82 souches ont été isolées à partir de 14 sites écologique différents et identifiées comme étant des espèces du genre *Bacillus* sur la base de quatre critères; (Gram positif, catalase positif, forme bacillaire et la présence d'une endospore), ces bactéries ont subit un programme de criblage pour la sélection des souches qui sont capable de produire les PHAs. Les méthodes utilisées dans ce présent travail pour le criblage, sont les colorations par le noir soudan B, sur des cultures en boîte de Pétri d'une part et sur lame après fixation des frottis d'autre part.

Le noir soudan est un colorant synthétique provenant des hydrocarbures extrait du goudron de houille et dérivant du Benzène, insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'éthanol, l'éther, méthanol et les corps gras comme le polyhydroxyalcanoates.

Les colonies issue des cellules bactériennes à PHA +, étaient reconnues par leur coloration en noir ou gris foncé, par contre les cellules à PHA -, les colonies étaient incolores ou grises, car les cellules n'ont pas retenues le colorant. Sur frottis on peut voir l'intensité des vésicules noires dans le cytoplasme des cellules productrices. Ces méthodes de criblage ont été utilisées par plusieurs auteurs (**Schlegel et al., 1970**, **Das et al., 2004**, **Arshad et al., 2007**, **Arun et al 2008** et **Gomaa., 2014**).

Dix sept (17) souches productrices ont été sélectionné, avec une taille cellulaire qui plus au moins grande et qui produisent dans leur cytoplasme les polyhydroxyalcanoates, elles appartiennent au groupe IA selon Gordon et Berkeley.,(1984) dans la classification du genre *Bacillus*. Par l'utilisation de la méthode probabiliste numérisée établie par Michel Cavalla en 2003, les pourcentage relatifs d'identification ont permis de valider avec des taux d'identification plus au moins satisfaisant, 8 souches appartenant à l'espèce *B. megaterium*, 8 souches de *B. cereus* et 1 souche *B. mycoides*. Pour pouvoir faire la distinction entre bactérie productrice ou non, deux souches faiblement ou non productrices de PHA : *B. subtilis* et *B. licheniformis* ont été retenue.

L'espèce *B. megaterium* est apparue sous huit profils différents et aussi l'espèce *B. cereus*, ce qui reflète bien la diversité au sein d'une même espèce en ce qui concerne les bactéries sporulées.

La fréquence d'apparition de *B. megaterium* et *B. cereus* reconnues comme bactéries capables d'accumuler des lipides intracellulaires dans le genre *Bacillus* sont de loin les plus élevées (47 % pour les deux espèces) par rapport à *B. mycoides* avec une fréquence d'apparition de 6% seulement et aussi relativement à celle des autres espèces du même genre. Ceci est dû au fait que les deux bactéries sont très réponsus dans l'environnement.

Balm et al., (2002), avaient isolé 40 souches à partir de 6 prélèvements de sol, 27 isolats appartiennent au genre *Bacillus*, dont *B. subtilis* (8 souches), *B. megaterium* (6 souches), *B. firmus* (5 souches), *B. sphaerius* (4 souches) et *B. thuringiensis* (4 souches).

Ainsi **Yilmaz et al., (2005)**, ils ont arrivé a isolé, identifié et sélectionné à partir des prélèvements de sol les souches *B. cereus*, *B. megaterium* et *B. circulans*, comme les bactéries les plus productrices de PHA dans le genre. **Prowal et al., (2007)**, avaient isolé 35 souches appartenant à 6 genres différents, la production de PHA a été observée chez seulement 8 espèces, dont *B. cereus*, *B. thuringiensis* par contre les espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis*, *P. mirabilis*, *P. studzei*, la production était moyenne ou très faible. Dans une autre étude effectuée par **Krueger et al., (2012)** qui ont isolé 72 espèces à partir de différents sites environnemental, parmi eux 21 espèces appartenant au genre *Bacillus*, après criblage et

identification ils ont pu sélectionner seulement 4 souches de *B. megaterium* fortement productrices de PHA.

Ces études montrent que les espèces du genre *Bacillus* sont très répandues dans l'environnement et l'espèce *B. megaterium* et *B. cereus* sont les bactéries les plus reconnues dans le genre dans le domaine d'accumulation des réserves lipidiques (les Polyhydroxyalcanoates).

L'observation microscopique après coloration au noir soudan B, montre que le PHA apparaît sous forme de granules cellulaires noirs, dont les dimensions et le nombre varient selon l'espèce.

Parmi toutes les espèces isolées et testées dans ce travail, *Bacillus megaterium* (D9) a été retenue comme la souche la plus productrice de PHA, ce choix était basé sur l'intensité de rétention du noir soudan ; Les cellules productrices de PHA augmentent de volume après 24 à 48h de croissance dans le milieu synthétique MS1.

Lundgren et al., (1964), rapportent que le nombre de granules après observation par microscope électronique de transmission chez *B. megaterium* est entre 6-8 par cellule. Cependant **Tian et al., (2005)**, ont étudiés la formation des granules de PHB par le microscope électronique à transmission chez *Wautersia eutropha* H16 connue sous le nom de *Ralstonia eutropha*, les cellules après 24h ne contiennent qu'un petit nombre de granules lipidiques, le deuxième jour de croissance, les cellules augmentent de taille avec un nombre élevé de vésicules, chaque cellule peut contenir de 8-12 granules avec 0,2 à 0,5µm de diamètre

Ainsi **Zhang et al., (1994)**, remarquent le changement de dimension des cellules de *Klebsiella aerogenes* recombinante avec une augmentation de volume de 10 à 20 fois entre les cellules PHB – et PHB +.

La production des PHAs a été largement étudiée chez *Ralstonia eutropha* et *Alcaligenes latus*, par contre l'accumulation de ces bioplastiques n'a pas été bien développée chez *B. megaterium*. Plusieurs stratégies ont été établies dans le but d'augmenter le rendement des PHAs tout en diminuant les coûts de production (**Omar et al., 2001**).

Un autre objectif de cette étude ; c'est l'optimisation des conditions de culture pour une production maximale de PHA à faible coût économique chez *B. megaterium* D9 par l'utilisation des sous produits comme la mélasse de canne, la mélasse de betterave et le moût des rebuts de dattes.

L'accumulation des PHAs dans les cellules est maximale lorsque les bactéries sont cultivées sur des substrats contenant simultanément un excès de carbone et une limitation de l'apport d'autres substances nutritives telles que, l'ammonium, le sulfate, le phosphate, le fer,

le magnésium, le potassium ou l'oxygène (Doi., 1990, Steinbüchel et al., 1992 , Phanse et al., 2011). En créant ce déséquilibre, les microorganismes cessent de se multiplier pour commencer à produire les PHAs. Le milieu synthétique sélectionné dans cette étude favorise l'accumulation de bioplastique lorsque l'équilibre de nutriment essentiel est perturbé en respectant le rapport C/N élevé.

Selon la société *Monsanto Chemical*, la production de polyesters bactériens ne serait pas commercialement viable tant que la teneur en PHA n'atteint pas 20 % (mg de PHA /mg de biomasse sèche) (AAC, 2003).

La concentration en substrat carboné et azoté (Simple ou complexe) affecte considérablement la croissance bactérienne et le rendement des PHAs.

L'étude de l'influence des différentes sources de carbone sur la croissance et la production de bioplastique chez la souche D9, montre que le meilleur rendement de production a été obtenu lors de l'utilisation de glucose (50% de PHA par MSC), puis mélasse de betterave à raison de 3% (41% par MSC), par contre le maximum de croissance a été obtenue avec l'amidon comme substrat carboné pur, cependant la production de PHA a été faible.

Borah et al., (2002) reportent que le saccharose est une source de carbone qui coûte cher pour la production des PHAs, en parallèle une étude effectuée par **Kulpreech et al (2009)** à montrer que le rendement de PHB chez la souche *B. megaterium* BA-019 augmente à 1,8 fois en remplaçant le saccharose par la mélasse de canne dans le milieu synthétique ; de 28 à 55% par MSC). Ainsi **Gouda et al., (2001)** obtiennent 39,9% de PHA par MSC en présence des mélasses de canne comme source de carbone chez une autre souche de *B. megaterium* . Un rendement de 40,8% a été rapporté chez la souche *Bacillus sp Jma5* par **Yuksedag et al., 2004.**

Dans une étude réalisée par **Kalnins et al., (1999)**, montrent que *Azotobacter chroococcum* cultivé sur un milieu minérale supplémenté de différentes sources de carbone, ont un effet sur la production du polymère ; le glucose et la mélasse de betterave donnent respectivement un rendement de 78% et 51% par rapport au poids sec cellulaire.

Par contre **William., (1992)** avait utilisé un milieu synthétique avec 5% de mélasse de betterave, la production de PHB par *Azotobacter vinelandii* UWD était de 69%.

Chaijamrus et al. (2008), ont testé la production du PHB, chez *B. megaterium* ATCC 6748 après 48h de croissance dans un milieu synthétique en présence de 4% de mélasse de canne, le rendement était de 43% par DCM.

La production de PHA atteint une valeur de 39% par rapport au poids sec cellulaire chez la souche *B. megaterim* H16 étudiée par **Salgaonka et al., (2013)** cultivée dans un milieu spécifique E2 en présence de glucose .

Alcaligenes et *Echerichia coli* recombinant possèdent aussi un très haut potentiel d'accumulation de bioplastique étudiés par **Hahn et al., (1994)**, ces microorganismes durant la réalisation de leur processus cellulaire, transforment les glucides (glucose, fructose, et le saccharose) ou les acides gras en homopolymères PHB, lorsque le glucose est employé comme source de carbone le rendement du polyester récupéré chez *A. eutrophus* et *E. coli* était de 62% et 59% respectivement, *E. coli* recombinante offre des perspectives intéressantes, car sa croissance est rapide et son rendement de productivité est élevé.

L'effet de la variation des concentrations des différents sous produits (de 1-5%) sur la croissance et la production des PHAs dans le milieu synthétique MSI chez la souche D9, a montré des résultats plus au moins variable, Le maximum de production était obtenu avec 3% de mélasse de betterave (41% par MSC) et le maximum de croissance (0,98g/l) était observé avec 5% de moût des rebuts de datte mais la production en PHA était faible, car le rendement généralement n'est pas relié à la biomasse cellulaire. Toutefois on ne peu pas négliger le rendement obtenu par l'utilisation de la mélasse de canne à raison de 2% (30% de PHA par rapport au poids sec cellulaire à été obtenu), qui est considéré comme satisfaisant selon *société Monsanto Chemical*.

Kulpreecha et al., (2009); ont montré que la mélasse de canne est un excellent substrat pour la croissance et l'accumulation des PHAs chez une souche *B. megaterium* BA-019 dans un système de culture fed-batch, la biomasse atteint 72,6 g/l avec une production de 43% par MSC. Ainsi **Omar et al., (2001)**, reporte que l'utilisation de mélasse de betterave avec le sirop de datte dans le milieu synthétique par *B. megaterium* donnent des rendements de 50% par MSC pour une biomasse de 3g/l.

B. megaterium D9 qui a été isolée et identifiée dans ce travail est une bactérie intéressante pour la production des PHAs car elle est capable d'utiliser les sucres présents dans les mélasses et le moût des rebuts de datte comme seul source de carbone ; des substrats bon marché à faible coût économique. Les mélasses contiennent des traces éléments et des vitamine tel que la thiamine, riboflavine, pyridoxine et niacinamide (**Gouda et al., 2001**) qui fait d'eux des sous produits attirant de point de vue industriel.

Si on compare les résultats obtenus par les autres auteurs qui ont utilisé d'autres déchets agroalimentaires comme le sirop de datte, déchets d'olive, pelures de pommes de terre et le son de riz blanc, et même à cette présente étude on peut dire que le moût des rebuts de datte n'a pas donné des bons rendements souhaités (17% par MSC) et cela revient peu être à sa richesse en minéraux et oligoélément, il renferme 1,5 à 1,8 g pour 100 g (2 à 3 fois plus que les fruits frais). C'est un des fruits les plus riches en potassium (plus de 670 mg), en calcium (62 mg) et en magnésium (58 mg) et ainsi qu'en fer (3 mg). Le cuivre, le zinc et le manganèse sont également présents à des niveaux intéressants (**Regal., 1995**), ce qui enrichi le milieu en sel minéraux et favorise ainsi la croissance de la bactérie étudiée mais il perturbe les enzymes responsable de la synthèse des PHAs.

Full et al., 2006, montrent que *B. megaterium* CL1 comme étant une bactérie hautement saccharophile, la production des PHAs elle est maximale dans la plus part des substrats carbonés ainsi avec plusieurs sous produits riche en carbone.

Les sous produits testés dans ce projet exposent un avenir fructifiant dans le domaine de rabaissement des coûts de production des bioplastique d'origine bactérien.

L'utilisation de chlorure d'ammonium comme source d'azote à raison de 0,05%, donne des bons résultats de production (41% par rapport au poids sec), l'extrait de levure permet d'avoir des quantités intéressantes de bioplastique (34% par MSC), mais se substrat est trop onéreux ne repend pas à notre objectif, une source d'azote minérale avec un prix non significatif permet de réduire les coûts de production.

Gouda et al., (2001) ont testé l'effet de plusieurs substrats azotés et carbonés pour la production des PHAs chez la souche *B. megaterium*, le rendement maximal était obtenu dans le milieu synthétique en présence de chlorure d'ammonium et la mélasse de canne (40,10% par MSC) suivie par le corn steep liquor (33,02% par MSC) et d'après **Beaulieu et al (1994)**, l'ammonium sulfate donne des bons rendements de croissance et de production de polyester chez *A. eutrophus* DSM 545 avec une concentration entre 0,05 et 1,5g/l.

Généralement les espèces du genre *Bacillus* peuvent accumuler des polyesters entre 6,53 à 48,2% par MSC (**Aslim et al., 2002, Shamala et al.,2003, Singh et al., 2013**).

L'étude cinétique de croissance et de production de PHA, chez *B. megaterium* D9, dans milieu synthétique en présence des mélasses et le moût des rebuts de datte donne approximativement les mêmes phases de croissance et une évolution de production du polyester presque dans les mêmes intervalles, dans tous les cas la production commence dans la phase exponentielle de croissance et le maximum de production était dans phase stationnaire. Dans les premières heures de croissance le taux de production est non

significatif, et arrive à son optimum après 48h de culture, au delà de cette période le rendement diminue, cela est due à l'utilisation de ce polymère par la souche productrice au cours de la sporulation par l'enzyme PHB- Dépolymérase (Singh et al., 2013). Cette réduction du polyester après 72h peut être due aussi à la diminution des micronutriments et l'accumulation des déchets toxique qui a un effet négative sur le microorganisme (Flora et al., 2010). Le taux de croissance μ de la souche D9 testée correspond à $0,20 \text{ h}^{-1}$.

Les auteurs expliquent ce phénomène, que les premières heures d'incubation (12h) les cellules bactériennes utilisent les sources de carbone et d'azote pour la synthèse des composants essentiels à la croissance, après 12h quand les éléments nutritifs s'épuisent dans le milieu de culture, la croissance diminue et comme le carbone est en excès les cellules commencent à accumuler les réserves énergétiques au cours de la phase stationnaire, après 24 à 48h de culture approximativement les cellules accumulent le maximum de réserves lipidiques.

Généralement les bactéries qui sont capable d'accumuler les PHAs dans leurs cytoplasmes sont divisées en 2 groupes. Le premier groupe accumule les PHAs durant la phase stationnaire avec une limitation des éléments nutritifs comme le N, Mg, P et l'oxygène et en excès du substrat carboné, parmi les microorganismes les plus important du point de vue industrielle qui appartient à ce groupe *Ralstonia eutropha*, mais aussi on trouve *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens* et *Protomonas oleovorans*.

Le second groupe accumule les PHAs durant la phase exponentielle de croissance par exemple *Alcaligenes latus*, des souches mutantes d'*Azotobacter vinelndii*, *A. beijerinckii* (Borah et al., 2002, Chee et al., 2010), ou *E. coli* recombinant qui renferme l'opéron PHA de *Ralstonia eutropha* (Adwitiya al., 2009).

La souche *B. megaterium* D9 qui a été isolé dans ce travail elle appartient au premier groupe car les PHAs s'accumulent durant la phase stationnaire de croissance.

L'étude de la variation de concentration en sucres dans le milieu synthétique au cours de la croissance bactérienne en présences de glucose ou les différents sous produits avec la méthode enzymatique et la méthode de Dubois, permet de constater l'assimilation du carbone par le microorganisme testé ; le substrat carboné est en excès dans le milieu de production cela n'empêche pas la bactérie de le consommer au cours de la croissance cellulaire puis de le transformer en réserves lipidiques dans la phase stationnaire. Selon Borah et al., (2002), la source de carbone est appliquée dans trois fonctions différentes pour la souche *B. megaterium* : source de carbone pour la synthèse de la biomasse, source d'énergie pour la

biosynthèse et la maintenance cellulaire et source de carbone pour la polymérisation des PHAs.

Lopez-cuellar et al., (2011) ont étudié la cinétique de croissance et la concentration en sucre chez *W. eutropha* dans un milieu synthétique en présence de 1% de fructose, cette bactérie donne des rendements importants en PHAs (89 % par MSC) avec une bonne croissance est une consommation considérable du substrat carboné ; la concentration du fructose diminue de 10g/l jusqu'à 0,44g/l dans le milieu.

Pour éviter que les bactéries consomment leurs réserves lipidiques, il faut optimiser le temps de fermentation, après lequel, la biomasse est centrifugée, rincée, et séchée. La biomasse referme le polymère.

Les PHA sont des produits intracellulaires, les moyens applicables pour leurs séparations de la biomasse sont très coûteux et complexes. La méthode la plus commune pour l'extraction à partir de la biomasse c'est l'extraction par solvants. Dans ce travail l'extraction liquide – solide avec le chloroforme chaud complétée par une précipitation sélective dans l'éthanol a été utilisée pour la récupération de PHA à partir de la biomasse de *B. megaterium* D9. Les températures élevées servent à maximiser les coefficients de diffusion et donc la vitesse et le rendement d'extraction. Le polymère purifié séché jusqu'à un poids constant puis quantifié par gravimétrie et exprimé par rapport au poids sec cellulaire ou (MSC),

Cette méthode d'extraction classique par solvant avec chauffage a été utilisé aussi **Xie et Chen (2007)** pour la récupération des polyhydroxyalcanoates à partir d'une biomasse lyophilisée d'*Aeromonas hydrophila* 4AK4 recombinant.

L'extraction par solvant sans chauffage avec une homogénéisation rapide à 13.500 rpm suivit d'une précipitation par l'éthanol a été exploité par **Chaijamrus et Udpuay (2008)**.

Plusieurs méthodes d'extraction des bioplastiques bactériens ont été traitées. L'extraction par solvants à chaud ou sans chauffage, ou une combinaison entre l'extraction au CHCl_3 et digestion chimique, comme l'hypochlorite de sodium était utilisé par (**Hahn et al., 1995, Choi et Lee.,1997, Yu et al, 2001, Adwitiya et al., 2009**) ou bien le SDS ; sodium dodecyl sulfate par (**Jiang et al., 2008**). Cependant le traitement chimique de la biomasse engendre le plus souvent une dégradation sévère du polymère (**Chee et al., 2010**).

L'analyse qualitative et quantitative des polymères peuvent se faire par chromatographie phase gazeuse (CPG), infra rouge, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (MNR), spectrométrie Raman ou par des techniques génétiques (hybridation Southern blot, la PCR, l'hybridation in situ) (**Tokiwa et Ugwu., 2007, Koller et Contreras., 2015**).

Dans ce travail l'analyse qualitative des polymères a été effectuée par spectrométrie Raman, cette technique permet la détermination de la structure moléculaire et les interactions des différents groupements chimiques.

Les spectres Raman obtenus dans ce travail, permettent d'identifier un certain nombre de bandes caractéristiques des groupements fonctionnels des PHAs (C=O, CH, CH₂, CH₃, C-O-C, CC) ce qui permet de confirmer que la bactérie *B. megaterium* D9 c'est un microorganisme capable de produire des polyesters intracellulaires dans un milieu synthétique en présence d'une variété de substrats carbonés.

La bande qui correspond à un groupement carbonyle est toujours remarquée dans la région 1750-1725 cm⁻¹, les vibrations obtenues dans la région 1150-850 cm⁻¹ indiquent des liaisons esters spécifiques au (Bioplastique analysé). Selon **Helm and Naumann., (1995)** et **Shamala et al., (2003)**; les premiers signes des groupements fonctionnels des PHAs c'est la présence des vibrations dans la région 1750-1724 cm⁻¹ du carbonyle ester, cette bande a été enregistrée à 1726 cm⁻¹ par **Misra et al., (2000)**, **Lopez-corté et al., (2010)** et **Campos et al., (2014)**.

Des cultures de *Bacillus megaterium* DSM 90 avec et sans PHB ont été analysées par spectrométrie Raman, la différence des spectres Raman obtenus montre la présence des bandes spécifiques aux groupements carbonyle à 1726 cm⁻¹ dans des cultures à PHA+ par contre leur absence est remarquable dans des biomasses à PHA- (**Ciobota et al., 2010**).

Ainsi que **Phukon et al., (2012)** ont analysé les PHAs produits par la souche *Bacillus circulans* MTCC 8167 par FT-IR. Ils ont montré que le biopolymère obtenu après extraction par solvant expose des groupements CH, et des bandes de transition intenses dans la région 1735-1000 cm⁻¹ caractéristique des groupements C=O et C-O-C similaire à celles de PHB standard. **Arcos-Hernandez et al., (2012)** ont également caractérisé les fonctions du P (3-HB-co-3HV) produit par une culture bactérienne mixte par FT-IR, les spectres ont montré une forte transition à 1753 cm⁻¹ et dans la région 1200 cm⁻¹.

Selon **Koller and Contreras., (2015)**, les bandes Raman retrouvées à environ 1725, 1443, et 1458 cm⁻¹ indiquent un PHB cristallin par contre la présence des vibrations à 1453, 1740, 2881, 2938 cm⁻¹, suppose la présence des domaines amorphes dans le polymère. Dans ce travail les polymères analysés montrent des zones amorphes à raison de 60% et cristallines à raison de 40%.

Généralement les bactéries synthétisent des PHAs constitués des monomères de 3HB dans les milieux de culture riches en glucose ou en sucrose. L'incorporation de petites quantités d'acide pentanoïque, valérate, ou propionate dans le milieu de production, le sous

produit qui en découle est le copolymère PHB-co-PHV (**Steinbuchel et al., (1993), Poirier et al., (1995), Lopez- Cuellar et al., (2011)**).

Toutes les vibrations obtenues pour chaque groupement chimique et pour chaque polymère récupéré dans cette présente étude, sont entièrement concorde avec celles observées par les autres auteurs et qui indique un polymère de type PHB Poly-3-hydroxyutyrates (**Oliveira et al., 2007., Ciobota et al., 2010, Ziribi Maaloul et al., 2013**). (Annexe 4)

Conclusion

De nombreux problèmes environnementaux affectent notre monde entier et l'un des plus grands problèmes, c'est la gestion des déchets solides en plastique.

Le remplacement de matière plastique non dégradable source de pollution environnementale par des substitues biodégradables constitue actuellement un axe d'investissement à privilégier. Les Polyhydroxyalcanoates (PHAs) forment une alternative intéressante pour les plastiques pétrochimiques. Actuellement on connaît plus de 90 microorganismes qui accumulent dans leurs cellules des réserves de carbone et d'énergie sous forme de PHAs.

Ces travaux de thèse étaient consacrés dans un premier temps à l'isolement des espèces du genre *Bacillus* à partir de quatorze échantillons différents. Sur un total de 82 souches, 17 isolats ont montré une réaction positive au noir soudan B, un agent de contrôle de composés lipophile.

Sur la base d'identification morphologique et biochimique par l'utilisation des galeries API 20^E et d'autres tests complémentaires, les 17 souches productrices de PHA ont été identifiées avec une répartition plus au moins hétérogène au sein du genre ; huit souches ont donné des profils d'identification semblables à l'espèce *B. cereus* dont le pourcentage de répartition est de 47%, les huit autres appartenaient à l'espèce *B. megaterium* avec une fréquence de 47% aussi, et en fin la souche *B. mycoides* a été apparue à une fréquence de 6 % seulement.

La souche **D9** a montré un fort potentiel de production de polyhydroxyalcanoates. Sur l'ensemble des résultats d'identification biochimique et génotypique, la souche D9 a été définie comme étant une souche apparentée à l'espèce *Bacillus megaterium*.

Le deuxième objectif de cette étude s'intéressait à l'optimisation des rendements de PHA et ainsi la réduction des coûts de production, de ce fait, plusieurs déchets agroalimentaires comme les mélasses de canne et de betterave ainsi le moût des rebuts de datte ont été exploités comme seule source de carbone chez la souche *D9*.

En effet la fabrication de PHA se fait en affamant partiellement les bactéries, il s'accumule sous forme de granules intracellulaires, lorsque les conditions de culture sont peu favorables pour la croissance et en présence d'excès de source de carbone. La méthode conventionnelle d'extraction par solvant a été utilisée pour la séparation des PHAs du reste de la biomasse.

L'analyse par spectrométrie Raman des polymères bactériens obtenue permet d'identifier les groupements fonctionnels relatifs aux PHB (Polyhydroxybutyrates).

A l'issue de cette étude il était constaté que le taux de synthèse, le niveau d'accumulation et le rendement de PHA varient considérablement selon le substrat sous les mêmes conditions de fermentation et pour la même souche. A l'essor de ces résultats on peut dire que la souche *Bacillus megaterium* peut être une candidate intéressante pour la production des bioplastiques à l'échelle industrielle.

En perspectives, il reste de trouver d'autres matières premières entièrement naturelles, obtenue à partir de sources 100% renouvelables. Des efforts devraient aussi porter sur le développement de stratégies de purification plus efficaces.

Et pour compléter ce travail, il serait intéressant de caractériser d'autres propriétés importantes des PHAs obtenue telles que la perméabilité et la biodégradation. Une analyse de cycle de vie permettrait également d'évaluer les impacts environnementaux.

Références

Bibliographiques

Référence Bibliographiques

- Abouseoud M, Medea C U. (2008).** Les biosurfactants. Biomolécules à multiusages. SNBP1
- Ash C, Farrow J.A.E, Wallbanks S et Collins M.D. (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, *Lett. Appl. Microbiol*, **13**, 202-206.
- Acinas S.G, Marcelino, L. A, K1epac-Ceraj, V et Polz, M. F. (2004).** Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. 1. *Bacteriol*. 9: 2629 -2635.
- Acourene S, Tama M. (2001).** Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. Revue Recherche Agronomique, N° 8, Ed. INRAA, pp19-39.
- Acourene S, Ammouche A, Djaafri K. (2008).** Valorisation des Rebutts de Dattes par la Production de la Levure Boulangère, de l'alcool et du Vinaigre. Sciences& Technologie C 28, pp.38 -45.
- Adwitiya P, Prabhu A, Kumar A, Rajagopal B, Dadhe K, Ponnamma V, Shivakumar S. (2009).** Optimization of process parameters for maximum poly-Beta-hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish. J. Microbiol*. 58: 149-154.
- Alexander, M. (1977).** Introduction to soil microbiology. New York: John Wiley. pp: 467.
- Alias Z, Tan IKP. (2005).** Isolation of palm oil utilizing polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource. Technol*. 96: 1229–1234.
- Allen AD, Anderson W, Ayorinde F, Eribo B. (2010)** Bio-synthesis and characterization of copolymer poly(3HB-co-3HV) from saponified *Jatropha cur-cas* oil by *Pseudomonas oleovorans*. *J Ind Micro-biol Biotechnol*; 37:849-856.
- Alm WE., Oerther DB., Larsen N., Stahl DA., Raskin L. (1996).** The oligonucleotide probe database. *Appl Environ Microbiol* 62:3557–3559
- Al-Obaidi Z S. (1987).** Optimization of propagation medium for Baker's Yeast using date extract and molasses. Determination of the optimum concentration of micro elements and vitamins. *Date palm journal*, vol. 5 (1) N°9, pp. 65-78.
- Amann, R, Ludwig, W et Schleifer K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev*. 59: 143 -169.
- Anderson A, Dawes E. (1990).** Occurrence metabolism metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev*. 54: 45-472.
- AOAC. (2002).** Officielle Methods of Analyses. 17TH Ed. Maryland. U.S.A.
- Archimède H, Xande X, Gourdine J L, Fanchone A, Alexandre G, Boval M, Coppry O, Arquet R., Fleury J, Regnier C, Renaudeau D. (2011).** La canne à sucre et ses coproduits dans l'alimentation animale.
- Arcos-Hernandez MV, Gurieff N, Pratt S, Magnusson P, Werker A, Vargas, Lant P. (2010).** Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: an application in mixed cultures, *Journal of Biotechnology* 150: 372–379.
- Arshad U, Jamil N, Naheed N, Hasnain S. (2007).** Analyze of Bacterial strain, from contaminated and non contaminated sites for the production of biopolymers. *Afric.j.Microb*.Vol 6,pp:1115-1121.

Référence Bibliographiques

Arun A, Arthi R, Shanmugabalaji V, Eyini M. (2008). Microbial production of polyhydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. *J. Bioresour. Technol.* 100: 2320-2323.

Aslim B, Yuksekdogan ZN, Beyatli Y. (2002). Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *J. of Biotechnology*. P: 24-30.

Balet J M. (2005). Aide mémoire gestion des déchets. Dunod, Paris.

Barkatov V et Elissev V. (1979). Guide des travaux pratiques du contrôle technico-chimiques de la production des conserves. INIL, Boumerdes, 74 p.

Bavykin, S. G, Lysov, Y. P, Zakhariev, V, Kelly, J. J, Jackman, J, Stahl, O. A et Cherni A. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. 1. *Clin. Microbiol.* 42: 3711-3730.

Beaulieu M, Beaulieu Y, Melinard J. (1994). Influence ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *App. Environ. Microbiol.* 61: 165-169.

Belm A, Yuksekdogan N, Beyatli Y. (2002). Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish.J.Biotech.* p: 24-30.

Benahmed D A. (2007). Etude et optimisation d'un processus de fabrication traditionnelle du vinaigre à partir de deux variétés de dattes communes cultivées dans le sud algérien. Mémoire de Magister « génie alimentaire », Université de Boumerdes

Besbes S, Drira L, Blecker K, Deroanne C, Hamadi A. (2009). **Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam.** *Journal of Food Chemistry*, Vol. 112, pp. 406-411.

Bessah R, Touzi A. (2001). Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 37-40.

Berkeley C. W & Goodfellowm. (1981). The Aerobic Endospore-forming Bacteria : Classification and Identification. London & New York : Academic Press.

Bernd H A, Rehm. (2006). Biogenesis of Microbial polyhydroxyalkanoate Granules: a platform technology for the production of Tailor-made Bioparticules. *Issues Mol Biol.* 9: 41-62.

Betancourt O.A. (2008). Analyse Extraction et récupération de polyhydroxybutyrate présent dans la biomasse. Thèse QUEBEC Montréal. pp: 154

Biomérieux. (2006). Applications Bio Pharmaceutiques. [Http: www.biomerieux.fr/servlet/srt/srt/bio/france/dyn](http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/srt/bio/france/dyn).

Borah B, Thakur PS, Nigam JN. (2002). The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J. Appl. Microbiol.* 92: 776-783.

Référence Bibliographiques

Boukhiar A. (2009). Analyses du processus traditionnelles d'obtention de vinaigre de datte tel qu'appliqué au sud algérien : essai d'optimisation mémoire de Magister spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès.

Byrom D. (1994). Polyhydroxyalkanoates, In: Mobley DP (ed) Plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors. Hanser Munich, pp. 5-33.

Camposa MI, Figueiredob TV, Sousab LS, Druzianb JI. (2014). The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surfacemethodology and its characterizations. Indust Crops and Products 52. 338– 346.

Casanova., A, Obreque J C, Sandino, A. M. G et Jashés M. (2001). tRNA genes were found in *Pisicricketsia salmonis* 16S-23S rDNA spacer region (ITS). *FEMS Microbiol. Lett.* 197: 19 -22.

Cavalla M. (2003). Identification biochimique des *Bacillus* par galleries API 20E. <http://mcavalla.free.fr>.

Chaijamrus S, Udpuay N. (2008). Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agr Engg Int: CIGR J.* Manuscript FP. 7(30):10.

Chee J Y, Yoga S S, Lau N S, Ling S C, Abed RMM, Sudesh K. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *In. Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Ed). Mendez-Vilas, A. pp. 1395–1404 Spain: Formatex Research Center.

Chen GQ, (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry, *Chemical Society Reviews*, 38(8):2434-2446.

Choi J, Lee S. (1997). Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*; 17:335-342.

Claus D, Berkeley RCW. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In Sneath PHA., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA.

Ciobotă V, Burkhardt EM., Schumacher W., Rösch P., Küsel k., Popp J.(2010).The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*; 397:2929–2937

CNR (Cercle National de Recyclage). (2000). Le traitement biologique des déchets organiques. 58 pages. France.

Das Q, Chowdhury J, Anwar M. (2004). Isolation, purification and characterization of biodegradable polymer producing Bacteria *Listeria murrayi*. *J .Biolog.*11: 2018-2021

De Bary A. (1884). Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bakterien. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.

Decloux M. (2008). **Procédés de transformation en sucrerie. Techniques de l'Ingénieur, traité Agro alimentaire F 6 150, pp. 1-18.**

De Smet MJ, Eggink G, Witholt B, Kingma J, Wynberg H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* 154: 870-878.

Référence Bibliographiques

De Vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K H, Whitman W B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. Vol Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.

Doi Y. (1990). « Microbial Polyesters ». New York: VCH éditeur, 166 p.

Droboiewski F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 324 -338.

Dubois M, Gilles, K.A, Hamilton, J.K, Rebers PA et Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.

Energie plus. (2000). Déchets ménagers. Valorisation thermique. La revue professionnelle de la maîtrise de l'énergie N° 254. <http://www.energie-plus.com/news/fullstory.DhD/aid/176>.

Fahmy f, Flossdorj f, & Claus d. (1985). The DNA base composition of type strains of the genus *Bacillus*. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 60- 65.

Full TD, Jung DO, Madigan MT. (2006). Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new rapidly growing *Bacillus* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 377–384.

Gaillard S. (2003). Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse. *Thèse Doct .univ Bretagne*.

Garrity M, Bell J, Lilburn T. (2004). Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Ed Doi. pp 172-178.

Geoffrey CP. (2011). Food science and technology. Ed. John Wiley and sons. USA. 520p.

Gerhardt P, Murray, R G E, Wood W A, Krieg NR. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington DC, ASM, USA.

Ghatnekar M. S, Pai, Ganesh M. (2001). Production and recovering of poly 3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp. V49 ». *J chem technol biotechnol*, vol. 77, p 444-448.

Gillis M, V Tran van, R Bardin, M Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin et M. Femandez. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N2-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol*, vol. 45, p. 274-289.

Gomaa EZ. (2014). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.57 n.1: pp. 145-154, J.

Gordon RE. (1981). One hundred and seven years with the genus *Bacillus*. In *The Aerobic Endospore forming Bacteria. Classification and Identification*, pp.1-15. Edited by R. C. W. Berkeley & M. Goodfellow. London : Academic Press.

Gordon R E., Haynes W.C and H N Pang .(1973).The genus *Bacillus* Agricultural Handbook n °427. Washington.

Référence Bibliographiques

Gouda MK, Swellam AE, Omar SH. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol Res* 156: 201–207.

Guattieri M, Rapaccini S. (1994). Date stone in broiler's feeding. In *Technologie de la datte*. Ed. GRIDAO, 35 p.

Haard N F. (1988). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses; *Biotechnology Letters* Volume 10, Number 9, 609-614, DOI: 10.1007/BF01024710.

Hahn S K, Yong K, Chang et Sang Y, Lee. (1995). Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*, vol. 61, no. 1, p. 34-39.

Harrison S T, Howard A, Chase et John S, Dennis. (1991). The lysis of Gram negative *Alcaligenes eutrophus* by enzymes from *Cytophaga*. *Biotechnol Tech*, vol. 5, no. 2, p. 115-120.

Helgason, E, Okstad, O. A, Caugant, D. A et Johansen, H. A. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* -one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2627 -2630.

Helm D, Naumann D. (1995) Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 126:75–80

Himmel D. (2005). Application de la microspectrométrie Raman à la mesure *in situ* de paramètres physiques régnant dans un contact sphère/plan en régime de lubrification elasto-hydrodynamique. Thèse De Doctorat, Université des Antilles et de la Guyane.90pp.

Holmes P A. (1982). séparations proces. *Eur Patent Appl* : EP-A-0046335.

Hori K. M, Kaneko Y, Tanji X. H, Xing and H. (2002). Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 211-216.

Huybens, N, mainil J et marlier D. (2009). Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann. Méd. Vét.*, 153, 112-128

Imbeault N B. (1997). Production d'acides gras par biodégradation anaérobie du perméat de lactosérum dans un bioréacteur en continu mémoire présenté à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables.

Jackson, S. G, Goodbrand RB, Ahmed, Ret Kasatiya, S. (1995). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Let!. App. Microbiol.* 21: 103 -105.

Jacquel N, Lo CW, Wu H S, Wei YH, Wang S S. (2007). Solubility of polyhydroxy-alkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *AIChE Journal* 53, 2704–2714.

Jernigan J A, Stephens D S, Ashford D A, Omenaca C, Topiel M S, Galbraith M, Tapper M, Fisk T L, Zaki S, Popovic T, Meyer R F, Quinu C P, Harper S A, Fridkin S K, Sejvar J J, Shepard C W, McConnell M, Guarner J, Shieh W J, Malecki J M, Gerberding J L, Hughes J M et Perkins B A. (2001). Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first la cases reported in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 933 -944.

Jiang Y, Song X, Gong L, Li P, Dai C, Shao W. (2008). High poly (β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzy. microbial. tech.* 42: 167–172.

Référence Bibliographiques

Joffin J N, Leyral G. (2006). Microbiologie Technique,Tome 2 : documentation technique, collection biologie technique .Ed. Doin, CRDP Aquitaine.363p.

Johansen T, Carlson, C. R et Kolsto A.B. (1996). Variable numbers of rRNA operons in *Bacillus cereus* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 325 -328.

Joshi AA, Kanekar P, Kelkar A.S, Shouche YS, Vani AA, Borgave, SB, Sarnaik SS. (2008). Cultivable bacteria diversity of alkaline Lonar lake India. *Microbial Ecology*; 55:163–172.

Joung K. B & Côté J. C. (2001). A phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFLP-based ribotyping. *J. Appl. Microbiol.* 91: 279 -289.

Kalnins M., Oics I., Sevenkova L., Viesturs U. (1999). Environmentally degradable polymeric composite Materials. Congr, Tech univ.

Kendri S. (1999). Caractéristiques biochimiques de la biomasse "Saccharomyces cerevisiae " produite à partir des dattes « Variété Ghars ». Mémoire d'Ingénieur. Département d'agronomie, Batna ; 51 p.

Kenneth T. (2005). The Genus *Bacillus*. University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology.

Khalil K. E, Abd-El-Bari M. S, Hafiz N. E, Entsar Y. A. (2002). **Production, evaluation and utilization of date syrup concentrate (Debis).** *Egypt. J. Food Sci.* 30 N° 2, pp. 179-203.

Khal M. (1982). Les dattes dans l'alimentation animale: valeur nutritive et conditions d'utilisation dans la vallée du Draa. Mémoire de 3ème cycle. IAV Hassan II, Maroc

Kim, J.Y. (2003). Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnol Letters* 25 : 1445-1449

Koller E. (2005). Traitement des pollutions industrielles : Eau, Air, Déchets, Sols, Boues ; Dound. Paris.

Koller M, Rodriguez-Contreras A. (2015). Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Eng. Life Sci.* 2015, 00, 1–24. Review

Krueger C, Radetski C, Bendia, Oliveira I, Castro-Silva M, Rambo C, Antonio R, Lima A. (2012). Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electronic J Biotechnol* ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol15.

Kulprecha S, Boonruangthavorn A, Meksiriporn B, Thongchul N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (β -hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *J. Biosci. Bioeng.* 107: 240–245.

Lam C, Wang C. (2002). Plastique naturel. Biotech exp.

Lechner S, Mayr R, Francis K. P, Pruss B. M, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart G. S et Scherer S. (1998). *Bacillus weihenslephanensis* sp. nov. is anew psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Inl. 1. Syst. Bacleriol.* 48: 1373 1382.

Leclerc H, Gaillard J. L, Simonet M. (1995). Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Ed Doin . Lett 70: 305-310.

Lee S. (1996). high cell density cultivation of *pseudomonas oliovorans* for the production of poly(3-hydroxyalcanoate). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* Vol: 51-53.

Leyral G, Vierling E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques . Wolters Kluwer .

Liebergessel M, and Steinbuchel A. (1993). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:493–501.

Liu J W, Zhao Q et Wan C X. (2001). Research progresses on degradation mechanism *in vivo* and medical applications of polylactic acid. *Space Med Eng*, vol. 14, no. 4, p. 308-312.

Logan N, Berkeley W. (1984). Identification of *Bacillus* strain using API system. *J. Microbiol.* 130: 1871-1880

Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, De Vos P, Fritze D, Heyndrickx M, Kaampfer P, Salkinoja-Salonen MS, Seldin L, Rabinovitch L and Ventosa A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 59:2114-2121.

Logan N. A & Turnbull P. C. (1999). Manual of Clinical Microbiology (Murray, P.R., Ed.). American Society for Microbiology. Washington, De. pp: 357 -369.

Lopez-Corte A, Rodriguez-Fernandez O, Latisnere-Barragan H, Mejia-Ruiz HC, Gonzalez G, Lomeli-Ortega C. (2010). Characterization of polyhydroxyalkanoate and the phaC gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World J Microbiol Biotechnol.* 26:109–118.

Lopez-Cuellar MR, Alba-Flores J, Gracida-Rodriguez JN, Pérez-Guevara F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *Int. J. Biol. Macromol.* 48: 74–80.

Luengo JM, Garcia B, Sandoval A, Naharro G, Olivera R E. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 251–260.

Lundgren A., Pfister M., Merrick M. (1964). Structure of poly-beta-hydroxybutyrate acid granules. *J. Gen. Microbiol* 34: 441-446.

Macrae RM, Wilkinson JF. (1958). The influence of culture conditions on poly-β-hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium*. *Proceedings of the Royal Physical Society of Edinburgh*; 27:73-78.

Maia J. L, M. H. A, Santana et M. (2004): The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 21, no. 1, p. 1-12.

Marchal N, Bourdon J, Richard C. (1982). Les milieux de culture : Pour l'isolement et identification des bactéries. Ed doin Paris .P. 480.

Messar EM. (2010). Le Secteur Phoenicicole Algérien – Situation et Perspectives à l'Horizon .Proceedings du Séminaire Méditerranéen: Le Palmier Dattier dans l'Agriculture d'Oasis des Pays Méditerranéens. Options Méditerranéennes, N°28.

Misra AK, Thakur MS, Srinivas P, Karanth NG. (2000) Screening of polyhydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biotechnol Lett* 22:1217–1219

Mock, M et Fouet A. (2001). Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 647 -671.

Nagao T, Mitamura T, Wang X. H, Negoro S, Yomo T, Urabe I, Okada H. (1992). Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J Bacteriol* 174:5013–5020.

Neyra C, Atkinson L. A, Olubayi O, Sadasivan L, Zaurov D et Zappi E. (1996). Novel microbial technologies for the enhancement of plant growth and biocontrol of fungal diseases in crops. *Ca. Opl. Méd.* 31: 447 -456.

Ojumu TV, Yu I et Solomon B O. (2004): Mini review. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afr J Biotechnol*, vol. 3, no. 1, p. 18-24.

Oliveira FC, Marcos LD, Leda RC, Denise M G F. (2007). Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource. Technol.* 98: 633–638.

Omar S A, Rayes A, Eqaab , Voss et A Steinbüchel. (2001). Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain . *Biotechnol lett*, vol. 23, no. 14, p 1119-1123.

Orgavalor. (2010). Valorisation des déchets organiques région PACA. Vol. IJVs 7. France, pages: 66.

Ould el hadj M. D, Cheick M, Hamdi W, Sayah Z, & Bouaziz S. (2012). Etude comparative de la production d'éthanol brut à partir de trois variétés de dattes communes (Degla Beida, Tacherwit Et Hamraya) réparties dans les différentes classes de dattes (molle, demi-molle et sèche) de la cuvette de Ouargla. *Algerian journal of arid environment* 2(2), 78-87.

Ould El Hadj M D, Sebihi A. H, Siboukeur O. (2001). **Qualité hygiénique et caractéristiques physicochimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette d'Ouergla.** *Rev. Energ. Ren. : Production et valorisation – Biomasse*, pp. 87-92.

Panbangred W, Weeradechapon K, Udomvaraphant S, Fujiyama K, and Meevootisom V. (2000) High expression of the penicillin G acylase gene (pac) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own pac minus mutant. *J Appl Microbiol* 89: 152-157.

Patra G, Fouet A, Vaissaire J, Guesdon L. L et Mock M. (2002). Variation in rRNA operon number as revealed by ribotyping of *B. anthracis* strains. *Res. Microbiol.* 153: 139 -148.

Patel R M, Desai A J. (2003). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses; *Letters in Applied Microbiology*. Volume 25, 91–94.

Phanse N, Chincholikar A, Patel B, Rathore P, Vyas P, Patel M. (2011). Screening of PHA (poly hydroxyalkanoate) producing bacteria from diverse sources. *Int J Biosciences*; Vol. 1, No. 6, p. 27-32, 2011 ISSN: 2220-6655.

Phukon P, Saikia JP, Konwar BK. (2012). Bio-plastic (P-3HB-co-3HV) from *Bacillus circulans* (MTCC 8167) and its biodegradation. *Colloids and Surfaces B* 92. 30–34.

Poirier Y, C. Nawrath and C. Somerville. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol*, vol.13, p. 142-150.

Porwal S, Kumar T, Lal S, Rani A, Cheema S, Hemant J, Sharma R, Patel S, Kalia V. (2007). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentation process. *Bioresource. Techno.*99: 5444-5451.

Prescott L, Harley J, Klein D. (1995). Prescott, Harley, Klein - Microbiologie. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles.

Priest F. G. (1981). DNA homology in the genus *Bacillus*. In The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification. Edited by R. C. W. Berkeley & M. Goodfellow. Academic Press. London, PP 33-57.

Priest G. (1993). Biotechnology, biological fundamentals volume 1, second edition, 367-400.

Rabetafika H N, M Paquot et P Dubois. (2006). Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique. *Biotechnol Agron Soc Environ*, vol. 10, no. 3, p. 185-196.

Ramsay J A, Berger E, Voyer R, Chavarie C, Ramsay B A. (1994). Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol Tech* ; 8:589-594.

Raux E, Lanois A, Warren M. J, Rambach A and Thermes C. (1998). Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* cobI operon. *Biochem J* 335: 159-166.

Regal. (1995). Répertoire général des aliments.

Rehm B.H.A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications applied and industrial microbiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 578–592.

Rémésy C. (2008). **Sucres simples purifiés versus sucres des fruits, ont-ils les mêmes effets métaboliques.** *Journal of Phytothérapie.* Vol. 6, pp. 91–95.

Rodier J. (1992). Analyse de l'eau naturelle. Eaux résiduaires. Eau de mer. Tome 1. Ed. Dunod, 7^{ème} Ed., Paris : 23 – 47.

Salazar A, Yepes M, Correa G, Mora A. (2014). Polyhydroxyalkanoate production from unexplored sugar substrates. *Univ Nacional Colombia. DYNA* 81 (185), pp. 73-77 Medellín. ISSN 0012-7353

Salgaonkar BB, Mani K, Braganca JM. (2013). Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic saltpan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. *J. Appl. Microbiol.* 114: 1347-1356.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Sato S, Christopher T, Hideki N, Doi Y, Tsuge T (2006): Poly(R-3-Hydroxybutyrate formation in *Escherichia coli* from glucose through an Enoyl- COA Hydratase-Mediated pathway. *J. Bioscie . Bioeng.* Vol, 130, No. 1, 38-44.

Saxena A, Zhang R. W, Bollag J.M. (1987). Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. *Appl Environ Microbiol.* 53:390-396.

Schallmey M, Singh A et Ward O. P. (2004). Developments In the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17.

Schlegel HG, Lafferty R and Krauss I. (1970). Bacterial mutants of *Hydrogenomonas* lacking poly- β -hydroxybutyrate acid, *Experienta* 26:283-294.

Référence Bibliographiques

Seabra JEA. (2008). Technology for integrated use of biomass (sugar cane). Facul de Engenharia Mecânica, (Thèse de Doctorat).

Shamala TR, Chandrashekar A, Vijayendra SVN, Kshama L. (2003). Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *J. Appl. Microbiol.* 94:369–374.

Singh G, Kumari A, Mittal A, Yadav A, Aggarwal NK. (2013). Poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water. *BioMed. Res. Inte.* doi:10.1155/2013/952641.

Sneath P. H. A, Mair, N. S, Sharpe, M. E et Holt, J. G. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. Baltimore, Williams & Wilkins. pp. 1105 -1139.

Sprumont J, Delahay S. (2010). La filière canne à sucre en Haïti Informations techniques – Propositions d'amélioration- documentation. B596.

Steinbüchel A. (1991): Polyhydroxyalkanoic acids. In: Biomaterials: novel materials from biological sources. New York: Stockton, p. 124-213.

Steinbüchel A. (2001). Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of poly-hydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol Bioscience* 1, 1–24

Steinbüchel A, Valentin H E. (1995): Discovery of polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Rev*; 1283: 219-28.

Suga K, Shiba Y, Sorai T, Shioya S, Ishimura F. (1990). Reaction kinetics and mechanism of immobilized penicillin acylase from *Bacillus megaterium*. *Ann N Y Acad Sci* 613:808–815.

Tan G.Y, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad I M N, Li .Y, Zhao L, Mo Y and Wang J.Y .(2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA):A Review . *Polymers* **2014**, 6, 706-754; doi:10.3390/polym6030706. ISSN **2073-4360**

Tanishoa S et Y Ishiwataa . (1994) . Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes* ; *International Journal of Hydrogen Energy* ; Volume 19, 807-812.

Thellen C, Coyne M, Froio D, Auerbach M, Wirsén C, Ratto J. (2008). A processing, characterization and marine biodegradation study of melt-extruded polyhydroxyalkanoate (PHA) films. *Journal of Polymers and the Environment*; 16:1-11.

Tian J, Anthony J, Sinskey and Joanne S. (2005): Kinetic studie of polyhydroxybutyrate granules formation in *Wauteria eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *J. bact.* P 3814- 3824.

Tokiwa Y, Ugwu CU. (2007). Biotechnological production of (R)-3- hydroxybutyric acid monomer. *J Biotechnol* 132: 264–272.

Touzi A. (1997). Valorisation des produits et sous-produits de la datte par les procédés biotechnologiques. Rapport de synthèse de l'atelier "Technologie et qualité de la datte", *Trends Biotechnol.*, 14 : 431-438.

USCOTA. (1993). Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper. Chapter 2- Technical Overview of Biopolymer Field. *OTA-BP-E-f02* (Washington, DC: U.S. *Government Printing Office*).

Vary P. S. (1994) Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* 140: 1001-1013.

Verlenden RAJ, Hill D.J, Kenward MA, Williams C. D and Radecka. (2007). Bactérial synthesis of biodegradable polyhydroxyalcoates. *J of Applied Microbiol* ISSN 1364-5072.

Von Tersch M.A and Robbins H. L. (1990). Efficient cloning in *Bacillus megaterium*: comparison to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cloning hosts. *FEMS Microbiol* .

Wallen LL, Rohwedder WK. (1974). Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science and Technology*. 8:576-579.

William JP. (1992) Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugar and complex nitrogen sources. *Appl Microbiol Biotechnol*.38:117-121.

Wisotzkey J. D, Jurtshuk P, Jr, Fox G. E, Deinhard G. & Poralla K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius* , *Bacillus acidoterrestris* , and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42 , 263–269

Xie WP, Chen GQ. (2007). Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4, harboring genes *phaPCJ*. *J.Biotech.Engine*.38 :484-489.

Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. (2005). Determination of polyhydroxybutyrate production by some *Bacillus* spp. *J. Microb & Biotech*. 21: 565-566.

Yu P H, Kinho L, Yun-chung L, Hugh L, Hong C et WaiHung L O. (2001). Production of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus* Species Isolated from Municipal Activate Sludge . *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 93, no. 1-3, p 515-525.

Zergat F. (1996). Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne, Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Zhang H, Obias V, Gonyer, Dennis D,(1994): production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilising rocombinant *Echerichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microb* .p. 1198-1205.

Zribi-Maaloul E, Trabelsi I, Elleuch L, Chouayekh H, Ben Salah R. (2013). Purification and characterization of two polyhydroxyalcanoates from *Bacillus cereus*. *Int. J. Biol Macromol*. 61: 828221.

Annexe

Annexe 1

Coloration avec le noir soudan

Le criblage de la présence des PHAs dans les cellules bactériennes se fait par coloration avec le noir soudan B.

Le noir Soudan B est un colorant synthétique provenant des hydrocarbures extraits du goudron de houille et dérivant du benzène.

Il fait partie de la catégorie des tétrazoïques parce qu'ils possèdent deux chromophores (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte) de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et diversement substitués.

Nous trouvons dans cette catégorie des colorants essentiels des matières grasses : le **Rouge Soudan**, le **noir Soudan B**, les **Soudan II, III & IV**, l'**écarlate R**.

Tous ces colorants sont insolubles dans l'eau, mais très solubles dans l'éther, l'éthanol, le méthanol et les corps gras. C'est un colorant acide, c'est-à-dire qu'il a tendance à se fixer préférentiellement sur les structures basiques. Il est soluble dans l'eau à raison de 25 g/litre.

Sa formule brute est :



Annexe

Annexe 2

Préparation des milieux de cultures utilisés

1-Gélose nutritive

Peptone.....	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH =6,8-7,4	

2-Gélose viande-foie

Extrait de viande.....	10 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	05 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,6	

3-Milieu Mannitol-Mobilité

Peptone	20g
Nitrate de potassium	01g
Mannitol	02g
Rouge de phénol	40 mg
Agar	04 g
Eau distillée	1000ml
pH = 8,1	

Annexe

4-Gélose à Amidon

Gélose nutritive.....	100ml
Amidon.....	10g

5-Gélose au sang frais

Milieu de base : Gélose Columbia g/l

Polypeptone	17
Peptone pancréatique de cœur	03
Amidon de maïs	01
Chlorure de sodium	05
Extrait de levure.....	03
Agar	13,5

A ce milieu de base, il faut ajouter 5% de sang frais de mouton ou de cheval, défibriné et stérile.

5-Milieus synthétiques pour la production des PHAs

- **Milieu MS1** : Le premier milieu synthétique dont la composition selon **Chaijamrus et al., (2008)** est la suivante :

20 g/l de glucose, **0.5 g/L** NH₄Cl, **2.3 g/L** KH₂PO₄, **2.3 g/L** Na₂HPO₄, **0.5 g/L** MgSO₄.7H₂O, **0.5 g/L** NaHCO₃, **0.01 g/L** CaCl₂, **0.5 g/L** citrate de fer et **5ml** de trace éléments.

- **La solution de traces éléments** est composé en g/L de : **0.01 g/L** ZnSO₄.7H₂O, **0.003 g/L** MnCl₂.4H₂O, **0.003 g/L** H₃BO₄, **0.02 g/L** CoCl₂.7H₂O, **0.001 g/L** CuCl₂. 2H₂O, **0.002 g/L** NiCl₂.6H₂O et **0.003 g/L** NaMO₄.2 H₂O, pH 7.

Ajuster à pH 7, puis stériliser à l'autoclave les sels minéraux, le MgSO₄, le NH₄Cl, traces éléments, substrat azoté et les substrats carbonés séparément à 121°C pendant 10 mn.

- **Milieu MS2** : Deuxième milieu synthétique : selon **Kulpreecha et al.,(2009)** est constitué de :

Annexe

20 g/l de glucose, **2,0 g/l** KH_2PO_4 , **0,6 g/l** Na_2HPO_4 , **1,0 g/l**, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, **0,1 g/l** d'extrait de levure et **1 ml** d'oligo-élément (1,3 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20,0 g/l de CaCl_2 , 0,2 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 0,6 g/l H_3BO_3).

La source de carbone et le $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ont été stérilisées séparément à 121°C pendant 10 min ensuite ajouter aseptiquement dans le flacon contenant les autres composants à la température ambiante. Le pH du milieu de culture final a été ajusté à 7,0 avant l'inoculation bactérienne.

6- Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

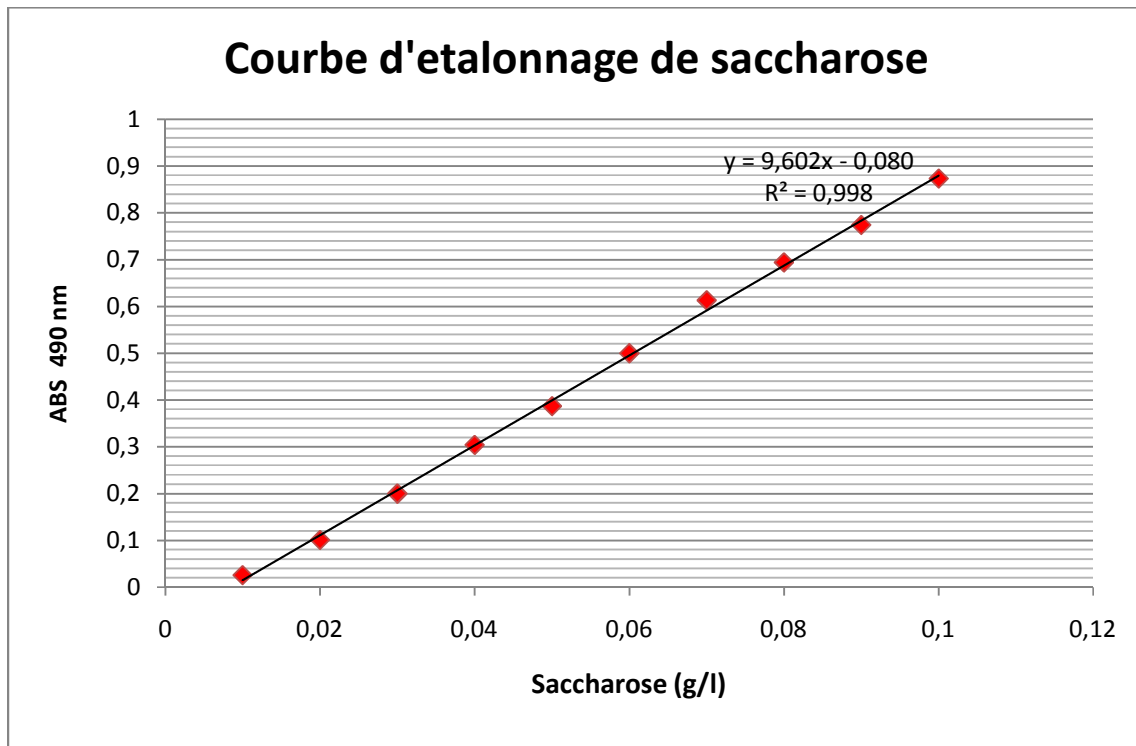
Après avoir flambé la coquille avec de l'alcool, récupérer le jaune d'œuf et additionner 1/2 le volume en eau distillée stérile, mélangé rigoureusement puis ajouter 10ml l'émulsion dans de 100 ml de la gélose nutritif.

Annexe

Annexe 3

Tableau de lecture de galerie API 20E

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- βD-galactopyranoside	β-galactosidase (OrthoNitroPhényl- βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
ODC	L-ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
CIT	Trisodium citate	Utilisation du CITrate	Vert pale-jaune	Bleu-vert-bleu
H₂S	Sodium thioisulfate	Production d' H ₂ S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	TryptophaneDésAminase	Jaune	TDA immédiat Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	Incolore-vert pale –jaune	JAMES immédiat Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoine	Incolore – rose pale	VP1+VP2/10min Rose -rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation -oxydation (GLUcose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -oxydation (MANnitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	Fermentation -oxydation (INOsitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation -oxydation (SORbitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation -oxydation (RHAmmose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SAC	D-saccharose	Fermentation -oxydation (SACcharose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MEL	D-melibiose	Fermentation -oxydation (MELibiose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
AMY	Amygdaline	Fermentation -oxydation (AMYgdaline)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
ARA	L-arabinose	Fermentation -oxydation (ARAbinose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
OX	Voir notice du test oxydase	Cytochrome oxydase	Voir notice du test oxydase	



Courbe d'étalonnage pour le dosage du Saccharose

The Raman spectrum of crystalline PHB (Ciobota et al., 2010).

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Assignements
2,932	C-H
1735	C=O stretching vibration
1,450	CH ₂ scissoring deformation
1,402	CH ₃ Symmetric deformation
1365	CH ₃ Symmetric deformation
1342	CH Déformation
1,314	CH ₃ / CH ₂ deformation vibrations
1048	C-O-C stretching vibration
840	CC stretching vibration

Annexe 5

**Méthode enzymatique pour le dosage de glucose
(Arnaut de Toledo et al., 2012)**

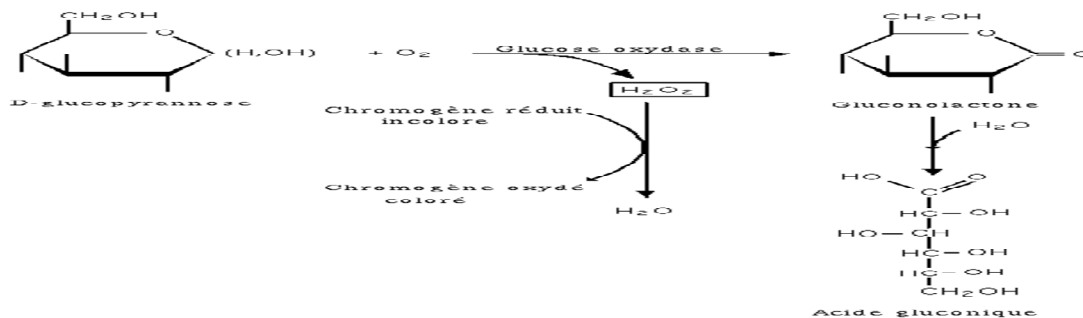
L'enzyme glucose oxydase est utilisé pour la determination quantitative et enzymatique du glucose dans les aliments et d'autres matériaux. le Test d'enzyme glucose oxyade est largement utilisé parce qu'il est moins cher, stable et par sa spécificité bien établi pour le glucose.

Dans cette réaction le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène par l'enzyme glucose oxydase.

Le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'ortho-dianisidine en présence d'enzyme peroxydase pour formé un produit coloré.

On mesure alors l'absorbance de la solution après réaction colorimétrique à la longueur d'onde 540nm ; celle-ci est proportionnelle à la concentration de glucose présente dans la solution testée.

	Blanc	Etalon	Essai
Réactif glucose	2ml	2ml	2ml
Eau déminéralisé	2µl		
Prélèvement			2µl
Solution		2µl	
	Incuber 10mn à 37°C, Lire à 540		



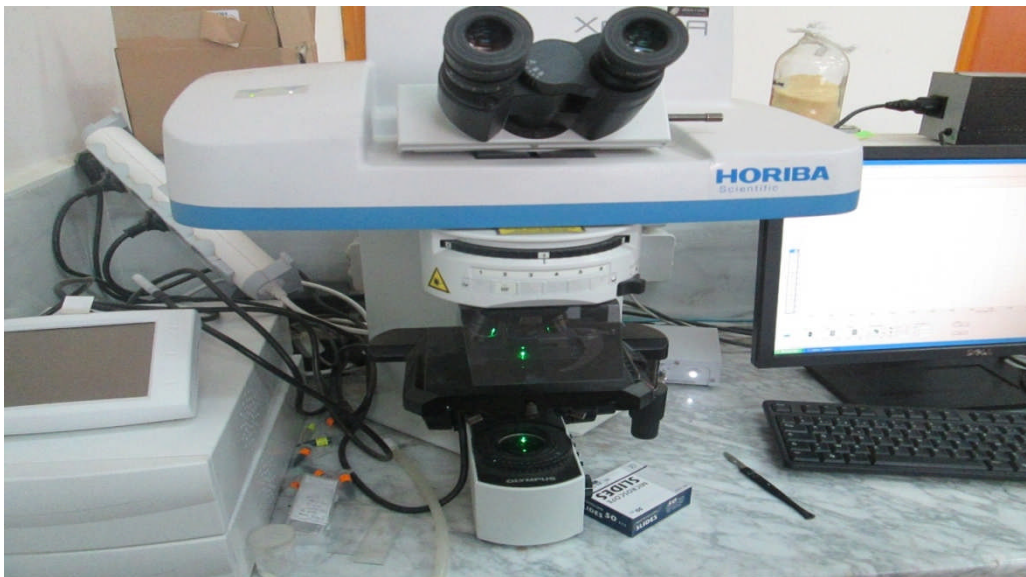
Réaction de la méthode enzymatique de la glucose oxydase.

Annexe

Annexe 6



PHA sous forme de poudre blanche



Spectromètre Raman HR800 HORIBA (Jobin Yvon Microspectrometer)

Production scientifique

Ce travail de thèse a donné lieu à un 2 article dans une revue internationale et nationale et à différentes communications (orales ou par affiches).

- *Publication dans une revue Internationale*

Medjeber N, Abbouni B, Menasria T, Beddal A, cherif N. Screening and production of polyhydroxyalcanoates by *Bacillus megaterium* using beet molasses as carbon sources. *Scholar research library*. Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (6):102-109.

- *Publication dans une revue Nationale*

Medjeber N, Abbouni B. Production de biopolymères de type polyhydroxyalcanoates par *Bacillus megaterium*. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*. 2010, 20(2), 133-141.

- *Présentations orales lors de conférences internationales*

Medjeber N, Abbouni B. Isolement et production microbienne du bioplastique (Polyhydroxyalcanoate). 1^{er} séminaire international sur chimie verte et développement durable. CVDD 2009. Mostaganem .Algérie.

Medjeber N, Abbouni B. Production Bactérienne de bioplastique biodégradable. 2eme colloque International en Biotechnologie 2010. Oran. Algérie

- *Communication par affiches*

Medjeber N, Abbouni B. Biomatériaux polymères biodégradable. Congrès international sur les matériaux et l'environnement CIEM 2010. Alger. Algérie

Annexe

Medjeber N, Abbouni B. Production de bioplastique de type polyhydroxyalcanoates par *Bacillus megaterium*. 11^{èmes} Journées Scientifiques sur les Sciences de la Nature et de la Vie **2014**. SBA Algérie

Medjeber N, Abbouni B. Optimisation de la production de bioplastique (polyhydroxyalcanoate) chez *bacillus megaterium* II^{ème} congrès international de biotechnologie et valorisation des bioressources (BVBR) **2014**. Tabarka Tunis.



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (6):102-109
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Screening and production of polyhydroxyalcanoates by *Bacillus megaterium* by the using cane and beet molasses as carbon sources

N. Medjeber¹, B. Abbouni^{2*}, T. Menasria³, A. Beddal⁴ and N. Cherif⁵

Laboratory for Molecular Microbiology Proteomics and Health, ¹Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Tiaret¹, University of Djillali Liabès of Sidi Bel Abbes², University of Tebessa³, University of Tissemsilet⁴; University of Mascara⁵, Algeria

ABSTRACT

Polyhydroxyalcanoates (PHAs) have been recognized as a desirable alternative material to the non-biodegradable petrochemical produced polymers. The present study was focused on the isolation of the polyhydroxyalcanoates accumulating bacteria belonging to the genus *Bacillus* from different grass soil samples in Western Algeria and the optimization of several parameters such as cultural conditions and the nutritional requirements by the use of sugarcane and beet molasses as carbon source, implicated in the increase of polyhydroxyalcanoates production. Fifty-two *Bacillus* isolated strains were screened for intracellular lipids accumulation by staining with Sudan Black B. The obtained results showed that 8 isolates of the genus *Bacillus* were positively stained. Based on the morphological and physiological properties and sequence of its 16S rDNA, the selected most accumulating polyhydroxyalcanoates strain L9 indicated was identified as *Bacillus megaterium*. Furthermore, *Bacillus megaterium* was explored for a potential to synthesize polyhydroxyalcanoates by the using of different Carbon and nitrogen sources. The presence of biopolymer granule in cells of *Bacillus megaterium* strain L9 indicated that the accumulation was depended on the ratio of carbon and nitrogen sources in the used culture medium. The highest polyhydroxyalcanoates accumulation (0.25 g.L⁻¹) was obtained by the using glucose and NH₄Cl. Furthermore, regarding the utilization of beet molasses as sole carbon source in the culture medium at concentration of 3%, has induced considerably the polyhydroxyalcanoates yield accumulation after 48h of growth (41% w/w), whereas the highest biomass (0,6 g.L⁻¹) was obtained at concentration of 4% beet molasses supplemented with 0,05% ammonium chloride. The present study indicated the benefits of conversion of available agro-industrial wastes materials into a valuable product.

Key words: Polyhydroxyalcanoates, *Bacillus megaterium*, beet molasses.

INTRODUCTION

The extensive usage of petrochemical plastics due to their versatile properties especially durability is causing severe problem in waste management affecting the aesthetic quality of cities, water bodies and natural areas [1].

The Polyhydroxyalkanoates have generated significant commercial interest due to their application as biodegradable and biocompatible thermoplastics that can be produced using renewable resources [2-4]. The Polyhydroxyalkanoates are a class of biopolymers formed as naturally occurring storage polyesters by wide diversity of bacteria [5, 6], as carbon and energy reserve material, when a nutritional factor such is limited in the presence of an excess carbon source [7, 8].

These polymers are deposited as spherical intracellular inclusions with an amorphous hydrophobic PHA core which is mainly surrounded by proteins involved in PHA metabolism [9]. The most extensively studied and frequently

found member of PHAs, the homopolymer Polyhydroxybutyrates (PHB) with properties similar to polypropylene [10].

The cost of the carbon source for bacterial growth of the producing strain and the PHA purification methods are factors that mostly influence the price of these polyesters [11]. The use of cheap carbon sources, specially generated from industrial or agricultural by-products can provide a way to reduce the price [11, 12]. For this reason, the efforts have been deployed for the exploitation of the low cost and cheap alternative substrates; fermentable raw and carbon sources as fermentative substrates for PHA production, from sucrose [37], soy molasses [13, 14] and corn steep liquor [15]. As well, an additional ecological advantage as compared to thermoplastics produced from fossil carbon source [16].

The large scale production of PHAs by bacteria has become an increasing interest, with the use of biodegradable polymers to replace some petrochemical based polymers, will help the reduction of the highly visible pollution of land and sea environments by plastic product.

Products made from PHAs are environmentally friendly since they biodegrade to CO₂ and H₂O. PHAs have been identified in more than 20 genera of bacteria, including *Azotobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia* and *Rhodospirillum* [33]. *Bacillus* genera were wide spread among the bacteria types in soil, *Bacillus megaterium* was grown in minimal medium without any added growth factors. The majority are mesophiles, with temperature optima between 30 and 45°C [34]. Indeed, the ability of *B. megaterium* to accumulate PHA in the cells could reach up to 32 % of the cell dry weight [11].

The main objective of this study was the isolation and the screening PHAs producing *Bacillus* strains from soil sample in Western Algeria. For the reduction of the cost production of PHAs and the decrease environmental pollution beet a local isolate *Bacillus megaterium*, the cane molasses as energy source were used.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and of PHA producing *Bacillus*

Different grassland soil samples were collected from eight different sites in western Algeria. Primary isolation of *Bacillus* was obtained by serial dilution technique by the using nutrient agar medium after heating samples at 80°C for 10 min. The plates were incubated for 48 h and analyzed for the total viable bacterial load. The colonies were picked and surface-streaked several times until purification.

All isolates were qualitatively screened for PHA production by using sudan black B dye [17] after cultivation on production medium containing (g L⁻¹) glucose, 20 ; NH₄Cl, 0,5; KH₂PO₄, 2,3; Na₂HPO₄, 2,3; MgSO₄.7H₂O, 0,5; NaHCO₃, 0,5; CaCl₂, 0,01; ferric citrate 0,5 and 5ml trace elements solution. The trace element solution contains (g L⁻¹) ZnSO₄.7H₂O, 0,01; MnCl₂.4H₂O, 0,003 ; H₃BO₄, 0,003 ; CoCl₂.7H₂O, 0, 02 ; CuCl₂. 2H₂O, 0,001; NiCl₂.6H₂O, 0,002 and NaMoO₄. 2 H₂O, 0,003. The pH of media was adjusted to 7.5 using NaOH solution or HCl. Pure isolates containing lipid inclusion were characterized on basis of their microscopic, morphological and biochemical characters using standard methods.

Genotypic characterization of the selected strain

Genomic DNA L9 strain was extracted by using the protocol described in Sambrook [18]. The 16S rRNA gene was amplified by using isolated chromosomal DNA as the template. The primers used for the amplification were S-D-Bact-0011-a-S-17 5'-GTTTGATC CTGGCTCAG-3' as forward and S-*-Univ-1392-b- A-15 5'-ACGGGCGGTGTGTTTC-3' as reverse primer. All PCR reactions were performed in a reaction mixture of 100 µl total volume using 1 µg template DNA. The reaction mixture was heated at 94°C for 3 min followed by 40 cycles of 94 °C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min. The final elongation step was carried out at 72 °C for 5 min. PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1.2 % agarose. The amplified DNA fragments were visualized by UV illumination and the images were captured by using a Hero LAB image analyzer (Wiesloch, Germany).

Polyhydroxyalcanoates production and optimization

To increase the efficiency of the production of PHA by *Bacillus megaterium* L9, the effect of different carbon and nitrogen sources on biopolymer production was studied. The PHA production was carried out in synthetic medium by using 2% : glucose, sucrose, beet and cane molasses as carbon source one at a time and various nitrogen sources (NH₄Cl, meat extract, yeast extract, Tryptone and asparagine). The batch culture was carried out in 500 mL shake flasks containing 100 mL of culture medium, incubated at 30°C for 48h on a rotary shaker at 130 rpm.

In order to compare the yield of biopolyester production, cultures were carried out in nutrient broth by the using three *Bacillus* sp. strains.

Determination of bacterial growth and dry weight

Cell growth was monitored by turbidity at 580 nm. For determination of biomass content, bacterial cells were collected after culture by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 10 °C. The pellets were washed twice with distilled water and dried at 100 °C. Then the total bacterial dry weight of the cells was determined.

Extraction and estimation of PHA

The intracellular PHA was extracted by using hot chloroform and precipitated in methanol. Initially, dry cells were mixed with chloroform at 50°C. The suspension was then carefully filtered through the filter paper Whatman N°1 and the viscous PHA solution was precipitated with 10 volumes of 95% ethanol. The mixture was centrifuge at 10.000 rpm for 20mn at 10 °C, washed with ethanol and the residual solvent was eliminated by evaporation [19, 20]. The PHA content in the biomass was determined gravimetrically. Molecular weight was estimated by measuring the intrinsic viscosity of different concentrations of PHA dissolved in chloroform at 30°C by Ubbelohde viscosimeter [21].

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of bacteria accumulating PHA

The results of the present study revealed the presence of various microorganisms in all soil samples collected in western Algeria. 52 different microbial species of Gram-positive *bacilli* sporulating bacterial were isolated from the surveyed soil and were evaluated to select the PHA producer strains. Based on the intensity of the Sudan Black B staining observed, strains were classified as potential PHA producers, moderate and non-producers. The PHA non-producing strains were noted with a light color (Figure 1).

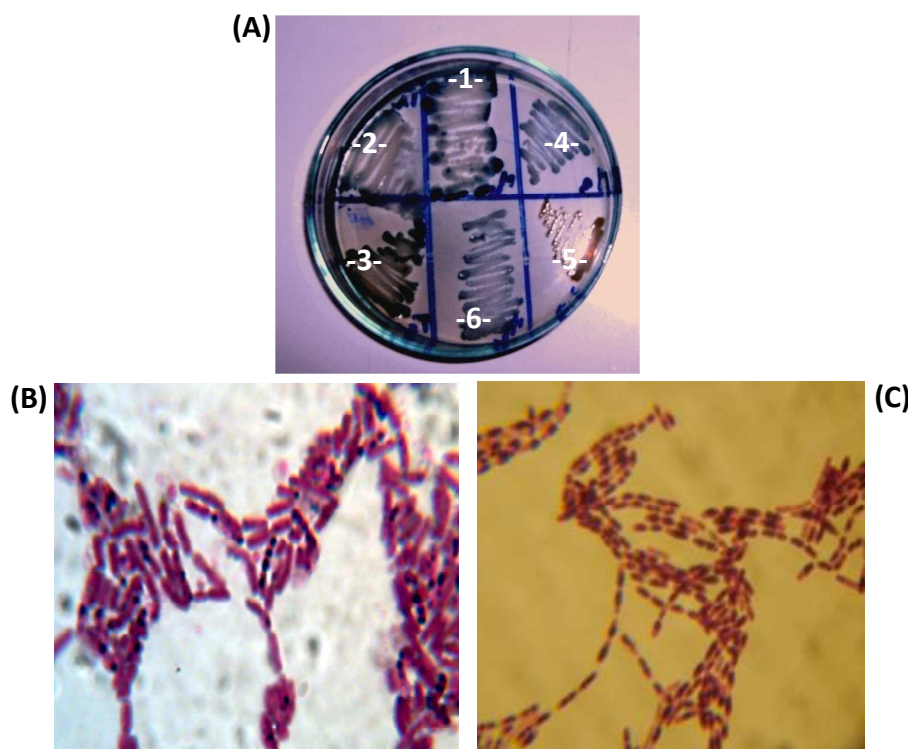


Figure 1. Illustration of PHA production by the using Sudan black B stain. (A) Stained colonies: (1, 2 and 3) potential producer; (4 and 5) moderate producers; (6) non producers, (B) PHAs granules within *Bacillus megaterium* strain L9 and *B. cereus* strain M1(C). Observed under optic light '100X'

From the 52 bacteria isolated from soils, 37 isolates (RA=71.15%) showed PHA granules (black section) and only eight strains showed significant lipophilic inclusions over the other strains. 9 testing positive isolates were chosen for further characterization. Based on the macroscopic, microscopic and biochemical characters, the isolates were identified as *Bacillus* spp., designated as *B. cereus* strains T1, F2 and M1, *B. subtilis* F6 and *B. megaterium* strains M2, L8, L9, PC7 and PP4, respectively (Table 1).

Table 1: Morphological and biochemical characterization of PHA producing bacteria

Characteristics	T ₁	F ₂	F ₆	M ₁	M ₂	L ₈	L ₉	PC ₇	PP ₄
Anaerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Shape	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sporulation	ST	ST	C	C	ST	C	ST	ST	ST
Glucose	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Gas production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	+	-	+	-	-
ADH	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase activity	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Growth in (w/v) NaCl 7%	+/-	-	+	-	-	+	+	+	-
10%	-	-	+	-	+	+	+	+	-
α -Hemolysis	α	α	-	α	-	-	-	-	-
PHA production	+	++	+/-	+	++	+++	+	+	+
Stained colony	+	+	+/-	+	++	+++	+	+	+
Identification	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>

+ Growth or positive reaction of the test strain, - no growth or negative reaction, ST: sub-terminal, C: central. ODC: Ornithine decarboxylase, LDC: Lysine decarboxylase, ADH: Arginine dihydrolase, TDA: Tryptophan desaminase.

Recent studies reported by Yilmaz and Porwala [22, 23], showed that *B. megaterium*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* can accumulate PHAs. Such *Bacillus* species are widespread in the soil, and have the potential to transform carbon substrates sources of lipid energy reserves.

In this study, *Bacillus megaterium* strain L9 was selected as the potential PHA producer, the choice is based on their ability to retain Sudan black manifested by the increase in volume in production medium after 24-48h of incubation. Tian has presented the formation of PHB granules with transmission electron microscopy in *Wautersia eutropha* H16 [24], they reported that a very high number of lipid vesicles was accompanied with the increase in cell size after 48 hours of incubation.

PHA Production and optimization studies

In order to explore, the effect of different carbon sources on the PHA production by *Bacillus megaterium*, starch, glucose, sucrose, glycerol, beet and sugarcane molasses were added at 2% to the production medium. The PHA amount and bacterial growth rate were determined after 48h incubation time. Furthermore, the optimization studies were carried out in batch fermentation,

The obtained results showed that the highest PHA production was observed when bacteria were grown on substrates containing simultaneously excess of carbon and limiting contribution of other nutrients such as ammonium, sulphate, phosphate, iron and magnesium.

As shown in Figure 2 the best carbon source for PHAs production by *Bacillus megaterium* was Glucose (50% per mg cell dry matter), followed by beet and sugarcane molasses (28% and 30% per mg cell dry matter respectively). On the other hand the best growth rate 0,815 g/l was achieved using starch. Similarly, Borah [26] have reported that the maximum PHA yield production (39.9% of dry cell weight) by *B. megaterium* was obtained after growing in the presence of glucose as sole carbon source. An earlier study described by Gouda [15] on the PHA production by *Bacillus megaterium*, cultivated on a minimal culture medium and supplemented with various carbon sources showed that glucose and cane molasses yielded 40.8 % and 39.9%, respectively compared to dry cell weight. The

described study by Wu [27] reported that *Bacillus sp.* JMa5 accumulated 25%-35% of cell dry weight PHB in the presence of sucrose [28]. Many researchers have explored various available agro-industrial wastes as carbon sources for PHA production by *Bacillus* species, such as soy molasses, date syrup, sugarcane molasses, corn steep liquor and dairy waste [13, 30, 31].

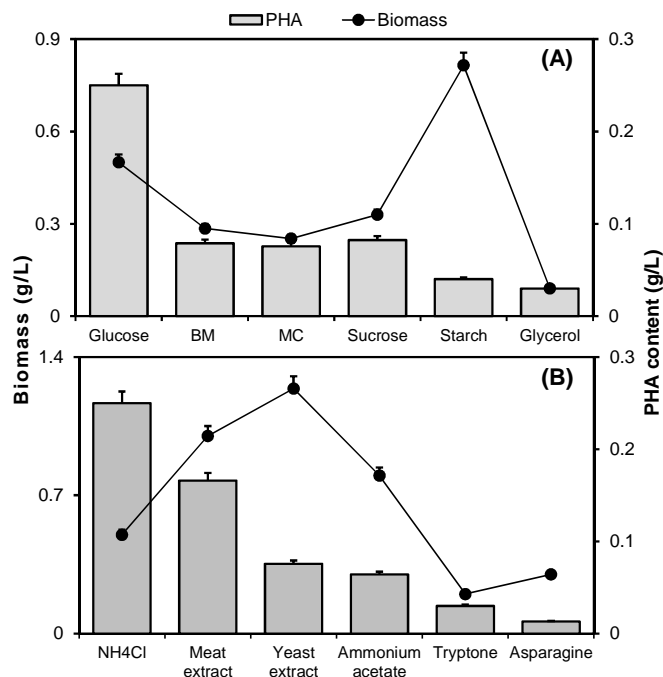


Figure 2 : Effect of different carbon (A) and nitrogen sources (B) on dry weight and PHA production by *B. megaterium* L9 . (BM: beet molasses, MC: cane molasses)

Furthermore, a variety of different nitrogen sources were added (on equal nitrogen basis using 0.05% ammonium chloride as control) to the medium culture in the presence of 3% beet molasses and the amount of PHA was determined after 48 h at 30°C and 130 rpm (Figure 2). The obtained results indicated that ammonium chloride produced the highest amount of PHA (41% of cell dry matter) followed by meat extract and yeast extract. The use of tryptone, asparagine or ammonium acetate decreased considerably the production of PHA (Figure 3). Gouda [15] has investigated the effects of different nitrogen and carbon sources on PHA production by *B. megaterium*, and reported different growth rates and PHA production reached a maximum level in the culture medium containing ammonium chloride (40.10% of cell dry matter) as nitrogen source. Moreover, other study showed that highest PHA production was observed in the culture medium in the presence of protease peptone as nitrogen source [33]. Similarly, Valappil and their co-workers [35] has reported that the produced PHA by *Bacillus cereus* SPV increased rapidly during the stationary growth phase and reached a maximum concentration of 38% of dry cell weight at 72h of growth in culture medium in the presence of glucose as a carbon source supplemented with traces of yeast extract. Adwitiya and their co-workers [36] showed that the highest level of PHB production by *B. thuringiensis* IAM12077 (43.33%) was obtained in the culture medium containing glucose: NaNO₃ combination in the ratio of 4:1.

To examine the effect of molasses level on the production of PHA and on the growth of *B. megaterium* L9, the production culture medium was supplemented with different concentration of beet molasses (ranging from 1-4%). The highest level was observed by the using of 3% of beet molasses (41% w/w), whereas the highest bacterial growth rate (0.6 g/l) was observed in the presence of 4% (w/w) of beet molasses, after incubation time of 48 h (Figure 3).

Chaijamrus and their co-workers [11] showed that PHB production yielded 43% by *B. megaterium* ATCC 6748, cultivated in the synthetic culture medium containing 4% of cane molasses. Further, Kulprecha and their co-workers [32] has reported that used cane molasses in the culture medium for PHA production in fed-batch cultivation, was found as excellent substrates for *Bacillus megaterium* growth with highest attained cell mass (72.7 g/l dry weight) PHB production of 42% weight/ weight. Whereas, Omar and their co-workers [30] reported that the use of a synthetic culture medium supplemented with 5% beet molasses yielded 50% of PHB production, with a cell dry mass concentration about 3 g L⁻¹. The use of beet or cane molasses as a growth factor maximized the production of PHA and showed some potential as a low-cost ingredient for industrial production. Since molasses contains trace

elements and vitamins such as thiamine, riboflavin, pyridoxine and niacinamide it can be used as a source of growth factors [15].

The obtained results showed that the yielded PHAs is not related to the increasing growth. Generally members of the genus *Bacillus* are known to accumulate PHA content ranging from 6, 53 to 48,2% [33, 37, 28]. It is known that the amounts of the produced PHA by microorganisms can have different compositions and structures depending on the type of microorganisms used for their production, as well as the composition and condition of the culture medium [7].

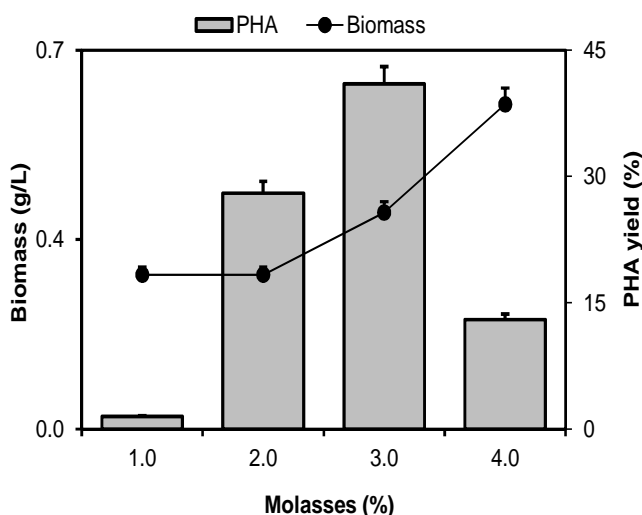


Figure 3: Effect of different levels of beet molasses on dry weight and PHA production by *B. megaterium* L9

Kinetic and molecular weight of the produced PHA by *B. megaterium* L9

The study of the kinetics of growth and PHA production by *B. megaterium* L9 in the production medium in the presence of 3% beet molasses (Figure 4), showed a feeble production rate in the early hours of growth. The stationary growth phase was reached after 23h fermentation and the production of polyester increased during the stationary phase up to 48h (0.4 g/L, 41% of dry weight). Subsequently, the production of PHA was reduced considerably (0.216 g/L) after 72h of incubation time. This may explain that the remaining bacterial cells use the PHA as an energy source during the process of sporulation [28]. Spores were produced during the stationary growth phase of *B. megaterium* L9, cultivated at time when PHA was being consumed.

The reduction of polyester after 72 h incubation time, may also be due to lack of micronutrients as well as an increase in metabolites that might have negative effect on the PHA production [29]. Specific growth rate up to 0,2 h⁻¹ was observed in the culture medium in the presence of beet molasses as a sole source of carbon and NH₄Cl as nitrogen source.

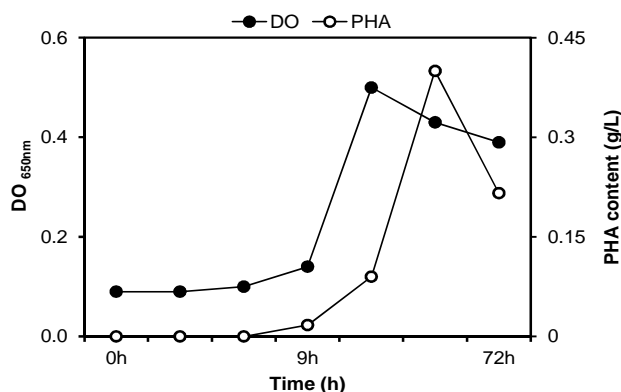


Figure 4 : Growth curve and PHA production by *B. megaterium* L9 by the using beet molasses as carbon source in the production medium

The comparison of the yielded PHA production and the study of the growth in the nutrient broth of *B. megaterium* L9, *B. cereus* F2 and *B. subtilis* F6 has been achieved (Figure 5). The obtained results showed that the polyester yielded by *B. megaterium* decreased to 9.5% compared to 41% of produced in the synthetic culture medium

containing 3% beet molasses. Furthermore, the feeble amount of PHA production produced by *B. cereus* F2 (2.5%), and the almost negligible by *B. subtilis* (0.5% compared to dry cell weight 4.69 g/L). The presence of the peptone and meat extract in the nutrient broth composition inhibited the production of polyester. The yielded Polyhydroxyalcanoates depends greatly on the composition of the used culture medium [38]. The molecular weight of the polymer produced by *B. megaterium* strain L9 was determined according to an Ubbelohde viscometer. In this study, PHA polymers were extracted by blending cells with chloroform with high-speed homogenizer for 10 min. As a result, the viscometric molecular weight of the bioplastic in the synthetic culture medium by the using 3% of beet molasses was found to be approximately 10^5 . Chen and their co-workers [39] have reported that substrates, culture conditions and method of PHA extraction might affect the molecular weight of the polymer [40, 41].

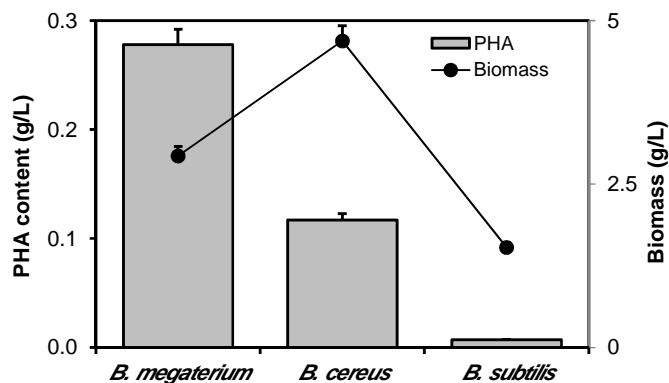


Figure 5: Dry cell weight and PHA production in the nutrient broth

CONCLUSION

The implementation of new production processes of biopolymers has been now become a major necessity. In fact, the production of polyesters such as PHAs by bacterial fermentation represents a very interesting capital axis, view their resemblance to petrochemical-based plastic materials (polyethylene and polypropylene). The research aimed at increasing the PHA production by *Bacillus megaterium* L9, by the using renewable and inexpensive bioresource as a substrate. The major disadvantage in the commercialization of bioplastic is their high production cost. The use of readily available cheap agro-industrial residues as the carbon sources may reduce the higher cost and improve economic bioplastic production process.

In this study, a higher PHA production level was obtained by the using beet molasses as byproduct at concentration of 3 % (41% of cell dry weight). The isolate *Bacillus megaterium* L9 from Algerian soil was able efficiently to utilize the beet molasses as nutrient source for PHA production and therefore it could directly serve as an inexpensive nutrient source for production of bioplastic.

On perspective, it remains to find all-natural raw materials, obtained from 100 % renewable sources. The efforts should be focus on the development of more efficient purification strategies.

Acknowledgment

I would like to express my sincere thank to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the financial support and Prof. Dr. Mohamed BENALI and Prof. Dr. Ali RIAZI.

REFERENCES

- [1] MC Santanamo ; N Nimali ; S Prabhu ; S Garg. *PHA Research journal of Microbiology*, **2009**, 4 (3): 89-96.
- [2] Z Alias ; IKP Tan. *Bioresource. Technol.* , **2005**, 96: 1229–1234.
- [3] CC Chien ; CC Chen ; MH Choi ; SS Kung ; YH Wei. *J. Biotechnol.*, **2007**, 132: 259–263.
- [4] BB Salgaonkar ; K Mani ; JM Braganca. *J. Appl. Microbiol.* ,**2013**,114: 1347-1356.
- [5] E Zribi-Maaloul ; I Trabelsi ; L Elleuch ; H Chouayekh ; R Bensalah. *Int. J. Biol Macromol.*, **2013**, 61: 828221.
- [6] M Beaulieu ; Y Beaulieun ; J Melinard. *App. Environ. Microbiol.*, **1994**, 61: 165–169.
- [7] MR Lopez-Cuellar ; J Alba-Flores ; JN Gracida-Rodriguez ; F Pérez-Guevara.. *Int. J. Biol. Macromol.* ,**2011**, 48: 74–80.
- [8] BHA Rehm. *Nat. Rev. Microbiol.* , **2010**, 8: 578–592.
- [9] D Jendrossek. *Journal of Bacteriology*, **2009**, 191:3195–3202
- [10] Y Tokiwa ; CU Ugwu. *J. Biotechnol.*, **2007**, 132: 264–272.

- [11] S Chaijamrus ; N Uduyay. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agr Engg Int: CIGR J. Manuscript FP.* ,**2008**, 7(30):10.
- [12] M Singh ; SKS Patel ; VC Kalia. *Microb. Cell. Factor.*, **2009**, 8:38.
- [13] TD Full ; DO Jung ; MT Madigan. *Lett. Appl. Microbiol.* ,**2006**, 43: 377–384.
- [14] K Mona , A Gouda ; E Swellam, H Sanaa. *Microbiol.* ,**2001**, 156: 201–207.
- [15] MK Gouda ; AE Swellam ; SH Omar. *Microbiol Res*, **2001**, 156: 201–207.
- [16] JM Luengo ; B Garcia ; A Sandoval ; G Naharro ; RE Olivera. *Curr. Opin. Microbiol.* ,**2003**, 6: 251–260.
- [17] A Lopez-Cortes ; LA Lanz ; MJQ Garcí. *Microb. Ecol.* ,**2008**, 56:112–120.
- [18] J Sambrook ; EF Fritsch ; T Maniatis. *Molecular cloning : a laboratory manual*, **1982**.
- [19] SU Rehman ; N Jamil ; S Husnain. *Bioloogia.* ,**2007**, 62:650–656.
- [20] Y Jiang ; X Song ; L Gong ; P Li ; C Dai ; W Shao. *Enzy. Microbial. Tech.*, **2008**, 42: 167–172.
- [21] PJ Barham ; A Keller ; EL Otun ; PA Holmes. *J. Mater. Sci.*, **1984**, 19: 2781–2794.
- [22] M Yilmaz ; H Soran ; Y Beyatli.. *J. Microb. Biotech.*, **2005**, 21: 565-566.
- [23] S Porwala ; T Kumar ; S Lal ; A Rani ; S Cheema ; J Hemant ; R Sharma ; S Patel ; V Kalia. *Bioresource. Technol.* ,**2007**, 99: 5444–5451.
- [24] J Tian ; J Anthony ; S Sinskey. *J. Bact.*, **2005**, 3814- 3824.
- [25] N Nimali ; M Prabhu ; C Santimano ; S Mavinkurve ; N Saroj ; GB Sandeep. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **2009**, 97:41–50
- [26] B Borah ; PS Thakur ; JN Nigam. *J. Appl. Microbiol.* , **2002**, 92: 776–783.
- [27] Q H Wu ; G. Huang ; J Hu ; K Chen ; P Ho ; GQ Chen. *Int. J. General and Molecular Microbio*, **2001**, 80(2):111–118.
- [28] G Singh ; A Kumari ; A Mittal A Yadav ; NK Aggarwal. *Bio Med. Res. Int.*, **2013**, doi: 10.1155/2013/952641.
- [29] GD Flora ; K Bhatt ; U Tuteja. *J. Cell. Tiss. Res.*,**2010**, 10: 2235-2242.
- [30] S Omar ; A Rayer ; A Eqaab , I Viss ; A Steinbuechel. *Biotechnol. Lett.*, **2001**, 23: 1119–1123.
- [31] RS Pandian ; V Deepak ; K Kalishwaralal ; N Rameshkumar ; M Jeyaraj ; S Gurunathan *Bioresour. Technol.* , **2010**, 101: 705–711.
- [32] S, Kulpreecha ; A Boonruangthavorn ; B Meksiriporn ; N Thongchul. *J. Biosci. Bioeng.* , **2009**, 107: 240–245.
- [33] B Aslim ; ZN Yükkedag ; Y Beyatli. *Turk. Electron. J. Biotech.* ,**2002**, 24–30.
- [34] T Kenneth. *The Genus Bacillus*. University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology, **2005**.
- [35] SP Valappil ; R Rai ; C Bucke ; I Roy. *J. Appl. Microbiol.* , **2007**, 104:1624–1635.
- [36] P Adwitiya ; A Prabhu ; A Kumar ; B Rajagopal ; K Dadhe ; V Ponnamma ; S Shivakumar. *Polish. J. Microbiol.*, **2009**, 58: 149-154.
- [37] TR Shamala ; A Chandrashekar ; SVN Vijayendra ; L Kshama. *J. Appl. Microbiol.* , **2003**, 94:369–374.
- [38] H, Zhang ; V Obias ; D Gonyer. *Appl. Environ. Microb.*,**1994**, 1198-1205.
- [39] GQ Chen ; WJ Page. *Biotechnol. Lett.*, **1994**, 16: 55–160.
- [40] PJ Senior ; EA Dawes. *Biochem. J.*, **1973**, 134: 225-238.
- [41] FC Oliveira ; LD Marcos ; RC Leda ; MGF Denise. *Bioresource. Technol.*, **2007**, 98: 633–638.