

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<sup>me</sup> ZERHOUNI Khadidja**

**EN VUE DE L'OBTENTION**

**DU DIPLOME DE DOCTORAT 3<sup>ème</sup> CYCLE**

**Spécialité : Sciences Biologiques**

**Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomies**

**Thème**

**Isolement et caractérisation des bactéries dégradatrices de plastiques industriels**

**Devant le Jury composé de :**

**Soutenu le :20/01/2021**

**Président :**

Mr. BENINE Mohamed El Amine (MCA, Université de Sidi Bel Abbès).

**Examineurs :**

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara).

Mr. MEDDAH Boumediene (Professeur, Université de Mascara).

**Directeur de thèse :**

Mr. ABBOUNI Bouziane (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

**Année universitaire 2019/2020**

# *Dédicaces*

---

*A*

*Ma plus grande source de bonheur mes chers parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien et surtout leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*A*

*Mon mari qui m'a encouragé et m'a soutenu durant la période d'élaboration de cette modeste étude.*

*A*

*Mon petit ange Mahammed el mehdi qui a entré de la joie dans ma vie.*

*A*

*Mon frère Hamza et mes sœurs Ammaria et Amina que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein de succès.*

*A*

*Ma belle famille pour leur encouragement.*

*A*

*Mes chères Meryame, téma, nadouch, samia, pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve.*

**ZERHOUN KHADIDJA**

## Résumé

Les matières plastiques, du fait de leur utilisation massive, constituent des polluants importants dans l'environnement.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement et la sélection des souches bactériennes productrices d'enzymes capables de dégrader le polyéthylène à basse densité.

A cet effet, trois (03) échantillons de sol, contenant des sachets en plastique (polyéthylène à basse densité) décomposés, sont effectués à partir de différentes décharges publiques de la Wilaya de Tlemcen telles que la décharge de Nedroma, de Tlemcen ville nouvelle et ancienne décharge, de la région Ouest d'Algérie.

Le screening primaire a permis l'isolement de 29 souches productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD. Ensuite, le screening secondaire a révélé la sélection de 11 souches (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD et ont fait l'objet d'une identification phénotypique.

L'utilisation de l'outil de la biologie moléculaire a permis une identification génétique des souches sélectionnées productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD. En outre, l'analyse phylogénétique et le séquençage des souches isolées, sélectionnées productrices d'enzymes capables de dégrader le polyéthylène à basse densité, sont soumises et répertoriées dans la base des données GenBank.

L'optimisation de différents paramètres impliqués dans la biodégradation par des souches sélectionnées a montré que les souches (ML007, ML014, ML020, ML022) ont manifesté une forte activité à une température comprise entre (30°C et 40°C). Cependant, les souches (ML001, ML018 et ML029) ont montré une importante activité de dégradation de PEBD à des valeurs de pH (7, 9, 6) respectivement. Par ailleurs, la souche ML002 a manifesté une excellente activité de dégradation de PEBD en présence d'une concentration de 4% NaCl. L'ajout du cuivre dans le milieu de culture inoculé avec des souches (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) a amélioré considérablement l'activité de biodégradation du PEBD, accompagnée avec une perte de 2.05 % de poids pendant 30 jours.

Le séquençage des 11 souches sélectionnées dégradatrices du PEBD (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) a révélé leur appartenance aux espèces : *Bacillus subtilis* ML636851, *Bacillus thuringiensis* MG738271, *Lysinibacillus macroides* ML636534, *Bacillus subtilis* ML636460 , *Enterobacter cloacae* ML636553, *Bacillus cereus* MT636856, *Bacillus licheniformis* MT636899, *Rhodococcus gordoniae* MT636651, *Pseudomonas balearica* MT636930, *Pseudomonas aeruginosa* MT636685, *Staphylococcus pasteurii* MT636753 respectivement, ce qui explique que les souches sélectionnées peuvent être excellents candidats dans la bioremédiation des sols pollués en plastique.

**Mots clés :** biodégradation, polyéthylène à basse densité, bactéries productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD, identification moléculaire.

## Abstract

Plastics, due to their massive use, are important environmental pollutants.

The objective of this work is the isolation, the selection of bacterial strains producing enzymes capable of degrading low density polyethylene. For this purpose, three (03) soil samples, containing decomposed plastic bags (low density polyethylene), are made from various public dumps of the Wilaya of Tlemcen such as the landfill of Nedroma, Tlemcen new and old city, of the Western region of Algeria.

The primary screening allowed the isolation of 29 enzyme-producing strains capable of degrading LDPE. Then, the secondary screening revealed the selection of 11 strains (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 and ML029) producing enzymes capable of degrading the LDPE and were phenotypically identified.

The use of the molecular biology tool has enabled genetic identification of selected enzyme-producing strains capable of degrading LDPE. In addition, phylogenetic analysis and sequencing of isolated strains, selected to produce enzymes capable of degrading low-density polyethylene. are submitted and listed in the Genbank database. Optimization of various parameters involved in biodegradation by selected strains showed that strains (ML007, ML014, ML020, ML022) showed high activity at a temperature between (30°C and 40°C). However, strains (ML001, ML018 and ML029) showed significant LDPE degradation activity at pH values (7, 9, 6) respectively. In addition, strain ML002 showed excellent LDPE degradation activity at a concentration of 4% NaCl. The addition of copper to the culture medium inoculated with strains (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 and ML029) significantly improved the biodegradation activity of the LDPE, accompanied by a loss of 2.05% of their weight. Sequencing of the 11 selected LDPE degrading strains (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 and ML029) revealed their species membership: *Bacillus subtilis* ML636851, *Bacillus thuringiensis* MG738271, *Lysinibacillus macroides* ML636534, *Bacillus subtilis* ML636460 , *Enterobacter cloacae* ML636553, *Bacillus cereus* MT636856, *Bacillus licheniformis*

MT636899, *Rhodococcus gordoniae* MT636651, *Pseudomonas balearica* MT636930, *Pseudomonas aeruginosa* MT636685, *Staphylococcus pasteurii* MT636753 respectively, This explains why the strains selected can be excellent candidates in bioremediation of polluted plastic soils.

**Keywords:** biodegradation, low-density polyethylene, enzyme-producing bacteria capable of degrading LDPE, molecular identification.

## ملخص

البلاستيك من أكثر المواد الملوثة للبيئة

الهدف من هذا العمل هو العزل، واختيار السلالات البكتيرية التي تنتج إنزيمات قادرة على خفض البولي إيثيلين ولهذا الغرض، ثلاث (03) عينات من التربة تحتوي على أكياس بلاستيكية متحللة (بوليثيلين منخفض الكثافة)، مصنوعة من مقالب مختلفة من الدفن العامة في ولاية تلمسان مثل دفن ندرومة، مدينة تلمسان الجديدة والقديمة، في المنطقة الغربية من الجزائر. الكثافة. المنخفض

سمح الفحص الأولي بعزل 29 إجهاداً منتجة للإنزيم قادرة على تحليل إنزيم البولي إيثيلين المنخفض الكثافة. ثم كشف الفحص الثانوي عن اختيار 11 سلالات (ML001 و ML002 و ML006 و ML007 و ML008 و ML014 و ML015 و ML018 و ML020 و ML022 و ML029) إنتاج الإنزيمات القادرة على خفض مستوى الإنتاج المحلي من الإنتاج المحلي الإجمالي وتم تحديدها من الناحية الظاهرية. وقد مكن استخدام أداة البيولوجيا الجزيئية من التعرف الجيني على سلالات مختارة منتجة للإنزيمات قادرة على خفض المواد المحفّرة للإنزيم المنخفض الكثافة. وبالإضافة إلى ذلك، يتم تقديم وتسلسل سلالات معزولة، يتم اختيارها لإنتاج إنزيمات قادرة على تحليل البولي إيثيلين منخفض الكثافة، ويتم إدراجها في قاعدة بيانات بنك الجينات.

أظهر تحسين مختلف المعلمات التي تنطوي على التحلل البيولوجي من قبل سلالات مختارة أن السلالات (ML007، ML014، ML020، ML022) أظهرت نشاطا كبيرا في درجة حرارة بين (30 درجة مئوية و 40 درجة مئوية). ومع ذلك، أظهرت سلالات (ML001 و ML018 و ML029) وجود نشاط كبير لتدهور حالة البولي إيثيلين المنخفض الكثافة (LDPE) بقيم الرقم الهيدروجيني (pH) (7، 9، 6) على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، أظهر السلالة ML002 نشاط ممتاز لتدهور جودة الناتج المحلي الإجمالي بتركيز 4% من النيكول. وقد أدى إضافة النحاس إلى وسط الثقافة الممزق بالسلالات (ML001 و ML002 و ML006 و ML007 و ML008 و ML014 و ML015 و ML018 و ML020 و ML022 و ML029) إلى تحسين نشاط التحلل البيولوجي في LDPE بشكل كبير، مع فقدان 2.05% من وزنها. كشف تسلسل السلالات المهانة من نوع (LDPE ML001 و ML002 و ML006 و ML007 و ML008 و ML014 و ML015 و ML018 و ML020 و ML022 و ML029) عن عضوية الأنواع :

*Bacillus subtilis* ML636851, *Bacillus thuringiensis* MG738271, *Lysinibacillus macroides* ML636534, *Bacillus subtilis* ML636460 , *Enterobacter cloacae* ML636553, *Bacillus cereus* MT636856, *Bacillus licheniformis* MT636899, *Rhodococcus gordoniae* MT636651, *Pseudomonas balearica* MT636930, *Pseudomonas aeruginosa* MT636685, *Staphylococcus pasteurii* MT636753



على التوالي، وهذا يفسر لماذا السلالات المختارة يمكن أن تكون مرشحين ممتازين في المعالجة البيولوجية للتربة البلاستيكية الملوثة.

**الكلمات الدالة:** التحلل الحيوي، منخفض الكثافة، البكتيريا المنتجة للإنزيم القادرة على تحليل البولي إيثيلين ، تحديد الجزيئات.

# *Remerciements*

---

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu Le Tout Puissant de m'avoir donné santé, patience, et courage pour mener à terme ce modeste travail.

En second lieu, je tiens à exprimer mes plus vifs et plus sincères remerciements à mon Directeur de thèse **Mr ABBOUNI Bouziane, professeur à l'université de Sidi Bel Abbes** pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, tout en me laissant suffisamment d'autonomie pour gérer ces recherches ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger cette thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent au **Mr Moussa Boudjamaa B., professeur à l'université de Tlemcen** et **Pr hassaine Hafida, directrice du Laboratoire de Microbiologie Appliquée l'Agro-Alimentaire au Biomédical et à l'Environnement de l'université de Tlemcen** qu'ils ont bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Je tiens à remercier **Mr BENINE Mohamed El Amine, MCA à l'université de Sidi Bel Abbes**, pour m'avoir témoigné sa confiance en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Je remercie également **Mr BELABID Lakhdar et Mr MEDDAH Boumediene, Professeurs à l'université de Mascara**, pour s'être déplacé pour examiner ce travail.

Les mots me manquent pour exprimer toute ma gratitude et ma vive reconnaissance à **Mlle BENAHMED Meryam** pour tous ces conseils, encouragements et son enthousiasme.

Je voudrais également remercier **Pr philippe BERTIN , Professuer à l'université de Strasbourg**, qui m'a accueilli dans son laboratoire avec toute la générosité et la sympathie qui réside en sa personne.

Un profond Merci pour **Mlle AISSAOUI Nadia** et **Mme LEVEILLE Elena** pour leur aide et pour tous les conseils.

La liste est longue mais il me tient particulièrement à cœur de remercier toutes les personnes qui m'ont consacré une partie de leur temps et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Table des Matières

Dédicaces .....	I
Résumé .....	III
Abstract .....	V
ملخص .....	VII
Remerciements .....	IX
Table des matières .....	XI
Liste des abréviations .....	XV
Liste des tableaux .....	XVIII
Liste des figures .....	XIX
Liste des annexes .....	XI
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Rappel bibliographique</b>	
1. Les matières plastiques .....	3
1.1. Généralités sur les polymères.....	3
1.1.1.1. Définition de polymère .....	3
1.1.1.2. Synthèse du polymère .....	3
2. 1. Classification des polymères.....	3
1.2.1. Classification selon l'origine.....	3
1.2.2. Classification selon l'architecture .....	4
1.2.3. Classification selon la structure.....	5
1.2.4. Classification selon le comportement mécanique et thermique .....	6
2. Polyéthylène.....	6
2.1. Définition .....	6
2.2. La réaction de polymérisation du polyéthylène .....	7
2.3. Les différents types de polyéthylène .....	7
2.4. La synthèse du polyéthylène .....	7
2.5. Procédés de fabrication des polyéthylènes .....	8
3. Le polyéthylène à basse densité .....	8
3.1. Propriétés du PEBD .....	8

3.1.1. Propriétés physico-chimiques .....	8
3.1.2. Propriétés mécaniques .....	8
3.1.3. Propriétés chimiques .....	8
3.1.4. Propriétés électriques .....	9
4. Les matières plastiques et leurs impacts sur l'environnement.....	9
5. La biodégradation du polyéthylène .....	10
5.1. Définition de la biodégradation .....	10
5.2. Mécanisme de la biodégradation des polymères .....	11
5.3. Biodégradation du polyéthylène .....	12
5.4. Mécanisme de la biodégradation du polyéthylène .....	19
6. Taxonomie des genres bactériens impliqués dans la dégradation du polyéthylène à basse densité .....	20
6.1 Taxonomie du genre <i>Bacillus</i> .....	20
6.2 Taxonomie du genre <i>Pseudomonas</i> .....	21
6.2.1 Caractéristiques du genre <i>Pseudomonas</i> .....	21
6.2.1.1 Caractéristiques métaboliques .....	22
6.2.1.2 Classification du genre <i>Pseudomonas</i> .....	24
6.2.1.2.1 Étapes de la classification .....	24
6.2.1.2.2. Classification contemporaine .....	26
6.2.1.2.2.1. Caractéristiques phénotypiques .....	26
6.2.1.2.2.2. Études chémo-taxonomiques .....	26
6.2.1.2.2.3. Caractérisations génétiques .....	27
6.3 Taxonomie du genre <i>Enterobacter</i> .....	28
6.3.1 Habitat .....	29
6.3.2 Caractères bactériologiques.....	30

## **Chapitre II. Matériel et méthodes**

1. Isolement et criblage de souches bactériennes dégradatrices du polyéthylène à basse densité .....	31
1.1 Echantillonnage .....	31
1.2 Enrichissement .....	34
2. Test de biodégradation du polyéthylène à basse densité .....	34

2.1 Conservation des souches dégradant le PEBD .....	35
3. Optimisation des paramètres de croissance .....	35
3.1 Influence de la concentration en NaCl .....	36
3.2 Effet du pH .....	36
3.3 Température optimale de croissance .....	36
3.4 Effet du CuSO <sub>4</sub> sur l'activité de la biodégradation du PEBD.....	36
4. Identification des souches isolées.....	36
4.1 Identification phénotypique.....	36
4.1.1 Examen macroscopique des colonies.....	36
4.1.2 Examen microscopique .....	37
4.1.3 Tests biochimiques et physiologiques .....	37
4.1.3.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires .....	37
4.1.3.1.1 Test de la catalase .....	37
4.1.3.1.2 Test de l'oxydase .....	37
4.1.3.1.3 Type respiratoire .....	38
4.1.3.1.4 Mannitol mobilité .....	38
4.1.3.1.5 Le test de Citrate de SIMMONS .....	39
4.1.3.2 Identification par la galerie API20E .....	39
4.2 Identification génotypique .....	40
4.2.1 Extraction d'ADN.....	40
4.2.2 Dosage de l'ADN au Nanodrop .....	40
4.2.3 Amplifications PCR.....	41
4.2.4 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	41
4.2.5 Purification de l'ADN .....	42
4.2.6 Séquençage.....	42
4.2.7 Analyse des séquences.....	43

### **Chapitre III. Résultats et discussion**

1. Isolement et criblage des bactéries dégradatrices du polyéthylène à basse densité..	44
2. Test de biodégradation du PEPD.....	46
3. Caractérisation physiologique .....	48
3.1 Effet de la température sur l'activité de la biodégradation du PEBD .....	48

3.2 Effet du Ph sur l'activité de la biodégradation du PEBD.....	50
3.3 Effet de la concentration du NaCl sur l'activité de la biodégradation du PEBD.....	52
3.4 Effet du CuSO <sub>4</sub> sur l'activité de la biodégradation du PEBD .....	55
4. Identification des souches isolées.....	56
4.1 Identification phénotypique.....	56
4.1.1 Identification morphologique.....	57
4.1.2 Caractérisation biochimique .....	61
4.1.3 Mise en évidence des enzymes respiratoires .....	61
4.1.4 Identification des souches sélectionnées par la galerie API20E.....	62
5. Identification génotypique des souches sélectionnées.....	66
5.1 Quantification de l'ADN au Nanodrop.....	66
5.2 Amplification du gène de l'ARN 16S des souches sélectionnées.....	67
5.3 Le séquençage et analyse phylogénétique.....	68

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# *Liste des abréviations*

---

**% /v** : pourcentage poids-volume.

**% v/v** : pourcentage volume –volume.

**%** : pourcentage.

**°C** : température en degré Celsius .

**ADH** : Arginine-Dihydrolase.

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.

**AMY** : Amygdaline.

**API** : Analytical profile index .

**ARA** : arabinose.

**ARNr 16S** : Acide RiboNucléique ribosomale 16S.

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**BET** : Bromure d'éthidium.

**C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** : Polymérisation de l'éthylène.

**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium.

**CIT** : citrate.

**cm** : centimètre.

**DNases** : DésoxyriboNucléase .

**DO** : Densité Optique.

**g/l** : Gramme par litre.

**GEL** : gélatine.

**GLU** : glucose.

**H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'Hydrogène

**IND** : indole.

**INO** : inositol.

**K<sup>+</sup>** : ion potassium.

**KCl** : chlorure de potassium.

**LDC** : Lysine decarboxylase.



**M** : Concentration molaire.

**MAN** : mannose.

**MEL** : melibiose.

**Mg<sup>2+</sup>** : ion magnésium.

**mg/ml** : milligramme/millilitre.

**mm** : millimètre.

**min** : minute.

**ml** : millilitre.

**NaCl** : chlorure de sodium.

**NaOH** : Hydroxyde de Sodium.

**nm** : nanomètre.

**Nm** : Nanomètre.

**ODC** : Ornithine decarboxylase .

**ONPG** : Ortho-nitrophényl-β-galactoside.

**Ox** : Oxydase.

**Pb** : Paire de base.

**PCR** : Polymerase Chain Reaction..

**PCR** : Polymerase chaine reaction.

**PE** : Polyéthylène.

**PEBD** : Polyéthylène à basse densité.

**PP** : Polypropylène.

**PS** : Polystyrène.

**PVC** : Polychlorure de vinyl.

**RHA** : rhamnose.

**Rpm** : Rotation par minute.

**S** : sensible.

**SAC** : saccharose.

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : ion sulfate.

**SOR** : sorbitol.

**TDA** : L-tryptophane.

**Tris** : Trishydroxyméthylaminométhane.

**UFC /ml** : Unité Format Colonie / millimètre.

**UFC** : Unité formant colonie.

**URE** : urée.

**VP** : Voges-Proskauer.

**µl** : microlitre

# *Liste des tableaux*

---

- Tableau 1 :** Enzymes extracellulaire impliquées dans la dégradation du polyéthylène
- Tableau 2:** La biodégradation du polyéthylène par les microorganismes (Huang, 2008)
- Tableau 3:** Présentation des bactéries dégradatrices de polyéthylène.
- Tableau 5:** Classification du genre *Bacillus*
- Tableau 6:** Présentation des résultats du test de biodégradatin du PEBD par la perte de la masse
- Tableau 7:** Présentation des optimums T°, pH et [NaCl] pour la biodégradation du PEBD.
- Tableau 8:** Présentation des résultats de la perte de la masse du PEBD additionné au CuSO<sub>4</sub>
- Tableau 9:** Illustration des caractéristiques macroscopiques des souches isolées,sélectionnées dégradatrices du PEBD sur GN
- Tableau 10:** Présentation des propriétés morphologiques lors de l'identification préliminaire des isolats.
- Tableau 11:** Présentation des propriétés biochimiques lors de l'identification préliminaire des isolats
- Tableau 12:** Illustration du profil biochimique des souches performantes par la galeri Api20E
- Tableau 13:** Valeur de la quantification de l'ADN Bactérien au Nanodrop
- Tableau 14:** Présentation des numéros d'accession, le pourcentage de similarité
- Tableau 15:** Présentation des résultats de l'interrogation de la base de données RDP Project

# *Liste des figures*

---

**Figure 1:** Classification des architectures macromoléculaires

**Figure 2:** Représentation semi-développée de la chaîne macromoléculaire du polyéthylène.

**Figure 3:** La polymérisation du polyéthylène

**Figure 4:** Classement des polyéthylènes selon leur densité et leur poids

**Figure 5:** Consommation annuelle des matières plastiques par habitant

**Figure 6:** Présentation de différentes voies de dégradation des polymères dans l'environnement

**Figure 7:** Présentation du mécanisme de biodégradation des polymères

**Figure 8:** Schéma simplifié montrant les produits de dégradation du polyéthylène

**Figure 9 :** Relations phylogénétiques entre les différents groupes de protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas*

**Figure 10:** Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la décharge publique de Nedroma.

**Figure 11 :** Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la nouvelle décharge publique de Tlemcen.

**Figure 12 :** Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de l'ancienne décharge publique de Tlemcen.

**Figure 13 :** Détermination du type respiratoire

**Figure 14 :** Aspect de la galerie API 20 E avant l'inoculation par les souches sélectionnées.

**Figure 15:** Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez les souches, inoculées sur le milieu minérale + PEBD, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figures 16:** Effet de la température sur la croissance des souches (ML001. ML002.ML006.ML007.ML008. ML014, ML015. ML018. ML020. ML022. ML029) lors de la dégradation du PEBD, inoculée dans un milieu minéral, incubée à une température de 37°C pendant 24h

**Figures 17:** L'Impact du pH sur la croissance des souches (ML001. ML002.ML006.ML007.ML008. ML014, ML015. ML018. ML020. ML022. ML029) lors de la dégradation du PEBD, inoculée dans un milieu minéral, incubée à une température de 37°C pendant 30 jours.

**Figures 18:** Influence de la concentration du NaCl(%) sur la croissance des souches (ML001. ML002.ML006.ML007.ML008. ML014, ML015. ML018. ML020. ML022. ML029) lors de la dégradation du PEBD, inoculée dans un milieu minéral, incubée à une température de 37°C pendant 24h

**Figure19 :** Diversité de l'aspect macroscopique des souches isolées en présence d'un mélange de formes, couleurs et de consistances des colonies

**Figure 20:** Coloration de Gram et observation microscopiques de quelques souches isolées (grossissement×100).

**Figure 21 :**L'aspect de la galerie API 20E des souches performante, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 22 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR après amplification.

**Figure 23:** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches ML001, ML007, ML014, ML002 et ML015. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Bacillus paranthracis* strain CFSAN068816 (CP045777.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.

**Figure 24 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML018. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii*(AB089859.1) est

utilisée comme outgroup. La barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.

**Figure 25 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML020 . La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii*(AB089859.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

**Figure 26 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML029 . La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii*(AB089859.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.

**Figure 27 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML008 . La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Pseudomonas putida* strain HB10 (KT803085.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

**Figure 28:** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML006. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Pseudomonas putida* strain HB10 (KT803085.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

# *Liste des annexes*

---

✚ **Annexe 01:** Préparation des milieux de cultures utilisés.

✚ **Annexe02 :** Base de données pour galerie Api20E.

✚ **Annexe03 :** Tableaux de lecture APi20E

# INTRODUCTION

---



## Introduction

La matière plastique est utilisée quotidiennement, sa multiplicité lui permet d'être présente dans tous les secteurs de l'industrie : l'agro-alimentaire, la cosmétologie, la santé, les produits d'entretien, les produits chimiques, dans le transport et la distribution, les produits industriels et agricoles (**Zaki, 2008**). Les propriétés diverses, la facilité de mise en œuvre et les coûts avantageux que présentent cette matière encouragent son application dans tous les domaines industrielles afin de satisfaire les besoins croissants des consommateurs.

Les polymères, ou les plastiques représentent, avec un volume global de plus de 290 millions de tonnes, un marché mondial d'environ 1600 milliards de dollars (USD).

Dans les trois dernières décennies, l'utilisation des matériaux plastiques pour l'emballage des aliments et dans le secteur agroalimentaire a augmenté d'une manière considérable. Cet accroissement c'est fait au détriment des matériaux traditionnels tels que le bois, le verre, et le métal, jusqu'à être aujourd'hui le matériau dominant dans l'emballage alimentaire (**Stoffers, 2005**).

Toutefois, cette exploitation massive n'est pas dépourvue de conséquences. En effet, le principal inconvénient des matériaux polymères réside dans le fait qu'ils ne sont pas biodégradables et pose ainsi le problème de la gestion de leurs déchets industriels ou de consommation qui s'accumulent de manière inquiétante. Ce n'est que depuis une vingtaine d'années seulement que le traitement des déchets de matières plastiques devient une préoccupation première dans la préservation de l'environnement. La valorisation des matières plastiques fait alors l'objet de toutes les attentions, notamment dans le monde scientifique où de nombreuses études se sont penchées sur ce phénomène mondial. Aujourd'hui, les industries de plasturgie disposent de plusieurs moyens de recyclage des polymères.

Bien que le recyclage des polymères usés soit significativement amélioré afin de réduire leur volume dans les décharges (**Hakkarainen et Albertsson, 2004**), cette technique reste inadéquate pour certains déchets tels que les sachets, les films de paillage agricole ou les emballages alimentaires, pour lesquels le polyéthylène à basse densité est le polymère de base. Ce dernier est l'un des thermoplastiques les plus

## INTRODUCTION

utilisés dû à ses bonnes propriétés à l'état solide, son inertie chimique et son faible coût. Sa production mondiale est d'environ 140 millions de tonnes par an, ce qui peut générer un grand tonnage de déchets (**Orhan et Buyukgungor, 2000**).

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

La biodégradation du polyéthylène a été rapportée dans un certain nombre de études de recherche publié au cours des 30 dernières années (**Gu, 2003; Hakkarainen et Albertsson, 2004; Koutny et al., 2006; Arutchelvi et al., 2008; Eubeler et al., 2010**).

La présente étude s'inscrit dans cette optique due à l'augmentation de la pollution qu'engendre les déchets du PEBD (sachet en plastique).

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

- ✓ L'isolement d'une large gamme des souches bactériennes productrices d'enzymes capables de dégrader le polyéthylène à basse densité à partir des sols riches en déchets des sachets en plastique.
- ✓ Caractérisation phénotypique et screening des souches les plus performantes.
- ✓ L'optimisation de conditions de la biodégradation du LDPE.
- ✓ L'identification des souches sélectionnées dégradatrices du PEBD via les techniques de biologie moléculaire : extraction d'ADN, amplification et le séquençage de l'ARN 16S et enfin le dépôt des séquences obtenues dans le GenBank afin de répertorier les souches sélectionnées dégradatrices du PEBD.

# **CHAPITRE I.**

## **RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE**

# RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Les matières plastiques

### 1.1. Généralités sur les polymères

#### 1.1.1. Définition de polymère

Les matières plastiques constitués essentiellement de la résine appelée « Polymère », substance organique, composée de macromolécules de la même nature chimique, d'origine naturelle, ou obtenue par modification chimique d'un polymère naturel ou bien synthétisé par voie chimique ou enzymatique par une réaction de polymérisation (**Farhi *et al.*, 2006 ; Berranem, 2010**).

#### 1.1.2. Synthèse du polymère

Les polymères sont synthétisés en reliant des molécules de monomère : les réactions de polymérisation constituées de deux types :

La polymérisation en chaîne ou polyaddition, dans laquelle les unités monomères sont additionnées une à une à un centre actif. Cette réaction concerne les polymères découlant des monomères possédant des fonctions alcène (C=C), C'est le procédé le plus utilisé dans l'industrie. le polyéthylène, le polypropylène, le polystyrène, l'alcool polyvinylique et le polytétra-fluoro-éthylène (Téflon) sont des exemples de polymères obtenus par cette polymérisation (**Makdour, 1982**).

La polymérisation par étapes ("step growth" polymerization) ou polycondensation, c'est la réaction entre molécules de base possédant des groupements fonctionnels différents, elle mène à l'élaboration des macromolécules nommés polycondensats. les monomères s'associent avec élimination simultanée d'atomes ou de groupes d'atomes. Les polyamides, les polyesters et certains polyuréthanes sont des exemples typiques de polymères obtenus par polycondensation (**Decker, 1996**).

## 1.2. Classification des polymères

### 1.2.1. Classification selon l'origine

Les polymères sont classés en trois catégories :

- Polymères naturels : ce sont des composés organiques issus du règne végétal ou animal, leur importance est considérable ; comme les protéines, les acides nucléiques, la cellulose et la chitine (**Fontanille et Gnanou, 2005**).
- Polymères artificiels (ou régénérés) : sont obtenus par modification chimique de polymères naturels, de façon a transformé certaines de leurs propriétés. Ils ont une

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

certaine importance économique. Par exemple : méthylcellulose (**Microsoft Encarta, 2009**).

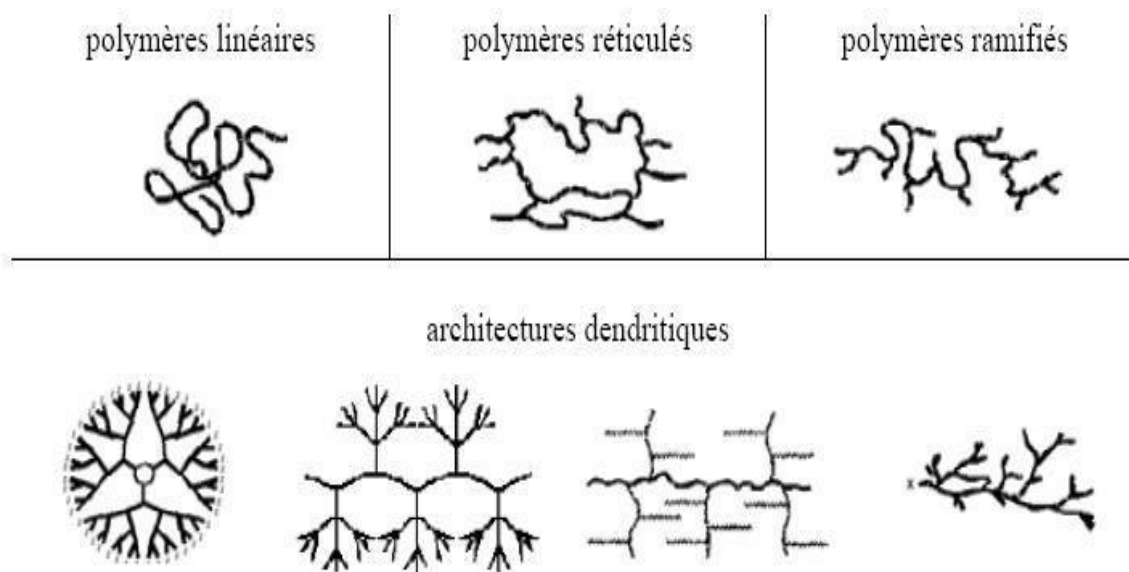
- Polymères synthétiques : totalement issus du génie de l'Homme, sont obtenus par polymérisation de molécules monomères. ce sont les matières plastiques, les élastomères, les fibres, les adhésifs (**Fontanille et Gnanou, 2005**).

### 1.2.2. Classification selon l'architecture

La classification selon l'architecture se divise en quatre grandes familles

- Les polymères linéaires: sont essentiellement obtenus par des techniques de polymérisation en chaîne ou des réactions de polymérisation par étapes.
- Les polymères ramifiées: découlent de réactions de transfert de chaîne, ou bien sont générées par des réactions de greffage.
- Les polymères réticulés: la formation de liaisons chimiques suivant les différentes directions de l'espace, au cours d'une polymérisation de polymères linéaires correspond à la réticulation, qui conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel (**Wiess, 2010**).
- Les polymères dendritiques: la possibilité de synthétiser des dendrimères à partir de monomères multifonctionnels été évoqué en 1953 par Paul Flory, dans son célèbre livre "Principles of Polymer Chemistry" (**Flory, 1953**). Mais ce n'est qu'à la fin des années 1970 la première synthèse de dendrimères (appelé « arborols »), est décrit par **Vögtle** suivi par **Tomalia et al., 1985** et **Newkom et al., 1985**).

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 1:** Classification des architectures macromoléculaires (Tomalia *et al.*, 1985).

### 1.2.3. Classification selon la structure

Les composés macromoléculaires sont classés en

- Les homopolymères sont des polymères de longues chaînes d'une seule unité, formés par répétition d'un monomère, leurs propriétés mécaniques telles que l'écoulement à l'état fondu, optique, sont dues essentiellement à la structure chimique des monomères et à la longueur des chaînes (Jouenne, 2005). Il existe différentes familles des homopolymères : les homopolymères linéaires, branchés et étoilés.
- Les copolymères sont des polymères de plusieurs unités, telles que les homopolymères, les copolymères peuvent se classer dans différentes familles, citons: le mode statistique, alterné, séquencé et greffé.

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.2.4. Classification selon le comportement mécanique et thermique

Les polymères sont souvent classés selon les propriétés thermodynamiques en trois types

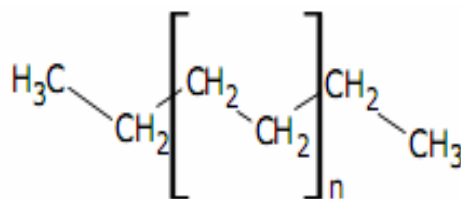
- Les thermoplastiques sont des polymères linéaires, généralement recyclable, se ramollissent sous l'effet de la chaleur, durcissent sous l'effet de froid (**Dupeux, 2004**).
- Les thermodurcissables sont des produits issus de la transformation par réaction chimique, à des composés macromoléculaires tridimensionnels liés par liaisons covalentes (**Perrin et Scharff, 1999**).
- Les élastomères sont des polymères étirés au moins deux fois leur longueur d'origine qui se rétracte à leur dimension initiale lors de la disparition de la force d'étirement.

Parmi, les avantages des élastomères sont les propriétés mécaniques telles que son très faible échauffement interne et sa très bonne tenue au froid (**Arlie, 1980**).

## 2. Polyéthylène

### 2.1. Définition

Le polyéthylène, ou polythène (PE), est un matériau thermoplastique obtenu par polymérisation de l'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) menant à des macromolécules composées par la répétition du monomère CH<sub>2</sub> (**Nicole et al., 2005**). Le polyéthylène est un des polymères les plus simples et les moins chers le plus important polymère de synthèse, devant le polypropylène (PP), le polychlorure de vinyl (PVC) et le polystyrène (PS). La production mondiale est de l'ordre d'une quarantaine de millions de tonnes en 2010 (**Peacock et al., 2000**).

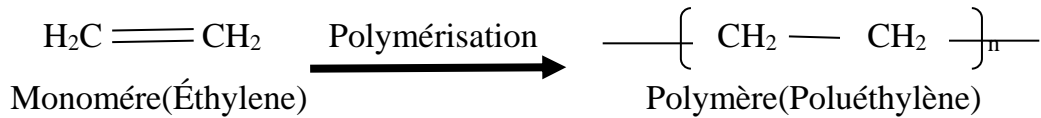


**Figure 2:** Représentation semi-développée de la chaîne macromoléculaire du polyéthylène.

# RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

## 2.2. La réaction de polymérisation du polyéthylène

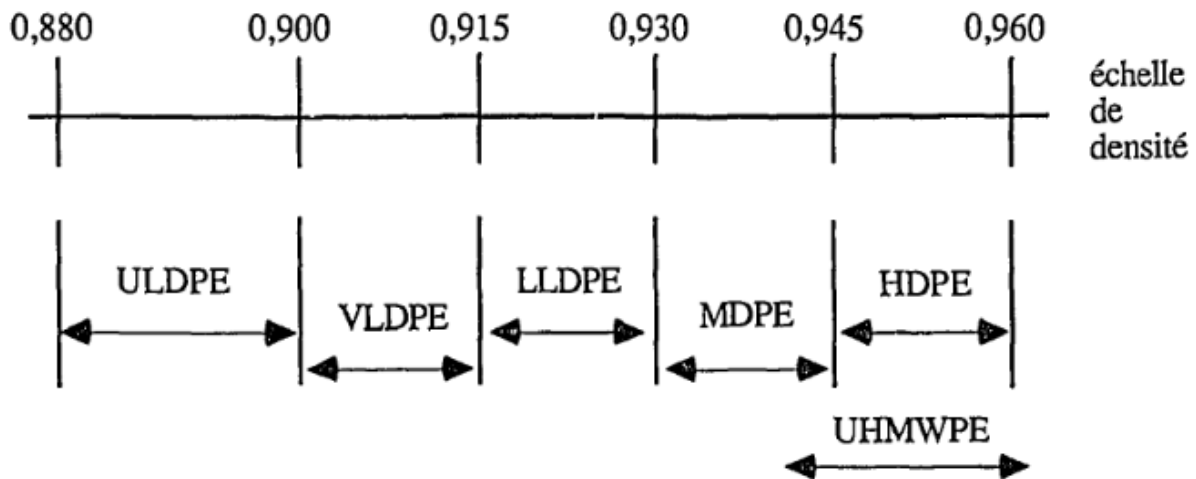
La polymérisation du polyéthylène est représentée dans la figure suivante ;



**Figure 3:** La polymérisation du polyéthylène (Monteil, 2012).

## 2.3. Les différents types de polyéthylène

Les polyéthylènes sont classés en fonction de leur densité qui dépend du nombre et de la longueur des ramifications présentes dans les chaînes moléculaires ( Fontanille et Gnanou, 2005).



ULDPE : "Ultra-low density polyethylene", Mw < 1 000 ; VLDPE : "Very-low density polyethylene", Mw = 1 000 - 20 000 ;  
LLDPE : "Linear low density polyethylene", Mw = 20 000 - 50 000 ; MDPE : "Middle density polyethylene", Mw = 50 000 - 200 000 ;  
HDPE : "High density polyethylene", Mw = 200 000 - 1 000 000 ; UHMWPE : "Ultra-high molecular weight polyethylene", Mw = 1 000 000 - 5 000 000.

**Figure 4:** Classement des polyéthylènes selon leur densité et leur poids moléculaire (Fontanille et Gnanou, 2005)

## 2.4. La synthèse du polyéthylène

Les deux voies essentielles impliquées dans la synthèse des polyéthylènes de haute densité sont des réactions de polymérisations catalysées par des systèmes à base d'oxyde de chrome ou des composés organométalliques de type Ziegler Natta. La polymérisation effectuée en suspension continue, utilise un procédé de catalyse à basse pression. Depuis quelques années une voie de synthèse catalytique à base d'espèces dites métallo cènes est apparue, permettant l'accès à des PE plus homogènes (Julien, 2005).



# RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

## 2.5. Procédés de fabrication des polyéthylènes

Deux technologies de polymérisation de l'éthylène sont mises en évidence :

- La polymérisation par voie radicalaire, par Imperiel Chemical Industries (I.C.I), qui donne naissance au polyéthylène basse densité.
- La polymérisation par voie ionique, opérant à basse pression qui conduit à un polyéthylène de haute densité ou à un polyéthylène de basse densité linéaire (Arlie, 1987).

## 3. Le polyéthylène à basse densité

Le polyéthylène à basse densité (PEBD) est un polymère thermoplastique de grande consommation est obtenu par polymérisation radicalaire de l'éthylène en présence d'une très haute pression (1800 à 3000 bars) et à haute température (200-300°C). Sa densité, voisine de 0,91-0,92, est plus faible que celle du polyéthylène haute densité, car sa structure révèle un taux de ramification supérieure (Mark, 1999).

### 3.1. Propriétés du PEBD

#### 3.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le PEBD est un polymère semi-cristallin, de densité située entre 0.91 et 0.92. Son taux de cristallinité est d'environ (43-50%) et sa température de fusion cristalline est située entre (105-115°C) (Fournie, 1990). En général, le PEBD présente :

- ✓ Résistance aux acides faibles.
- ✓ Résistance aux acides forts non oxydants.
- ✓ Résistance aux bases faibles et fortes (Fusesserry, 1996).

#### 3.1.2. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques du PEBD dépendent essentiellement de leur masse molaire et de leur cristallinité. Nous pouvons citer entre autres (Fusesserry, 1996) :

- ✓ La résistance à la traction variant de (9-23 MPa).
- ✓ L'allongement à la rupture variant de (150-1000 %).
- ✓ Le module d'élasticité en traction variant de (200-500 MPa).

#### 3.1.3. Propriétés chimiques

Les polyéthylènes présentent une très bonne stabilité chimique :

- ✓ Très résistants aux attaque d'acides, bases et des solutions de sels (d'où leur utilisation en vaisselle de chimie).

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

- ✓ Insolubles dans l'eau même sous forme de films (emballage)
- ✓ Sensibles à la fissuration sous contraintes en présence de savon, alcools, détergents...
- ✓ Les polyéthylènes à l'état naturel sont très sensibles à l'action des rayons ultraviolets (UV) en présence d'oxygène (air) (Tratignon *et al.*, 1989).

### 3.1.4. Propriétés électriques

Le PEBD est une substance non polaire, caractérisée par : une permittivité relative faible ( $\approx 2-3$ ) limitant ainsi le courant de déplacement, un facteur de pertes diélectriques relativement faible, et une rigidité diélectrique élevée (Fusesserry, 1996).

## 4. Les matières plastiques et leurs impacts sur l'environnement

Le développement du marché de la production des matières plastiques est extraordinaire, expliqué par les multiples qualités attractives et versatiles. Les matières plastiques représentent environ deux tiers ( $2/3$ ) de produits finis pétrochimiques et leur consommation est devenue un critère économique important caractérisant le niveau de vie d'une nation (Bellahcene, 2009). Le taux de consommation par habitant est mentionnée dans la (Figure 5).

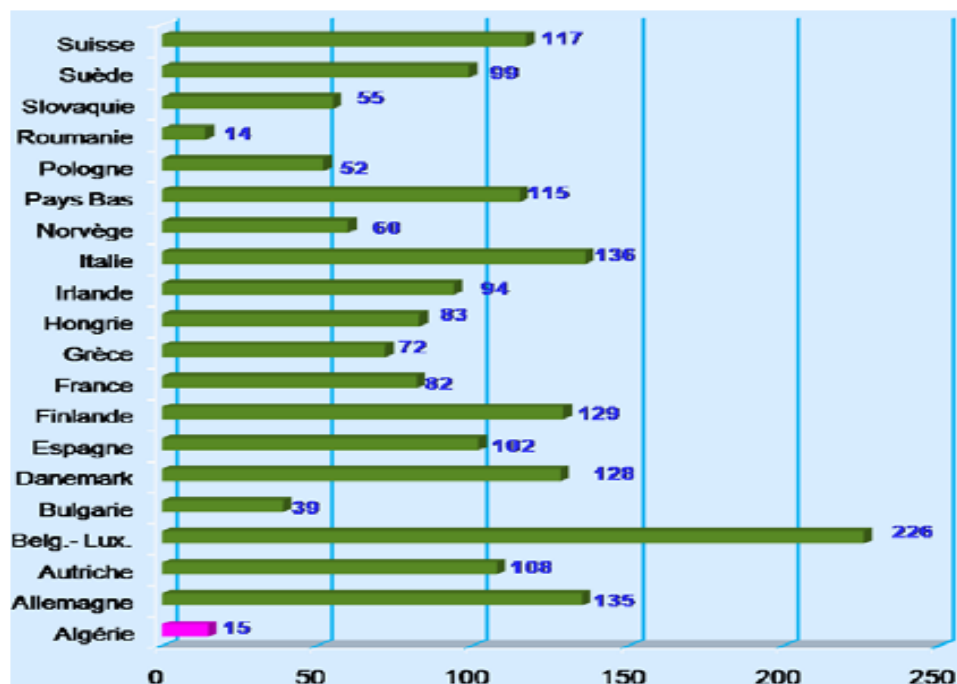


Figure 5 : Consommation annuelle des matières plastiques par habitant (Bellahcene, 2009).

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

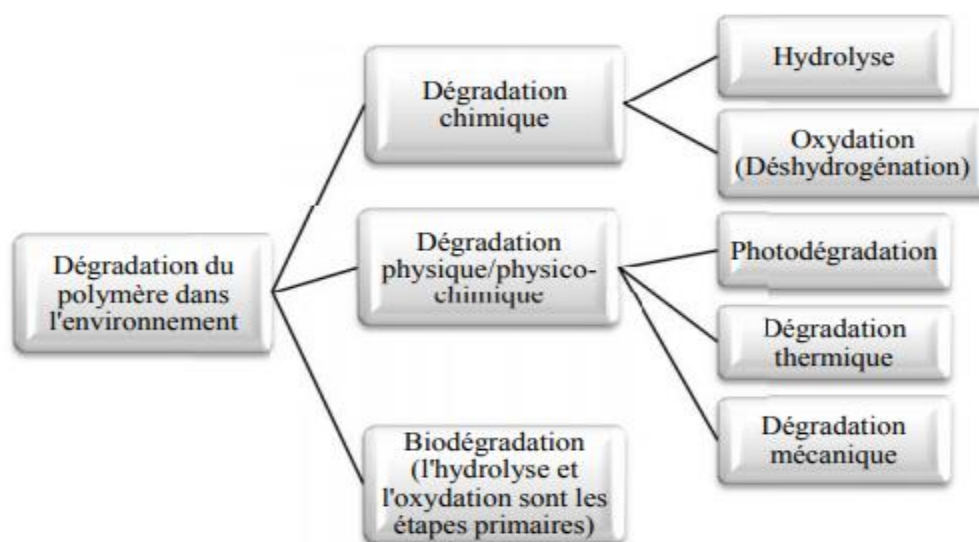
Malgré leur application bénéfique dans différents domaines, les matières plastiques posent des sérieux problèmes vis-à-vis de l'environnement et de la santé. En effet, la contenance des adjuvants et des monomères, en quantité plus au moins grandes, dans les polymères présente le risque de réactions chimiques nocives pendant le procédé de fabrication et l'usage de ces matières. La décomposition de matières plastiques à haute température génère des émissions de gaz, des solvants, des poussières et des rejets atmosphériques considérables (Dorbane, 2014).

La toxicité de matières plastiques sur la santé du personnel de l'industrie de plasturgie lors de l'introduction des différents additifs, causent de graves maladies telles que les vertiges somnolents, pertes de connaissance, des atteintes de la fois, des cancers (poumon, cerveau), etc.

### 5. La biodégradation du polyéthylène

#### 5.1. Définition de la biodégradation

Dans la nature, les matériaux polymères peuvent subir une dégradation par l'action d'agents biologiques, chimiques et/ou physiques(mécaniques) (Figure 6) (Matsumora, 2005).



**Figure 6:** Présentation de différentes voies de dégradation des polymères dans l'environnement (Matsumora, 2005).

Généralement, ces voies interviennent de manière concomitante dans le processus de dégradation (Domenek, 2009). Les facteurs impliqués dans la modification de la structure moléculaire du polymère et la détérioration de leurs propriétés

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

macroscopiques procèdent une dégradation chimique telles que l'oxydation, l'hydrolyse et physique telles que la photodégradation, la thermodégradation) et biologique par l'action des enzymes et les produits de sécrétions produites par les micro-organismes tels que les bactérie, les levures et les champignons, ,....) (Albersson et Carlsson, 1994 ; Calmon-Decriaud *et al.*, 1998).

### 5.2. Mécanisme de la biodégradation des polymères

Les polymères biodégradables sont généralement dégradés en deux étapes (**Figure 7**)

#### Dégradation primaire

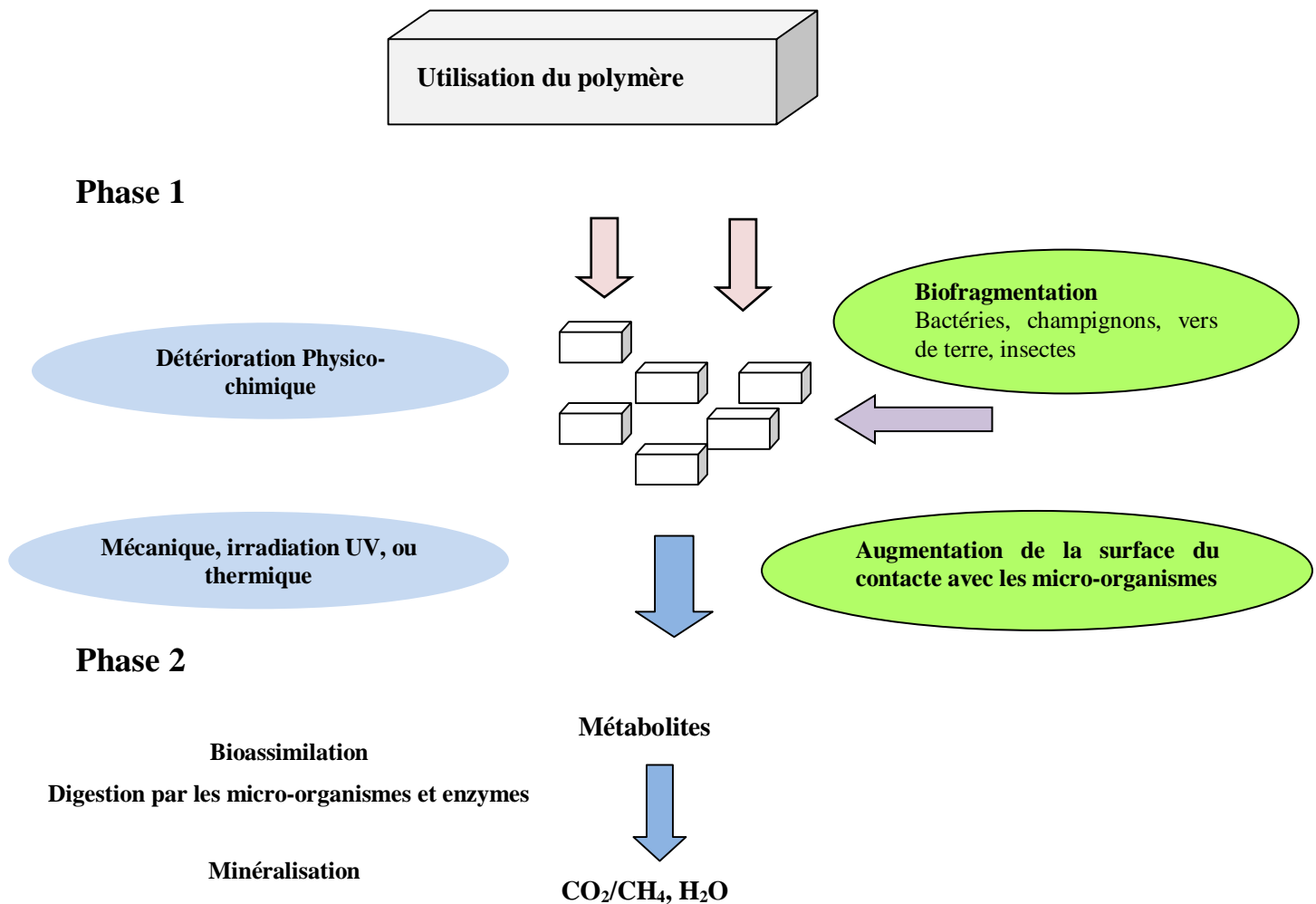
La Dégradation primaire correspond soit à une détérioration physico-chimique, soit à une biofragmentation du produit. La détérioration physico-chimique est généralement provoquée par des agents extérieurs (mécanique, chimique ou thermique). Cependant, la biofragmentation est essentiellement provoquée par des êtres vivants (bactéries, champignons, vers de terre, insectes, etc.) (Lehman *et al.*, 2003).

#### Biodégradation ultime

La biodégradation ultime est la digestion des matériaux par les microorganismes et les enzymes (bioassimilation) et leur transformation en métabolites assimilables par les cellules (Lehman *et al.*, 2003).

Dans des conditions aérobies, les molécules de faible poids moléculaire produits sont assimilables par les microorganismes sont transformées en dioxyde de carbone, eau et de métabolites secondaires. Cependant, dans les conditions anaérobies, le méthane est principalement produit à la place du dioxyde de carbone et l'eau. Une nouvelle biomasse est produite dans les deux conditions (Smith, 1997 ; Lehman *et al.*, 2003).

# RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 7:** Présentation du mécanisme de biodégradation des polymères (Lehman *et al.*, 2003).

## 5.3. Biodégradation du polyéthylène

La biodégradation des polymères synthétisés est un processus très lent qui implique de nombreux facteurs environnementaux, suivi par l'action de certains micro-organismes (Albertsson et Banhidi, 1980 ; Ahmed *et al.*, 2012).

La biodégradation complète de polyéthylène d'un film en PEBD de 60  $\mu\text{m}$  d'épaisseur dans le sol peut prendre environ 300 ans, (Huang, 2008). Le polyéthylène est un polymère semi-cristallin de haut poids moléculaire, constitué exclusivement de longues chaînes hydrocarbonées, d'une structure de grande hydrophobicité qui le rend non-susceptible à la dégradation biologique (Tsai et Chang, 1996 ; Bourry et Favis, 1998).

En outre, vu leur grande dimension, les polyéthylènes sont incapables de pénétrer à l'intérieure des cellules microbiennes et digérées par les enzymes intracellulaires

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

produites par les micro-organismes à cause de leurs propriétés protectrices (**Huang, 2008**). Des travaux antérieurs réalisés par (**Tsai et Chang, 1996 ; Dedecker et Groeninckx, 1998 ; Chuai et al., 2003**) ont rapporté que les longues chaînes des n-alcanes, de masses moléculaires 5000 Da, sont assimilées par les microorganismes.

**Galloway et ses collaborateurs (2005)** ont signalé qu'un polyéthylène de poids moléculaire initial de 4000-28000 est dégradé en poids moléculaires inférieurs à 500 après trois mois d'incubation d'une culture fongique.

Les résultats obtenus de la dégradation de MEB ont montré la croissance des microorganismes (moisissures) sur la surface du polyéthylène, traduites par la formation des trous et des érosions sur la surface.

**(Veenstra et al., 2000)** ont rapporté sur le blanchissement de la région dégradée et l'apparition de petits trous sur la surface des films de PE lors de l'enfouissement dans le sol pendant 32 ans. **Ohtaki et coll (1998)** ont analysé des bouteilles en PEBD, exposées sur le sol, dans des conditions aérobies pendant une durée plus de 30 années par microscopie électronique (MEB) et par spectrométrie de masse (TOF-MS).

La réduction du poids moléculaire de parties dégradées et les micrographes obtenus ont indiqué la biodégradation des matériaux (**Su et al., 2009**).

**Shah et coll (2007)** ont enfoui des morceaux de polyéthylène de basse densité dans du sol, mélangé avec la boue des eaux usées pendant une durée de dix mois et l'examen microscopique a montré la présence de souches fongiques sur la surface des matériaux, expliquée de leur utilisation comme source de carbone par les microorganismes (**Phillips et Kao, 1986**).

Les souches fongiques isolées sont identifiées comme étant du *Fusarium sp. AF4*, *Aspergillus terreus AF5* et *Penicillium sp. AF6*. La capacité de ces souches fongiques à former un biofilm sur le polyéthylène est attribuée à la diminution de l'hydrophobicité de la surface. De plus, les changements structuraux observés par microscopie (MEB), se présentant sous forme de trous et d'érosions, montrent un endommagement de la surface du PE incubé avec les souches (**Phillips et Kao, 1986**).

La biodégradation du polyéthylène est fortement liée à la diminution de leur taux de cristallinité, l'amélioration du caractère hydrophile et/ou et la réduction des longueurs des chaînes par l'ajout d'un matériaux hydrolysables tels que l'amidon (**Su et al.,**

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

**2009; Oyama, 2009 ; Bourry et Favis, 1998).** Les additifs hydrophiles sont facilement dégradés en présence de certaines enzymes telles que l'amylase, produites par les microorganismes (**Galloway, 2005**).

Lors de la dégradation l'amidon, les vides produits au sein de la matrice du polymère, provoquent un accroissement de la surface de contact entre le PE et le milieu extérieur, ce qui favorise l'augmentation de l'adsorption de l'oxygène, l'oxydation des chaînes du PE (**Galloway, 2005 ; Minkova et al., 2002**).

En présence d'un additif pro-oxydant, la biodégradation aura lieu après une photodégradation et une dégradation chimique. Lorsque le pro-oxydant résulte d'une combinaison de métaux, le métal catalyse la peroxydation thermique du polymère et la biodégradation se produira sur des produits oxydés de faible poids moléculaires (**Galloway, 2005 ; Ferg et Bolo, 2013 ; Dagli et Kamdar, 1994**).

**Ferg et Bolo, (2013)** ont rapporté sur l'isolement huit souches de *Streptomyces* et de *Mucor rouxii* NRRL 1835 et *Aspergillus flavus* capables de dégrader des films de polyéthylène dans un milieu de culture contenant une concentration de 6% amidon.

Des travaux antérieurs réalisés par (**Pracella et al., 2002**) ont rapporté sur la biodégradabilité des film de polyéthylène, dans un milieu de culture, contenant de métaux de transitions et 12% d'amidon, inoculé avec *Phanerochaete chrysosporium*.

**Yamada-Onodera et coll (2001)** ont isolé *Penicillium simplicissimum* YK, capable de biodégrader le polyéthylène sans additifs. Cependant, le polyéthylène est exposé aux rayonnements UV ou à des agents oxydants, afin d'activer ce matériau inerte. Le polyéthylène est traité avec l'acide nitrique à une température de 80°C pendant 6 jours (**Dagli et Kamdar, 1994**).

L'exposition des morceaux de polyéthylène aux rayons Ultra-violettes, traités avec de l'acide nitrique, inoculé dans un milieu de culture riche en sels minéraux avec le *Fusarium sp. AF4* a montré une augmentation du taux de croissance et des changements structuraux considérable mis en évidence par IRTF, observés lors du traitement de PE (**Pedroso et Rosa, 2005**).

**Koutny et coll (2006)** ont signalé que des bêta et gamma-Protéobactéries ainsi que *Rhodococcus* forment de biofilms sur la surface de polyéthylène de basse densité, contenant des additifs du pro-oxydant, ce qui suggère leur rôle dans l'assimilation de

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

film du polyéthylène oxydé (Jafari *et al.*, 2005). Par ailleurs, Albersson et Carlsson, (1994) ont montré que le genre de l'*Arthrobacter parraffineus* est capable d'assimiler les produits de faibles poids moléculaires issus de la dégradation thermo-oxydative de polyéthylène (Lee *et al.*, 2011).

Roy et coll (2008) ont rapporté sur des résultats semblables sur la dégradation de films de polyéthylène basse densité, contenant du stéarate de cobalt comme pro-oxydant), inoculé dans un milieu de culture enrichi avec des espèces microbiennes appartenant au genre de *Bacillus* a causé une perte de 8% du poids du polymère et une augmentation considérable de la biomasse bactériennes (Martin et Averous, 2001).

L'absorbance à 1710-1715  $\text{cm}^{-1}$  (correspondant aux groupements carbonyles), 1640  $\text{cm}^{-1}$  et 830-880  $\text{cm}^{-1}$  (correspondant à aux doubles liaisons -C=C-), apparaissant après le traitement les radiations (UV et acide nitrique), ont diminué lors de l'incubation avec les consortiums microbiens (Pedroso et Rosa, 2005).

La dégradation du polyéthylène par les micro-organismes peut être améliorée par l'addition de surfactants tels que le (Tween 80, l'huile minérale), Mn (II) et l'éthanol, dans le milieu de culture (Williams, 1981 ; MacDonald *et al.*, 1996 ; Moon *et al.*, 2003 ; Tsuji et Ishizaka, 2001).

(Williams, 1981 ; Arena *et al.*, 2011) ont signalé que l'addition du surfactant tel que le Tween 80 dans le milieu de culture liquide, inoculé avec *Pseudomonas aeruginosa*, a favorisé la formation de biofilm sur la surface du polyéthylène, expliqué par l'orientation des groupes hydrophobes du surfactant vers la surface du polyéthylène.

Moon *et al.*, (2003) ont montré que *Rhodococcus rubber* est capable de dégrader environ 8% d'un film en polyéthylène pendant 30 jours, et l'augmentation de la colonisation de la surface du PE, lors de l'addition d'huile minérale et par conséquent la dégradation de 50%.

Shimao et ces collaborateurs (2001) ont mentionné que les espèces *Streptomyces*, produisent des enzymes extracellulaires, capables de dégrader la lignocellulose et le polyéthylène. MacDonald *et al.*, (1996) ont montré que les moisissures (ZU-154 et *Phanerochaete chrysosporium*) secrètent de la manganèse peroxydase (MnP), dont la production est accélérée par l'addition de Mn(II) dans le milieu de culture.



## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 1** : Enzymes extracellulaire impliquées dans la dégradation du polyéthylène

Micro-organisme	Enzyme	Références
<i>Streptomyces sp.</i>	Enzyme extracellulaire (non caractériser)	(Pometto <i>et al.</i> , 1992)
Champignons dégradant le bois	Lignin peroxidase, Manganese peroxidase, phnoloxidase, laccase	(Sangale <i>et al.</i> , 2012)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Polycaprolactone depolymerase	(Oda <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pseudomonas</i>	Lipase	(Skaryachan <i>et a.,l</i> 2015)

La biodégradation du polyéthylène en présence de consortium microbien présent dans l'environnement par l'utilisation de microorganismes sélectionnés, dans un milieu de culture dans des conditions de laboratoire contrôlées est représentée dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2**: La biodégradation du polyéthylène par les microorganismes (Huang, 2008)

Origine de Microorganismes	Echantillon	Microorganismes
Collection de cultures	PEBD avec prétraitement (chaleur et /ou UV)	<i>Gliocladium virens</i> ATCC 9645 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 <i>Penicillium pinophilum</i> ATCC 11797 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> H289
Collection de cultures	PEBDL/6% amidon/prooxydant	<i>Streptomyces viridosporous</i> ATCC 39115 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME 446
Collection de cultures	prétraitement UV/chaleur	<i>Streptomyces badius</i> ATCC 39117 <i>Streptomyces setonii</i> ATCC 39116
Collection de cultures	PEBD, PEBDL/prooxydant/ prétraitement thermique	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275 <i>Gliocladium virens</i> ATCC 9645 <i>Paecilomyces variotii</i> 10121 <i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 19010 <i>Streptomyces strain</i>
Collection de cultures	PEBD /prooxydant	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Collection de cultures	PEHD	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Collection de cultures	PEBD Fe prooxydant TDPA® prooxydants	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 20251 <i>Rhodococcus rhodochroust</i> ATCC 29672
Collection de cultures	PE/6% amidon (prétraitement thermique )	<i>Mucor rouxii</i> 1835 <i>Aspergillus flavus</i> <i>Streptomyces sp</i>
Paraffine dégradée	PEBD/amidon/Festearate/ prétraitement thermique PEBD /amidon, Mn stearate/ styrenbutadiene co-polymer/ prétraitement thermique	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
Sol	PEBD /photosensibilisateur UV/ prétraitement thermique	<i>Rhodococcus rubber</i>
Sol	PEBD / photosensibilisateur prétraitement thermique / UV	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
Sol	PEHD/prétraitement thermique + UV/ traitement avec acide nitrique	<i>Penicillium simplicissimum</i> YK
Sol	PEBD /60% Bionella	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium funiculosum</i>
Sol	PEBD /cobalt stearate	<i>Bacillus pumilus</i>
Mer	PEBD et PEHD avec et sans amidon/avec et sans prétraitement thermique	<i>Bacillus sphericus</i> GC subgroup IV <i>Bacillus cereus</i> subgroup A
Laboratoire	PEBD/ prétraitement thermique	<i>Rhodococcus ruber</i>

Plusieurs exemples de bactéries dégradant le plastique ont été rapportés sur le **Tableau 3**.

**Tableau 3** : Présentation des bactéries dégradatrices de polyéthylène.

<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	(Abrusci <i>et al.</i> , 2011 ; Suresh <i>et al.</i> , 2011 ; Aswale, 2010)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Priyanka and Archana , 2011; Abrusci <i>et al.</i> , 2011 ; Nwachukwu <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Bacillus sp.</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2007 ; Usha <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Bacillus megaterium</i>	(Abrusci <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Bacillus mycoides</i>	(Seneviratne <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus Xylanilyticus</i>	(Abrusci <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	(Priyanka and Archana, 2011 ; Kathiresan, 2003 ; Nanda <i>et al.</i> , 2010 ; Usha <i>et al.</i> , 2011 ; Skariyachan <i>et al.</i> , 2015)

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

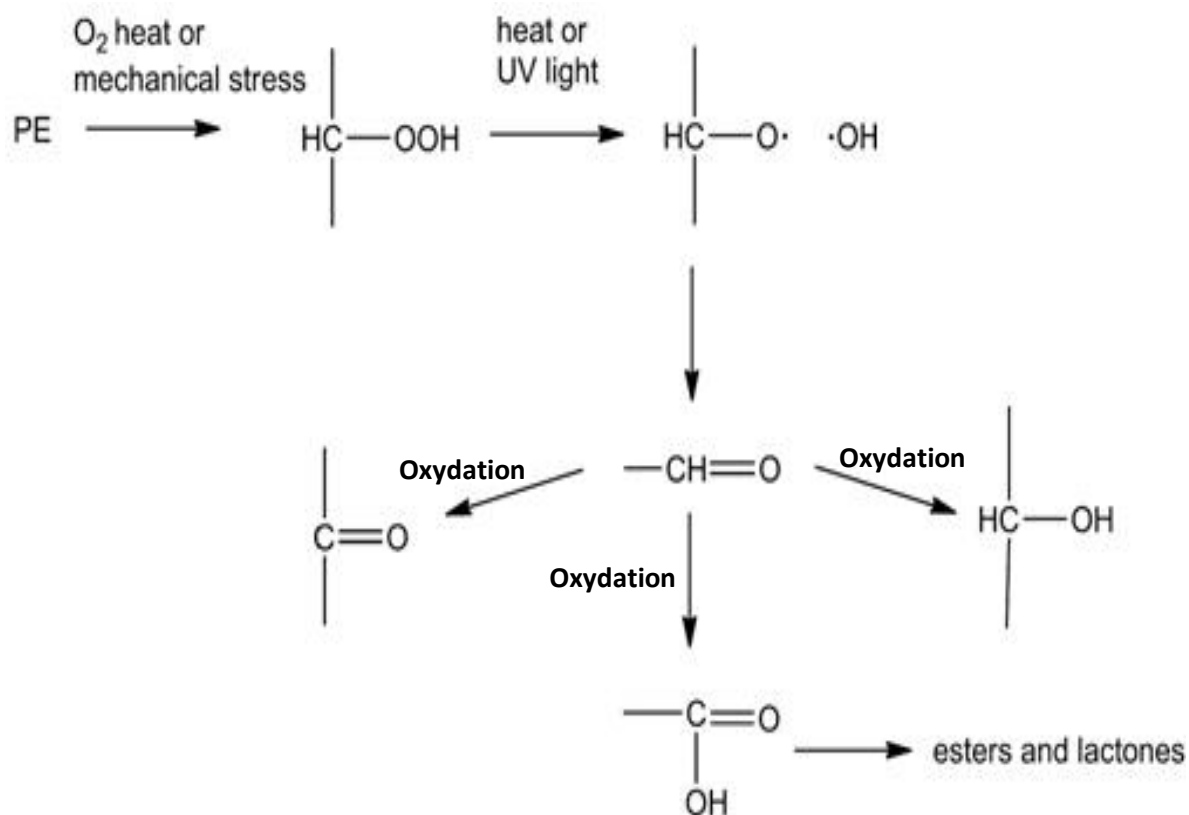
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Nwachukwu <i>et al.</i> , 2010 ; Kyaw <i>et al.</i> , 2012 ; Aswale, 2010)
	<i>Pseudomonas putida</i>	(Kyaw <i>et al.</i> , 2012 ; Nwachukwu <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Kyaw <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Sharma and Sharma, 2004)
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	(Reddy, 2008 ; Kathiresan, 2003 ; Usha <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Priyanka and Archana, 2011)
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	(Reddy, 2008 ; Kathiresan, 2003)
	<i>Streptococcus lactis</i>	(Priyanka and Archana, 2011)
	<i>Streptococcus aureus</i>	(Aswale, 2011)
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2007 ; Reddy, 2008 ; Kathiresan, 2003)
	<i>Micrococcus luteus</i>	(Priyanka and Archana, 2011)
	<i>Micrococcus lylae</i>	(Aswale, 2010)
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	(El-shafei <i>et al.</i> , 1998 ; Usha <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Streptomyces vinidosporus T7A</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1991 ; Pometto <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Streptomyces badius 252</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Streptomyces setonii 75 Vi 2</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1991)
<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus ruber</i>	(Sivan <i>et al.</i> , 2011 ; Chandra and Rustgi, 1997)
	<i>Rhodococcus Rhodochrous</i>	(Fontanella <i>et al.</i> , 2009 ; Bonhomme, 2003)
<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	(Priyanka and Archana, 2011)
<i>Listeria</i>	<i>Listeria</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bravibacillus</i>	<i>Bravibacillus Borstelensis</i>	(Hadad <i>et al.</i> , 2005 ; Abrusci <i>et al.</i> , 2011)
<i>Serratia</i>	<i>Serratia marscence</i>	(Aswale, 2010)
<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia steroids</i>	(Bonhomme <i>et al.</i> , 2003)
<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>	(Balasubramanian <i>et al.</i> , 2010)

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Diplococcus</i>	<i>Diplococcus sp.</i>	(Reddy, 2008)
<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella sp.</i>	(Reddy, 2008 ; Kathiresan, 2003)

### 5.4. Mécanisme de la biodégradation du polyéthylène

En général, la dégradation du polyéthylène est une combinaison de la dégradation oxydative et la biodégradation. La première étape consiste l'oxydation abiotique (rayonnements UV ou chaleur) alors que durant la deuxième étape, les micro-organismes dégradent les produits oxydés, de bas poids moléculaires, pour achever la biodégradation (Galloway, 2005). Le mécanisme de l'oxydation abiotique du PE conduit à la formation de composés carbonylés (Figure 8). La photo- ou la thermo- oxydation des polyoléfines de haut poids moléculaire, tel que le polyéthylène, sont des étapes indispensables puisque seuls les produits oxydés (500-5000 Da maximum) peuvent être dégradés et assimilés par les micro-organismes (Tsai et Chang, 1996 ; Dedecker et Groeninckx, 1998 ; Galloway, 2005 ; Dagli et Kamdar, 1994).



## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

**Figure 8:** Schéma simplifié montrant les produits de dégradation du polyéthylène (Tsuji *et al.*, 2002).

### 6. Taxonomie des genres bactériens impliqués dans la dégradation du polyéthylène à basse densité

#### 6.1 Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient au phylum des *Firmicutes*, découvert pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn. Les membres ce genre sont des bactéries à Gram positif, formant des endospores et se distinguent des autres bactéries formant des endospores par leur morphologie cellulaire (en forme de bâtonnet généralement), aérobies ou aéro-anaérofacsultatifs, par la production de catalase et par leur distribution ubiquitaire (Nicholson, 2002).

Ce genre englobe une variété d'espèces phénotypiquement hétérogènes, présentant un large éventail de besoins nutritionnels, de diversité physiologique et métabolique et la composition en base d'ADN (Claus et Berkeley, 1986).

Historiquement, les espèces sont regroupées en six grands groupes basés sur de nombreux caractères physiologiques, biochimiques et morphologiques (Priest *et al.*, 1993), ainsi que sur la capacité de formation de spores (Tableau 5) (Jonson, 1989).

Les études de la taxonomie numérique réalisées ont présenté un succès pour l'analyse des *Bacillus* provenant des sols et ont contribué à la compréhension de la distribution des espèces de ce genre.

La classification moderne est basée sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S. Des recherches récentes utilisant cette analyse ont confirmé des niveaux élevés d'hétérogénéité phylogénétique dans ce genre (Garveba *et al.*, 2003).

Rosler *et al.*, (1991) ont regroupé neuf espèces du genre *Bacillus* en quatre groupes. Cependant, Ash *et ces collaborateurs* (1991) ont séparé 51 espèces appartenant au genre *Bacillus* en cinq groupes phylogénétiquement distincts.

Les caractérisations génotypiques et phénotypiques complémentaires des espèces du genre *Bacillus* sélectionnées ont mené à la création de nouveaux genres multiples : *Amphibacillus* (Niimura *et al.*, 1990), *Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.*, 1992), *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993), *Aneurinibacillus* et *Brevibacillus* (Shida *et al.*,

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

1996), *Virgibacillus* (Heyndrickx *et al.*, 1998), *Gracilibacillus* et *Salibacillus* (Wäinö *et al.*, 1999), *Filobacillus* (Schlesner *et al.*, 2001), *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001), *Ureibacillus* (Fortina *et al.*, 2001), *Jeotgalibacillus* et *Marinibacillus* (Yoon *et al.*, 2001).

A cet effet, l'image finale de la taxonomie du genre *Bacillus* est encore loin d'être établie car de nombreuses espèces initialement décrites telles que *Bacillus* sont transférées vers des genres voisins. Néanmoins, Le genre *Bacillus* comprend plus de 200 espèces et est l'un des plus grands genres bactériens (Logan *et al.*, 2007).

**Tableau 5** : Classification du genre *Bacillus* (Priest *et al.*., 1993).

Groupes	Espèces représentantes	Caractéristiques
Groupe I	<i>B. polymyxa</i>	Anaérobies facultatives, fermentent une variété de sucres. Besoins de croissance : vitamines et acides aminés. Sécrètent : amylases, glucanases pectinases et pullulanases.
Groupe II	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> et <i>B. amyloliquefaciens</i>	Endospores ovales, aérobies stricts pour la plus part des espèces. Certaines espèces sécrètent de nombreuses enzymes extracellulaires : les $\beta$ -glucanases et protéases.
Groupe III	<i>Brevibacillus brevis</i>	Taxonomiquement moins définis.
Groupe IV	<i>B. sphaericus</i> , <i>B. insolitus</i> , et <i>B. psychrophilus</i> .	Groupe phylogénétiquement homogène. Tous aérobies stricts. Méso-diaminopimélique du peptidoglycane est remplacé par de la lysine ou de ornithine
Groupe VI	<i>B. stearothermophilus</i>	Thermophiles. Groupe physiologiquement et
		morphologiquement hétérogènes. Métabolisme diverses allant de la aérobies stricts à des types microaérophiles.
Groupe VII	<i>Alicyclobacillus</i> (genre)	Thermophiles acidophiles.

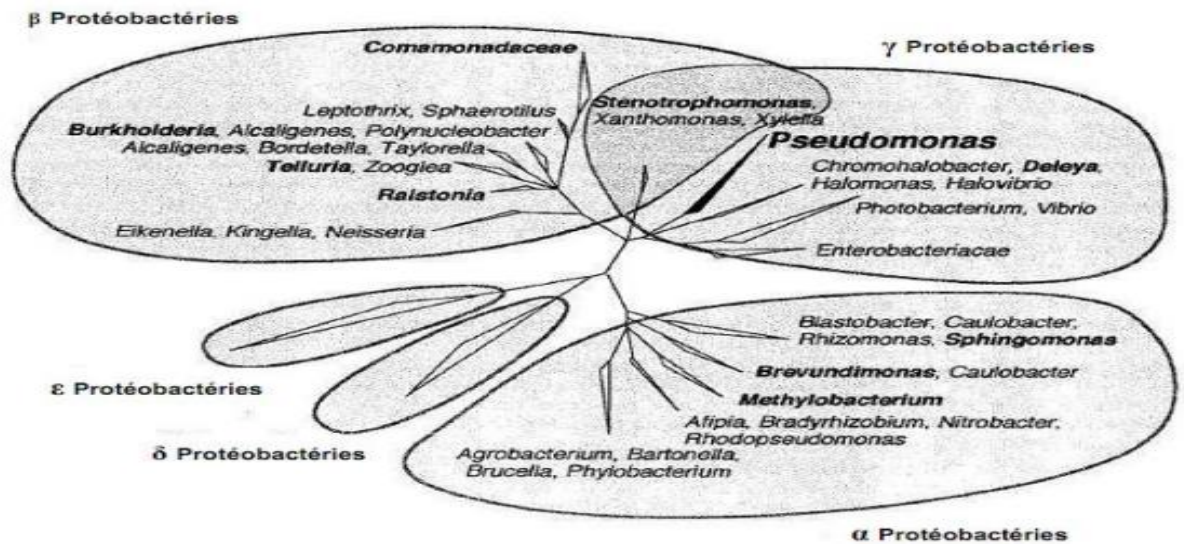
## 6.2 Taxonomie du genre *Pseudomonas*

### 6.2.1 Caractéristiques du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un groupe bactérien, appartenant à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

*Pseudomonas* (Migula, 1894), de nombreuses espèces lui sont assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement due à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Relations phylogénétiques entre les différents groupes de protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (**Bossis et al., 2000**).

### 6.2.1.1 Caractéristiques métaboliques

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif, non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent le processus de la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose).

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes possèdent tous une cytochrome oxydase c ayant un maximum d'absorption caractéristique à 552/554 nm, qui peut être mise en évidence par l'oxalate de N, N-diméthyl-paraphénylène-diainine (**Lelliot et al., 1966**). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certaines *Pseudomonas* sont chimio-organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie, utilisent de sources de carbones variables (versatilité nutritionnelle), et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (**Stanier et al., 1966**).

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Certaines espèces telles que *P. syringea* et particulièrement *P. aeruginosa* sont phytopathogènes, reconnues comme des pathogènes opportunistes et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique ((**Stanier et al., 1966 ; Mavrodi et al., 2001**))

Les températures de multiplication des espèces varient de 4-42°C sont caractéristiques de l'espèce *P. aeruginosa*, cependant, la température optimale de la croissance des espèces saprophytes est située entre 28-30°C. Par ailleurs, la majorité des espèces appartenant à ce genre se multiplient à des valeurs de pH inférieur à 4.5 (**Palleroni, 1984**). Certaines bactéries sont capables de dégrader des composés complexes tels que les protéines et les polysaccharides complexes (l'amidon, la cellulose) et le poly  $\beta$ -hydroxybutyrate; (**Palleroni, 1993 ; Palleroni, 1984**). En outre, l'aptitude dégradatrice de substances xénobiotiques par certains isolats a également retenu l'attention de différents chercheurs (**Latour et Lemanceau, 1997 ; Bossis et al., 2000**). *P. fluorescens* et *P. putida* sont caractérisées par leur capacité de dégradation de molécules aromatiques plus ou moins complexes.

L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (**Campbell et al., 1995 ; Latour et Lemanceau, 1997**). Le catabolisme de xénobiotiques par les *Pseudomonas spp* fluorescents se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes dégradatrices et présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une large gamme de composés (**Golovleva et al., 1992**).

Certaines populations de *Pseudomonas spp* fluorescents ont la possibilité de dissimilation de l'azote, plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (**Clays-Josserand et al., 1995 ; Matsubara et Zumft, 1982**).

*Pseudomonas spp* fluorescents contribuent d'une manière significative dans la réduction des nitrates et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques sont capables de résister aux nombreux agents antiseptiques ou antibiotiques (**Latour et Lemanceau, 1997 ; Euzéby, 2008**).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisant une couche d'exopolysaccharide entourant les cellules, et les protègent de la phagocytose par les macrophages chez les



## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

mammifères. La couche d'exopolysaccharide (EPS) permet la formation des biofilms, collées aux surfaces des cellules (**Visca et al., 2007**).

### 6.2.1.2 Classification du genre *Pseudomonas*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Cette définition doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques pour la différenciation des autres bactéries à Gram négatifs (**Palleroni, 2008**).

#### 6.2.1.2.1 Étapes de la classification

**Stanier et ses collaborateurs (1966)** dans une approche de clarification de la taxonomie du genre, ont publié un travail sur l'étude des caractéristiques nutritionnelles, basé sur l'utilisation de 146 composés organiques de 267 isolats du genre.

Dans la même décennie, la découverte du caractère de renaturation de l'ADN par **Marmur (1961)**, a permis la classification phénotypique des *Pseudomonas*, lors des essais d'hybridation ADN/ADN (**Colwell et Mandel, 1964 ; Colwell et al., 1965 ; Johnson et Ordal, 1968**).

(**Palleroni et al., 1973**) ont classé le genre *Pseudomonas* selon le degré d'homologies ARN/ADN en cinq sous-groupes d'ARNr. Toutefois, ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (**Peix et al., 2009**).

L'édition de 1974 du Bergey's Manual, dont leur classification s'est reposée sur l'étude des caractéristiques phénotypiques, et la composition en G+C a introduit les bactéries de ce groupe dans la famille des Pseudomonadaceae. Par ailleurs, dans la première édition du Bergey's Manual, la classification est basée sur le degré d'homologie ARN/ADN, dont le nombre d'espèces et les caractéristiques phénotypiques sont maintenus (**Palleroni, 1984**).

**Woese et ses collaborateurs (1984)** ont rapporté que la classification phylogénétique est basée sur l'amplification des gènes codant la région l'ARNr 16S, a permis la subdivision des protéobactéries en 15 genres appartenant aux classes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  proposé par **Stackebrandt et al., (1987)**. En même temps, *Pseudomonas acidovorans* et *P.*

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

*testosteroni* inclus dans le groupe ARNr III sont reclassifiés en 1987 dans le genre *Comamonas* (Tamaoka *et al.*, 1987), alors que les espèces *P. flava*, *P. palleroni*, *P. taeniospiralis*, *P. pseudoflava* et *P. carboxydoflava* seront reclassifiés deux ans plus tard dans le genre *Hydrogenophaga* (Willems *et al.*, 1989).

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres phylogéniques représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (Peix *et al.*, 2009).

Les espèces du groupe ARNr III telles que *P. facilis*, *P. delafieldii* et d'autres isolats cliniques sont reclassifiées dans le genre *Acidovorax* (Willems *et al.*, 1990), des espèces phytopathogènes telles que *P. avenae* et *P. catleyae* sont reclassifiées dans ce genre et introduites dans la classe des beta-Protéobacteria, au même titre que *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992) et *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995).

Les deux derniers genres proviennent de la reclassification des espèces du groupe ARNrII comme *P. cepacia* (designée comme espèce type du genre *Burkholderia*) *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* et *P. solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1992, 1995). Le groupe ARNr V, est phylogénétiquement plus proche de *Pseudomonas* (ARNr groupe I), *Xanthomonas maltophilia* reclassifié dans le genre *Stenotrophomonas* en 1993, appartenant à la classe des gamma-Proteobacteria (Palleroni et Bradbury, 1993).

Dans la première décennie, la révision taxonomique détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, est entreprise par Anzai *et al.*, (2000).

L'analyse des séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), a montré que 57 seulement appartenaient aux groupe des *Pseudomonas* sensu stricto; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes :

Le groupe des *P. syringae*.

Le groupe des *P. chlororaphis*.

Le groupe des *P. fluorescens*.

Le groupe des *P. putida*.

Le groupe des *P. stutzeri*.

Le groupe des *P. aeruginosa*.

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

Le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, de nombreuses espèces mal classées telles que *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* sont désormais des sous espèces du groupe *P. chlororaphis* (**Peix et al., 2007**), qui compte actuellement trois sous espèces: *P. chlororaphis subsp. chlororaphis subsp. nov.*; *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca subsp. nov., comb. nov.* et *P. chlororaphis subsp. aureofaciens subsp. nov., comb. nov.* (**Peix et al., 2007**).

### 6.2.1.2.2. Classification contemporaine

L'édition actuelle du Bergey's compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification d *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique ((**Palleroni, 2008 ; Peix et al., 2009**).

#### 6.2.1.2.2.1. Caractéristiques phénotypiques

L'étude des caractéristiques phénotypiques est basée sur l'étude de la forme cellulaire, le type de flagelle, l'utilisation des sources de carbones tel que : les acides organiques, les polyols, les acides aminés, la croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exo-enzymes et la production d'antibiotiques (**Palleroni, 2008**).

#### 6.2.1.2.2.2. Études chémo-taxonomiques

Parmi les caractéristiques utilisées dans la taxonomie des *Pseudomonas*, l'utilité des études chimio-taxonomiques est prouvée dans la reclassification des espèces (**Peix et al., 2009**). En outre, la présence de certains lipides polaires telles que le phosphatidyl-glycerol, diphosphatidyl-glycerol et la phosphatidyl-éthanolamine (**Camara et al., 2007**), les ARN stable (5S rRNA et tRNA) de faible poids moléculaire (**Höfle, 1990**), les quinones et d'autres marqueurs sont utilisés dans la reclassification de certains genres de *Pseudomonas* (**Kampfer et al., 2008**). **Auling et al. , (1991)** ont contribué à la différenciation des espèces de ce groupe par l'étude de la composition en polyamine chez les Protéobacteria. Par ailleurs, **Janse et al., (1992)**, ont analysé les acides gras d'une collection de phytopathogènes opportunistes, pour la clarification de la position taxonomique de souches de *P. marginalis* incluses dans le groupe de *P. fluorescens*. **Jean-Marie Meyer** et ces collaborateurs (**2002**), ont mis en évidence la production des sidérophores chez les *Pseudomonas spp.* fluorescents et non fluorescents.

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

L'approche taxonomique, basée essentiellement sur la caractérisation isoélectrophorétique des sidérophores, de pyoverdine et la détermination de la spécificité des pyoverdines des souches productrices a permis la caractérisation des espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de la pyoverdines spécifiques aux espèces (Meyer *et al.*, (2002, 2007). Delorme *et al.*, (2002) et Ramette *et al.*, (2011) ).

Le pouvoir de résolution et l'exactitude de cette nouvelle technique taxonomique est améliorée par la détermination de la masse moléculaire des pyoverdines par spectroscopie de masse (Meyer *et al.*, 2008). Actuellement, les techniques modernes d'analyse de biomolécules sont appliquées dans la taxonomie des *Pseudomonas*. En effet, l'empreinte génétique par spectroscopie à fluorescence (spectres d'émission de fluorophores intrinsèques: NADH, tryptophane et un complexe d'acides aminés aromatiques et d'acides nucléiques), a permis une discrimination entre les genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* ou *Stenotrophomonas* avec une grande sensibilité. Malgré la pertinence de ces approches chimio-taxonomique avec les études phénotypiques et écologiques, le séquençage des gènes a permis des avancées majeures dans la taxonomie de *Pseudomonas*.

### 6.2.1.2.2.3. Caractérisations génétiques

Les gènes ribosomiaux sont présents chez tous les organismes, possèdent la même fonction vitale : la synthèse protéique. Ces caractéristiques n'ont fait que les ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes. En effet ces molécules possèdent un niveau d'évolution assez élevé pour assurer une variabilité entre les différentes espèces ; mais avec un degré de conservation suffisant pour assurer que ces différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces. Parmi tous les ARN ribosomiaux seul le gène ARNr16S remplis ces deux caractéristiques, le gène ARNr23S est extrêmement conservé alors que le gène ARNr5S est trop petit (Peix *et al.*, 2009). A cet effet, le gène ARNr16S est devenu la molécule clé de la classification des procaryotes (Anzai *et al.*, 2000 ; Palleroni, 2008).

Parfois, l'analyse du gène ARNr16S est insuffisante dans la différenciation entre des espèces très proche. D'autres gènes ayant démontré leur importance dans la

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

différenciation entre les espèces sont analysées. Ces gènes nommés gènes de ménage : *recA* (recombinase A), *rpoD* (facteur  $\sigma$ 70 de l'ARN polymérase), *gyrB* (sous unité  $\beta$  de l'ADN gyrase), *rpoB* (sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase), ont permis la différenciation des espèces de *Pseudomonas* (**Hilario et al., 2004**).

En effet, la discrimination entre des espèces très proches de *Pseudomonas* est obtenue par l'analyse du gène *rpoB*. L'arbre phylogénétique obtenue avec ce gène donne une résolution 3 fois plus importante que celui obtenu avec le gène ARNr16S (**Ait-Tayeb et al., 2005**). Pourtant le gène ARNr16S a permis la différenciation des sous espèces de *P. chlororaphis* (**Peix et al., 2007**).

Cependant, l'analyse des gènes de ménage n'est pas communément utilisée dans la description des espèces de *Pseudomonas*. Et seulement, la description des gènes *rpoD*, *gyrB*, *rpoB* est incluse dans des descriptions récentes de *Pseudomonas* : *P. xiamenensis* (**Lai et Shao, 2008**), chez 107 espèces de référence de *Pseudomonas* (**Mulet et al., 2010**), et chez *P. syringae*, *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (**Ramette et al., 2011**).

Un autre marqueur phylogénétique des ITS (intergenic spacer), région située entre ADNr 16S-23S est utilisé dans les études taxonomiques. Cette séquence présente une grande variabilité tant du point de vue taille que séquence, permettent ainsi une distinction entre des espèces très proches (**Gurtler et Stanisich, 1996**).

Des protocoles spécifiques utilisant des amorces universelles, sont désigné pour l'analyse de cette séquence chez les *Pseudomonas* environnementaux (**Locatelli et al., 2002**). Une méthode prometteuse pour l'identification des microorganismes a permis l'analyse de 300 échantillons en une seule fois est le MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), par l'analyse des protéines ribosomiques (**Pineda et al., 2003**).

### 6.3 Taxonomie du genre *Enterobacter*

Selon le manuel de Bergy's, le genre *Enterobacter* proposé par Hormaeche et Edward en 1960 appartient à la famille des Enterobacteriaceae, à l'ordre Enterobacteriales, à la classe Gamma Proteobacteria, au phylum Proteobacteria, et au domaine des Bacteria (**Grimont et Grimont, 2002**). Jusqu'à 1963, ce genre est composé de deux espèces : *Enterobacter aerogenes* (Décrite par **Escherich en 1885**) et l'espèce type *Enterobacter cloacae*. Vers la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, un total de 15 espèces appartenant au

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

genre *Enterobacter* : *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens* et *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter taylora*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter pyrinus*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter sakazakii* et *Enterobacter intermedius* (**Grimont et Grimont, 2006**). Les études taxonomiques basées sur l'hybridation ADN-ADN, ont mené au transfert de trois espèces d'*Enterobacter* aux genres alternatifs (*Enterobacter intermedius* = *Kluyvera intermedia* (**Pavan et al., 2005**), *Enterobacter agglomerans* = *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter sakazakii* = *Cronobacter* spp.) (**Lehner, 2011**)

Pendant la dernière décennie, 17 nouvelles espèces sont introduites dans ce genre : *Enterobacter cowanii* (**Inoue et al., 2000**), *Enterobacter ludwigii* (**Hoffmann et al., 2005**), *Enterobacter pulveris* (**Stephan et al., 2008**), *Enterobacter turicensis*, *Enterobacter helveticus* (**Stephan et al., 2007**), *Enterobacter oryzae* (**Peng et al., 2009**), *Enterobacter radicincitans* (**Kampfer et al., 2005**), *Enterobacter arachidis* (**Madhaiyan et al., 2010**), *Enterobacter massiliensis* (**Lagier et al., 2013**), *Enterobacter mori* (**Zhu et al., 2011**), *Enterobacter siamensis* (**Khunthongpan et al., 2013**), *Enterobacter oryziphilus* et *Enterobacter oryzendophyticus* (**Hardoim et al., 2013**), *Enterobacter sacchari* (**Zhu et al., 2013**), *Enterobacter xiangfangensis* (**Gu et al., 2014**), *Enterobacter tabaci* (**Duan et al., 2015**), *Enterobacter muelleri* (**Kampfer et al., 2008**).

L'étude de génotypique du hsp60-et rpoB, d'analyse MLSA et d'hybridation génomique comparative (CGH) a montré que le genre d'*Enterobacter* comporte actuellement 29 espèces : *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* et *Enterobacter nimipressuralis* étroitement liées à *Enterobacter cloacae* (**Lehner, 2011**).

### 6.3.1 Habitat

Les espèces du genre *Enterobacter* sont souvent rencontrées dans l'environnement naturel tel que le sol, l'eau et la végétation, également dans une vaste gamme de produits alimentaires (viandes, poissons, œufs, produits laitiers, grains et noix, pâtes et confiseries) (**Lehner, 2011**).

## RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

### 6.3.2 Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Enterobacter* sont des bacilles droits à Gram négatif, de 0,6-1,0 µm de diamètre sur 1,2-3,0 µm de longueur, se présentent de manière isolée, groupée, ou en courtes chainettes ; mobiles par des flagelles péritriches (généralement de 4-6) et asporogènes. Le pourcentage de GC % de leur ADN est de l'ordre de (52-60 %). Environnementalement 80 % des souches d'*Enterobacter aerogenes* isolées sont entourées par une capsule, (**Grimont et Grimont, 2002 ; Lehner, 2011**).

L'isolement d'*Enterobacter spp.* s'effectue sur les milieux de cultures tels que Drigalski, éosine bleu de méthylène, MacConkey et Hektoen et se développent dans des conditions aéro-anaérofacultatives à des températures de (30, 37°C), forment des colonies rondes, de 2-3 mm de diamètre, légèrement irisées ou mates, sèches ou mucoïdes et avec des contours irréguliers. Des virements de couleur sur le milieu de culture sont observés lors de la fermentation du lactose chez 80% des souches (**Lehner, 2011**). Les espèces de ce genre présentent les mêmes caractères biochimiques généraux des entérobactéries telles que la fermentation du glucose avec la production d'acide et de gaz, coloration négative avec rouge méthyle, oxydase négative, catalase positive et Voges-Proskauer positive.

**CHAPITRE II.**

**MATERIEL ET**

**METHODES**



# MATERIELS ET METHODES

## 1. Isolement et criblage de souches bactériennes dégradatrices du polyéthylène à basse densité

### 1.1 Echantillonnage

Des échantillons de sol sont prélevés dans des conditions d'asepsie à partir d'une profondeur de 10 cm des trois différentes stations de décharge publique riches en déchets plastiques à la wilaya de Tlemcen (Algérie). Le premier échantillon est prélevé partir de la station de décharge de Nedroma (**Figure 10**), le deuxième de la nouvelle décharge de Tlemcen (**Figure 11**) et le troisième de l'ancienne décharge de Tlemcen ville (**Figure 12**). Les échantillons sont récoltés dans des pots stériles étiquetés et transportés directement au laboratoire.



**Figure 10** : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la décharge publique de Nedroma.



**Figure 11 :** Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la nouvelle décharge publique de Tlemcen.



**Figure 12 :** Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de l'ancienne décharge publique de Tlemcen.

# MATERIELS ET METHODES

## 1.2 Enrichissement

Une pesée de vingt-cinq gramme de sol (25 g) prélevée après leur séchage à une température ambiante (25°C) pendant 2 heures, est inoculé dans un volume de 225 ml d'eau physiologique stérile, homogénéisé à l'aide d'un vortex et laissé reposer pendant 30 min. Les surnageant sont recueillis dans des flacons stériles, et des dilutions décimales ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) sont préparées à partir de la solution mère.

Ensuite, un volume de 100 µl de chaque dilution décimale est ensemencé dans des boîtes de Pétri, contenant le milieu de culture minéral gélosé (Annexe 01), additionné d'une pesée d'un gramme de la poudre de polyéthylène (1g du PE) comme seule source de carbone, incubé à une température de 30 °C pendant 10 jours (**Tribedi *et al.*, 2013**). Des repiquages successives sont effectuées sur milieu de culture gélosé (Annexe 01) pour purification des colonies isolées, sélectionnées dégradatrices de polyéthylène.

## 2. Test de biodégradation du polyéthylène à basse densité

La mise en évidence de la dégradation de polyéthylène à basse densité est procédé par la fragmentation des films de polyéthylène en petits morceaux d'une dimension de 3 cm, séchées pendant 24 heures à une température de 60°C, désinfectées dans de l'éthanol à une concentration de 70%, pendant 30 minutes et introduites dans des flacons stériles, contenant un volume de 40 ml de milieu de culture minéral liquide (Annexe 01).

Les flacons stériles sont inoculés avec un volume de 2 ml d'une pré-culture bactérienne jeune préalablement cultivé dans un bouillon nutritif. La biomasse bactérienne est ensuite récupérée par microcentrifugation à une vitesse de 1000 rpm, lavée avec un milieu de culture minéral (**Sivan *et al.*, 2006**).

Le test de la biodégradation du polyéthylène à basse densité est effectué lors de l'incubation à une température de 30°C avec agitation à une vitesse à 120 rpm pendant des intervalles de temps de (30, 90, et 120 jours) respectivement.

## Mesure de la perte de masse

La mesure de perte de masse du poids du LDPE après incubation le biofilm bactérien est retiré de la surface par incubation des échantillons dans des flacons contenant 2% (v/v) de solution aqueuse solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) pendant 4 h. Ce détergent s'est avéré efficace pour éliminer les résidus du biofilm. Les échantillons du LDPE sont collectées sur un papier filtre, rincées à l'eau distillée et ensuite séché une nuit à 60°C avant d'être finalement pesé (**Bhone *et al.*, 2012**).

## 2.1 Conservation des souches dégradant le PEBD

### Conservation courte durée

La conservation à court terme est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées dégradatrices de PEBD dans des tubes à essai, contenant de la gélose nutritive et l'incubation à une température 30°C pendant 24 heures. Les cultures obtenues sont maintenues à une température 4°C et le renouvellement des souches est effectué par des repiquages successifs dans un intervalle de temps de 6 semaines.

### Conservation longue durée

A partir des cultures jeunes de 24h (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation à 1000 tours par minute pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé le milieu de culture de conservation est ajouté sur le culot. Ce milieu contient 70% du BHIB et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes éppendorfs à une température de -20 °C.

## 3. Optimisation des paramètres de croissance

L'influence de la concentration en NaCl, de la température et du pH sur la croissance est déterminée en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants. La croissance était suivie durant 24h et la densité optique était mesurée à une longueur d'onde de 590 nm.

# MATERIELS ET METHODES

## 3.1 Influence de la concentration en NaCl

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance des souches est évalué selon la méthode décrite par **Joshi et al. (2008)**. Les souches sont ensemencées dans le milieu minéral, ajusté à une valeur de pH 7,0 en présence de différentes concentrations en NaCl (0, 1, 2, 4, 6, 8, 8.5 9%), incubées à une température de 30°C.

## 3.2 Effet du pH

L'influence du pH sur la croissance a est explorée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées dégradatrices de PEBD dans le milieu minéral, ajusté à des valeurs de pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 et 11.0), incubées à une température de 30°C.

## 3.3 Température optimale de croissance

L'influence de la température sur la croissance est explorée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées dégradatrices de PE dans le milieu minéral, ajusté à une valeur de pH 7,0, et l'incubation à différentes températures (20, 28, 30, 37, 40, 45, 50, 55°C).

## 3.4 Effet du CuSO<sub>4</sub> sur l'activité de la biodégradation du PEBD

L'influence du Cuivre sur la biodégradation du PEBD, est explorée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées dégradatrices de PE dans le milieu minéral additionné à 50µM du CuSO<sub>4</sub>, avec agitation à une vitesse à 120 rpm, et incubées à la température convenable durant 30jours (**Miriam et al., 2013**).

## 4. Identification des souches isolées

### 4.1 Identification phénotypique

#### 4.1.1 Examen macroscopique des colonies

L'étude des caractères visibles à l'œil nus sont : forme, taille, couleur et aspect (visqueuse).

## 4.1.2 Examen microscopique

### Observation à l'état frais

La mobilité des bactéries est étudiée par observation microscopique à l'état frais sur cultures en phase de croissance dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle, et confirmée par repiquage sur milieu spécifique : mannitol-mobilité.

### Coloration de Gram

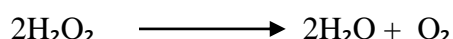
L'examen microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules (Taille des cellules, la forme, mode de regroupement, et la quantité approximative des colonies par champ microscopique), et de distinguer deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram négatives qui se colorent en rose et les bactéries à Gram positives qui apparaissent violettes. (Guiraud, 1998).

## 4.1.3 Tests biochimiques et physiologiques

### 4.1.3.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires

#### 4.1.3.1.1 Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Le test se révèle en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 10 volumes. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992).

#### 4.1.3.1.2 Test de l'oxydase

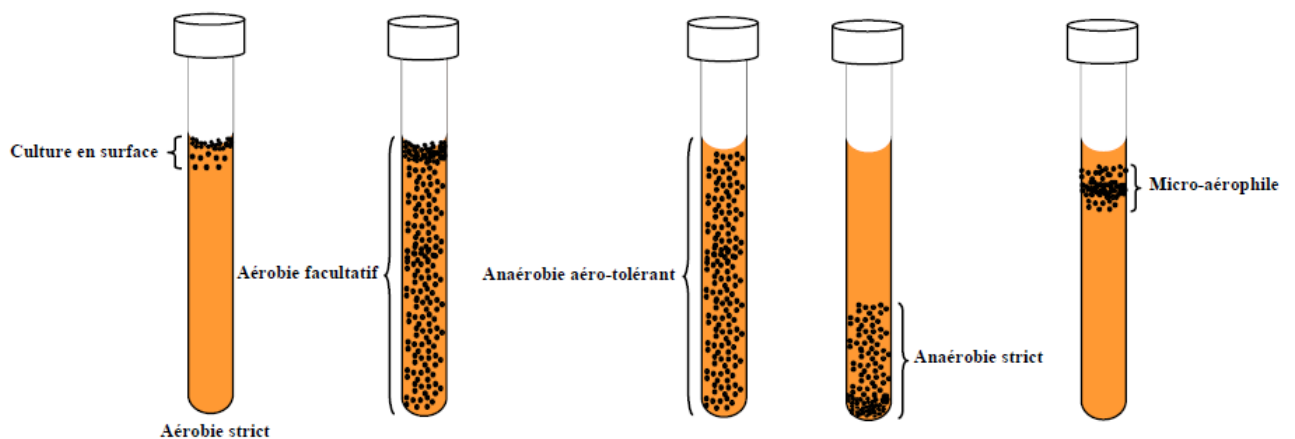
L'oxydase est recherchée sur papier filtre selon la technique de Kovacs (1956) : une colonie est étalée sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. Une réaction positive se traduit par

## MATERIELS ET METHODES

l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

### 4.1.3.1.3 Type respiratoire

La détermination du type respiratoire s'effectue sur la gélose viande foie semi-solide à 0,6% avec une valeur de pH de 7,6. Le milieu est régénéré au bain-marie, refroidi à une température de 45°C, coulé dans des tubes à essai stériles. Les tubes sont ensuite inoculés à l'aide d'une pipette boutonnée et incubés à une température 30°C pendant 24 heures (**Figure 13**) (**Prescott, 2002**).



**Figure 13** : Détermination du type respiratoire (**Prescott, 2002**).

### 4.1.3.1.4 Mannitol mobilité

La mise en évidence de la dégradation du mannitol et la mobilité des bactéries isolées, sélectionnées dégradatrices de PEBD est effectuée lors de leur ensemencement par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur et l'incubation à une température de 30°C pendant 24 heures. La fermentation du mannitol se manifeste par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune et la mobilité des bactéries par leur diffusion toute au long de la ligne d'ensemencement (**Gerhardt *et al.*, 1994**).



## MATERIELS ET METHODES

### 4.1.3.1.5 Le test de Citrate de SIMMONS

La mise en évidence de l'utilisation du citrate de Simmons comme source de carbone est effectuée lors de l'inoculation des bactéries isolées, sélectionnées dégradatrices de PEBD sur le milieu de culture de citrate de Simmons et l'incubation à une température de 30°C pendant 24 heures. La lecture positive se manifeste par le bleuissement de la couleur du milieu de culture lors de la décarboxylation oxydative.

### 4.1.3.2 Identification par la galerie API20E

La mise en évidence des tests biochimiques suivants tels que la recherche de la  $\beta$ -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H<sub>2</sub>S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres est effectués par l'utilisation de la galerie API 20E. La galerie API 20E (**Figure 14**) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures, dont la lecture et l'interprétation des résultats obtenus sont effectuées à l'aide d'un catalogue analytique et des matrices d'identification, en utilisant le tableur Excel. La base de données est fournie sous forme d'un tableau (Annexe 02) donnant, pour chaque taxon et pour chaque caractère, sa probabilité d'être positif (Annexe 03) (**Joffin et Leyral, 2006**).



**Figure 14** : Aspect de la galerie API 20 E avant l'inoculation par les souches sélectionnées.

## 4.2 Identification géotypique

### 4.2.1 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN génomique des bactéries isolées, sélectionnées dégradatrices de polyéthylène à basse densité, inoculées sur milieu de culture liquide LB, incubées à 30°C avec agitation de 120 rpm, pendant 24 h est réalisée selon la méthode décrite par **Samrook et Russel (2001)** avec quelques modifications. Cette technique consiste à introduire une suspension bactérienne d'un volume de 1,5 ml dans des Eppendorfs stériles. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à une vitesse 5000 rpm (4100g) pendant 10 minutes tandis que le surnageant ont été éliminés. Par la suite, le culot est remis en suspension dans 200 µl de tampon de lyse (200 µl de triton 200%, 1000 µl de SDS 1%, 200 µl de NaOH à 100 mM, 100 µl de Tris à 10 Mm, 20 µl d'EDTA, et 6,68 ml de H<sub>2</sub>O), et 0,3 g de billes en verre sont ajoutées dans les tubes contenant les cellules et le tampon de lyse pour éclater la paroi des bactéries à gram positive. Ensuite, un volume de 200 µl de phénol: chloroforme: alcool isoamylique est ajouté et homogénéisé à l'aide d'un Vortex, puis centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm pendant 4 °C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml.

Ensuite, la solution est centrifugée à 13000 rpm pendant 5 min à 4 °C. L'ADN obtenu est précipité à l'aide d'un volume de 1 ml d'éthanol à une concentration de 70% (-20 °C), et centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C, le surnageant est ensuite éliminé, l'ADN est séché à l'air pendant 10 mn, et le culot est resuspendu dans un volume de 50 µl d'eau distillée stérile, conservé à température de 4°C.

### 4.2.2 Dosage de l'ADN au Nanodrop

Lors des différentes extractions effectuées, les quantités d'ADN purifiées sont vérifiées par la technologie NanoDrop (Thermo Fisher Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) et quantifiées la concentration de l'ADN recueillie lors de l'extraction. L'appareil permet la réalisation d'un dosage spectrophotométrique en utilisant une faible quantité d'ADN.

## MATERIELS ET METHODES

Cette technique consiste le dépôt d'un volume de 1µl de l'ADN sur la cellule de l'appareil, renfermant un système d'aimant, permettant la formation d'une colonne de liquide entre les deux surfaces et la lecture permettant la mesure du spectre. Toutes les mesures effectuées sont enregistrées en temps réel dans un ordinateur. L'absorbance de l'acide nucléique est mesurée à une longueur d'onde de 260 nm, les protéines à 280 nm et les composés organiques tels que le phénol à 230 nm. Les rapports  $260_{nm}/280_{nm}$  et  $260_{nm}/230_{nm}$  donnent le degré de pureté d'ADN et de phénol respectivement (Prieur *et al.*, 2004; Michoud, 2014).

### 4.2.3 Amplifications PCR

Les amplifications PCR sont réalisées à l'aide un thermocycleur Mastercycler Nexus Eppendorf. Les amorces fD1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG(20) et rD1 AAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC (23) sont utilisées. L'amplification d'ADN est réalisée avec la Taq ADN polymérase. Le mix réactionnel est composé des solutions suivantes : 1 µl d'ADN matrice, 2,5 µl de Tampon 10X «*Incubation mix Taqpolymerase with MgCl<sub>2</sub>*», 0,5 µl de mix de dNTP (10 mM), 1 µl de chacune des amorces (10 µM) et de l'eau ultra-pure (qsp 25 µl). Après avoir placé les tubes dans un thermocycleur, l'amplification est programmée comme suit :

- ✓ Dénaturation initial : 95 °C pendant 2 minutes → 1 cycle
  - ✓ Dénaturation : 94 °C pendant 40 sec
  - ✓ Hybridation : 56 °C pendant 45 sec
  - ✓ Elongation : 72 °C pendant 1 minute
  - ✓ Elongation finale : 72 °C pendant 8 minutes → 1 cycle.
  - ✓ Fin : 10 °C
- } 35 cycles

### 4.2.4 Électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de vérifier la présence d'ADN, les produits de PCR obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse horizontale (35 min, 90V et 300 mA) sur gel d'agarose 1% et révélés dans un bain de tampon TAE 1X (tris 4,8 g/l, acétate de sodium 0,41 g/l, EDTA 0,34 g/l, eau distillée qsp 1 l) au BET (1,5 mg/l). Le BET introduit précédemment dans le gel permet la visualisation de la migration lors de leur

## MATERIELS ET METHODES

intercalation entre les bases de l'ADN et leur fluorescence sous l'effet de l'excitation avec les rayons ultra-violettes. La révélation des gels est réalisée à l'aide d'un transilluminateur, qui permet la visualisation de la taille des amplicons. Par ailleurs, des contrôles négatifs sont réalisés avec de l'eau distillée.

### 4.2.5 Purification de l'ADN

Un volume de 10 µl d'une solution digestive du gel d'agarose est ajouté au fragment d'ADN séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, transféré dans un Eppendorf stérile, incubé à une température de (50-65°C) jusqu'à la dissolution du gel. La solution est ensuite transférée dans un Eppendorf, incubée à température ambiante pendant une minute, centrifugée à une vitesse de 16000 rpm pendant une minute. Des lavages successifs sont procédés par l'ajout d'un volume de 700 µl d'une solution de l'éthanol, centrifugée à une vitesse de 16000 rpm pendant une minute. Les microtubes d'Eppendorfs contenant la solution sont ouverts pendant une minute, afin d'assurer l'évaporation de l'éthanol. Ensuite, un volume de 50 µl d'une solution de la nucléase est ajouté à la solution d'ADN, incubé à une température ambiante pendant une minute, centrifugé à une vitesse de 16000 rpm pendant une minute, conservé à une température 4°C ou -20°C.

### 4.2.6 Séquençage

Les produits de PCR sont envoyés à la société EurofinsGenomics avec les amorces (10 µM) correspondantes pour séquençage par la méthode de Sanger. La réaction de séquençage se fait en présence de plusieurs réactifs : les fragments d'ADN amplifiés par la PCR, une amorce, l'ADN polymérase, les quatre nucléotides (A, T, C, G) (dNTP) et didésoxyribonucléotide (ddNTP). Dans un premier temps le mélange est chauffé pour que les deux brins d'ADN se séparent. Lorsque la température descend l'amorce s'hybride sur sa séquence complémentaire. L'ADN polymérase est fixé à l'extrémité 3'OH de l'amorce pour synthétiser le brin d'ADN en intégrant les nucléotides complémentaires. Aléatoirement un didésoxyribonucléotide est incorporé et provoque l'arrêt de synthèse.

## MATERIELS ET METHODES

L'échantillon contenant plusieurs millions de fragment d'ADN, ce qui permet l'obtention d'une séquence complète. Par la suite les produits de réaction de séquençage sont passés par un gel capillaire traversé par un courant électrique. Pendant la migration, les fragments sont migrés en fonction de leurs tailles, du plus court au plus long, et captés par un laser. Chaque type de ddNTP émet une lumière à une longueur d'ondes caractéristique est enregistré dans un logiciel. Après traitement, un électrophorégramme permet de visualiser les pics de couleurs correspondant à une lettre de la séquence (A, T, C, G) et de reconstituer la séquence complète.

### 4.2.7 Analyse des séquences

Les séquences de gènes des ARNr 16S, amplifiées par la technique de la PCR, obtenues sont soumises à une recherche des degrés d'homologies de séquences par l'utilisation du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) et la base de donnée EZBiocould pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans GenBank.

Les alignements de séquences sont réalisés à l'aide du logiciel CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994).

L'analyse phylogénétique se repose sur des hypothèses de la nature de l'évolution des gènes, modélisés par l'utilisation des méthodes mathématiques et l'analyse phylogénétique, désormais réalisable grâce à un ensemble de programmes informatiques MEGA.6. L'arbre phylogénétique est construit avec la méthode du Neighbor-Joining (NJ), basée essentiellement sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux (Saitou et Nei, 1987). Les corrections sont effectuées par Nucleotide Maximum Composite Likelihood qui tient compte des transitions et des transversions. Les niveaux de confiance de la topologie des arbres phylogénétiques obtenus par la méthode de Neighbor-Joining (MEGA .6) sont estimés par la méthode des analyses de rééchantillonnage « bootstrapping » des données avec 1000 répliques.

**CHAPITRE III.**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSION**

### 1. Isolement et criblage des bactéries dégradatrices du polyéthylène à basse densité

La collecte des échantillons a été réalisée à partir de trois sites de décharges publiques à la Wilaya de Tlemcen, où le totale des sacs en plastique s'accumulent qui se traduit finalement par une énorme pile de déchets. Ce stock devient le lieu de reproduction d'une flore microbienne puissante.

L'isolement des souches bactériennes productrices d'enzymes capables de dégrader le polyéthylène à basse densité a été effectué à partir de trois échantillons prélevés au niveau de différents sites des décharges publiques.

La culture bactérienne a été réalisée sur un milieu minéral gélosé contenant du PEBD (0.1%); comme seule source de carbone. La croissance a été remarquée à partir de 4 à 5 jours d'incubation. Une zone opaque a été observée autour de la colonie. Après 10-30 jours ; une zone transparente claire a été formée, le diamètre de la zone varie de 2 à 5 mm (**Figure 15**). Cette même constatation a été observée lors des travaux de **Pramila et Vijaya (2011)** menés sur d'autres microorganismes prélevés à partir des sites de décharge de Pallikaranai, Chennai (Inde). Selon **Deepika et Jaya (2015)** cette observation témoigne la dégradation du polyéthylène à basse densité

A la lumière de cette observation qui représente un criblage primaire, 29 souches dotées productrices d'enzyme capable de dégrader le PEBD ont été sélectionnées. Une sélection sur la base du morphotype et de l'aspect microscopique a été faite, retenant ainsi que les souches différentes. 11 souches ont été maintenues à la base de ces deux critères pour le test de dégradation du PEBD. De ce fait, le phénotype de ces souches sera décrit, et qui sera couplée à une analyse génotypique. L'ensemble constituera une approche polyphasique d'intérêt (**Stackebrandt et al., 2002**).

## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figure 15:** Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez les souches, inoculées sur le milieu minérale + PEBD, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



# RESULTATS ET DISCUSSION

## 2. Test de biodégradation du PEBD

L'utilisation de la méthode décrite par **Sivan et al (2006)**, basée sur la mesure de la perte de la masse du PEBD pour l'évaluation de la dégradation du PEBD chez les souches isolées, inoculées dans un milieu de culture minérale, complété par les films PEBD incubées à une température de 30 ° C avec agitation à une vitesse de 120 rpm pendant des intervalles de temps de (30, 90, et 120 jours), a permis l'obtention des résultats présentés dans le **Tableau 6**.

Le pourcentage de perte de masse est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Weight loss (\%)} = \frac{(\text{Initial weight} - \text{Final weight}) \times 100}{\text{Initial weight}}$$

D'après les résultats obtenus, il existe une variabilité de la perte de masse du PEBD d'une souche à autre avec un pourcentage allant de 0% à 3.59% .Cela confirme que toutes les souches sélectionnées dégradent le PEBD. Le tableau 6 révèle que la souche ML018 est la plus active (3.59% de dégradation pendant 120 jours), suivi des souches ML001, ML007, ML008, ML014, ML020 et ML029 avec un pourcentage de dégradation estimé à 2.56%. Le reste des souches étaient actives sur le PEBD mais avec un pourcentage faible comparé aux autres souches.

Ce pourcentage de dégradation observé dans notre étude reste moyen comparé aux taux de perte estimé par **Sivan et al. (2006)**, où ils ont rapporté un pourcentage de 7,5% pendant une incubation prolongée (8 semaines) avec la souche *Rhodococcus ruber*.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 6 :** Présentation des résultats du test de biodégradation du PEBD  
en mesurant la perte de la masse (mg)

Souches	30 jours			90jours			120jours		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Témoin	130	130	130	130	130	130	130	130	130
ML001	130	130	130	129	128	128	127	128	127
ML002	129	130	130	129	128	128	128	128	128
ML006	130	129	130	130	129	129	129	129	128
ML007	129	129	130	128	128	127	127	127	127
ML008	130	129	129	128	128	128	127	128	127
ML014	130	127	130	130	128	128	127	127	127
ML015	130	130	129	129	129	129	129	128	129
ML018	128	128	128	126	127	126	126	125	125
ML020	129	129	129	129	128	128	127	126	127
ML022	129	130	128	128	127	130	128	127	129
ML029	130	128	129	128	127	129	129	127	127

## 3. Caractérisation physiologique

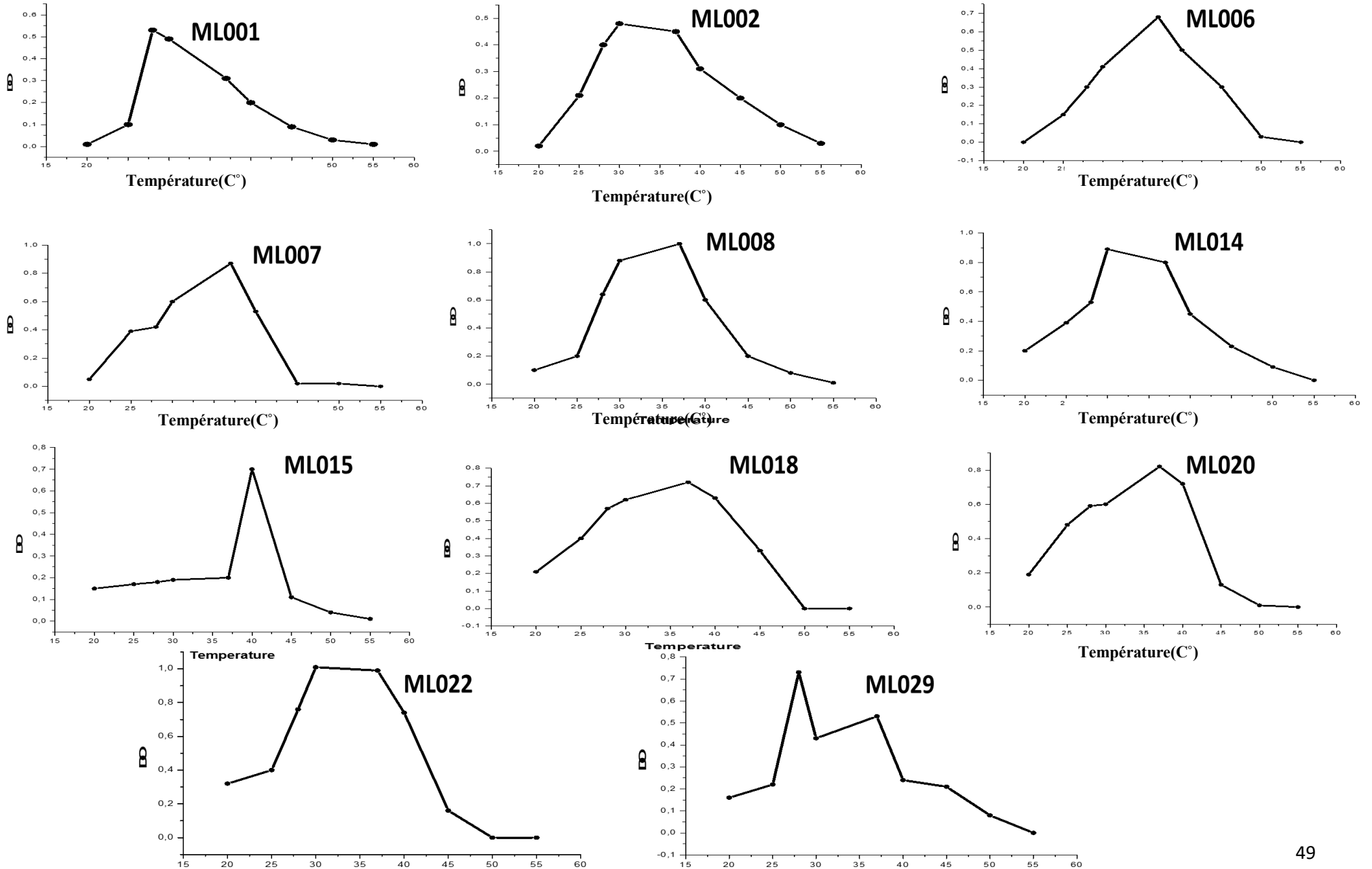
### 3.1 Effet de la température sur l'activité de la biodégradation du PEBD

L'évaluation de l'effet de la température sur la biodégradation du PEBD chez les 11 souches performante a été mise en évidence. Les souches sélectionnées sont inoculées dans un milieu minéral, avec agitation à une vitesse à 120 rpm, incubées à différentes températures pendant 30jours. La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 590nm.

Sur la base des résultats obtenus, l'influence de la température sur la biodégradation du PEBD des souches les plus performantes est illustrée dans la **figure 16**, les optima de température ont pu être déterminés chez les onze souches. En se basant sur les résultats du **tableau 6**, les souches les plus performantes ML007, ML008, ML018, ML029 et ML014 avaient un optimum de dégradation à 37 °C ou à 30°C selon les souches.

En revanche la souche ML020, considérée comme une des souches les plus performantes avait un optimum de 40°C, même température a été enregistrée pour la souche ML015. La souche ML001 présentait une température optimale de 28°C.

## RESULTATS ET DISCUSSION

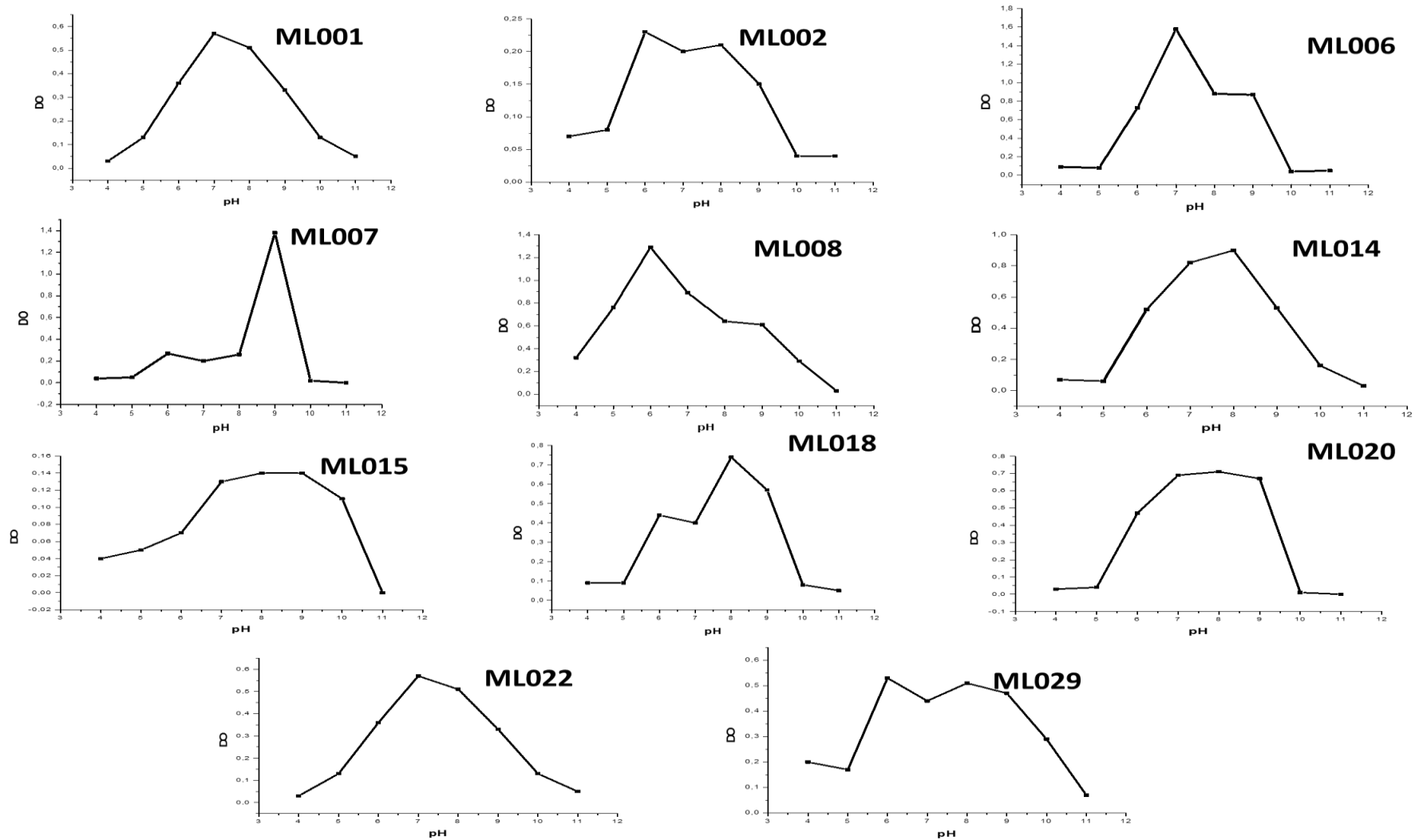


**Figures 16:** Effet de la température sur la croissance des souches (ML001. ML002. ML006. ML007. ML008. ML014, ML015. ML018. ML020. ML022. ML029) lors de la dégradation du PEBD, inoculée dans un milieu minéral, incubée à une température de 37°C pendant 24h.

### 3.2 Effet du Ph sur l'activité de la biodégradation du PEBD

Afin d'étudier l'influence du pH sur la biodégradation du PEBD, les souches sélectionnées sont inoculées dans un milieu minéral, avec agitation à une vitesse à 120 rpm, à différentes valeurs de pH (5; 6; 7; 8; 9; 10;11) et incubées à 37°C durant 24h.. Les résultats obtenus ont montré que les 11 souches ont manifestés une dégradation maximale dans l'intervalle de pH entre 6 à 9. Les résultats obtenus confirment que la valeur du pH affecte considérablement la production d'enzyme de dégradation du PEBD et varie d'une souche à une autre (**Figures 17**).

# RESULTATS ET DISCUSSION



**Figures 17:** L'Impact du pH sur la croissance des souches (ML001. ML002.ML006.ML007.ML008. ML014, ML015. ML018. ML020. ML022. ML029) lors de la dégradation du PEBD, inoculée dans un milieu minéral, incubée à une température de 37°C pendant 30 jours.

### 3.3 Effet de la concentration du NaCl sur l'activité de la biodégradation du PEBD

L'évaluation de l'effet de la concentration du NaCl sur l'activité de la biodégradation du PEBD chez les souches sélectionnées a été mise en évidence. Les souches sont inoculées dans un milieu minéral, avec agitation à une vitesse à 120 rpm, incubées à différentes concentration du NaCl (1%, 2%,4%,6%,8%,8.5%,9%) pendant 30jours. La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 590nm.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure (18) est montrer que les souches sélectionnées manifestaient une excellente dégradation à des concentrations différentes selon les souches : 1% pour ML006, ML008, ML014, ML018, ML29 ; 2% pour ML002, ML020, ML022 ; 4% pour ML001 et ML007 et enfin 9% pour ML015.

Le **tableau 7** suivant représente les optimums de dégradation du PEBD (Température, pH, [NaCl]).

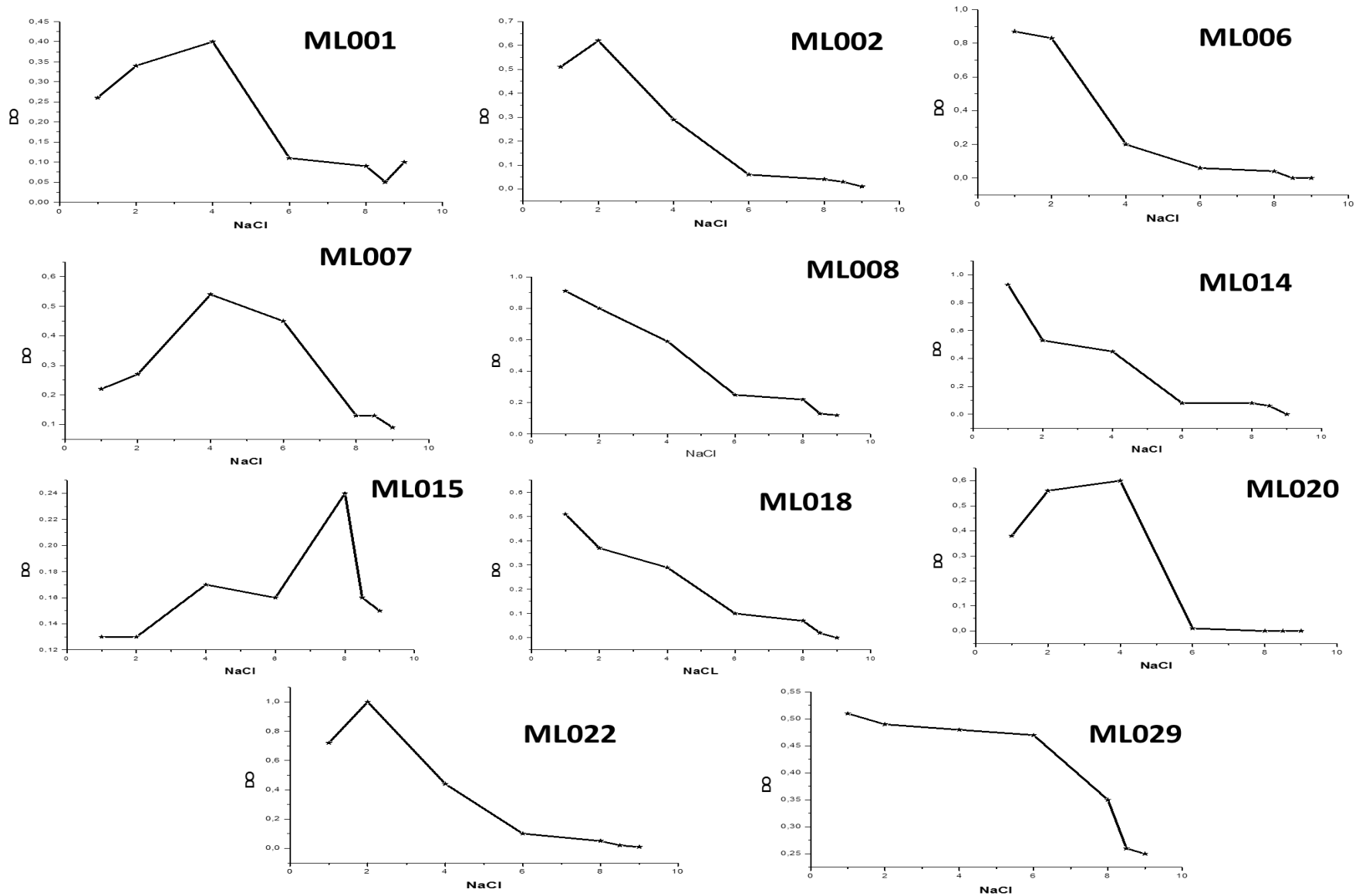
## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 7:** Présentation des optimums T°, pH et [NaCl] pour la biodégradation du PEBD.

Souches	Température	pH	[NaCl]
ML001	28°C	7	4%
ML002	30°C	9	2%
ML006	37°C	7	1%
ML007	37°C	8	4%
ML008	37°C	7	1%
ML014	30°C	8	1%
ML015	40°C	8	9%
ML018	37°C	9	1%
ML020	40°C	7	2%
ML022	30°C	6	2%
ML029	37°C	6	1%



## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figures 18:** Influence de la concentration du NaCl(%) sur la croissance des souches (ML001. ML002.ML006.ML007.ML008. ML014, ML015. ML018. ML020. ML022. ML029) lors de la dégradation du PEBD, inoculée dans un milieu minéral, incubée à une température de 37°C pendant 24h

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.4 Effet du CuSO<sub>4</sub> sur l'activité de la biodégradation du PEBD

Afin d'étudier l'influence du Cuivre sur la biodégradation du PEBD, les souches sélectionnées les plus performantes (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022, ML029) sont inoculées dans un milieu minéral additionné à 50µM du CuSO<sub>4</sub>, avec agitation à une vitesse à 120 rpm, et incubées à la température convenable durant 30jours (**Miriam et al., 2013**). Les résultats obtenus (**tableau 8**) ont montré que les souches ont manifestés une dégradation importante on comparant avec la biodégradation sans cuivre, accompagnée avec une perte de 2.05 % de poids pendant 30 jours. Cette étude élucide le rôle d'un enzyme bactérien (laccase) dans la biodégradation du polyéthylène. Ce qui a été prouvé par des travaux antérieurs que la laccase est la première enzyme signalée qui dégrade le polyéthylène (**Mayer et Staples, 2002**). Le cuivre on ce liant a l'enzyme laccase avec 4 sites de liaison pouvant contribuer à son oxydation (**Morozova et al., 2007**). **Miriam et al., (2013)** ont rapporté que le cuivre pourrait affecter l'activité des laccases et contribuer à la biodégradation des polyéthylène. Également, **Palmieri et al., (2000)** ont rapporté que l'ajout de CuSO<sub>4</sub> augmente l'activité laccase de *Pleurotus ostreatus* jusqu'à 50 fois. Le cuivre et les enzymes de liaison au cuivre puissent jouer un rôle majeur dans la biodégradation du polyéthylène et éventuellement d'autres polymères synthétiques.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 8:** Présentation des résultats de la perte de la masse du PEBD additionné au  $\text{CuSO}_4$

Souches	30 jours		
	1	2	3
<b>Témoin</b>	130	130	130
<b>ML001</b>	129	130	129
<b>ML002</b>	129	129	128
<b>ML006</b>	130	129	129
<b>ML007</b>	129	129	129
<b>ML008</b>	128	129	129
<b>ML014</b>	128	127	128
<b>ML015</b>	129	130	129
<b>ML018</b>	127	127	128
<b>ML020</b>	128	129	129
<b>ML022</b>	129	128	128
<b>ML029</b>	129	128	129

### 4. Identification des souches isolées

Le but de ce travail est d'isolé et d'identifié à l'aide de techniques culturales et de moléculaires, des bactéries biodégradatrices du PEBD à partir des trois décharges public de la wilaya de Tlemcen

Cette étude consiste à l'utilisation de techniques culturales d'isolements qui semblent adéquates pour une telle approche. Un grand nombre de cultures a été réalisé en multipliant les conditions physico-chimiques et en utilisant le PEBD à 1% comme seul source de carbone.

#### 4.1 Identification phénotypique

29 colonies ont été obtenues après une culture sur le milieu solide. 11 d'entre elles sont été retenues pour une complète identification Afin de déterminer la position

## RESULTATS ET DISCUSSION

taxonomique des souches sélectionnées, une analyse morphologie de ces souches a été réalisée en premier temps suivi d'une détermination de certains de leurs caractères biochimiques.

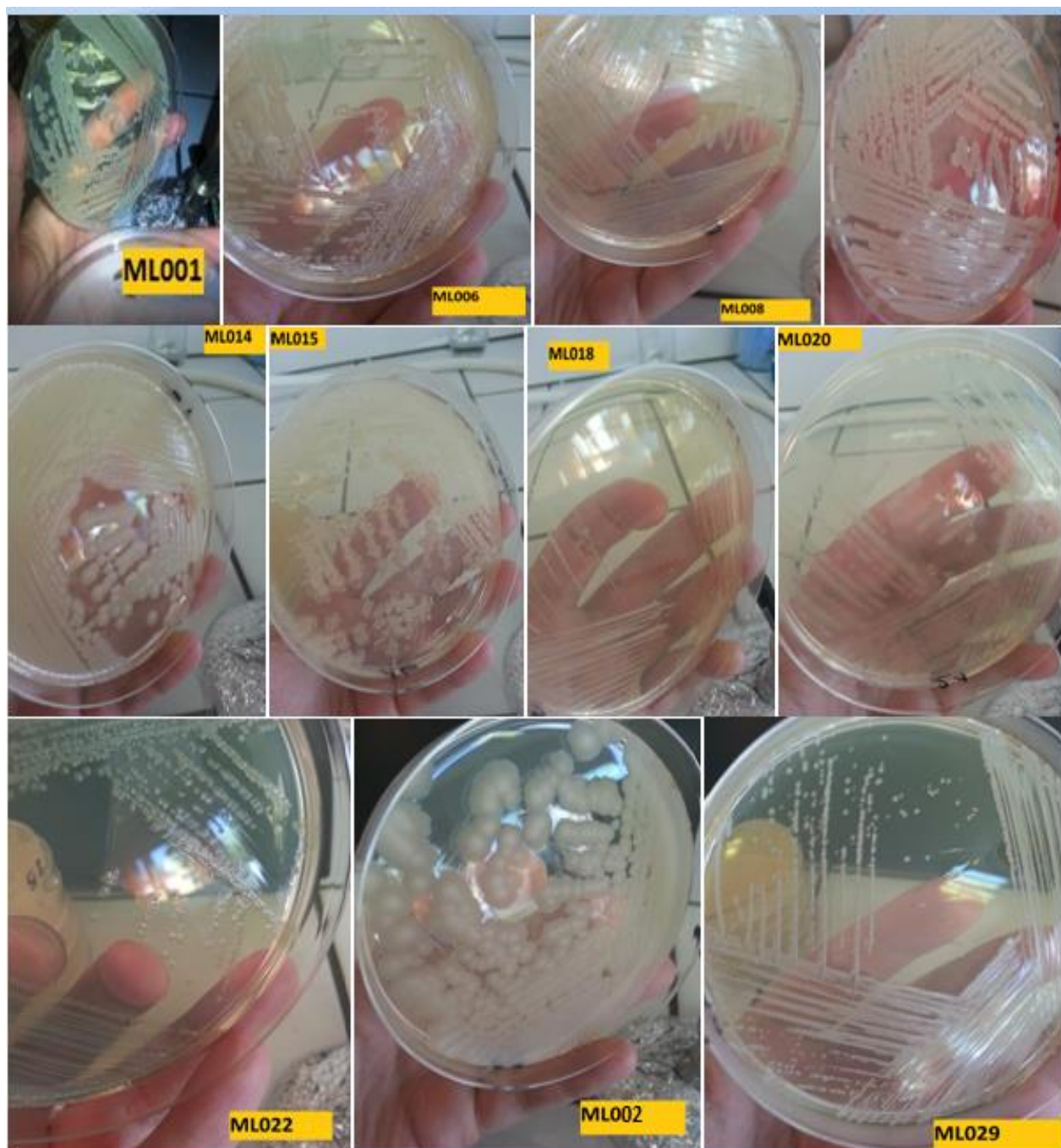
### 4.1.1 Identification morphologique

#### Examen macroscopique

L'observation macroscopique a été réalisée sur la gélose nutritive et a permis d'établir les critères suivants : l'aspect, la couleur, le diamètre et le relief des colonies (**Figure 19**). Le **tableau 9** est un récapitulatif des caractéristiques macroscopiques des souches isolées, sélectionnées dégradatrices du PEBD.

Les colonies produites sont généralement rondes et petites. La majorité des colonies ne sont pas pigmentées exception du ML018 pigmentée en orange, ML022 verte pigmentée en vert et la ML008 qui était la seule colonie transparente.

## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figure 19 :** Diversité de l'aspect macroscopique des souches isolées en présence d'un mélange de formes, couleurs et de consistances des colonies

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 9:** Illustration des caractéristiques macroscopiques des souches isolées, sélectionnées dégradatrices du PEBD sur GN.

Souche	Description
ML001	Blanche, sec, dentelé, convexe basse
ML002	Ronde, petite, convexe en dôme, Crémeuse
ML006	Ronde, opaque, petite, bombée
ML007	Ronde, petite, crémeuse
ML008	Ronde, transparente, convexe, crémeuse
ML014	Ronde, dentelé, bossus, sec
ML015	Crémeuse, blanche
ML018	Très petite, ronde, bombée, orange
ML020	Sec
ML022	Ronde, crémeuse, verte
ML029	Petite, ronde, opaque

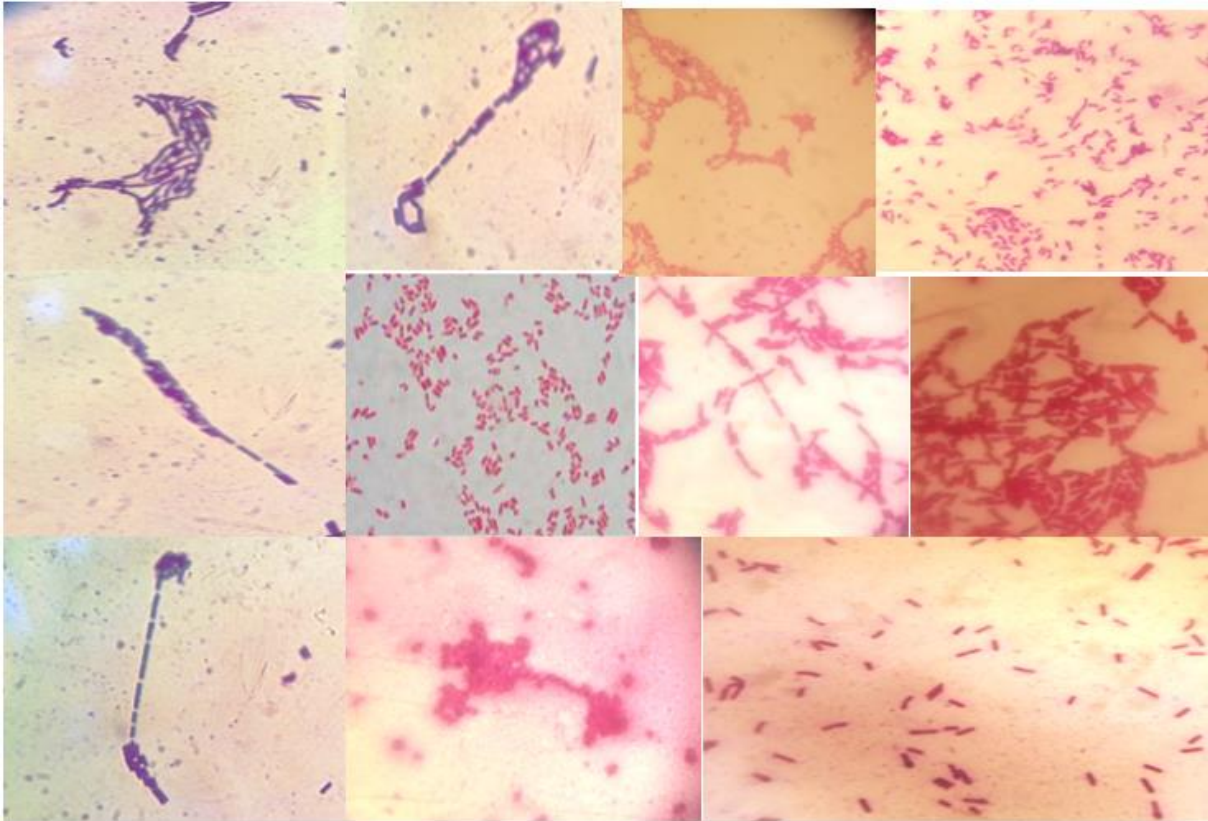
### Examen microscopique

La coloration de Gram et l'observation microscopique des souches sélectionnées dégradatrices du PEBD (**Figure 20**) a permis de constater la présence de formes cellulaire variables (voir **tableau 10**) allant des formes sphériques aux bâtonnets réguliers et irréguliers. Les souches ML002, ML007 et ML014 formaient des spores après 48 heures d'incubations. Les bactéries formant des endospores sont bien adaptées à différents environnements ont généralement des besoins nutritionnels simples. Par conséquent, Elles sont capables de coloniser différentes niches oligotrophes. En ce qui concerne le Gram, il était positif pour la majorité des souches à l'exception du ML008, ML022 et ML020 dont le Gram était négatif.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 10** : Présentation des propriétés morphologiques lors de l'identification préliminaire des isolats.

<b>Isolats</b>	<b>Mode de regroupement</b>	<b>Gram</b>
ML001	bâtonnets isolés, droits à bout arrondis.	+
ML002	grande bacilles, sporulés	+
ML006	Petits bacilles isolés en forme de tiges	+
ML007	bacilles en forme de bâtonnets, sporulés	+
ML008	bacilles en forme de bâtonnet	–
ML014	bacilles en forme de bâtonnet,sporulés	+
ML015	grande bacilles en chaînette	+
ML018	Coques, groupés en amas	+
ML020	Bacilles fins, et droits, groupés en diplocoque.	–
ML022	Bacilles fins, et droits, groupés en diplocoque.	–
ML029	Coques, groupés en amas	+



**Figure 20:** Coloration de Gram et observation microscopiques de quelques souches isolées (grossissement×100).

### 4.1.2 Caractérisation biochimique :

La caractérisation biochimique a été faite en déterminant les enzymes respiratoires et la plaque API 20E. Les résultats sont représentés dans le **tableau 11**.

### 4.1.3 Mise en évidence des enzymes respiratoires

Toutes les souches bactériennes sélectionnées possèdent au moins une des deux enzymes respiratoires recherchées et sont aérobies strictes ou facultatives. 5 d'entre elles sont oxydase et catalase positives.

Pour la mobilité, seules les souches ML018 et ML029 étaient immobiles. En reliant l'aspect macroscopique avec la mobilité, ces deux souches sont des coques à Gram positif.



## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 11** : Présentation des propriétés biochimiques lors de l'identification préliminaire des isolats

Souches	Catalase	Oxydase	Type respiratoire	mobilité
ML001	+	-	Aérobic strict	+
ML002	+	-	Aérobic strict	+
ML006	+	+	Aérobic	+
ML007	+	+	Aérobic	+
ML008	+	-	Anaérobic facultatifs	+
ML014	+	+	Anaérobic	+
ML015	+	-	Aéroanaérobic	+
ML018	+	-	Aérobic strict	-
ML020	+	+	Aéroanaérobic	+
ML022	+	+	Aéroanaérobic	+
ML029	+	-	Aéroanaérobic facultatifs	-

### 4.1.4 Identification des souches sélectionnées par la galerie API20E

Les autres tests biochimiques ont été réalisés en utilisant la plaque API 20 E. Ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification. Des travaux antécédents ont montré que la meilleure reproductibilité des différents tests est plutôt réalisée avec des plaques API qu'avec les tests classiques.

## RESULTATS ET DISCUSSION

L'inoculation de la galerie API20E avec une suspension de chacune des souches isolées et une incubation à 30C pendant 48heures , la lecture des résultats s'est effectuée par l'observation du changement de couleur des tests (**Figure21**) en s'appuyant sur le tableau d'interprétation des galeries disponibles avec le kit (**tableau 12**), l'utilisation du logiciel d'identification (Identax) a permis l'orientation de l'identification des souches isolées vers leurs appartenance en ce qui concerne leur famille et de connaitre les résultats concernant leurs profils biochimiques mais une identification génotypique reste essentielle pour avoir une identification fiable des souches isolées.



**Figure 21** :L'aspect de la galerie API 20E des souches performante, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 12** : Illustration du profil biochimique des souches performantes par la galerie Api20E

Souches	ON PG	AD H	LD C	OD C	Citrate	H <sub>2</sub> S	Urée	TD A	Indole	VP	Gélatinase	Glucose	Manitole	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Saccharose	Mélibiose	Amygdaline	Arabinose
ML001	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
ML002	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
ML006	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ML007	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
ML008	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
ML014	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
ML015	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ML018	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
ML020	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ML022	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ML029	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-

## RESULTATS ET DISCUSSION

recherche d'une  $\beta$ -galactosidase s'est avérée positive pour les souches ML006, ML008, ML015, ML018 et ML029. En ce qui concerne la recherche de la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et de l'arginine dihydrolase, 8 sont ADH positive, 2 sont ODC positive et 3 sont LDC positive.

La capacité d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie a été observée chez toutes les souches à l'exception de 2 souches (ML006 et ML029)

Pour la production d'indole et les acides mixtes, elles ont été observées que chez ML001, ML002, ML007, ML014 et ML015. En revanche les souches ML008 et ML029 produisent d'acétone à partir de la fermentation du glucose, mais sont déficientes en tryptophanase responsable de la production d'indole. Il a été montré que la production d'indole joue des rôles biologiques divers notamment lors la signalisation intercellulaire (**Lee *et al.*, 2011**).

Concernant la liquéfaction de la gélatine, seules quatre souches en étaient déficientes. En recensant le bagage enzymatique de ces souches sélectionnées, on peut déduire que la souche ML006 possède un bagage enzymatique faible comparé avec les autres souches. Le bagage enzymatique des microorganismes est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct, et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel.

Pour la dégradation des sucres, selon les données du **tableau 12**, le glucose semble être la source la plus utilisable par ces souches à l'exception de ML002, ML006, ML008 et ML014. Ce constat peut s'expliquer par les différentes adaptations provoquées par les restrictions des milieux naturels. Une autre constatation a été faite avec la souche ML022, où seul le glucose a été assimilé. A l'instar, la souche ML015 semblait assimiler tous les sucres à l'exception du l'arabinose.

### 5. Identification génotypique des souches sélectionnées

A la lumière des résultats de la caractérisation phénotypique obtenus, l'identification de nos souches sélectionnées avec certitude au niveau genre/espèce n'étaient pas suffisantes. Il a été rapporté que les méthodes traditionnelles, y compris la caractérisation morphologique et biochimique utilisée pour l'identification des souches sont parfois difficiles à interpréter (Mohammad *et al.*, 2017).

#### 5.1 Quantification de l'ADN au Nanodrop

Après extraction de l'ADN, la mesure spectrophotométrique de la quantité des rayons ultraviolets absorbés par les bases a été effectuée. L'élution de l'ADN est réalisée par l'H<sub>2</sub>O. La concentration de l'ADN est mesurée à une longueur d'onde de 260 nm contre un Blanc (H<sub>2</sub>O). L'interférence par des contaminants se reconnaît par le calcul d'un ratio ce qui permet d'estimer la pureté de l'ADN. D'après les résultats indiqués dans le **tableau 13**, le ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> est au voisinage de 1,8 ce qui confirme la pureté de nos échantillons d'ADN.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 13.** Valeur de la quantification de l'ADN Bactérien au Nanodrop

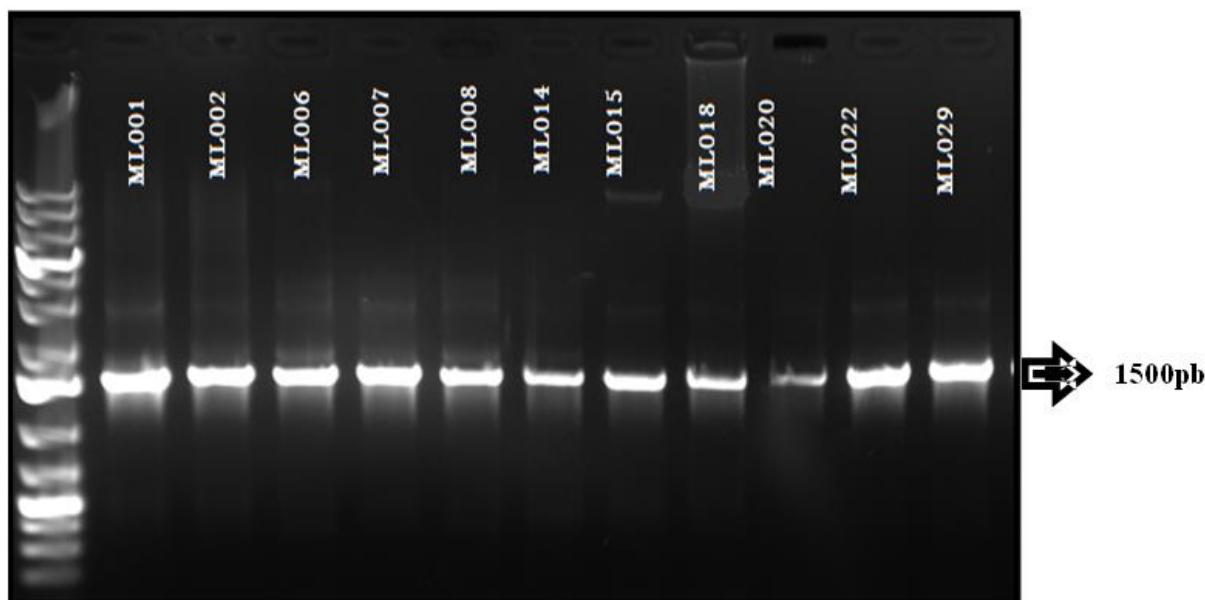
N° du tube	ng/ul	A260	A280	260/280	280/260	Cons tant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
1	682.22	13.644	6.960	1.96	1.28	50.00	230	10.683	2.427
2	741.11	14.822	7.644	1.94	1.16	50.00	230	12.794	2.045
3	114.55	2.291	1.237	1.85	1.40	50.00	230	1.636	0.137
4	131.13	2.623	1.466	1.79	0.94	50.00	230	2.787	0.399
5	828.65	16.573	8.141	2.04	1.41	50.00	230	11.735	1.246
6	1436.53	28.731	14.849	1.93	1.24	50.00	230	23.077	5.176
7	720.6	14.411	7.758	1.86	1.54	50.00	230	9.330	0.339
8	238.9	4.777	2.734	1.75	0.90	50.00	230	5.320	0.141
9	95.1	1.903	1.067	1.78	0.92	50.00	230	2.059	3.700
10	462.8	9.256	5.557	1.67	0.80	50.00	230	11.612	1.519
11	1078.62	21.572	11.053	1.95	1.28	50.00	230	16.850	3.072

### 5.2 Amplification du gène de l'ARN 16S des souches sélectionnées

Les souches sélectionnées ont été retenues pour une éventuelle identification moléculaire. Les gènes de l'ARN 16S des souches ont été amplifiés en utilisant des amorces fD1AGAGTTTGATCCTGGCTCAG(20) et rD1 AAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC (23) décrites par **Weisburg *et al.*, (1991)**.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les produits de la PCR obtenus ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose-TBE. Après migration, le gel est photographié sur une table UV. Les bandes d'ADN ont migré dans la région 1500 paires de bases (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR après amplification.

### 5.3 Le séquençage et analyse phylogénétique

Les produits de la PCR16S ont été séquencés et comparés avec les séquences déposées dans la base de données BLAST. Les analyses ont indiqué que les 10 souches sélectionnées sont affiliées aux genre *Bacillus* ( 5 souches), *Pseudomonas* (2 souches) *Lysinibacillus* (1souche), *Enterobacter* (1souche), *Staphylococcus*(1souche). Et une souche (ML018) a été affiliée aux Actinobatéries genre *Rhodococcus*.

Au seuil de cet ordre, les souches présentaient une similarité entre 99.78% % et 100%. Le tableau **14** résume les pourcentages de similarité et les numéros d'accession attribués par le GenBank. Les séquences consensus des souches identifiées sont interrogées dans une autre base de données RDP Project (**Tableau 15**).

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 14.** Présentation des numéros d'accèsion, le pourcentage de similarité et l'identité des souches sélectionnées productrices de protéases.

La souche	Numéro d'accèsion	Identité de la souche	Similarité
ML001	MT636851	<i>Bacillus subtilis strain CR1</i>	100.00%
ML002	MG738271	<i>Bacillus thuringiensis strain R10-3</i>	99.29%
ML006	MT636534	<i>Lysinibacillus macroides strain SMV311</i>	99.85%
ML007	MT636460	<i>Bacillus subtilis</i>	99.89%
ML008	MT636553	<i>Enterobacter cloacae strain B3X8</i>	100.00%
ML014	MT636856	<i>Bacillus cereus strain B3</i>	100.00%
ML015	MT636899	<i>Bacillus licheniformis strain CRh49</i>	100.00%
ML018	MT636651	<i>Rhodococcus gordoniae strain PB-1</i>	99.78%
ML020	MT636930	<i>Pseudomonas balearica strain IMB16-119</i>	100.00%
ML022	MT636685	<i>Pseudomonas aeruginosa strain OE5</i>	100.00%
ML029	MT636753	<i>Staphylococcus pasteurii strain 164.1.2B</i>	99.89%

Les séquences des souches ML001, ML002, ML007, ML014 et ML015 sont affiliées au genre *Bacillus* groupe *B. cereus*. Il s'agit de *Bacillus subtilis* (2souches), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, avec des pourcentages de similarité variant de 99.85% à 100.00%

La séquence de la souche ML006 est affiliée au genre *Lysinibacillus*. Il s'agit de *Lysinibacillus macroides* avec un pourcentage de 99.85%.

La séquence de la souche ML008 est affiliée au genre *Enterobacter*. Il s'agit de *Enterobacter cloacae* avec un pourcentage de 100.00%.

La séquence de la souche ML008 est affiliée au genre *Rhodococcus*. Il s'agit de *Rhodococcus gordoniae* avec un pourcentage de 99.78%.

Les séquences des souches ML020, ML022 sont affiliées au genre *Pseudomonas*. Il s'agit de *Pseudomonas balearica* et *Pseudomonas aeruginosa* avec un pourcentage de 100.00%.

La séquence de la souche ML008 est affiliée au genre *Staphylococcus*. Il s'agit de *Staphylococcus pasteurii* avec un pourcentage de 99.89%.



## RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 15.** Présentation des résultats de l'interrogation de la base de donnée RDP Project

souches	RDP Project
ML001	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre Bacillus
ML002	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre Bacillus
ML006	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Planococcaceae Genre: Lysinibacillus
ML007	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre Bacillus
ML008	Domaine : <u>Bacteria</u> Phylum : <u>Proteobacteria</u> Classe : <u>Gammaproteobacteria</u> Ordre : <u>Enterobacteriales</u> Famille : <u>Enterobacteriaceae</u> Genre : <u>Enterobacter</u>
ML014	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre Bacillus

## RESULTATS ET DISCUSSION

ML015	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre: Bacillus
ML018	Domaine: Bacteria Phylum: Actinobacteria Classe: Actinobacteria Ordre: Actinomycetales Famille: Nocardiaceae Genre: Rhodococcus
ML020	Domaine: Bacteria Phylum: Proteobacteria Classe: Gammaproteobacteria Ordre: Pseudomonadales Famille: Pseudomonadaceae Genre: Pseudomonas
ML022	Domaine: Bacteria Phylum: Proteobacteria Classe: Gammaproteobacteria Ordre: Pseudomonadales Famille: Pseudomonadaceae Genre: Pseudomonas
ML029	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Staphylococcaceae Genre: Staphylococcus

La diversité des souches sélectionnées est discutée ci-dessous, en s'appuyant également sur les arbres phylogénétiques (**Figures 23, 24, 25, 26, 27, 28**) qui représentent une vision synthétique de ces souches identifiées par les différentes approches culturales et moléculaires durant cette étude.

La diversité des séquences bactériennes appartenant aux genre *Bacillus* obtenues est représentée dans l'arbre phylogénétique qui inclut également les séquences proches. Cet arbre permet mieux de visualiser les affiliations des souches. Les alignements des séquences d'ARN sont réalisés par Clustal W (**Thompson et al., 1994**). L'arbre est construit à partir de Neighbor-Joining en utilisant le test de « bootstrap » (nombres sur les branches) de 100 répliquions en utilisant les distances de

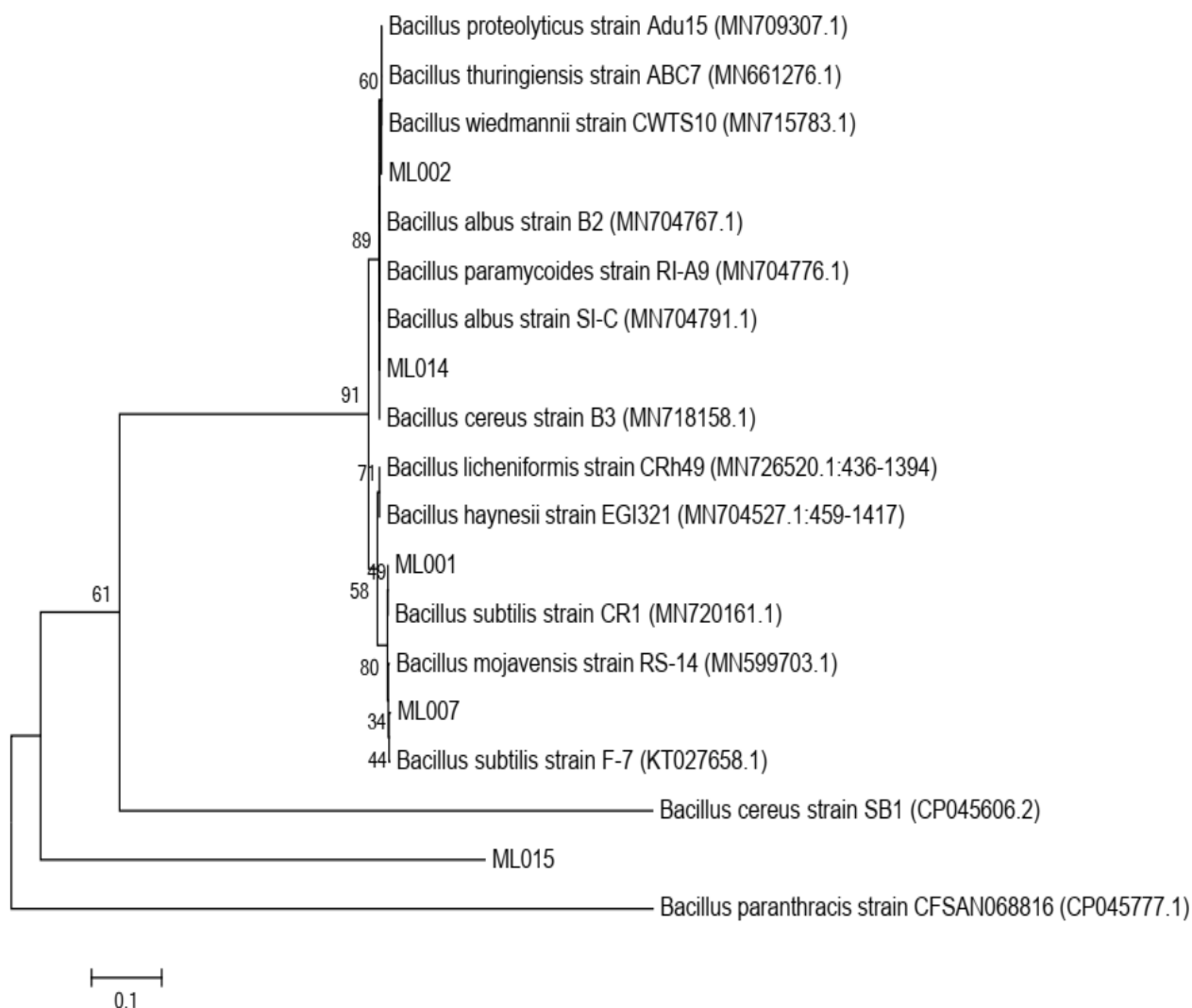
## RESULTATS ET DISCUSSION

Tamura-Nei qui prend en compte les transitions et les transversions du programme Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013). L'enracinement a été réalisé en utilisant la séquence ribosomale de *Bacillus paranthracis* strain CFSAN068816 (CP045777.1).

Le premier clade regroupe les séquences les souches ML001 et ML007, tandis que le second clade regroupe les souches ML014 et ML002. La souche ML015 semble la plus éloignée malgré qu'elle appartient au même groupe.

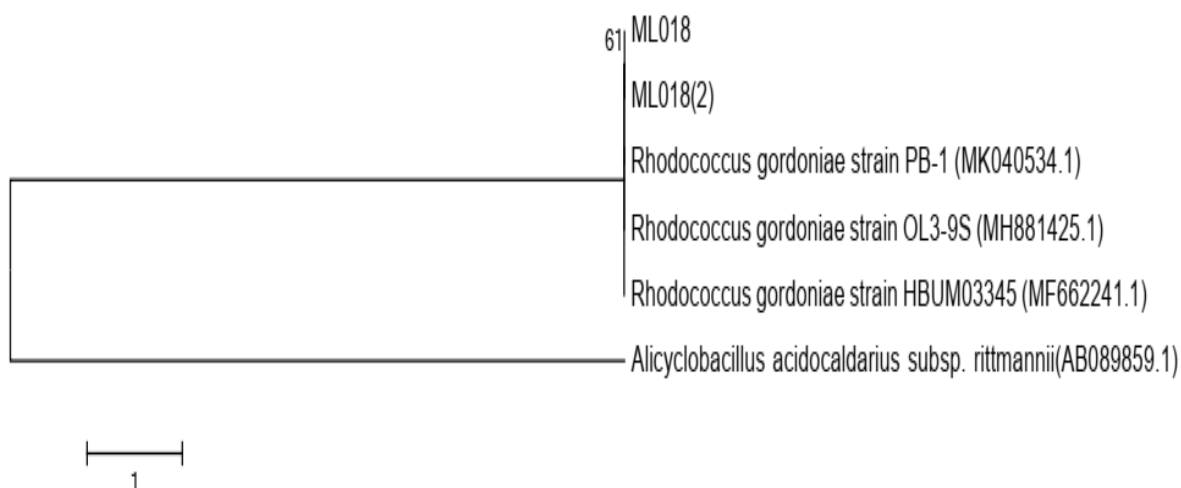
Les arbres phylogénétiques (Figures 24, 25, 26) des souches ML029, ML020, ML022 et ML018 ont été construits en utilisant *Alicyclobacillus acidocaldarius* *subsp. rittmannii*(AB089859.1) comme un out groupe pour l'enracinement de ces arbres. En revanche les souches ML008 et ML006, l'enracinement des arbres a été fait avec la souche *Pseudomonas putida* strain HB10 (KT803085.1) comme le montre les figures 27, 28.

## RESULTATS ET DISCUSSION

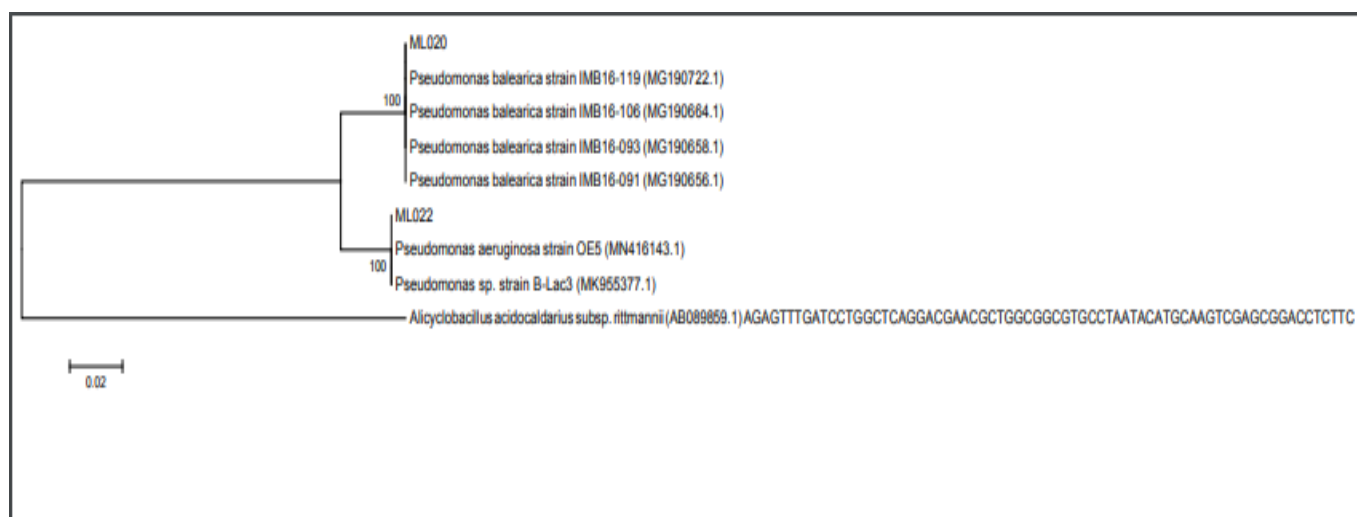


**Figure 23 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position des souches ML001, ML007, ML014, ML002 et ML015. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Bacillus paranthracis* strain CFSAN068816 (CP045777.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.

## RESULTATS ET DISCUSSION

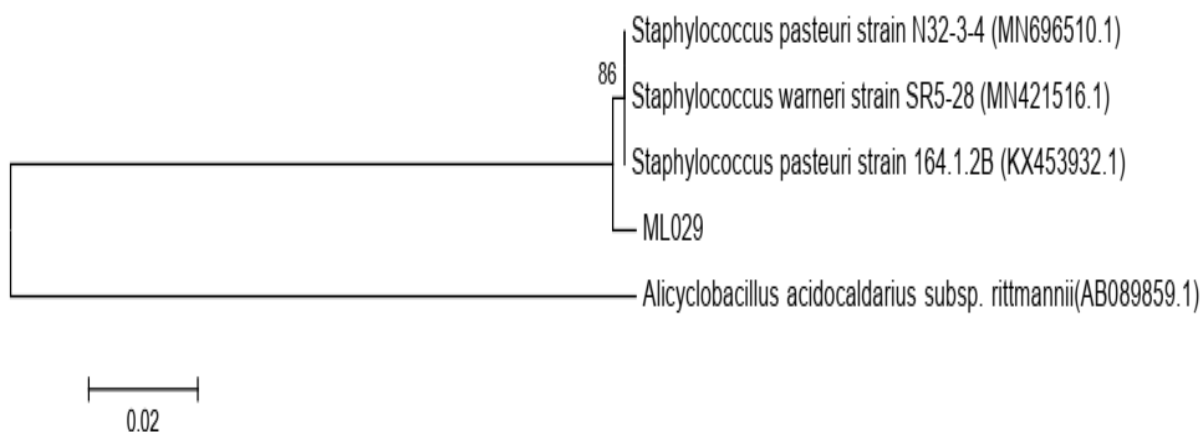


**Figure 24 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML018. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii*(AB089859.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.

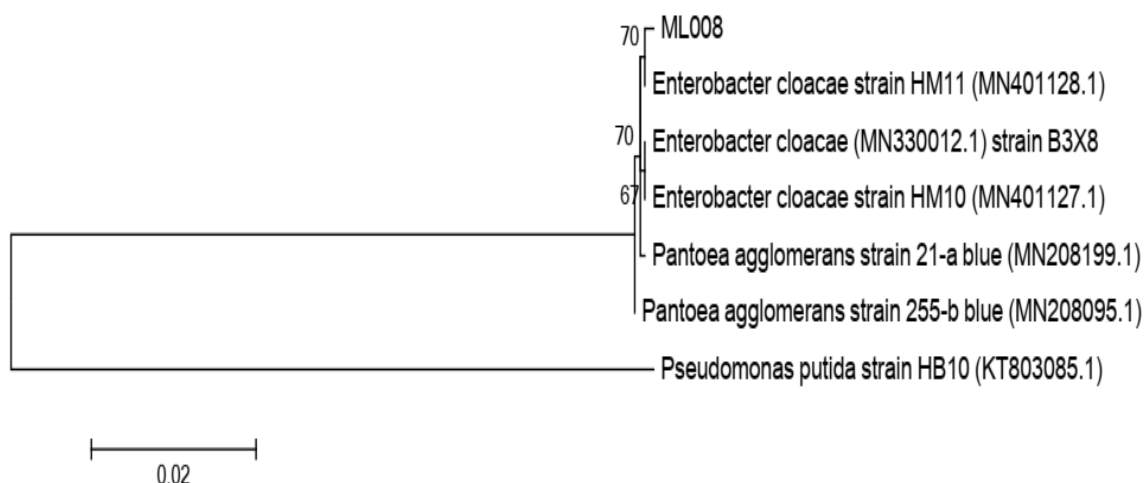


**Figure 25 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML020 . La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii*(AB089859.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

## RESULTATS ET DISCUSSION

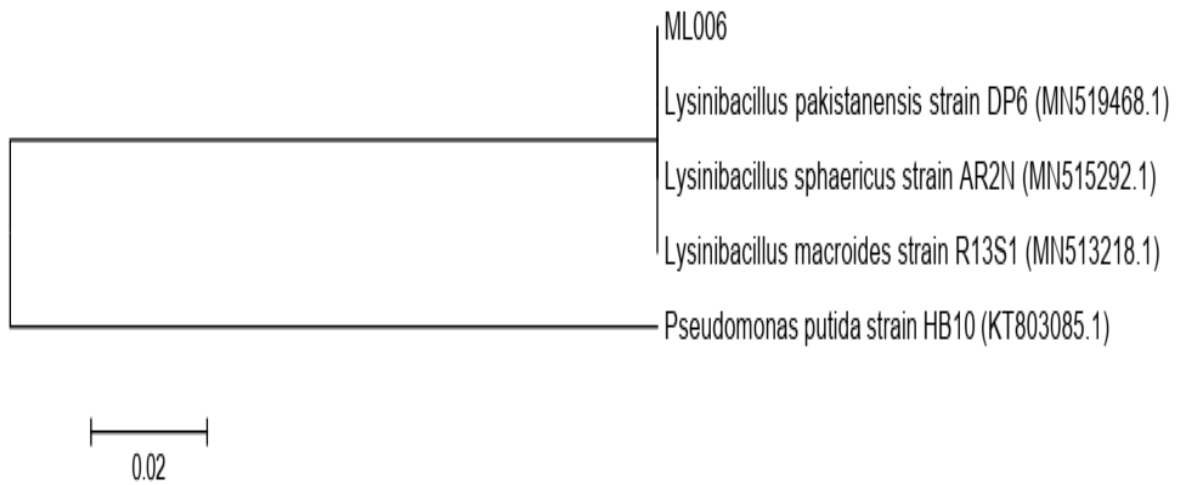


**Figure 26 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML029 . La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii*(AB089859.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 10 substitutions par 100 nucléotides.



**Figure 27 :** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML008 . La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Pseudomonas putida* strain HB10 (KT803085.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figure 28.** Arbre phylogénétique basé sur le gène codant l'ARNr 16S montrant la position de la souche ML006. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Pseudomonas putida* strain HB10 (KT803085.1) est utilisée comme outgroup. La barre représente 2 substitutions par 100 nucléotides.

# **CONCLUSION**



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

L'objectif de ce présent travail est l'isolement, la sélection des souches bactériennes dégradatrices du polyéthylène à basse densité à partir de trois différentes décharges publiques de la wilaya de Tlemcen, l'optimisation de certains facteurs physicochimiques tels que le pH, la température, la concentration en NaCl et l'influence du Cuivre sur la biodégradation du PEBD ainsi que leur identification phénotypique et génotypique par l'utilisation de la galerie API20E et l'amplification du fragment d'ADN codant la région conservée de l'ARN16S.

Le criblage primaire a permis l'isolement de 29 souches bactériennes appartenant aux différents genres. Par suite, et lors du screening secondaire 11 souches témoignant d'une bonne activité dégradatrices du PEBD.

L'optimisation des paramètres impliqués dans la biodégradation par des souches sélectionnées a montré que ces dernières (ML007, ML014, ML020, ML022) ont manifesté une forte activité à une température entre 30°C et 40°C, les souches (ML001, ML018 et ML029) ont montré une activité à des valeurs de Ph (7, 9, 6) respectivement, en revanche la souche ML002 a manifesté une excellente dégradation du PEBD à une concentration NaCl de 4%, par ailleurs l'ajout du cuivre a amélioré considérablement l'activité de biodégradation du PEBD chez les souches (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029).

Les souches (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) sont hautement dégradatrices du polyéthylène à basse densité avec une perte de masse qui peut atteindre un pourcentage de 3.59.

Les souches isolées, sélectionnées dégradatrices du PEBD (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) sont identifiées génétiquement, le séquençage du gène codant la sous unité ribosomale 16S a révélé leur appartenance aux espèces (*Bacillus subtilis* strain CR1, *Bacillus thuringiensis* strain R10-3, *Lysinibacillus macroides* strain SMV311, *Bacillus subtilis*,

*Enterobacter cloacae* strain B3X8, *Bacillus cereus* strain B3, *Bacillus licheniformis* strain CRh49, *Rhodococcus gordoniae* strain PB-1, *Pseudomonas balearica* strain IMB16-119, *Pseudomonas aeruginosa* strain OE5, *Staphylococcus pasteurii* strain 164.1.2B) respectivement.

Les résultats obtenus dans cette étude sont d'une grande importance. Cependant, des études approfondies doivent compléter ce travail à savoir :

- ✓ L'étude de la consommation d'O<sub>2</sub> et la production du CO<sub>2</sub>.
- ✓ La mesure de degré d'oxydation par FTIR et leur hydrophobicité.
- ✓ Purification d'enzyme responsable à la biodégradation des plastiques industriels.
- ✓ Caractérisation des gènes impliqués dans la production d'enzyme.
- ✓ Clonage des fragments ADN, codant la production d'enzyme responsable de dégradation des plastiques industriels.

# REFERENCES

# BIBLIOGRAPHIQUE

1. **Abrusci C., Pablos J.L., Corrales T., Lopez-Marín J., and Marín I., (2011),** Biodegradation of photo-degraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 451-459.
2. **Ahmed J., Jiwari B. K., Imam S. H., Rao M. A. (2012).** Starch-Based polymeric materials and nanocomposites: chemistry, processing, and applications: CRC Press, Boca Raton, 609-626.
3. **Ait-Tayeb L. A., Ageron E., Grimont F., Grimont P.A.D. (2005).** Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol*, 156: 763–773.
4. **Albersson A. C. and Carlsson S. (1994).** Chemistry and biochemistry of polymer biodegradation, In : Griffin, G.J.L. Ed, Chemistry and technology of Biodegradable polymers, Blackie Academic and Professional, Glasgow, 21:301-313.
5. **Albertsson A. C. and Banhidi Z. G. (1980).** Microbial and oxidative effects in degradation of polyethylene. *Journal of applied polymer science*, 25(8): 1655-1671.
6. **Anzai Y., Kim H., Park J-Y., Wakabayashi H., Oyaizu H., (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563–1589.
7. **Arena M., Abbate C., Fukushima K., Gennari M. (2011).** Degradation of poly(lactic acid) and nanocomposites by *Bacillus licheniformis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(6) : 865-870.
8. **Arlie J. P. (1980).** Caoutchoucs synthétiques. Procédés et données économiques. Éditions Technip,.
9. **Arutchelvi J., Sudhakar M., Arkatkar A., Doble M., Bhaduri S. (2008)** Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian J Biotechnol* 7: 9-22.
10. **Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. and Collins M.D. (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative

analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology; 13: 202- 206.

11. **Ash C., Priest F. G. and Collins D. (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. Antonie van Leeuwenhoek; 64: 253–260.
12. **Aswale P. (2010),** Studies on bio-degradation of polythene. PhD thesis, Dr Babasaheb Ambedkar Marathwada University, Aurangabad, India.
13. **Aswale P., and Ade A., (2011),** Polythene degradation potential of *Aspergillus niger*. In: Sayed IU (Ed) Scholarly Articles in Botany, Pune. Biodegradation 45: 49-55.
14. **Balasubramanian V., Natarajan K., Hemambika B., Ramesh N., Sumathi C.S., Kottaimuthu R., Kannan V. R. (2010),** High-density polyethylene (HDPE)- degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India, Letter in Applied Microbiology, 51: 205-211.
15. **Bellahcene M. (2009)** Les matières plastiques et leur impact sur l'environnement. L'Algerian Petroleum Institute 03: 01.
16. **Berranem M. (2010),** Etude du vieillissement sur les propriétés physiques et mécaniques du polyéthylène à basse densité (PEBD). Mémoire de Magister.
17. **Bhone M. K., Ravi C., Meena K. S., Chu S. L., Kishore R. S. (2012).** Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species: Indian Microbiol: 52(3):411–419.
18. **Bonhomme S., Cuer A., Delort A.M., Lemaire J., Sancelme M., Scott G. (2003),** Environmental biodegradation of polythene, Polymer Degradation and Stability, 81: 441-452.
19. **Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
20. **Bourry D. and Favis B. D. (1998).** Cocontinuity and phase inversion in HDPE/PS blends: influence of interfacial modification and elasticity. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 36(11): 1889-1899.

21. **Calmon-Decriaud A., Bellon-maurel V., Silvestre F. (1998).** Standard methods for testing the aerobic biodegradation of polymeric materials. *Advances in polymer Science*, 135: 207-226.
22. **Camara B., Strompl C., Verborg S., Sproer C., Pieper D.H. Tindall, B.J. (2007).** *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 923–931.
23. **Campbell J. I. A., Jacobsen C.S., Sorensen J. (1995).** Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 18: 51-62.
24. **Chandra R. and Rustgi R. (1997),** Biodegradation of maleated linear low-density polyethylene and starch blends, *Polymer Degradation and Stability*, 56: 185-202.
25. **Chatterjee S., Roy B., Roy D., Banerjee R. (2010),** Enzyme-mediated biodegradation of heat treated commercial polyethylene by Staphylococcal species, *Polymer Degradation and Stability*, 95: 195-200.
26. **Chuai C. Z., Almdal K., Lyngaae-Jørgensen J. (2003).** Phase continuity and inversion in polystyrene/poly (methyl methacrylate) blends. *Polymer*, 44(2): 481-493.
27. **Claus D. and Berkeley R.C.W., (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA.
28. **Clays-Josserand A., Lemanceau P., Philippot L., Lensi R., (1995).** Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1745-1749.
29. **Colwell R. R. and Mandel M. (1964).** Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 87: 1412–1422.

30. **Colwell R. R., Citarella R. V., Ryman I. (1965).** Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *J. Bacteriol.* 90: 1148–1149.
31. **Dagli S. S., Kamdar K. M. (1994).** Effects of component addition protocol on the reactive compatibilization of HDPE/PET blends. *Polymer Engineering Science*, 34(23): 1709-1719.
32. **Decker C. (1996).** Photoinitiated crosslinking polymerisation: Progress in polymer science 21 (4): 593-650.
33. **Dedecker K., Groeninckx G. (1998).** Reactive compatibilisation of A/(B/C) polymer blends. Part 2. Analysis of the phase inversion region and the co-continuous phase morphology. *Polymer*, 39(21): 4993-5000.
34. **Deepika S. and Jaya M. R. (2015).** Biodegradation of low density polyethylene by microorganisms from garbage soil. *Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3(1): 2320-8694.
35. **Delorme S., Lemanceau P., Christen R., Corberand T., Meyer J. M., Gardan L., (2002).** *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 513–523.
36. **Domenek S. (2009).** Polymères biodegradables ! Normes de biodegradation et propriétés principales, Viandes et produits Carnés, 27(4) : 154-158.
37. **Dorbane N. (2014).** Gestion déchets développement durable de (LIVRE).
38. **Duan Y. Q., Zhou X. K., Di-Yan L., Li Q. Q., Dang L. Z., Zhang Y. G., Qiu L. H., Nimaichand S., Li W. J. (2015).** *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108 : 1161-1169.
39. **Dupeux M. (2004).** Aide-mémoire Science des matériaux, Editions Dunod.
40. **El-Shafei H. A., El-Nasser N. H. A., Kansoh A. L., Ali AM. (1998),** Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and *Streptomyces* species, *Polymer Degradation and Stability*, 62: 361-365.
41. **Eubeler Jan P., Bernhard M., Knepper Thomas P. (2010).** Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 1.

42. **Euzeby J. P. (2008).** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/.96203>.
43. **Farhi R., Morel C., Chéron J. (2006),** Matière plastique et adjuvants hygiène et sécurité. Institut national de recherche et de sécurité inrs.ed638
44. **Ferg E. E., Bolo L. L. (2013).** A correlation between the variable melt flow index and the molecular mass distribution of virgin and recycled polypropylene used in the manufacturing of battery cases. *Polymer Testing*, 32(8): 1452-1459.
45. **Flory P.J. (1953).** *Principles of Polymer Chemistry*; Ithaca, NY: Cornell University Press,
46. **Fontanella S., Bonhomme S., Koutny M., Husarova L., Brusson JM. (2009),** Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing prooxidant Additives, *Polymer Degradation and Stability*, 95: 1011-1021.
47. **Fontanille M., Gnanou Y. (2002).** Chimie et Physico-chimie Des Polymères (cours), 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycles., Ecoles d'ingénieurs., Nouvelle présentation 2005. Dunod, Paris, 4(8) : 478-485.
48. **Fortina M. G., Pukall R., Schumann P., Mora D., Parini C., Manachini P.L. and Stackebrandt E. (2001).** *Ureibacillus gen. nov.*, a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (**Andersson et al., 1995**), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus sp. nov.* *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 51 : 447–455.
49. **Fournie R. (1990).** Les isolants en électrotechnique. Essais, mécanismes de dégradation, applications industrielles”, Edition Eyrolles, Paris.
50. **Fusesserry S. (1996)-**Polyéthylènes basse densité, Techniques de l'Ingénieur, Publication A 3310
51. **Galloway J. A., Jeon H. K., Bell J. R., Macosko C. W. (2005).** Block copolymer compatibilization of cocontinuous polymer blends. *Polymer*, 46(1): 183-191.



52. **Garveba P., Van Veen I.A. and Van Elsas J.D., (2003).** Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*; 45:302- 31.
53. **Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A. and Krieg N.R., (1994).** *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC, ASM, USA.
54. **Golovleva L. A., Maltseva O. V., Solyanikova I. P. (1992).** Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology (Galli, E., Silver, S., Witholt, B.,eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 231-238.
55. **Grimont F., Grimont P. A. D. (2006).** The Genus *Enterobacter* In : *Prokaryotes* (3éd, Vol 6) USA, Springer, pp:197–214.
56. **Grimont F., Grimont P. A. D. (2002).** *Enterobacter* In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2éd, Vol 2 : *The Proteobacteria*, Partie B : *The Gammaproteobacteria*) USA, Springer, pp : 661-671.
57. **Gu C. T., Li C. Y., Yang L. J., Huo G. C. (2014).** *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari* Zhu et al. 2013 as *Kosakonia sacchari* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 64 : 2650-2656..
58. **Guiraud J.P., (1998).** *Techniques d'analyses microbiologiques : Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, France.
59. **Gurtler V. and Stanisich V.A. (1996).** New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142: 3–16.
60. **Hadad D., Geresh S., Sivan A. (2005),** Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*, *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1093-1100.
61. **Hakkarainen M., Albertsson, A. C. (2004).** *Environmental degradation of polyethylene* *Adv. Polym. Sci.* , 169: 177– 199.
62. **Hardoim P. R., Nazir R., Sessitsch A., Elhottova D., Korenblum E., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. (2013).** The new species *Enterobacter*

oryzophilus sp. nov. and *Enterobacter oryzendophyticus* sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice. *BMC.Microbiol.*, 13: 164.

63. **Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G. and Logan N.A., (1998).** *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight, 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 4: 99-106.
64. **Hilario E., Buckley T. and Young J., (2004).** Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86 : 51–64.
65. **Hoffmann H., Stindl S., Stumpf A., Mehlen A., Monget D., Heesemann J., Schleifer K. H., Roggenkamp A. (2005).** Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Syst.Appl.Microbiol.*, 28: 206 -212.
66. **Höfle M.G., (1990).** Transfer RNAs as genotypic fingerprints of eubacteria. *Arch. Microbiol.* 153: 299–304.
67. **Huang J. W. (2008).** Poly (butylene terephthalate)/clay nanocomposite compatibilized with poly (ethylene-co-glycidyl methacrylate). I. Isothermal crystallization. *Journal of Applied Polymer Science*, 110(4): 2195-2204.
68. **Inoue K., Sugiyama K., Kosako Y., Sakazaki R., Yamai S. (2000).** *Enterobacter cowani* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae. *Curr.Microbiol.*, 41: 417-420.
69. **Jafari S. H., Yavari A., Asadinezhad A., Khonakdar H. A., Böhme F. (2005).** Correlation of morphology and rheological response of interfacially modified PTT/m- LLDPE blends with varying extent of modification. *Polymer*, 46(14) : 5082-5093.
70. **Janse J. D., Derks J. H. J., Spit, B. E., Van Der Tuin W.R. (1992).** Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. Marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 15 : 538 -553.

71. **Joffin J. N. and Leyrol G. (2006).** Microbiologie technique. Tomel. Dictionnaire des techniques 4<sup>ème</sup> édition. Boreaux : CRDP d'aquitaine. ISBN., 363 :2-86617.
72. **Johnson J. L. and Ordal E. J. (1968).** Desoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *J. Bacteriol.* 95: 893–900.
73. **Jonson J. L. (1989).** Nucleic acid in bacterial identification. In: Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Volume 4. (ed) Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams and Wilkins Press .Baltimore, USA.
74. **Joshi A.A., Kanekar P.P., Kelkar A.S., Shouche Y.S., Vani A.A., Borgave S.B. and Sarnaik S.S. (2008).** Cultivable bacteria diversity of alkaline Lonar lake India. *Microbial Ecology* ; 55:163–172.
75. **Jouenne S. (2005),** Option chimie et physicochimie des polymère ; Thèse de Doctorat Université Pierre et Marie Curie France.
76. **Julien C. (2005).** Sur le comportement rigidité/durabilité du polyéthylène haute densité en relation avec la structure de chaîne, la microstructure et la topologie moléculaire issues de la cristallisation.Thèse de Doctorat, Ecole doctorale matériaux de Lyon.
77. **Kampfer P., McInroy J. A., Glaeser S. P. (2015)** Enterobacter muelleri sp. nov., isolated from the rhizosphere of Zea mays. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*45:144-187
78. **Kampfer P., Ruppel S., Remus R. (2005).** Enterobacter radicincitans sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Syst.Appl.Microbiol.*, 28, 213-221.
79. **Kampfer, P., Falsen, E., Busse, H.J. (2008).** Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthino bacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley et al. 1978. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 136–138.
80. **Kathiresan K., (2003),** Polythene and Plastics-degrading microbes from the mangrove soil *Revista de biologia tropical*, 51: 3-4.

81. **Khunthongpan S., Bourneow C., Kittikun A., Tanasupawat S., Benjakul S., Sumpavapol P. (2013).** Enterobacter siamensis sp. nov., a transglutaminase-producing bacterium isolated from seafood processing wastewater in Thailand. *J.Gen.Appl.Microbiol.*, 59 : 135-140.
82. **Koutny M., Lemaire J., Delort A. (2006).** Biodegradation of Polyethylene Films with Prooxidant Additives. *Chemosphere* 64:1243.
83. **Kumar S., Hatha AAM., and Christi KS., (2007),** Diversity and effectiveness of tropical mangrove soil microflora on the degradation of polythene carry bags, *Revista de biologia tropical*, 55: 777-786.
84. **Kyaw BM., Champakalakshmi R., Sakharkar MK., Lim CS., Sakharkar KR. (2012),** Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by Pseudomonas species, *Indian Journal of Microbiology*.62:244-254
85. **Lagier J. C., El K. K., Mishra A. K., Robert C., Raoult D., Fournier P. E. (2013).** Non contiguous-finished genome sequence and description of Enterobacter massiliensis sp. nov. *Stand.Genomic.Sci.*, 7: 399-412.
86. **Lai, Q. and Shao, Z. (2008).** *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1911–1915.
87. **Latour X. and Lemanceau P. (1997).** Carbon and energy metabolism of oxidase positive saprophytic fluorescent Pseudomonas spp., *Agronomie*, 17: 427–443.
88. **Lee B., Pometto AL., Fratzke A., Bailey TB. (1991),** Biodegradation of degradable plastic polyethylene by phanerochaete and streptomyces species, *Applied Environmental Microbiology*, 57: 678-685.
89. **Lee J. B., Lee Y. K., Choi G. D., Na S. W., Park T. S., Kim W. N.(2011).** Compatibilizing effects for improving mechanical properties of biodegradable poly (lactic acid) and polycarbonate blends. *Polymer Degradation and Stability*, 96(4):553- 560.
90. **Lehman R., Idol J., Nosker T. (2003),** Co-Continuous Phase Composite Polymer Blends for In vivo and In vitro Biomedical Applications, *WO Patent* 10: 39-25.

91. **Lehner A., Roger S., Fanning S., Iversen C. (2011).** Enterobacter In : MOLECULAR DETECTION OF HUMAN BACTERIAL PATHOGENS. USA, CRC,12: 853-863.
92. **Lelliott R. A., Billing E., Hayward A. C. (1966).** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470–489.
93. **Lévy E., Eyal Z., Chet I., Hochman A. (1966).** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.*, 29:470-489.
94. **Locatelli L., Tarnawski S., Hamelin J., Rossi P., Aragno M., Fromin, N.(2002).** Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 30 half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 220–227.
95. **Logan N.A., Lebbe L., Verhelst A., Goris J., Forsyth G., Rodriguez- Diaz M., Heyndrickx M. and De Vos P., (2002).** *Bacillus luciferensis* sp. nov., from volcanic soil on degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1): 4174.
96. **MacDonald R. T., McCarthy S. P., Gross R. A. (1996).** Enzymatic degradability of poly (lactide): effects of chain stereochemistry and material crystallinity. *Macromolecules*, 29(23): 7356-7361.
97. **Madhaiyan M., Poonguzhali S., Lee J. S., Saravanan V. S., Lee K. C. Santhanakrishnan P. (2010).** *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant-growth promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 60: 1559-1564.
98. **Makdour M (1982).** Polymères, Synthèse Macromoléculaire ; Tome 1 ; Office des publications universitaires O.P.U. Alger.
99. **Mark J.E. (1999).** *Polymer Data Handbook*. Oxford University Press Inc New York USA.
100. **Marmur J. (1961).** Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208.

101. **Martin O., Averous L. (2001).** Poly (lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer*, 42(14): 6209-6219.
102. **Matsubara T. and Zumft W. G. (1982).** Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arch Microbiol.* 132: 322-328.
103. **Matsumora S.(2005)**Mechanism of biodégradation, in : biodegradable polymers for industrial applications, Ed.R.Smith, CRC Press Inc, New Yoek.
104. **Mavrodi D. V., Ksenzenko V. N., Bonsall R. F., Cook R. J., Boronin A. M., Thomashow, L. S. (1998).** A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1 carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriol.* 180: 2541–2548.
105. **Mayer Alfred M., Staples Richard C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* :60: 551-565.
106. **Meyer J. M., Geoffroy V. A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W., Palleroni N. (2002).** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2745–2753.
107. **Meyer J. M., Gruffa C., Raharinosy V., Bezverbnaya I., Schafer M. Budzikiewicz,H. (2008).** Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*, 21: 259–271.
108. **Meyer J. M., Gruffaz C., Tulkki T., Izard D. (2007).** Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2543–2556.
109. **Michoud G. (2014).** Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi « omics », thèse Université de Bretagne Occidentale.
110. **Minkova L., Yordanov H., Filippi S. (2002).** Characterization of blends of LDPE and PA6 with functionalized polyethylenes. *Polymer*, 43(23): 6195-6204.

111. **Miriam S., Ronen W., Sivan A. (2013).** The role of the copper-binding enzyme laccase in the biodegradation of polyethylene by *the actinomycete Rhodococcus Ruber*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84: 204-210.
112. **Mohammad B.T., Al Daghistani H.I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S. and Kennes, C., (2017).** Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*, 10.(11) : 557-694
113. **Monteil V. (2012),** *La catalyse de polymérisation dans tous ses états*, HDR de l'université Claude Bernard Lyon I.
114. **Moon S.I., Urayama H, Kimura Y (2003)** Structural characterization and degradability of poly(L-lactic acid)s incorporating phenylsubstituted alpha-hydroxy acids as comonomers. *Macromolecular Bioscience* 3: 301–309.
115. **Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V. (2007).** Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl Biochem Microbiol* 43: 523–535.
116. **Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. (2010).** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12(6):1513–1530.
117. **Nanda S., Sahu S., and Abraham J., (2010),** Studies on the biodegradation of natural and synthetic polyethylene by *Pseudomonas* spp., *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14: 57-60.
118. **Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau AR, Novikova RV., Grigoryan AA., Ivanova AE., Lysenko, AM., Petrunyaka V.V., Osipov S.S., Ba1yaev S.S. and Ivanov M.V. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Gebacillus subterraneus* gen. nov. sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. novo from petroleum reservoirs and transfer and transfer of *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearotherophilus* , *G.*

*thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidarius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Bacteriology*; 51:433-446.

119. **Negi H., Kapri A., Zaidi M.G.H., Satlewal A., Goel R. (2009).** Comparative in vitro biodegradation studies of epoxy and its silicone blend by selected microbial consortia. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63 (5): 553-558.
120. **Newkome G. R. Yao Z.Q., BakerGupta V. K. G. (2003).** Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol, *J. Org. Chem* :50:11-19.
121. **Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. and Setlow P., (2000).** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 64:548-572.
122. **Nicol .M ., Lee, S., Most, S. P., Whipple, M. E., McCulloch, T. M., Stanley, R. B., Farwell, D. G. (2005).** Porous high-density polyethylene for orbital reconstruction. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 131(5): 446-450.
123. **Niimura Y., Koh E., Yanagida F., Suzuki K.-I., Komagata K. and Kozaki M. (1990).** *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *International Journal of Bacteriology* ; 40 : 297–301.
124. **Nwachukwu S., Obidi O., and Odocha C., (2010),** Occurrence and recalcitrance of polyethylene bag waste in Nigerian soils, *African Journal of Biotechnology*, 9: 6096-6104.
125. **Oda Y., Oida N., Urakami T., and Tonomura K., (1998),** Polycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faecalis*, *FEMS Microbiology Letters*, 150: 339-343.
126. **Ohtaki A, Sato N, Nakasaki K. (1998)** Biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) under controlled composting conditions. *Polym Deg Stab* 61:499–505.



127. **Orhan, Y., Buyukgungor, H., (2000).** Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45: 49-55.
128. **Oyama H. T. (2009).** Super-tough poly (lactic acid) materials: Reactive blending with ethylene copolymer. *Polymer*, 50(3): 747-751.
129. **Palleroni N. J. (1984).** Genus I. *Pseudomonas* **Migula 1894.** In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA: 141–171.
130. **Palleroni N. J. (2008).** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
131. **Palleroni N. J. and Bradbury J. F. (1993).** *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : 606–609.
132. **Palleroni N. J. and Moore E. R. B. (2004).** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.
133. **Palleroni N. J., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M. (1973).** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333–339.
134. **Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G.(2000).** A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem.* ;272:31301–31307.
135. **Pavan M. E., Franco R. J., Rodriguez J. M., Gadaleta P., Abbott S. L., Janda J. M., Zorzopulos J. (2005).** Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 55: 437-442.
136. **Peacock, D.C.P., Knipe, R.J., Sanderson, D.J., (2000).** Glossary of normal faults. *Journal of Structural Geology* 22: 291–305.

137. **Pedroso A. G., Rosa D. S. (2005).** Effects of the compatibilizer PE-g-GMA on the mechanical, thermal and morphological properties of virgin and reprocessed LDPE/corn starch blends. *Polymers for advanced technologies*, 16(4): 310-317.
138. **Peix A., Ramírez-Bahena M.H., Velázquez, E. (2009).** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9: 1132–1147.
139. **Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J.M., Ramirez-Bahena M.H., Mateos P.F., Santa-Regina I., Rodriguez-Barrueco C., Martinez-Molina E., Velazquez E. (2007).** Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* into *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp.nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov. and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1286–1290.
140. **Peng G., Zhang W., Luo H., Xie H., Lai W., Tan Z. (2009).** *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 59 : 1650-1655.
141. **Perrin R., Scharff J. P(1999),** Chimie industrielle, Dunod, 2ème Ed.
142. **Phillips P. J., Kao Y. H. (1986).** Crystallinity in chemically crosslinked low density polyethylenes: 2. Crystallization kinetics. *Polymer*, 27(11): 1679-1686.
143. **Pineda F.J., Antoine M.D., Demirev P.A., Feldman A.B., Jackman J., Longenecker M., Lin J.S., (2003).** Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Ann. Chem.* 75: 3817–3822.
144. **Polymère" Microsoft ® Encarta ® 2007.** [CD].Microsoft Corporation.
145. **Pometto A. L., Lee B., and Johnson KE., (1992),** Production of an Extracellular Polyethylene-Degrading Enzyme(s) by *Streptomyces* Species, *Applied Environmental Microbiology*, 58: 731-733.
146. **Pracella, M., Rolla, L., Chionna, D., Galeski, A. (2002).** Compatibilization and properties of poly (ethylene terephthalate)/polyethylene blends based on

- recycled materials. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203(10), 1473-1485.
147. **Pramila R. and Vijaya R. K. (2011).** Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area. *Microbiol Biotech Res* 1(4): 131-136.
  148. **Prescott L. M. (2002).** VIII Ecology and symbiosis. In *Microbiology*. Fifth edition. De Boeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1014.
  149. **Priest F.G., Sonenshein A.L., Hoch J.A. and Losick R., (1993).** *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Washington D.C., American Society for Microbiology, USA.
  150. **Prieur D. ; Erauso G., Geslin C., Lucas S., Gaillard M., Bidault A., Mattenet A., Rouault K. and Flament D. (2004).** Genetic elements of thermococcales. *Biochemical Society Transactions*, 32(2):184-187.
  151. **Priyanka N., and Archana T., (2011),** Biodegradability of Polythene and Plastic by the Help of Microorganism: A Way for Brighter Future, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 1, pp 111.
  152. **Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffac C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moëgne-Loccoz Y. (2011).** *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4 diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl.Microbiol.* 34 : 180–188.
  153. **Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffac C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moëgne-Loccoz Y. (2011).** *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread \$ plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4 diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl.Microbiol.* 34 : 180–188.
  154. **Reddy R. M. (2008),** Impact of soil composting using municipal solid waste on biodegradation of plastics, *Indian Journal of Biotechnology*, 7: 235-239.
  155. **Rossler D., Ludwig W., Schleifer K. H., Lin C., McGill T. J., Wisotzkey J. D., Jurtshuk P. and Fox G. E., (1991).** Phylogenetic diversity in the

- genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies. *Systematic and Applied Microbiology*; 14: 266–269.
156. **Roy, P. K., Titus, S., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C., Rajagopal, C. (2008).** Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability*, 93(10): 1917-1922.
  157. **Saitou N. & Nei M. (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 63: 406-4250
  158. **Samrook J. and Russe D. W. (2001).** *Molecular cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York.
  159. **Sangale M. K., Mohd Shahnawaz., and Avinash B. A., (2012),** A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. Sangale et al., *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 3: 10.
  160. **Schlesner H., Lawson P. A., Collins M .D., Weiss N., Wehmeyer U., Voßlker H. and Thomm M., (2001).** *Filobacillus milosensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51: 425–431.
  161. **Seneviratne G., Tennakoon NS., Weerasekara MLMAW., and Nandasena KA. (2006),** Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium-Bacillus* biofilm, *Current Science*, 90: 20-22.
  162. **Seymour RB, (1989), Polymer Science Before & After 1899:** Notable Developments during The Lifetime Of Maurtis Dekkar, *Journal of Macromolecular Science*, 26: 1023-1032.
  163. **Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. Ahmed, S. (2007).** Isolation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading actinomycetes and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Streptovercillium kashmirensis* AF1. *Annal Microbiol.*; 57(4):583-588.
  164. **Sharma A., Sharma A. (2004),** Degradation assessment of low density polythene (LDP) and Polythene (PP) by an indigenous isolate of

- Pseudomonas stutzeri*, Journal of Scientific & Industrial Research, 63: 293-296.
165. **Shida O., Takagi H., Kadowaki K. and Komagata K., (1996).** Proposal for two new genera, *Brevibacillus gen. nov.* and *Aneurinibacillus gen. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*; 46: 939–946.
  166. **Shimao, M. (2001).** Biodegradation of plastics. *Current opinion in Biotechnology*, 12(3): 242-247.
  167. **Sivan A. (2011),** New perspectives in plastic biodegradation, *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 422-426.
  168. **Sivan A., Szanto M., and Pavlov V. (2006)** Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 346-352.
  169. **Skariyachan S., Megha M., Kini MN., Mukund KM., Rizvi A., Vasist K., (2014),** Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly. *Mol Biol Evol* 63: 406-425.
  170. **Smith, C., (1997).** Les mesures pyrolyse, In: *Recueil des techniques instrumentales pour la chimie analytique*, Settle (Ed.)
  171. **Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A. D., Kämpfer P., Maiden M. C. J., Nesme X., Rosselló-Mora, R., Swings J., Trüper H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1043-1047.
  172. **Stackebrandt E., Ludwig W., Weizenegger M., Dorn S., McGill T.J., Fox G.E., Woese C. R., Schubert W., Schleifer K. H. (1987).** Comparative 16S rRNA Oligonucleotide Analyses and Murein Types of Round Spore Forming Bacilli and Non Spore Forming Relatives. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2523-2529.
  173. **Stanier R. Y, Palleroni N. J., Doudoroff, M. (1966).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
  174. **Stephan R., Van T. S., Cleenwerck I., Iversen C., Joosten H., De V. P., Lehner A. (2008).** *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder,

- infant formula and an infant formula production environment. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 58: 237-241.
- 175. Stephan R., Van T. S., Cleenwerck I., Vancanneyt M., De V. P., Lehner A. (2007).** Enterobacter turicensis sp. nov. and Enterobacter helveticus sp. nov., isolated from fruit powder. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 57: 820-826.
- 176. Stoffers N. H. (2005).** Certified Reference Materials for Food Packaging Specific Migration Tests: Development, Validation and Modeling, Doctorate Thesis, Wageningen University, the Netherlands,
- 177. Su Z., Li Q., Liu Y., Hu G. H., Wu C. (2009).** Compatibility and phase structure of binary blends of poly (lactic acid) and glycidyl methacrylate grafted poly (ethylene octane). *European Polymer Journal*, 45(8): 2428-2433.
- 178. Suresh B., Maruthamuthu S., Palanisamy N., Rangunathan R., Pandiyaraj KN., et al.,(2011),** Investigation on biodegradability of polyethylene by Bacillus cereus strain Ma-Su isolated from compost soil, *International Journal of Microbiology Research*, 2: 292-302.
- 179. Tamaoka J., Ha D.-M., Komagata K., (1987).** Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosterone* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst.Bacteriol.* 37: 52–59.
- 180. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.
- 181. Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. (1994).** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673 4680.
- 182. Tomalia D. A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. A. (1985).** New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules *Polym. J.*, 17: 117.

183. **Tratignon J. P., Verdu P., Dobraczynski A. J. M. (1989).** Matières plastiques, PP 40 44, Nathan, 4ième édition, Paris,
184. **Tribedi P. and Sil A. K. (2013).** Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas sp.* AKS2 biofilm. *Environ Sci Pollut Res* 20: 4146-4153.
185. **Tsai C. H., Chang F. C. (1996).** Polymer blends of PBT and PP compatibilized by ethylene-co-glycidyl methacrylate copolymers. *Journal of applied polymer science*, 61(2): 321-332.
186. **Tsuji H, Ishizaka T. (2001.)** Preparation of porous poly( $\delta$ -caprolactone) films from blends by selective enzymatic removal of poly(L-lactide). *Macromolecular Bioscience*, 1: 359–365.
187. **Tsuji H. Polylactides. In Doi Y., Steinbüchel A. (2002).** Biopolymers, Polyesters III, Applications and Commercial Products, 4;158-167.
188. **Usha R., Sangeetha T., Palaniswamy M. (2011),** Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil, Libyan Agriculture Research Centre *Journal International*, 2(4):200-204.
189. **Veenstra H., Van Dam J., Posthuma de Boer A. (2000).** On the coarsening of co continuous morphologies in polymer blends: effect of interfacial tension, viscosity and physical cross-links. *Polymer*, 41(8): 3037-3045.
190. **Visca P., Imperi F., Lamont, I. L. (2007).** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15: 22–30.
191. **Vögtle F., Buhleier E., Wehner W. (1978),** Cascade and Nonskid-Chain-Like Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis*, 2: 155-158.
192. **Wainø M., Tindall B. J., Schumann P. and Ingvorsen K., (1999).** *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 49: 821–831.
193. **Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173(2):697-703.

194. **Wiess P. (2010).** la chimie des polymères, Université Médicale Virtuelle Francophone.
195. **Willems A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters K., de Ley J., (1992).** Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 107–119.
196. **Williams D. F. (1981).** Enzymic hydrolysis of polylactic acid. *Engineering in Medicine*, 10(1): 5-7.
197. **Wisotzkey J. D., Jurtshuk P., 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* ; 42 : 263–269.
198. **Woese C. R., Stackebrandt E., Weisburg W. G., Paster B. J., Madigan M. T., Fowler V. J., Hahn, C. M., Blanz P., Gupta R., Neelson K. H., Fox G. E. (1984).** The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 315–326.
199. **Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M., (1992).** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immun.* 36: 1251–1275.
200. **Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. (1995).** Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov., Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immun.* 39: 897–904.
201. **Yoon J. H., Weiss N., Lee K. C., Lee I. S., Kang K. H. and Park Y. H., (2001).** *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall, and reclassification of



*Bacillus marinus* Ruger 1983 as *Marinibacillus marinus* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 51: 2087–2093.

202. **Zaki O. (2008).** «Contribution à l'étude et à la modélisation de l'influence des phénomènes de transfert de masse sur le comportement mécanique de flocons en polypropylène», Université de Paris-Est, Paris (France).
203. **Zhu B., Lou M. M., Xie G. L., Wang G. F., Zhou Q., Wang F., Fang Y., Su, T., Li B., Duan Y. P. (2011).** *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 61, 2769-2774.
204. **Zhu B., Zhou Q., Lin L., Hu C., Shen P., Yang L., An Q., Xie G., Li Y. (2013).** *Enterobacter sacchari* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 63: 2577-2582.

# **ANNEXES**

## Annexe 01 : Préparation des milieux de cultures utilisés

### 1. Gélose nutritif (composition en g/L)

Extrait de levure .....	05g
Peptone.....	10g
NaCl.....	05g
Agar.....	20g

pH=7

### 2. Milieu minéral gélosé

MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.5g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12H <sub>2</sub> O).....	2.52 g/l
NH <sub>4</sub> Cl.....	1 g/l
CaCl <sub>2</sub> .....	0.002 g/l
MnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.007 g/l
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.001 g/l
ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.007 g/l
Agar.....	20 g/l

### 3. Milieu minéral liquide

MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.5g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12H <sub>2</sub> O).....	2.52 g/l
NH <sub>4</sub> Cl.....	1 g/l
CaCl <sub>2</sub> .....	0.002 g/l
MnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.007 g/l
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.001 g/l
ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....	0.007 g/l

## Annexe02: Base de données pour galerie Api20E

Esèce	ANAEROBIOSE	ONPG	ADH	LDG	ODC	CITRATE	SIMMONS	H2S	URE	TDA	INDOLE	VP	GELATINASE	GLUCOSE	MANNITOL	INOSITOL	SORBITOL	RHAMNOSE	SACCHAROSE	MELIBIOSE	AMYGDALINE	ARABNOSE	OXYDASE	NITRITES	MOBILITE	LECITHINASE	
<i>L. olivei</i>	100	80	0	0	0	0	0	75	0	50	99	99	99	1	50	1	1	1	50	50	1	0	25	90	0	0	
<i>L. amylicaquefaciens</i>	0	85	0	0	0	75	0	0	0	0	50	99	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	95	90	0	0	
<i>L. ondereis</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	90	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	99	0	0	96	
<i>L. drevis</i>	0	25	5	0	0	70	7	3	0	0	57	40	1	1	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0	
<i>L. coroterrum</i>	?	1	1	1	1	50	1	1	1	1	99	50	99	50	50	1	1	50	50	1	50	0	99	50	0	0	
<i>L. cereus</i>	100	0	85	0	1	80	1	50	0	0	60	99	99	1	1	1	1	50	50	1	1	0	78	90	90	96	
<i>L. cereus (feretique)</i>	100	0	2	0	1	99	14	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	85	90	90	96	
<i>L. circulans</i>	50	80	2	0	0	30	4	4	0	4	30	16	99	99	50	1	50	99	50	99	99	0	16	90	0	0	
<i>L. coagulans</i>	100	99	0	0	0	0	0	0	0	0	99	50	99	50	50	50	50	99	50	50	50	0	50	90	0	0	
<i>L. firmus</i>	0	21	7	0	0	99	0	0	0	0	71	99	99	99	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0	
<i>L. heterosporus (2)</i>	100	0	0	0	0	75	0	0	0	50	50	99	99	99	1	1	1	1	50	50	1	0	75	90	0	0	
<i>L. lentus</i>	0	98	2	0	0	60	1	50	0	0	30	30	99	99	1	50	50	99	50	50	1	0	0	90	0	0	
<i>L. licheniformis</i>	100	99	93	0	0	77	0	3	0	0	80	99	99	99	50	99	99	99	50	99	99	0	87	90	0	0	
<i>L. macerans</i>	100	99	26	0	0	30	0	0	0	0	73	50	99	99	50	99	99	50	99	99	0	36	90	0	0		
<i>L. megarherum (2)</i>	0	83	0	0	5	77	0	0	0	0	88	77	99	99	50	1	99	50	99	99	0	77	90	0	0		
<i>L. mycolides</i>	?	43	56	6	0	93	0	18	0	0	99	99	99	1	1	1	1	50	50	50	1	0	50	1	0	0	
<i>L. pasteurianus</i>	100	25	0	0	0	20	0	10	0	0	50	99	50	50	50	99	99	99	50	99	1	0	20	90	0	0	
<i>L. pasteurii</i>	0	1	1	1	1	1	1	99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50	1	1	0	99	90	0	0	
<i>L. polymyxa</i>	100	99	0	0	0	52	0	0	0	0	99	95	99	99	1	50	99	50	99	99	99	0	71	90	0	0	
<i>L. pumilus</i>	0	99	4	0	0	86	0	0	0	0	99	95	99	99	50	1	1	99	50	99	99	0	25	90	0	0	
<i>L. sphaericus</i>	0	1	0	0	0	60	0	25	0	0	43	37	1	1	1	1	1	1	50	1	1	0	10	90	0	0	
<i>L. steurothermophilus 1</i>	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	50	50	1	99	50	1	99	50	1	50	0	50	90	0
<i>L. steurothermophilus 2</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	50	90	0	0	
<i>L. steurothermophilus 3</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	1	90	0	0	
<i>L. subtilis</i>	0	95	5	0	0	89	0	5	0	0	99	95	99	99	99	99	1	99	50	99	99	0	94	90	0	0	
<i>L. thermophilus</i>	100	99	1	1	1	99	99	99	1	99	50	99	99	1	99	1	1	99	50	99	1	0	50	90	0	0	
<i>L. thuridiformis (2)</i>	100	1	99	0	0	99	0	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	50	50	1	1	0	99	90	0	96	

### Annexe03: Tableaux de lecture APi20E

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
H <sub>2</sub> S	Sodium thioisulfate	Production d' H <sub>2</sub> S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	TriptophaneDésAminase	Jaune	TDA immédiat Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	Incolore-vert pale –jaune	JAMES immédiat Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	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 (RHAMnose)	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	

**REGULAR ARTICLE**

## Isolation and identification of low density polythene-degrading bacteria from soil of North West of Algeria

K. Zerhouni<sup>1</sup>, B. Abbouni<sup>1\*</sup>, K. Kanoun<sup>2</sup>, K. Larbi Daouadji<sup>3</sup>, A. Tifrit, M. Benahmed<sup>4</sup>, T. M. Chaouche<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Microbiology Proteomics and Health, Department of Biology

<sup>2</sup>Faculty of Natural Science and Life, University of Djillali Liabes Sidi Bel Abbès (Algeria)

<sup>3</sup>Laboratory of Applied Microbiology for industrial food in biomedical and the environment, Algeria

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen (Algeria)

**ARTICLE INFO****Article History:**

Received: 19 Oct 2018

Revised: 13 Dec 2018

Accepted: 26 Dec 2018

**\*Corresponding Author:**

Email: [abbounibouziane@yahoo.de](mailto:abbounibouziane@yahoo.de)

Telephone: 0021377175221

**Keywords:** Bacteria degrading LDPE, low density Polyethylene, biodegradation

**ABSTRACT**

Plastic bags (Low Density Polyethylene (LDPE)) belong to the polymers, which plays a very important role in our daily lives by their diversified application. However, the accumulation of the plastic bags in the environment constitutes a serious problem and a real source for visual nuisance, pollution of soil and marine environments. Furthermore, their biodegradation was the safest method of breakdown that possibly leaves behind less toxic residues and showed potential of bio-geo chemical cycling of the substrate. The aim of the present work was the characterization of the isolated bacterial strains from a municipal landfill area of Tlemcen, North West Algeria, which were implicated by the biodegradation ability of the Low Density Polyethylene. The degradation of the Low Density Polyethylene was investigated by studying the bacterial growth of the isolated, inoculated on a solid culture medium, which was composed of LDPE as the sole carbon source with and without a nitrogen source and the selection was based by the determination of the produced diameter of hydrolysis clear zone on the surface. Furthermore, the isolated, selected degrading Low Density Polyethylene bacterial ML002 has been identified by the study of their morphological, biochemical characteristics and the amplification of the fragment, coding the region of ARN 16S. The use of the API system indicated their belonging to the genus *Bacillus Cereus*, which has reduced the weight of LDPE by 0.26, 1.28, 1.53% after 30, 90, 120 days respectively. Furthermore, the amplified of the fragment, coding the region of ARN 16S by the isolated, selected bacterial ML002 indicated a similarity of 99.394% with *Bacillus wiedmannii* and *Bacillus proteolyticus* and 99.293% homology with *Bacillus toyonensis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.

**1. Introduction**

Industrial plastics have multiplied and diversified applications because of their unrivaled properties such as their versatility, lightness, transparency,

durability, hygiene, resistance to chemical products, thermal and electrical insulation (Bellahcene, 2009), where a polyethylene was known with their excessive use in packaging and other industrial and

agricultural applications (Esmaeili et al., 2013) with an annual global production of approximately 150 million tons (Zahra et al., 2010 ; O'Brine and Thompson, 2010).

Low Density Polyethylene (LDPE) is a thermoplastic polymer, which was composed of a long chain monomers of ethylene, durable, light-weight, easily processed and characteristically inert, where these properties make it appropriate for many industrial uses (Mark, 1999). The accumulation of plastic debris in the environment has considerably augmented and caused a serious source of pollution and disturbs the ecosystem (Harshvardhan and Jha, 2013 ; Juan-Manuel et al., 2014 ; Sadaqat et al., 2016) .Due the drastically problem caused by the use of polyethylene, the reduction of the accumulated debris in the environment was required.

However, the present work was dealt with the isolation of the bacterial strains from garbage waste soil, and the determination of the biodegraded polyethylene LDPE weight in the inoculated liquid culture medium and a further characterization has been used by the study of the morphological, biochemical characteristics and the amplification of the fragment, coding the region of ARN 16S.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample collection and bacterial isolation

The soil samples were collected from the garbage of a municipal landfill area of Tlemcen, located in the region of North West Algeria (Figure 1). For this purpose, the associated soil with bags of waste polyethylene was removed under aseptic conditions from a depth of 10 cm and dried at room temperature for 2 hours (Deepika and Madhuri, 2015). Furthermore, 25 g of the collected soil sample was transferred in a flask, which was contained a volume of 125 ml of physiological distilled water and the content was homogenized by shaking for a period of 30 minutes. The supernatant was serially diluted, where a volume of 100 µl of each dilution was inoculated in the solid nutrient culture medium, incubated at temperature 37°C for 24 hours. The developed colonies were isolated and successively sub-cultured and the selected pure colonies were conserved and then preserved in slant at temperature of 4°C (Deepika and Madhuri, 2015).

### 2.2. Screening of degrading Polyethylene LDPE bacterial strains

The screening of the degrading Polyethylene LDPE

bacterial strains has been achieved by the adding of 1g of the LDPE powder in a volume of 1000 ml of the mineral culture medium, which was described by Bonhomme et al., (2003) composed of the followed components : MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.52 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, CaCl<sub>2</sub> 0.002 g, MnSO<sub>4</sub> 0.007 g, FeSO<sub>4</sub> 0.001 g, and ZnSO<sub>4</sub> 0.007 g). The mixture was homogenized by sonification for a period of 1 hour and 20 g of agar were added and sterilized in the autoclave for 20 min. The isolated bacterial strains was inoculated in the culture medium, incubated at temperature 37°C for 5 weeks (Deepika and Madhuri, 2015; Usha et al., 2011).

### 2.3. Identification of degrading Low Density Polyethylene bacteria

The identification of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains was mainly based on macroscopic and microscopic observation after the coloration of Gram and by using the (galerie API20E -system ) for biochemical characteristic determination (Reffas et al ., 2016).

### 2.4. Parameters influencing bacterial growth

The optimization of the parameters implicated in the bacterial growth has been investigated by the inoculation of the isolated, selected LDPE-degrading bacteria on the nutrient broth culture medium, adjusted at several pH-value pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), and incubation at different temperature (25, 28, 30, 40, 45, 50, 55°C) in the presence of different concentration (1, 2, 4, 6, 8, 8.5, 9%) of NaCl.

### 2.5. Study of Biodegradation of LDPE by the determination of weight

The biodegradation assay was carried out by the using of polyethylene films (4x4 cm), which was dried overnight at a temperature of 60°C. 130 mg weighed sample was disinfected with 70% ethanol for 30 min] (Pramila and Ramesh, 2011; Sudhakar et al., 2008; Santo et al., 2012), introduced in the flasks, which was contained a volume of 40 ml of the mineral culture medium. The mineral culture medium was inoculated with a volume of 2 ml of the overnight culture of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains, incubated at temperature of 37°C for 5 weeks. The biomass of the grown degrading LDPE bacterial strains was harvested by the using centrifugation at 1000 rpm, washed twice by the using of the mineral culture medium a control was used for measuring of the

weight reduction of LDPE (Sivan et al.,2006 ; Tribedi and Sil ,2013). Furthermore, the flasks were further incubated in a stirring incubator at temperature 30°C, 120 rpm for (30, 90 days and 120 days) respectively. After that, the biomass was washed with 70% ethanol, dried overnight at temperature 60°C and weighed (Bhone et al.,2012 ; Tribedi et al.,2012) .The lost weight was calculated and compared according to the formula below (Deepika and Madhuri, 2015):

$$\text{Weight Loss (\%)} = \frac{[(\text{Initial Weight} - \text{Final Weight}) / \text{Initial Weight}] \times 100}{}$$

### 2.6. Molecular identification of LDPE degrading strains

The genomic DNA extraction of the inoculated, isolated, selected degrading low density polyethylene bacterial strains was carried out by the using of Promega kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit". For this purpose, the biomass of the isolated, selected degrading low density polyethylene bacterial strains was harvested by the inoculation of a volume of 25 ml culture medium culture, and incubation at temperature of 30°C for 2 hours and the centrifugation at 6000 rpm for 10 min. The obtained, extracted DNA was dissolved in TE buffer (Tris-EDTA), quantified by the using NanoDrop technology (Thermo Fisher Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) and stored at temperature of 4°C and -20°C for short and long period respectively.

PCR Amplifications: DNA fragment was amplified by PCR technique, which has been achieved the using of Mxycycler® NexusEppendorf® thermocycler. A standard primers were used primers, which was contained the followed sequence : fD1 AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG (20) and rD1 AA-GCTTAAGGAGGTGATCCAGCC (23). DNA amplification was done by the using of Taq DNA polymerase. The mixture reaction was composed of 1 µl of template DNA, 2.5 µl of 10 µM buffer "Incubation mix Taq-polymerase with MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl of dNTP mix (10 mM), 1 µl of each of the primers µM) and ultra-pure water (25 µl).

For DNA amplification the followed program has been employed: the first step, the DNA fragment was denatured by heating at temperature 95°C for 2 min and the reaction was programmed for 35 cycles as followed denaturation at 94°C for 40 sec, hybridization at 56°C for 45 sec and the elongation at 72°C for 1 min, and for the last cycle 8 min elongation at 72°C. The obtained, amplified PCR DNA

product has been visualized by the using of 1% agarose gel electrophoresis (35 min, 90 V and 300 mA), eluted in TAE buffer bath, which was contained (4.8 g/L Tris, 0 sodium acetate, 41 g/L, EDTA 0.34 g/L, 1 L distilled water) to BET (1.5 mg/l). The visualization of the amplified PCR product was done under UV and sent to EurofinsGenomics. Their sequencing has been achieved by the using of the described method by Sanger et al (1977).

### 3. Results and Discussion

The most used popular plastics wastes in Algeria were the Plastic bags, which was usually composed of low density polyethylene and their accumulation in the environment constituted a serious problem and a real source for visual nuisance, pollution of soil and marine environments. Furthermore, their biodegradation was the safest method of breakdown that possibly leaves behind less toxic residue and showed potentials of bio-geo chemical cycling of the substrate.



Figure 1: Presentation of soil sampling for isolation of degrading low density polyethylene Bacterial strains from garbage of a former dump in Tlemcen, located in the region of North West Algeria.

The aim of the present work was the isolation if the bacterial strains from the region of a municipal landfill area of Tlemcen, located North West Algeria and their characterization for biodegradation of the Low Density Polyethylene.

(Sudhakar et al.,2008; Albertsson et al.,1987) has reported that several microorganisms has manifested a important for biodegradation of LDPE, where some bacteria were isolated from soil garbage (Ji-Dong,2003 ; Albertsson et al.,1987). The primary screening of the isolated, selected ML002 *Bacillus cereus*, inoculated on the mineral medium, supplemented with of LDPE powder as sole source of carbon, incubated at temperature of 30°C indicated the presence of important potential of biodegradation of LDPE, illustrated by the formed hy-

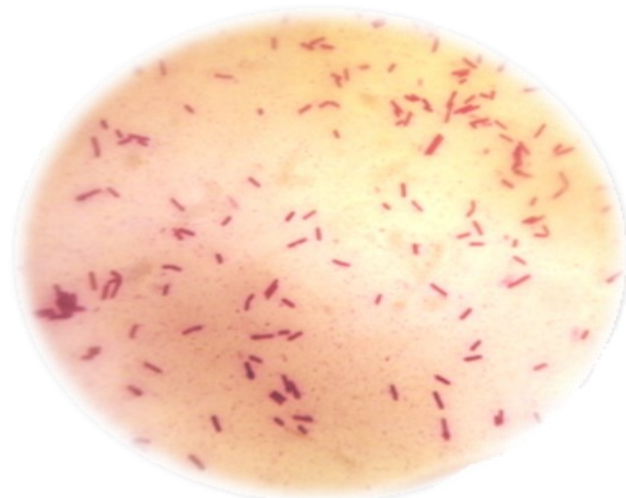


drolysis (**Figure 2**). Early study has reported **Gilan et al (2004)** and **Sivan et al (2006)** that the bacterial strains *Rhodococcus ruber* has manifested as a important potential for LDPE degradation .



**Figure 2:** Illustration of the formed hydrolysis zone of the isolated, selected degrading LDPE ML002 *Bacillus cereus*, inoculated in the mineral medium, which was supplemented with of LDPE powder as sole source of carbon, incubated at temperature of 30°C .

The identification of the isolated, selected bacterial degrading LDPE (ML002) was identified by the study of the morphological observation and the biochemical investigation. Furthermore, the macroscopic observation of the isolated, selected degrading LDPE bacterial (ML002) on the nutrient broth solid culture medium indicated the growth of white and large colonies, furthermore, the microscopic observation has been showed the presence of large Gram-positive, rod-shaped with endospore forming (**Figure 3**). The biochemical investigation of



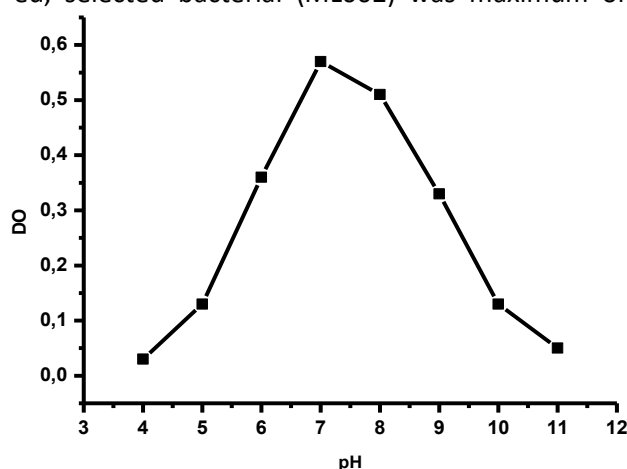
**Figure 3:** Microscopic observation of the colored Gram, isolated, selected degrading LDPE ML002 *Bacillus cereus*, inoculated in the mineral medium, supplemented with LDPE powder as sole source of carbon, incubated at temperature of 30°C for 24 hours.

the isolated, selected degrading LDPE bacterial (ML002) indicated their belonging to the genus of *Bacillus cereus*.

### 3.1. Optimization of the implicated parameters for bacterial growth

The effect of pH-value and temperature on the degradation of LDPE by growth of the isolated, selected degrading LDPE bacterial (ML002) has been achieved. For this purpose, the isolated, selected degrading LDPE bacterial (ML002) was inoculated on the mineral medium, supplemented with of LDPE powder as sole source of carbon, adjusted at different pH-value (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), incubated at different temperature (25, 28, 30, 40, 45, 50, 55°C) in the presence of different concentration (1, 2, 4, 6, 8, 8.5, 9%) of NaCl.

The obtained results indicated that the growth of the isolated, selected degrading LDPE bacterial (ML002) was maximum on the culture medium adjusted at pH-value of (7-8). After that, the bacterial growth was drastically reduced on the culture medium adjusted at pH-values over (9-11) (**Figure 4**). Furthermore, the obtained results of the effect of temperature showed that the growth of the isolated, selected bacterial (ML002) was maximum on



**Figure 4:** Optimization of bacterial growth of the isolated, selected degrading LDPE ML002 *Bacillus cereus*, inoculated in nutrient broth culture medium, adjusted at different pH -value: (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), incubated at temperature of 30°C for 24 hours.

the on the culture medium, incubated at temperature of 35°C. After that the bacterial growth was considerably decreased on the inoculated culture medium, incubated at temperature (40, 45, 50, 55°C) (**Figure 5**). Finally, the obtained results of effect of different concentration of NaCl showed that the growth of the isolated, selected degrading LDPE bacterial (ML002) was maximum on the culture medium, which contained 2%. After that, the

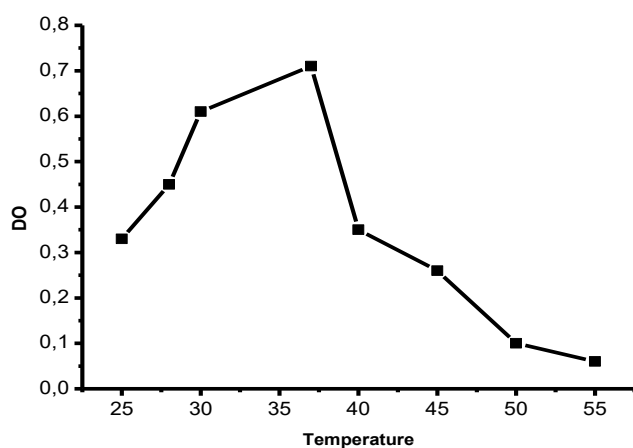


Figure 5: Optimization of bacterial growth of the isolated, selected degrading LDPE ML002 *Bacillus cereus*, inoculated in nutrient broth culture medium, incubated at different Temperature (25, 28, 30, 40, 45, 50, 55°C) for 24 hours.

bacterial growth was considerably decreased in the presence in the inoculated culture medium of the followed concentration (4, 6, 8, 8.5, 9%) of NaCl (Figure 6).

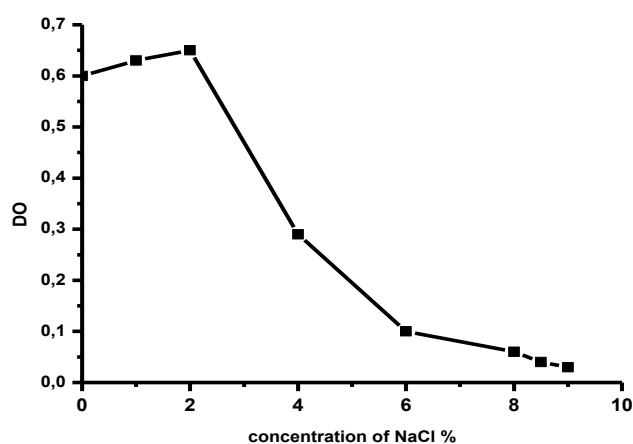


Figure 6: Optimization of bacterial growth of the isolated, selected degrading LDPE ML002 *Bacillus cereus*, inoculated in nutrient broth culture medium, in the presence different concentration NaCl (1, 2, 4, 6, 8, 8.5, 9%), , incubated at temperature of 30°C for 24 hours.

### 3.2. Study of LDPE degradation by determination of their molecular weight

The study degradation of LDPE by the isolated, selected degrading LDPE ML002 bacterial strain has been investigated by the inoculation of the mineral culture medium, supplemented with several concentration of LDPE powder incubated at temperature of 30°C and the determination of the lost molecular weight LDPE. The obtained results indicated that the measurement of the lost weight LDPE has been achieved by the incubation of the isolated, selected ML002 bacterial strain by shaking at 120 rpm at temperature of 30°C for a period (30, 90, 120 days) respectively (Table 1). The contained

molecular weight LDPE in the inoculated mineral culture medium after (30, 90, 12) days incubation has been considerably reduced to (0.26, 1.28, 1.53%) respectively. Where, the molecular weight LDPE reduction was for the control was 0%. (Mark, 1999; Tribedi and Sil, 2013; Gilan et al., 2003) has reported that some bacterial strains use the LDPE as a sole source of carbon.

### 3.3. Molecular identification of LDPE degrading bacterial strains

The molecular identification of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains ML002 was carried out by the sequencing of the amplified DNA fragment of the ARN16S region by the using the above mentioned primers with Mcycycler® NexusEppendorf® thermocycler. The obtained sequencing by Eurofins Genomics for sequencing was submitted to Genbank and available under (accession no: MG738271) (Figure 7). The performed similarity analysis of the sequence indicated their affiliation to Firmicutes, where the sequence of the small ribosomal subunit sequence of the isolated, selected bacterial degrading LDPE strains ML002 was presented over 99.394% identity to both bacterial strains *Bacillus wiedmannii* and *Bacillus proteolyticus* and 99.293% homologies to *Bacillus toyonensis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Furthermore, the gene sequence of the 16S rRNA of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains ML002 was also aligned with the species closed to Firmicutes, which was obtained the database by Clustal W 1.8 software (Thompson et al., 1994). The phylogenetic tree was constructed by the using of the Mega 6 program (Kumar et al., 2004), whereas, the rooting was performed using the ribosomal sequence of *Bacillus muralis* DSM16288 (Figure 8).

### 4. Conclusion

The effective isolation, selection low density polyethylene degrading bacterial strains (LDPE) indicated the possibility of the use of some bacteria under natural conditions for the elimination of LDPE in the environment. The molecular identification of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains ML002 by the sequencing of the amplified DNA fragment of the ARN16S region indicated their belonging to the genus of *Bacillus cereus*. Furthermore, detailed studies will be required by the use of others modern methods such as spectroscopic analysis and gas chromatography. Finally, the used chemical fertilizers could be replaced by the isolat-

**ML002\_fd1 -- 14..1006 of sequence**  
 CTATACTGCAGTCGAGCGAATGGATTAGAGAGCTTGCTCTTCATGAAGTTAGCGGCGGAC  
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG  
 TAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCA  
 CTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC  
 GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT  
 CCTACGGGAGCGAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGAGCGGAGCAACGC  
 CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCT  
 AGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC  
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG  
 CGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGTCATTGG  
 AAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATG  
 GTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTAAGTACACTGA  
 GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
 TGATGGTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACT  
 CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA  
 GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATC  
 CTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTC

**ML002\_rD1 -- 18..1028 of sequence**  
 TTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTA  
 CCCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
 GGGAACGTATTCACCGCGCATGTGTATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTATGTAG  
 GCGAGTTGCAGCTACAATCCGAAGTGAAGACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCG  
 GTCTTGACAGCTCTTTGACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA  
 TGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGT  
 CCCAATTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTAAACCAAC  
 ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGA  
 AGCCCTATCTTAGGGTTTTAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT  
 CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAG  
 CTTGCGGCGTACTCCCAGGCGGAGTGTAAATGCGTTAACTTCAGCATAAAGGGCG  
 GAAACCCTTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC  
 TGTGCTCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTACAGTACAGACCAGAAAGTGCCTTCGC  
 CACTGGTGTCTCCATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCT  
 CTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTCA  
 CATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTG>  
 CCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTG

Figure 7: Illustration of the sequence of ARN16S, region of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains ML002, obtained by EurofinsGenomics and submitted to Genbank and available under (accession no: MG738271).

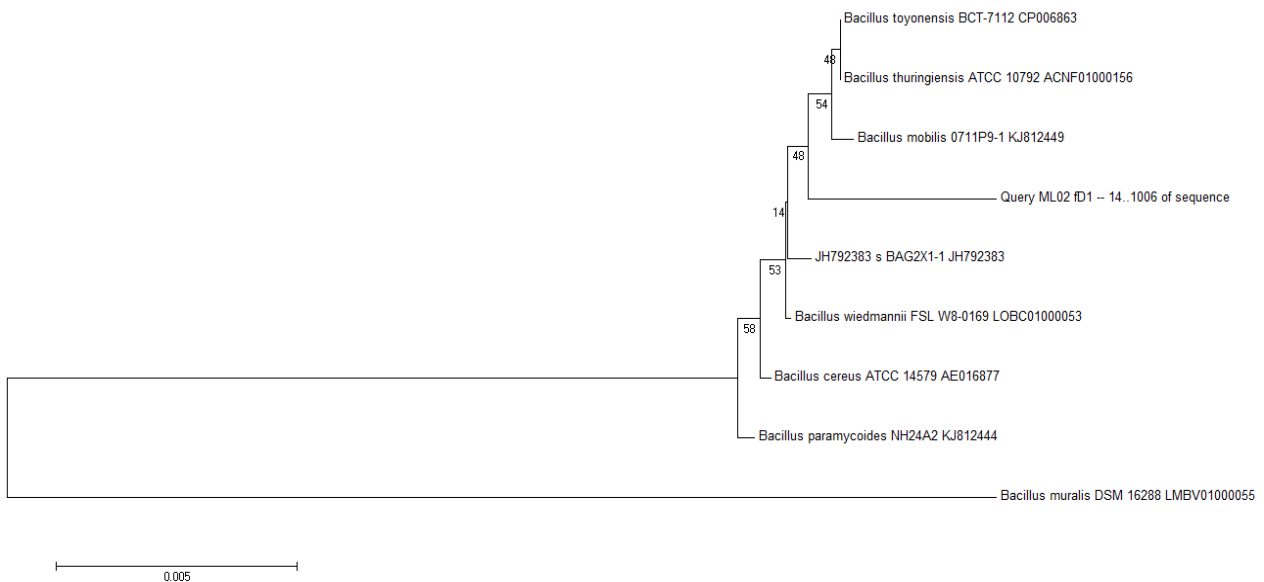


Figure 8: Construction of Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence of the isolated, selected degrading LDPE bacterial strains ML002 by the using of the Mega 6 program. The above topology was obtained with the Neighbor-Joining method and by the using *Bacillus muralis* DSM16288 as out group. Bar represents 0.2 substitutions per 100 nucleotides.

Description	Weight loss of LDPE (Mg)								
	30 days			90 days			120 days		
Control	130	130	131	130	131	130	131	131	130
ML002	129	130	130	129	128	128	128	128	128

Table 1: weight measurement of loss LDPE film in shaker cultures during an incubation period of 30, 90, 120 days at 30°C.

ed and selected low density polythene-degrading bacteria.

### Acknowledgments

We are thankful to the department head of the bacteriology laboratory of hospital of University of Sidi Bel Abbès Mr. Harrachi Abdelkader for providing us with the bacterial strains. We would like to thank a personnel responsible for National institute of agronomic research Algerian (INRAA), for your encouragement, your support and your useful discussion. Without the kind cooperation of the above mentioned people the work could not have been possible.

### References

- Bellahcene M (2009) Les matières plastiques et leur impact sur l'environnement. L'Algerian Petroleum Institute 03: 01.
- Esmaeili A ,Pourbabaee AA,Alikhani HA , Shabani F and Esmaeili E (2013) Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. PLoS ONE 8(9): e71720.
- Zahra S, Abbas SS, Mahsa MT and Mohsen N (2010) Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. Waste Management 30: 396-401.
- O'Brine T and Thompson RC (2010) Degradation of plastic carrier bags in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 60: 2279-2283.
- Mark JE (1999) Polymer Data Handbook. Oxford University Press Inc New York USA.
- Harshvardhan K and Jha B (2013) Biodegradation of low-density polyethylene by *marine* bacteria from pelagic waters Arabian Sea India. Marine Pollution Bulletin 77: 100-106.
- Juan-Manuel R, Amarjeet FB and Thompson MR (2014) Microbial degradation and deterioration of polyethylene. International Biodeterioration & Biodegradation 88: 83-90.
- Sadaqat S, Ishtiaq A, Qazi A, Arshad M, Khan Z, Thomas C, Voice Ch and Mahmood T (2016) Photocatalytic degradation of low density polyethylene (LDPE) films using Titania nanotubes. Environmental Nanotechnology Monitoring and Management S2215-1532.
- Deepika S and Madhuri RJ (2015) Biodegradation of low density polyethylene by microorganisms from garbage soil. Experimental Biology and Agricultural Sciences 3(1): 2320-8694.
- Bonhomme S, Cuer A, Delort AM, Lemaire J, Sancelme M and Scott G (2003) Environmental biodegradation of polyethylene. Polymer Degradation and Stability 81: 441-452.
- Usha R, Sangeetha T and Palaniswamy M (2011) Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. Libyan Agriculture Research Center 2(4): 200-204.
- Reffas FZI , Missouri A, Nourine Z, Tifrit A, Larbi-Daouadji K, Tayeb S and Abbouni B (2016) Optimization of cellulase production by bacterial strains, isolated from the soils of the North West of Algeria. Der Pharmacia Lettre 8(17): 42-48.
- Pramila R and Ramesh KV (2011) Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area. Microbiol Biotech Res 1(4): 131-136.
- Sudhakar M, Doble M, Murthy P S and Venkatesan R (2008) Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. International Biodeterioration & Biodegradation 61: 203-213.
- Santo M, Weitsman R and Sivan A (2012). The role of the copper-binding enzyme laccase in the biodegradation of polyethylene by the Actinomycete *Rhodococcus ruber*. International Biodeterioration & Biodegradation 1-7.
- Sivan A, Szanto M and Pavlov V (2006) Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. Appl Microbiol Biotechnol 72: 346-352.
- Tribedi P and Sil A K (2013) Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas sp.* AKS2 biofilm. Environ Sci Pollut Res 20: 4146-4153.
- Bhone MK , Ravi C , Meena KS, Chu SL and Kishore RS (2012) Biodegradation of low density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. Indian J Microbiol 52(3): 411-419.
- Tribedi P ,Sarkar S, Mukherjee K and Sil AK, (2012) Isolation of a novel *Pseudomonas sp.* from soil that can efficiently degrade polyethylene succinate. Environ Sci Pollut Res 19: 2115-2124.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson A R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U.S.A 74: 5463-5467.
- Ji-Dong G (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. International Biodeterioration & Biodegradation 52: 69-91.
- Albertsson A C ,Andersson SO and Karlsson S (1987) The mechanism of biodegradation of polyethylene. Polymer Degradation and Stability 18: 73-87.
- Gilan I, Hadar Y and Sivan A (2004) Colonization biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. Appl Microbiol Biotechnol 65: 97-104.
- Thompson JD , Higgins D G , Gibson TJ and Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22(22): 4673-80.
- Kumar HM, Gajaria SC and Radha KS (2004) Biores Technol, Growth and development of catla (*Catla catla*) fed with different levels of diet containing Spirogyra 95(1): 73-76.

## Résumé

Les matières plastiques, du fait de leur utilisation massive, constituent des polluants importants dans l'environnement.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement et la sélection des souches bactériennes productrices d'enzymes capables de dégrader le polyéthylène à basse densité.

A cet effet, trois (03) échantillons de sol, contenant des sachets en plastique (polyéthylène à basse densité) décomposés, sont effectués à partir de différentes décharges publiques de la Wilaya de Tlemcen telles que la décharge de Nedroma, de Tlemcen ville nouvelle et ancienne décharge, de la région Ouest d'Algérie.

Le screening primaire a permis l'isolement de 29 souches productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD. Ensuite, le screening secondaire a révélé la sélection de 11 souches (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD et ont fait l'objet d'une identification phénotypique.

L'utilisation de l'outil de la biologie moléculaire a permis une identification génétique des souches sélectionnées productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD. En outre, l'analyse phylogénétique et le séquençage des souches isolées, sélectionnées productrices d'enzymes capables de dégrader le polyéthylène à basse densité, sont soumises et répertoriées dans la base des données GenBank.

L'optimisation de différents paramètres impliqués dans la biodégradation par des souches sélectionnées a montré que les souches (ML007, ML014, ML020, ML022) ont manifesté une forte activité à une température comprise entre (30°C et 40°C). Cependant, les souches (ML001, ML018 et ML029) ont montré une importante activité de dégradation de PEBD à des valeurs de pH (7, 9, 6) respectivement. Par ailleurs, la souche ML002 a manifesté une excellente activité de dégradation de PEBD en présence d'une concentration de 4% NaCl. L'ajout du cuivre dans le milieu de culture inoculé avec des souches (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) a amélioré considérablement l'activité de biodégradation du PEBD, accompagnée avec une perte de 2.05 % de poids pendant 30 jours.

Le séquençage des 11 souches sélectionnées dégradatrices du PEBD (ML001, ML002, ML006, ML007, ML008, ML014, ML015, ML018, ML020, ML022 et ML029) a révélé leur appartenance aux espèces : *Bacillus subtilis* ML636851, *Bacillus thuringiensis* MG738271, *Lysinibacillus macroides* ML636534, *Bacillus subtilis* ML636460, *Enterobacter cloacae* ML636553, *Bacillus cereus* MT636856, *Bacillus licheniformis* MT636899, *Rhodococcus gordoniae* MT636651, *Pseudomonas balearica* MT636930, *Pseudomonas aeruginosa* MT636685, *Staphylococcus pasteurii* MT636753 respectivement, ce qui explique que les souches sélectionnées peuvent être excellents candidats dans la bioremédiation des sols pollués en plastique.

**Mots clés** : biodégradation, polyéthylène à basse densité, bactéries productrices d'enzymes capables de dégrader le PEBD, identification moléculaire.