

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT LMD 3^{ème} cycle

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de la biodégradation des
déchets plastiques par les champignons**

Présentée par : Mlle HARRAT Randa

Directrice de thèse : Mme BOURZAMA Ghania MCA, Université Badji Mokhtar - Annaba

Membres du Jury:

Président : M. BRANES Zidane Prof., Université Badji Mokhtar - Annaba

Examineurs : Mme BOUACHA Mabrouka MCA, Université Badji Mokhtar - Annaba

M. DEHIMAT Laid Prof., Université Frères Mentouri -
Constantine 1

Invités : M. COTON Emmanuel Prof., Université de Bretagne Occidentale -
France

M. BURGAUD Gaëtan MC - HDR, Université de Bretagne
Occidentale - France

Remerciements

Avant tout, je remercie « Allah » le tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail.

- Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon travail, M. BRANES Zidane, professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, Mme BOUACHA Mabrouka, maître de conférences A à l'université Badji Mokhtar d'Annaba et M. DEHIMAT Laid, professeur à l'université Frères Mentouri - Constantine 1.

- Je tiens à remercier Dr. BOURZAMA Ghania, maître de conférences A à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Qu'elle soit également remerciée pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour ses encouragements.

- Je remercie également le responsable de la formation doctorale, Pr. SOUMATI Boudjema, pour sa gentillesse et sa confiance, le directeur du laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale (LBTE), Pr. MESSARAH Mahfoud, et le chef du département de Biochimie, Pr. BRANES Zidane, pour toutes les facilités qu'ils m'ont fourni.

- Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements et ma profonde reconnaissance au Dr. BURGAUD Gaëtan, membre du laboratoire universitaire de biodiversité et d'écologie microbienne (LUBEM) et maître de conférences-HDR à l'université de Bretagne Occidentale (Brest, France) pour son aide, sa bienveillance, sa gentillesse, ses éclaircissements et ses appuis scientifiques dans cette recherche, ainsi qu'au directeur du LUBEM, Pr. COTON Emmanuel, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, sans oublier l'ensemble du personnel de LUBEM pour leur accueil et leur aide en particulier Christophe, Lorence, Amandine et Nicolas. Veuillez accepter mon estime et mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent également :

- À mes collègues, doctorant(e)s, enseignant(e)s, technicien(ne)s et à tout le personnel du département de Biochimie.

- Aux Dr. BENOUAGUENI Sarah, Dr. BENZAID Chahrazed, Dr. OUARTSI Nouha et Dr. GUELLATI Fatma, maîtres de conférences à l'université Badji Mokhtar d'Annaba (Algérie).

- Au Pr. OULED-HADDAR Houria, directrice du laboratoire de toxicologie moléculaire à l'université de Jijel (Algérie).

- Au Dr. SADRATI Nouari, enseignant chercheur à l'université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arreridj (Algérie).

- Au Dr. BEN SAID Olfa, enseignante chercheuse au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires CNSTN, Technopole Sidi Thabet (Ariana, Tunisie).

- Au Dr. BOUREZGUI Aymen, enseignant chercheur à l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences et Technologies Avancées de Borj Cedria (ENSTAB), Université de Carthage, Tunis, Tunisie.

- Au Pr. BENSEHAMDI Salim directeur de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines et de la Métallurgie Amar Laskri (Annaba, Algérie) et au Dr. LEMBOUB Samia directrice adjointe à l'ENSMM ainsi qu'au personnel du laboratoire de microscopie.

- À toute l'équipe de la Plateforme Technologique « Elaboration des Matériaux et Fabrication » de l'Ecole Nationale Polytechnique de Constantine-Malek Bennabi (Algérie).

Enfin, mon plus grand merci revient à mes très chers parents, que Dieu me les garde et les protège,

À mon frère Naim, ma sœur Wissal Asma et ma belle-sœur Emma,

À toute la grande famille,

À mes chères amies,

À toutes celles et à tous ceux qui m'ont aidé, d'une façon ou d'une autre, à réaliser ce travail, je les remercie du fond du cœur.

Merci

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUME

INTRODUCTION **1**

PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Généralités sur le plastique

1. Définition	4
2. Historique	4
3. Origine	5
4. Classification des matières plastiques	6
4. 1. Classification en fonction de la structure moléculaire	6
4. 2. Classification en fonction des propriétés thermiques	6
4. 2. 1. Les thermoplastiques	6
4. 2. 2. Les thermodurcissables	7
4. 2. 3. Les élastomères	8
4. 2. 4. Les élastomères thermoplastiques	8
4. 3. Classification en fonction des types de résine	8
4. 3. 1. Polyéthylène téréphtalate (PET)	9
4. 3. 2. Polyéthylène haute densité (PEHD)	9
4. 3. 3. Polychlorure de vinyle (PVC)	9
4. 3. 4. Polyéthylène basse densité (PEBD)	9
4. 3. 5. Polypropylène (PP)	9
4. 3. 6. Polystyrène (PS)	10

4. 3. 7. Autres	10
4. 4. Classification en fonction des propriétés de conception	10
4. 5. Classification en fonction des propriétés de dégradabilité	10

Chapitre II: Polyéthylène basse densité et problématique des sacs en plastique

1. Définition du polyéthylène	11
2. Processus de fabrication du polyéthylène	12
3. Classification du polyéthylène	13
3. 1. Classification des polyéthylènes linéaires ou ramifiés	13
3. 1. 1. Classification en fonction de la densité	14
3. 1. 2. Classification en fonction de la masse molaire	14
3. 2. Classification des polyéthylènes réticulés (PEX)	14
4. Polyéthylène basse densité	14
4. 1. Définition	15
4. 2. Propriétés du polyéthylène basse densité	15
4. 3. Applications	16
5. Problématique des sacs en plastique	16
5. 1. Définition d'un sac plastique	16
5. 2. Composition d'un sac plastique	17
5. 3. Processus de fabrication d'un sac plastique	17
5. 4. Pollution par les sacs plastiques	18
5. 5. Gestion des déchets plastiques	19
5. 5. 1. Recyclage	20
5. 5. 2. Incinération	21
5. 5. 3. Mise en décharge	21
5. 5. 4. Dégradation	22

6. Pollution plastique en Algérie	22
6. 1. Problématique du plastique	22
6. 2. Gestion des déchets en Algérie	25
6. 3. Réglementations régissant les déchets	25

Chapitre III: Biodégradation

1. Définition	27
2. Différentes étapes de la biodégradation	28
2. 1. Biodétérioration	28
2. 2. Biofragmentation	28
2. 3. Assimilation	29
2. 4. Minéralisation	29
3. Polymères biodégradables	31
3. 1. Polymères naturels	31
3. 2. Polymères synthétiques	32
3. 3. Polymères semi-synthétiques	33
4. Applications des polymères biodégradables	33
5. Paramètres d'évaluation de la biodégradation	33
5. 1. Méthodes standards d'évaluation de la biodégradation des plastiques	34
5. 1. 1. Observations visuelles	34
5. 1. 2. Mesures de perte de masse/poids	34
5. 1. 3. Mesure de la consommation d'O ₂ et/ou de la production de CO ₂	34
5. 1. 4. Formation de zones de clairance	34
5. 1. 5. Traçage du carbone marqué	34
5. 2. Techniques analytiques d'évaluation de la biodégradation	35
5. 2. 1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	35
5. 2. 2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	35

5. 2. 3. Microscopie à force atomique (AFM)	35
5. 2. 4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	35
5. 2. 5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	35

Chapitre IV: Les champignons

1. Généralités	36
2. Taxonomie	37
3. Classification des champignons	38
3. 1. Les levures	38
3. 2. Les champignons filamenteux (moisissures)	39
3. 3. Les champignons ressemblant à des levures	39
3.4. Les champignons dimorphiques	39
4. Développement des champignons	40
4. 1. Germination des spores	40
4. 2. Phase végétative	40
4. 3. Phase reproductive	40
4. 3. 1. Reproduction asexuée	41
4. 3. 2. Reproduction sexuée	41
5. Habitat et conditions de développement	42
5. 1. Modes de nutrition	43
5. 2. Conditions de développement environnementales	43
6. Métabolites fongiques	44
7. Rôle des champignons dans la dégradation des plastiques	44
7. 1. Mécanismes de la biodégradation	44
7. 1. 1. Adhésion, colonisation et formation de radicaux libres	45
7. 1. 1. 1. Adhésion et colonisation	45

7. 1. 1. 2. Production et sécrétion d'enzymes extracellulaires	45
7. 1. 1. 3. Formation des radicaux libres	45
7. 1. 2. Dégradation oxydative et hydrolytique	45
7. 1. 3. Fragmentation des polymères	46
7. 1. 4. Assimilation et minéralisation	46
7. 1. 5. Synergie microbienne	46
7. 2. Exemples de champignons impliqués dans la dégradation des polymères	46

PARTIE II. MATERIEL ET METHODES

1. Echantillonnage	48
2. Isolement des champignons indigènes du sol	49
2. 1. Purification des isolats fongiques	50
2. 2. Conservation des isolats fongiques	50
3. Identification des isolats fongiques	50
3. 1. Identification macroscopique	50
3. 2. Identification microscopique	51
3. 3. Caractérisation moléculaire des isolats fongiques	51
3. 3. 1. Extraction de l'ADN fongique	51
3. 3. 2. Dosage et standardisation de la concentration d'ADN	52
3. 3. 3. Amplification des gènes d'intérêt par PCR	53
3. 3. 3. 1. Amorces utilisées	53
3. 3. 3. 2. Préparation de la solution Mix PCR	54
3. 3. 3. 3. Conditions d'amplification des gènes d'intérêt	54
3. 3. 4. Révélation des produits PCR	55
3. 3. 5. Séquençage des produits PCR	55
3. 3. 5. 1. Analyse bioinformatique	55

3. 3. 5. 2. Analyse phylogénétique	55
3. 3. 5. 3. Numéros d'accèsion des séquences nucléotidiques	56
4. Tests de biodégradation des films de PEBD	57
4. 1. Préparation du milieu minimum liquide et solide	57
4. 2. Sélection des isolats pour les tests de biodégradation	57
4. 3. Préparation du polymère à tester	59
4. 4. Tests de biodégradation des films de PEBD <i>in vitro</i>	59
4. 4. 1. Sur milieu minimum solide	60
4. 4. 2. Sur milieu minimum liquide	60
4. 4. 2. 1. Optimisation de la biodégradation en culture discontinue (culture en batch)	60
4. 4. 2. 1. 1. Influence de l'agitation	60
4. 4. 2. 1. 2. Influence du poids des films	61
4. 4. 2. 1. 3. Influence du pH initial	61
4. 4. 2. 1. 4. Influence de la température	61
4. 4. 2. 1. 5. Influence de la biomasse fongique	62
4. 4. 2. 1. 6. Influence de la composition du milieu	62
4. 4. 2. 1. 7. Influence des caractéristiques du polymère	62
4. 4. 2. 2. Culture continue	63
4. 5. Tests de biodégradation <i>ex situ</i>	64
4. 6. Suivi de la biodégradation des films de PEBD après trois mois d'incubation	65
5. Evaluation de la biodégradation des films de PEBD	65
5. 1. Pourcentage de perte de poids	65
5. 2. Microscopie électronique à balayage (MEB)	66
5. 3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	66
5. 4. Diffractométrie (Cristallographie) des rayons X (DRX)	67

PARTIE III. RESULTATS

1. Obtention d'isolats fongiques à partir du sol d'une décharge publique	69
2. Identification des isolats fongiques	71
2. 1. Identification macroscopique et microscopique	71
2. 2. Identification moléculaire	76
3. Sélection des isolats pour les tests de biodégradation	86
4. Résultats des tests de la biodégradation	87
4. 1. Biodégradation <i>in vitro</i>	87
4. 1.1. Biodégradation sur milieu minimum solide	87
4. 1. 2. Biodégradation sur milieu minimum liquide (cultures en batch)	89
4. 1. 2. 1. Influence de l'agitation du milieu	89
4. 1. 2. 2. Influence du poids des films de PEBD	92
4. 1. 2. 3. Influence du pH du milieu	95
4. 1. 2. 3. 1. Test de croissance	95
4. 1. 2. 3. 2. Test de biodégradation	95
4. 1. 2. 4. Influence de la température	100
4. 1. 2. 4. 1. Test de croissance	100
4. 1. 2. 4. 2. Test de biodégradation	100
4. 1. 2. 5. Influence de la biomasse fongique	104
4. 1. 2. 6. Influence de la composition du milieu: Milieu Czapek Dox	107
4. 1. 2. 7. Influence des caractéristiques du polymère	108
4. 1. 3. Biodégradation sur milieu minimum liquide dans une culture continue	109
4. 2. Biodégradation <i>ex situ</i>	111
4. 2. 1. Eau de mer	111
4. 2. 2. Eau du robinet	114

4. 2. 3. Sol	117
4. 3. Suivi de la biodégradation des films de PEBD après trois mois d'incubation <i>in vitro</i> et <i>ex situ</i>	120
5. Confirmation de la biodégradation	121
5. 1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	122
5. 1. 1. Observations des films de PEBD sous microscope électronique à balayage	122
5. 1. 2. Analyse des films de PEBD par spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS)	127
5. 2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	129
5. 2. 1. Analyse ATR-FTIR	129
5. 2. 2. Mesure de l'indice carbonyle (IC)	140
5. 3. Diffractométrie des rayons X (DRX)	141
5. 3. 1. Analyse DRX	141
5. 3. 2. Taux de cristallinité	150

PARTIE IV. DISCUSSION

1. Obtention d'isolats fongiques à partir du sol d'une décharge publique	152
2. Sélection des isolats pour les tests de biodégradation	154
3. Biodégradation <i>in vitro</i>	156
3. 1. Biodégradation sur milieu minimum solide	156
3. 2. Biodégradation sur milieu minimum liquide: facteurs clés et optimisation	157
3. 3. Influence de la composition du milieu sur la biodégradation	163
4. Biodégradation <i>ex situ</i>	164
5. Suivi de la biodégradation des films de PEBD après trois mois d'incubation	165
6. Changements morphologiques sous MEB et altérations structurelles sous FTIR	167
7. Détermination des changements de cristallinité par DRX	169

CONCLUSION	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174
ANNEXES	197

**LISTES DES ABREVIATIONS,
FIGURES ET TABLEAUX**

LISTE DES ABREVIATIONS

ABS	Acrylonitrile Butadiène Styrène
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à Force Atomique
AND	Agence Nationale des Déchets
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	Réflectance Totale Atténuée
aw	Activité de l'eau
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOPP	Polypropylène à orientation biaxiale
BR	Polybutadiène
CET	Centre d'Enfouissement Technique
C₂H₄	Ethylène
[C₂H₄]_n	Polyéthylène
CLS-Y	Cell Lysis Solution for Yeast and Fungi
CuSO₄	Sulfate de cuivre
DMA	Déchets Ménagers et Assimilés
dNTP	Désoxyribonucléoside Triphosphate
DO	Densité Optique
DRX	Diffraction des Rayons X
EC	Ethyl Cellulose
EDS	Spectroscopie à Dispersion d'Énergie
EUROMAP	Europe's Association for Plastics and Rubber Machinery Manufacturers
FeSO₄ x 7 H₂O	Sulfate de fer (II) heptahydraté
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GC-MS	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
HR	Humidité Relative
IC	Indice Carbonyle
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal Transcribed Spacer
Lac	Laccases

LiP	Lignine Peroxydase
LSU	Large Subunit
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEER	Ministère de l'Environnement et des Energies Renouvelables
MC	Méthyl-cellulose
ML	Maximum Likelihood
MML	Milieu Minimum Liquide
MMS	Milieu Minimum Solide
MnP	Peroxydase de manganèse
Mw	Molecular weight
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBT	Polybutylène téréphtalate
PC	Polycarbonate
PCL	Polycaprolactone
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PE	Polyéthylène
PEBD	Polyéthylène Basse Densité
PEBDL	Polyéthylène Basse Densité Linéaire
PEHD	Polyéthylène Haute Densité
PEMD	Polyéthylène Moyenne Densité
PET	Polyéthylène Téréphtalate
PETase	Polyéthylène Téréphtalate Hydrolase
PETBD	Polyéthylène à Très Basse Densité
PEUHPM	Polyéthylène Ultra-Haute Masse Moléculaire
PEX	Polyéthylène Réticulé
PF	Phénol-Formaldéhyde
PHB	Polyhydroxybutyrate
PMMA	Polyméthacrylate de Méthyle
PNAEDD	Plan National d'Actions pour l'Environnement et le Développement Durable
PP	Polypropylène
PS	Polystyrène

PUR	Polyuréthane
PVC	Polychlorure de Vinyle
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SBS	Styrène-Butadiène-Styrène
SNE	Stratégie Nationale de l'Environnement
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TCA	Tricarboxylic Acid
VDM	Verband Deutscher Maschinen-und Anlagenbau (Association des Constructeurs de Machines et d'Equipements Allemands)

Unités

Å	Angström	Mt	Mégatonne
Hz	Hertz	N	Newton
Kb	Kilobase	UI	Unité Internationale
kDa	kilodalton	uma	Unité de Masse Atomique
Kt	Kilotonne	u.a	Unités Arbitraires
M€	Millions d'euros	V	Volt
MPa	Mégapascal		

Symboles

θ	Theta
∞	Infini
λ	Lambda
Kα	Raie caractéristique dans le spectre des rayons X

LISTE DES FIGURES

N°	Titres	Pages
1	Structure d'une molécule d'éthylène	11
2	Structure d'une molécule de polyéthylène	11
3	Procédés de fabrication du polyéthylène à partir du pétrole brut	13
4	Structures des différents types de polyéthylène (A); structure chimique du PEBD (B)	15
5	Processus de fabrication des sacs en plastique	17
6	Devenir des déchets plastiques et leurs impacts sur l'environnement	19
7	Importation de plastique en Algérie entre 2015 et 2022	23
8	Importation des technologies d'emballage en Algérie entre 2016 et 2022	23
9	Composition des déchets ménagers et assimilés en Algérie entre Avril 2018 et Mars 2019	24
10	Répartition des déchets plastiques générés entre Avril 2018 et Mars 2019	24
11	Schéma de la biodégradation d'un polymère en conditions aérobiques et anaérobiques	27
12	Les différentes étapes de la biodégradation d'un sac en plastique	30
13	Schéma d'une cellule fongique	37
14	Localisation géographique de la décharge de Boumehadjer (Collo)	48
15	Photographies de la décharge publique de Boumehadjer (Collo)	48
16	Echantillons de sol prélevés de la décharge de Boumehadjer (Collo)	49
17	Schéma représentatif des étapes de l'isolement des isolats fongiques	49
18	Microscope optique Zeiss Axiostar Plus	51
19	Composants du Kit FastDNA Spin utilisés pour l'extraction de l'ADN fongique	52
20	Appareillage utilisé pour l'extraction de l'ADN fongique	52
21	Protocole expérimental de l'amplification et du séquençage des gènes d'intérêt	56
22	Granulés de PEBD de type TASNEE LD 1925AS	58

23	Films de PEBD utilisés comme modèle d'étude	59
24	Protocole expérimental de la biodégradation <i>in vitro</i> des films de PEBD sur MML	60
25	Ajustement du pH du MML par un pH mètre Ohaus Starter2C	61
26	Dispositif de la culture continue	63
27	Protocole expérimental de la biodégradation <i>ex situ</i> : (A) dans l'eau de mer, (B) dans l'eau du robinet et (C) dans un échantillon de sol	65
28	Microscope électronique à balayage Quanta 250	66
29	Spectromètre INVENIO-R (329) -Bruker-	67
30	Diffractomètre à rayons X D8 ADVANCE -Bruker-	68
31	Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences ITS des espèces du genre <i>Aspergillus</i> .	77
32	Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences D1/D2 des espèces du genre <i>Candida</i> .	79
33	Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences BenA des espèces du genre <i>Penicillium</i> .	81
34	Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données combinées des séquences ITS-LSU des espèces du genre <i>Rhizopus</i> .	83
35	Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences D1/D2 des espèces du genre <i>Rhodotorula</i> .	85
36	Pourcentages des poids finaux des granulés de polyéthylène après 30 jours d'incubation avec <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>P. hordei</i> , <i>R. arrhizus</i> , <i>R. mucilaginosa</i> et <i>Trichoderma</i> sp., comparés au témoin	86
37	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation avec et sans agitation du milieu avec: (A) <i>A. niger</i> , (B) <i>C. tropicalis</i> , (C) <i>P. hordei</i> , (D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	92
38	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD (0.2 g, 0.4 g et 0.6 g) après 30 jours d'incubation avec: (A) <i>A. niger</i> , (B) <i>C. tropicalis</i> , (C) <i>P. hordei</i> , (D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	95
39	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD en fonction du pH du milieu après 30 jours d'incubation avec: (A) <i>A. niger</i> , (B) <i>C. tropicalis</i> , (C) <i>P. hordei</i> , (D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	99

40	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD en fonction de la température après 30 jours d'incubation avec: (A) <i>A. niger</i> , (B) <i>C. tropicalis</i> , (C) <i>P. hordei</i> , (D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	104
41	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation en fonction de la biomasse fongique de: (A) <i>A. niger</i> , (B) <i>C. tropicalis</i> , (C) <i>P. hordei</i> , (D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	107
42	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans le milieu Czapek avec <i>A. niger</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. hordei</i> , <i>R. arrhizus</i> et <i>R. mucilaginosa</i> , comparés au témoin	108
43	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD2 après 30 jours d'incubation dans un MML avec <i>A. niger</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. hordei</i> , <i>R. arrhizus</i> et <i>R. mucilaginosa</i> , comparés au témoin	109
44	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) après 30 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans une culture continue, comparés au témoin	110
45	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) après 90 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans une culture continue, comparés au témoin	111
46	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans l'eau de mer stérile et non stérile avec: (A) <i>A. niger</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> ; (C) <i>P. hordei</i> ;(D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	114
47	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans l'eau du robinet stérile et non stérile avec: (A) <i>A. niger</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> ; (C) <i>P. hordei</i> ; (D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	117
48	Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans un échantillon de sol stérile et non stérile avec: (A) <i>A. niger</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> ; (C) <i>P. hordei</i> ;(D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés aux témoins	120
49	Observation du film témoin de PEBD sous microscope électronique à balayage aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	122
50	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>A. niger</i> dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	123
51	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>C. tropicalis</i> dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	123

52	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>P. hordei</i> dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	123
53	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	124
54	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>R. mucilaginosa</i> dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	124
55	Observation du film de PEBD (F5) sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans le MML (culture continue) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	124
56	Observation du film de PEBD (F5) sous microscope électronique à balayage après 90 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans le MML (culture continue) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	125
57	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>A. niger</i> dans l'eau de mer non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	125
58	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>A. niger</i> dans l'eau du robinet non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	125
59	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>A. niger</i> dans un échantillon de sol non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	126
60	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans l'eau de mer non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	126
61	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans l'eau du robinet non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	126
62	Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans un échantillon de sol non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)	127
63	Analyse du film témoin par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie	128
64	Analyse du film de PEBD par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie après incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans une culture discontinue	128

65	Analyse du film de PEBD (F5) par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie après incubation avec <i>R. arrhizus</i> dans une culture continue	128
66	Analyse ATR-FTIR des films de PEBD incubés pendant un mois dans un MML en cultures discontinues avec: (A) <i>A. niger</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> ; (C) <i>P. hordei</i> ;(D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés au témoin	133
67	Analyse ATR-FTIR du film de PEBD (F5) incubé pendant 30 et 90 jours dans un MML en culture continue avec <i>R. arrhizus</i> , comparé au témoin	134
68	Analyse ATR-FTIR des films de PEBD incubés avec <i>A. niger</i> pendant 30 jours en cultures discontinues dans: (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin	138
69	Analyse ATR-FTIR des films de PEBD incubés avec <i>R. arrhizus</i> pendant 30 jours en cultures discontinues dans: (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin	139
70	Diffractionogrammes des films de PEBD incubés pendant un mois dans un MML en cultures discontinues avec: (A) <i>A. niger</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> ; (C) <i>P. hordei</i> ;(D) <i>R. arrhizus</i> et (E) <i>R. mucilaginosa</i> , comparés au témoin	144
71	Diffractionogramme du film de PEBD (F5) incubé pendant 90 jours dans un MML en culture continue avec <i>R. arrhizus</i> , comparé au témoin	145
72	Diffractionogrammes des films de PEBD incubés <i>ex situ</i> avec <i>A. niger</i> pendant 30 jours en cultures discontinues dans: (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin	147
73	Diffractionogrammes des films de PEBD incubés <i>ex situ</i> avec <i>R. arrhizus</i> pendant 30 jours en cultures discontinues dans : (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin	149

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titres	Pages
1	Exemples d'espèces fongiques et les types de plastiques qu'elles dégradent	47
2	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes ITS, Actine, LSU, β -tubuline et D1/D2	53
3	Composition du mélange réactionnel de la PCR	54
4	Conditions d'amplification des gènes d'intérêt	54
5	Propriétés typiques des granulés de PEBD de type TASNEE LD 1925AS	58
6	Propriétés typiques des films de PEBD utilisés comme modèle d'étude	59
7	Propriétés typiques des films de PEBD2	62
8	Lecture des boîtes après isolement sur gélose PDA et incubation à 27°C pendant sept jours	69
9	Observations macroscopiques (sur PDA et sabouraud) et microscopiques (100x, 400x) des isolats fongiques purifiés après sept jours d'incubation à 27°C	72
10	Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques purifiés	74
11	Gènes d'intérêt pour chaque isolat fongique	76
12	Résultats des tests de biodégradation sur milieu minimum solide après 30 jours d'incubation à 27°C	88
13	Evaluation de la croissance des isolats fongiques sur milieu PDA à différents pH	95
14	Evaluation de la croissance des isolats fongiques sur milieu PDA après incubation à différentes températures	100
15	Pourcentages de perte de poids des films de PEBD incubés avec <i>A. niger</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. hordei</i> , <i>R. arrhizus</i> et <i>R. mucilaginosa</i> pendant trois mois <i>in vitro</i> et <i>ex situ</i>	120
16	Fréquences de vibrations de valence obtenues par ATR-FTIR des films de PEBD cultivés avec les isolats fongiques <i>in vitro</i>	130
17	Fréquences de vibrations de valence obtenues par ATR-FTIR des films de PEBD cultivés avec <i>A. niger</i> et <i>R. arrhizus</i> <i>ex situ</i>	135
18	Indice carbonyle des films de PEBD après incubation avec les isolats fongiques	140
19	Taux de cristallinité des films de PEBD après incubation avec les isolats fongiques	150

RESUME

Résumé

La pollution environnementale due à l'accumulation des déchets plastiques constitue un énorme problème écologique. La dégradation de ces polymères dans l'environnement dépend de la présence de micro-organismes susceptibles de les décomposer dans leur écosystème. L'objectif de cette étude est de déterminer la contribution et l'efficacité des champignons indigènes du sol dans la dégradation des films d'un sac en plastique de type polyéthylène basse densité (PEBD), un déchet plastique très répandu dans la nature.

A cet égard, neuf espèces fongiques ont été isolées sur milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar) après 7 jours d'incubation à 27°C. Ces isolats ont été prélevés à partir de la décharge publique de Boumehadjer située dans la ville de Collo à l'est de Skikda (Algérie). Cinq espèces ont été sélectionnées pour les tests de biodégradation et ont été identifiées par une analyse phylogénétique comme étant *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium hordei*, *Candida tropicalis* et *Rhodotorula mucilaginosa*.

Le potentiel de dégradation a été étudié *in vitro* dans des cultures discontinues dans un milieu minimum liquide (MML) en agissant sur quelques paramètres tels que la température, le pH et la biomasse fongique, dans le but d'optimiser la biodégradation. De plus, d'autres tests ont été menés *in vitro* dans une culture continue et *ex situ* dans différents milieux naturels (eau de mer, eau du robinet et un échantillon de sol).

Les taux de dégradation obtenus après l'optimisation sont, respectivement, de 17.21 %, 23.77 %, 7.77 %, 7.60 % et 5.53 % pour *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa* après un mois d'incubation. Cependant, des taux de dégradation faibles (inférieurs à 1%) ont été obtenus pour les films incubés *ex situ* avec *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*, contrairement aux films incubés avec *A. niger* et *R. arrhizus* présentant des taux de dégradation supérieurs à 1% dans les milieux naturels. Quant à la culture continue, des pourcentages de perte de poids plus élevés ont été trouvés, allant jusqu'à 29.74 % après trois mois d'incubation avec *R. arrhizus*.

La biodégradation a été confirmée par microscopie électronique à balayage (MEB) qui a révélé plusieurs altérations telles que des fissures à la surface des films incubés avec les espèces fongiques, contrairement aux films témoins présentant des surfaces lisses sans changements apparents. De plus, des activités d'hydrolyse et d'oxydation biologiques des films de PEBD ont été révélées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), montrant diverses modifications structurelles, notamment l'apparition de groupements fonctionnels tels que les

esters, les aldéhydes et les cétones, présentant des groupes carbonyles. Enfin, la diffractométrie des rayons X (DRX) a montré des pics d'intensité élevée dans la position angulaire $2\theta = 20 - 30^\circ$, confirmant la structure semi-cristalline des polymères testés. En outre, plusieurs altérations ont été observées après la dégradation par les isolats fongiques, notamment des variations d'intensité et des décalages dans la position de certains pics.

Cette étude souligne l'efficacité des isolats identifiés dans la dégradation du PEBD. Ces espèces fongiques sont prometteuses pour des applications de biodégradation des polymères plastiques, qui pourraient être exploitées afin de développer de futurs systèmes de mycoremédiation.

Mots-clés: Biodégradation, champignons, culture continue, déchets plastiques, *ex situ*, *in vitro*, PEBD, pollution.

Abstract

Environmental pollution due to the accumulation of plastic waste constitutes a major ecological problem. The degradation of these polymers in the environment depends on the presence of microorganisms capable of decomposing them in their ecosystem. The objective of this study is to determine the contribution and effectiveness of indigenous soil fungi in the degradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic bag films, a very common plastic waste in nature.

In this regard, nine fungal species were isolated on PDA (Potato-Dextrose-Agar) medium after 7 days of incubation at 27°C. These isolates were collected from the public landfill of Boumehadier located in the city of Collo in the east of Skikda (Algeria). Five species were selected for biodegradation tests and were identified through phylogenetic analysis as *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium hordei*, *Candida tropicalis*, and *Rhodotorula mucilaginosa*.

The degradation potential was studied *in vitro* in batch cultures, in a liquid minimal medium (MML) by acting on several parameters, such as temperature, pH, and fungal biomass, in order to optimize biodegradation. Furthermore, other tests were conducted *in vitro* in a continuous culture and *ex situ* in different natural environments (seawater, tap water, and a soil sample). The degradation rates obtained after optimization are respectively 17.21%, 23.77%, 7.77%, 7.60%, and 5.53% for *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis*, and *R. mucilaginosa* after one month of incubation. However, low degradation rates (less than 1%) were obtained for films incubated *ex situ* with *P. hordei*, *C. tropicalis*, and *R. mucilaginosa*, unlike films incubated with *A. niger* and *R. arrhizus* showing degradation rates higher than 1% in natural environments. As for the continuous culture, higher weight loss percentages were found, up to 29.74% after three months of incubation with *R. arrhizus*.

The biodegradation was confirmed by scanning electron microscopy (SEM), which revealed several alterations such as surface cracks of the films incubated with fungal species, unlike control films showing smooth surfaces without apparent changes. Furthermore, biological hydrolysis and oxidation activities of LDPE films were revealed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), showing various structural modifications including the appearance of functional groups such as esters, aldehydes, and ketones, presenting carbonyl groups. Finally, X-ray diffraction (XRD) showed peaks of high intensity at the angular position $2\theta = 20 - 30^\circ$ confirming the semi-crystalline structure of the tested polymers. Moreover, several alterations

were observed after degradation by fungal isolates, including intensity variations and shifts in the position of certain peaks.

This study highlights the effectiveness of the identified isolates in LDPE degradation. These fungal species show promise for applications in plastic polymer biodegradation, which could be exploited to develop future mycoremediation systems.

Keywords: Biodegradation, fungi, continuous culture, plastic waste, *ex situ*, *in vitro*, LDPE, pollution.

الملخص

يشكل التلوث البيئي الناتج عن تراكم النفايات البلاستيكية مشكلة بيئية ضخمة. يتوقف تحلل هذه البوليميرات (المجموعات المكثفة) في البيئة على وجود الكائنات الدقيقة القادرة على تفكيكها في نظامها البيئي. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مساهمة وفعالية الفطريات الموجودة بالتربة في تحلل أشرطة كيس بلاستيكي من نوع البولي إيثيلين قليل الكثافة، هذا النوع من النفايات البلاستيكية الشائع وجودها في الطبيعة.

في هذا السياق، تم جمع العينات من موقع النفايات العمومي ببومحاجر - الواقع في مدينة القل - شرق ولاية سيكدة - الجزائر. تم عزل تسعة أنواع من الفطريات على وسط PDA (مستخلص البطاطا دكستروز أجار)، بعد مرور 7 أيام على درجة 27 م°. تم إختيار 05 أنواع من الفطريات لإجراء إختبارات التحلل البيولوجي بواسطة التحليل الفيتولوجي (علم الوراثة العرقي) المحددة كما يلي : *Aspergillus niger*، *Rhizopus arrhizus*، *Penicillium hordei*، *Candida tropicalis* و *Rhodotorula mucilaginosa*.

تم دراسة إمكانية التحلل المخبري في مزارع متقطعة في وسط سائل أدنى من خلال التأثير على بعض العوامل مثل درجة الحرارة، درجة الحموضة والكتلة الفطرية، بغرض تحسين التحلل البيولوجي. إضافة إلى ذلك، تم إجراء اختبارات أخرى مخبريا في مزرعة مستمرة ومزارع متقطعة على عينات خارجية من مختلف الأوساط الطبيعية (ماء البحر، ماء الحنفية، وعينة تربة). تم الحصول على معدلات التحلل بعد التحسين على التوالي 17.21 %، 23.77 %، 7.77 %، 7.60 %، و 5.53 % لأنواع الفطريات *R. mucilaginosa*، *C. tropicalis*، *P. hordei*، *R. arrhizus*، *A. niger* بعد شهر من التحضين. مع ذلك، تم الحصول على معدلات تحلل ضعيفة (أقل من 1%) للأشرطة المحضنة للعينات خارج الموقع مع *R. arrhizus*، *C. tropicalis*، *P. hordei* و *R. mucilaginosa*، على عكس الأشرطة المحضنة مع *A. niger* و *R. arrhizus* التي أظهرت تحلل أكثر من 1% في الأوساط الطبيعية. أما بالنسبة للمزرعة المستمرة، فقد تم العثور على نسب فقدان الوزن أعلى، تصل إلى 29.74 % بعد 03 أشهر من التحضين مع الفطر *R. arrhizus*.

تم تأكيد التحلل البيولوجي بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح (MEB) الذي أظهر عدة تغيرات مثل التشققات على سطح الأشرطة المحضنة مع الأنواع الفطرية، على عكس الأشرطة الشاهد التي تظهر أسطحاً ناعمة دون تغييرات واضحة. إضافة إلى ذلك فإن نشاطات التحلل البيولوجي والأكسدة البيولوجية لأشرطة PEBD قد تم إظهارها بواسطة طيفية التحويل الفورية للأشعة تحت الحمراء (FTIR) في شكل تغيرات هيكلية متنوعة، وخاصة ظهور مجموعات وظيفية مثل الأسترات والألدهيدات والكيونات، مع وجود مجموعات الكربونيل. أخيراً، أظهر جهاز التحليل بالأشعة السينية (XRD) عن ذروات مرتفعة عند الزاوية 20 - 30° مما يؤكد الهيكل شبه البلوري للبوليميرات المختبرة. علاوة على ذلك، لوحظت عدة تغييرات بعد التحلل بواسطة العزلات الفطرية بما في ذلك تغييرات في شدة الذروات وكذا تحريك في مواقع بعض الذروات.

تسلط هذه الدراسة الضوء على فعالية الفطريات المعزولة والمحددة في تحلل PEBD والتي تعتبر واعدة لتطبيقات تحلل البوليميرات البلاستيكية، والتي يمكن الاستفادة منها لتطوير أنظمة مستقبلية للمعالجة بالفطريات.

الكلمات المفتاحية: تحلل حيوي، فطريات، مزرعة مستمرة، نفايات بلاستيكية، عينات خارجية، في المختبر، PEBD، تلوث.

INTRODUCTION

« Ce n'est qu'après les catastrophes que l'on prend conscience des dégâts infligés par l'homme à l'environnement. »

Introduction

La pollution par le plastique ne connaît pas de frontières. Récemment, ce polymère s'est imposé dans le monde entier comme un besoin fondamental essentiel pour notre vie quotidienne, sa production mondiale est en augmentation continue et elle dépasse actuellement les 300 millions de tonnes par an (Ekanayaka *et al.*, 2022).

Des recherches antérieures ont montré que les plastiques sont susceptibles d'avoir des répercussions sur l'écosystème aquatique (Plummer *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2009; Rao et Geckeler, 2011). Cependant, plusieurs études récentes ont indiqué que la contamination par le plastique dans l'environnement terrestre pourrait être encore plus grave que dans le système marin (Horton *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2021), c'est pourquoi diverses questions connexes sur les écosystèmes terrestres ont attiré davantage d'attention (Chae et An, 2018).

Les déchets plastiques universels ont atteint environ 6300 millions de tonnes au cours des dernières années, et 79 % d'entre eux ont été mis en décharge ou laissés dans l'environnement naturel. En outre, des estimations récentes indiquent que 12 000 millions de tonnes de déchets plastiques seront accumulées sur terre d'ici l'an 2050 (Ekanayaka *et al.*, 2022). L'accumulation de ces matières récalcitrantes dans l'environnement, en particulier le polyéthylène, est une menace majeure qui s'est répandue dans l'ensemble des écosystèmes terrestres du monde entier (Rochman *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2021). Parmi les différents types de polyéthylène, le polyéthylène basse densité (PEBD) est le premier plastique largement employé dans les emballages à la fin des années 1940 (Selke et Hernandez, 2001). Actuellement, c'est le polymère le plus couramment utilisé et le plus répandu dans la nature. Il a été largement produit sous forme de sacs en plastique comme matériau d'emballage en raison de sa légèreté, sa résistance et sa durabilité (Khruengsai *et al.*, 2021).

L'Algérie fait partie des grands consommateurs des sacs en plastique au niveau mondial avec une estimation de 7 milliards de sacs plastiques par an (Chambre de Commerce et d'Industrie Algéro-Allemande 2019). Malheureusement, le taux de production et de consommation de ces polymères dépasse leur taux d'élimination ce qui fait de ces matières des polluants environnementaux importants (Abraham *et al.*, 2016) qui nécessitent environ 1000 ans pour se décomposer (Pramila et Ramesh, 2011). De plus, certains matériaux ont suscité une controverse considérable quant à leurs risques toxicologiques en raison de la présence d'additifs tels que les

phtalates ou le bisphénol A. C'est pourquoi de nombreux pays ont restreint l'utilisation de certains produits en plastique, notamment les sacs en plastique (Lewis, 2012).

Plusieurs approches ont été proposées pour faire face à cette situation, à savoir l'enfouissement, l'incinération et le recyclage, mais elles étaient soit trop coûteuses, soit partiellement efficaces en plus de leurs conséquences et de leurs éventuels effets négatifs sur l'environnement à court ou à long terme. De plus, d'autres processus de dégradation impliquant des facteurs abiotiques ont été proposés, notamment la photo-dégradation, l'oxo-dégradation et la thermo-dégradation. Or, ces approches engendrent d'énormes problèmes environnementaux d'où la nécessité d'une réglementation adaptée pour le traitement des déchets générés (Bonanni *et al.*, 2012). A cet égard, une solution alternative impliquant la biodégradation de ces déchets, a été proposée.

Des études ont montré que la dégradation des déchets plastiques par les micro-organismes est le principal processus de décontamination des sédiments et des sols profonds pour accélérer leur dégradation naturelle, habituellement très lente (Bonanni *et al.*, 2012). Il s'agit de la conversion des atomes de carbone contenus dans les plastiques récalcitrants en composants biologiques inoffensifs pour l'environnement qui peuvent être facilement assimilés par d'autres organismes vivants (Premraj et Doble, 2005).

Certes, plus de 400 micro-organismes ont été identifiés comme capables de dégrader le plastique, notamment des bactéries et des micromycètes (Ekanayaka *et al.*, 2022). Le plus souvent, ces organismes sont isolés du sol, des sites d'enfouissement, de l'eau de mer et des boues actives (Montazer *et al.*, 2020). Divers genres fongiques ont été signalés pour leur capacité à dégrader le polyéthylène dont *Alternaria* (Gao *et al.*, 2022), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Sheik *et al.*, 2015; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2002; Zahra *et al.*, 2010), *Cladosporium* (Gong *et al.*, 2023), *Gliocladium*, *Mortierella* (Nowak *et al.*, 2011), *Mucor* (Pramila et Ramesh, 2011) et *Zalerion* (Paço *et al.*, 2017).

En effet, les champignons possèdent des systèmes enzymatiques puissants et peuvent survivre dans des conditions environnementales difficiles avec de faibles niveaux d'approvisionnement en nutriments et en eau. De plus, ils peuvent largement étendre leurs hyphes sur les polymères plastiques, engendrant la formation de fissures et de creux superficiels visibles sous microscope électronique à balayage (Jeyakumar *et al.*, 2013; Daccò *et al.*, 2020).

Avec l'avancée des recherches, il a été découvert que les micro-organismes capables de dégrader le plastique varient en termes de diversité, d'abondance et d'activité, fournissant des preuves de dégradation du plastique (Cai *et al.*, 2023). Toutefois, le processus de dégradation dépend des espèces microbiennes utilisées, ainsi, il est essentiel d'isoler un micro-organisme «

parfait ». De même, les facteurs affectant la biodégradation microbienne doivent être compris en détail pour accélérer le processus.

Toutefois, à ce jour, les recherches réalisées en Algérie sur la dégradation des déchets plastiques par des champignons sont limitées, d'où la nécessité de telles études qui permettraient de mettre en évidence des méthodes écologiques de contrôle de la pollution plastique. Cette étude vise à identifier des champignons isolés d'une décharge publique située au nord-est de l'Algérie, à étudier la capacité de ces isolats à dégrader des films d'un sac plastique de type polyéthylène basse densité (PEBD) *in vitro* et *ex situ*, et enfin, à aborder une nouvelle approche de dégradation *in vitro* (culture continue) afin de développer une méthode rentable de gestion des déchets plastiques.

Pour répondre à ces questions, ce projet de thèse s'articule autour de plusieurs axes, répartis en quatre parties principales:

- **Première partie:** consacrée à l'étude bibliographique et comportant quatre chapitres: généralités sur le plastique, polyéthylène basse densité et problématique des sacs en plastique, biodégradation et un chapitre sur les champignons.
- **Deuxième partie:** décrivant le matériel et les méthodes utilisés pour l'isolement, la sélection et l'identification des isolats fongiques, l'évaluation de la biodégradation *in vitro* des sacs en plastique de type PEBD dans une culture discontinue avec variation de quelques paramètres biotiques et abiotiques, l'évaluation de la biodégradation *in vitro* dans une culture continue, l'évaluation de la biodégradation *ex situ*, et la confirmation de la biodégradation par microscopie électronique à balayage, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et par diffractométrie des rayons X.
- **Troisième partie:** présentant l'ensemble des résultats obtenus.
- **Quatrième partie:** réservée aux discussions qui en découlent, et enfin, les conclusions tirées de ce travail avec quelques perspectives de recherches.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Généralités sur le plastique

1. Définition

Le terme « plastique » est dérivé du mot grec « *plastikos* », signifiant une substance qui peut être moulée dans n'importe quelle forme, généralement à chaud et sous pression (Ghosh *et al.*, 2013). Chimiquement, c'est un polymère à longue chaîne hydrocarbonée ayant un poids moléculaire élevé. Les plastiques sont principalement dérivés de produits pétrochimiques qui sont ensuite synthétisés par certains procédés chimiques pour produire ces polymères à longue chaîne (Shimao, 2001).

Les plastiques se présentent sous de nombreuses formes: pièces moulées, tubes, films, fibres, tissus, revêtements, etc, et sont utilisés dans de nombreux secteurs (Candlin, 2008). Ces polymères synthétiques encore utilisés aujourd'hui ont été créés entre 1862 et 1990.

2. Historique

L'histoire des matières plastiques a débuté en 1862 avec la fabrication de la Parkésine à base de nitrocellulose par le chimiste britannique Alexander Parkes lors de l'exposition universelle de Londres. En 1869, suite à un concours visant à trouver une matière qui pourrait remplacer l'ivoire naturel des boules de billard, les frères Hyatt (États-Unis) ont mis au point le Celluloïd, un produit d'origine végétale composé essentiellement de nitrocellulose et du camphre (Rasmussen, 2021). En 1893, Auguste Trillat, chimiste français, constate que le formol (qu'il a fabriqué en 1892) coagule la caséine du lait. Cependant, l'invention de Trillat passe inaperçue en France. Son brevet de fabrication est déposé en 1897 par deux allemands, Wilhelm Kricheldorf et Adolf Spitteler, sous le nom de Galalithe (Gilbert, 2017). Les résines phénoliques ont été découvertes par un chimiste belge, Leo Baekeland, en 1907, qui a créé la première matière plastique entièrement synthétique: la Bakélite, marquant véritablement le début de l'ère des plastiques (Crespy *et al.*, 2008). En 1908, le chimiste suisse Jacques Brandenberger a fabriqué le premier matériau souple et parfaitement transparent: la Cellophane (Kumar et Tamang, 2022). L'année 1930 a vu le début de la fabrication industrielle du polystyrène. En 1933, les ingénieurs E. Fawcett et R. Gibson ont découvert le polyéthylène basse densité (PEBD), utilisé comme isolant électrique performant pour protéger les câbles des radars (Feldman, 2008).

Au cours des années 1940 et 1941, pendant la seconde guerre mondiale, le silicone et le Caoutchouc synthétique ont été fabriqués. Ces deux matériaux répondaient aux besoins en matières premières des pays en guerre (Feldman, 2008; Zare *et al.*, 2021). En France, de 1940

à 1955, la matière première thermoplastique, le chlorure de polyvinyle plastifié, a vu le jour. Cette matière a été utilisée pendant la guerre pour remplacer le caoutchouc, devenu impossible à importer (Semon et Stahl, 1981). En Amérique, le premier polyamide, le « nylon », est apparu pour remplacer les fibres textiles naturelles (Tyuftin et Kerry, 2020). Après la guerre, le chlorure de polyvinyle rigide a contribué à la renaissance de l'industrie chimique grâce à sa bonne résistance chimique aux acides et aux alcalins (Semon et Stahl, 1981; Blackley, 1983). Il est utilisé dans les applications à moyenne température, notamment dans la fabrication de réservoirs de stockage ou de canalisations pour le transport de produits corrosifs (Dunnicliff, 1968).

En 1950, le transport automobile s'est développé et la demande de pétrole comme source d'énergie a augmenté (Bilgen, 2014). La « pétrochimie » a donc pris le relais et a donné naissance à une variété de matériaux thermoplastiques dérivés d'oléfines carbonées obtenues par craquage de produits pétroliers (à savoir l'éthylène, le benzène, le propylène, le phénol et le cumène). Tous ces produits sont à la base de nombreuses synthèses aboutissant plus ou moins directement à des matières plastiques (Shimao, 2001). Toutefois, les plastiques les plus couramment utilisés ont été introduits sur le marché entre 1936 et 1984, notamment le polychlorure de vinyle (1936), le Polystyrène (1937), le polyéthylène téréphtalate (1944), le polyéthylène (1955) et le polypropylène (1957) (Billmeyer, 1984).

3. Origine

La production du plastique commence par un processus de distillation dans une raffinerie de pétrole. Le processus de distillation consiste à chauffer le pétrole brut aboutissant à un phénomène physique qui implique la séparation du pétrole en différentes fractions avec des températures d'ébullition variées (raffinage du pétrole). Chaque fraction est un mélange de chaînes d'hydrocarbures (composés chimiques composés de carbone et d'hydrogène), qui diffèrent par la taille et la structure de leurs molécules. Le four de distillation chauffe le pétrole à 370°C ce qui conduit à son craquage. En effet, l'augmentation progressive de la température provoque l'évaporation successive de produits, des plus légers (butane, propane, essence légère : le naphta) aux plus lourds (essence lourde, kérosène, mazout et diesel (gazole), fioul domestique), qui s'élèvent dans la colonne de distillation et sont récupérés séparément. Le naphta, utilisé notamment par la pétrochimie, est l'élément crucial pour la production de plastiques. Il est envoyé dans une usine de plasturgie (industrie du plastique) où il est transformé

en différents plastiques grâce à de multiples procédés complexes. Ces polymères, une fois fondus, sont formés par différentes méthodes, telles que le moulage, selon les besoins.

Les plastiques sont également produits à partir de gaz naturel extrait des gisements de pétrole et de gaz offshore (en pleine mer). Le pétrole brut et le gaz naturel sont raffinés en éthane, en propane et en centaines d'autres produits pétrochimiques. Le méthane, principal constituant du gaz naturel, est retiré. L'éthane et le propane sont séparés, purifiés et chauffés en mélange de vapeur qui produit de l'éthylène, du propylène, de l'hydrogène et d'autres sous-produits. Le catalyseur est combiné avec de l'éthylène ou du propylène dans un réacteur, ce qui donne un « duvet », un matériau en poudre (polymère) ressemblant à un détergent à lessive. Ces derniers sont ensuite combinés avec des additifs dans un réacteur. Le polymère est acheminé vers une extrudeuse où il est fondu, refroidi et acheminé vers un granulateur qui coupe le produit en petites granules de plastique (Shaw et Sahni, 2014).

Chaque pièce en plastique destinée à un objet doit avoir certaines caractéristiques (couleur, dureté, transparence, etc.). Cependant, chaque objet a ses propres caractéristiques, c'est pourquoi il existe plusieurs types de plastiques.

4. Classification des matières plastiques

4. 1. Classification en fonction de la structure moléculaire

Si le monomère change, le plastique qui en résulte change de forme ainsi que de propriétés chimiques, physiques et mécaniques, d'où la polyvalence des matières plastiques destinées à plusieurs applications. Les thermoplastiques et les thermodurcissables sont les principales divisions des plastiques, basées sur la liaison moléculaire et l'arrangement des structures de résine dans la matrice. Les composés de résine s'organisent de manière autonome pendant le processus de fusion-refroidissement-durcissement (Bhogayata, 2024).

4. 2. Classification en fonction des propriétés thermiques

Sur la base de leurs propriétés thermiques, les plastiques sont classés en trois groupes : les thermoplastiques, les thermodurcissables et les élastomères.

4. 2. 1. Les thermoplastiques

Les thermoplastiques sont des polymères linéaires ou ramifiés qui se ramollissent et deviennent souples sous l'action de la chaleur, ce qui leur permet d'être moulés plusieurs fois. Cette transformation est réversible et peut être régénérée à plusieurs reprises, ce qui facilite le

recyclage des thermoplastiques. Toutefois, ces polymères ne peuvent pas subir de changements chimiques dans leur composition. De plus, ils ne sont pas biodégradables et ont une « durée de vie » de plusieurs centaines d'années. Ils sont également connus sous le nom de plastiques courants, dont le poids moléculaire varie de 20 000 à 500 000 uma (unité de masse atomique). Ils ont différents nombres d'unités répétitives dérivées d'une simple unité monomère (Ghosh *et al.*, 2013; Banerjee et Ray, 2022; Venkatesan *et al.*, 2022). Ces polymères thermoplastiques sont représentés par une large gamme de matières plastiques, et il existe trois types (Amin S et Amin M, 2011; Grigore, 2017):

- Thermoplastiques cristallins: généralement translucides, avec des chaînes moléculaires présentant un arrangement régulier. Par rapport à d'autres types, ces polymères ont une plus grande résistance aux chocs mécaniques. Ils ont des températures de fusion élevées et fortes, et ils rétrécissent davantage que les thermoplastiques amorphes lors du durcissement.

Exemples: le polypropylène (PP) et le polyéthylène (PE).

- Thermoplastiques amorphes: généralement transparents, avec des molécules disposées de manière aléatoire, ce qui explique le fait qu'ils ne s'écoulent pas aussi facilement dans le moule que les polymères cristallins. Ils ne présentent pas un point de fusion bien défini et rétrécissent moins que les thermoplastiques cristallins lors du durcissement.

Exemples: le polychlorure de vinyle (PVC), le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polycarbonate (PC), le polystyrène (PS) et l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS).

- Polymères semi-cristallins: présentent des propriétés combinées de polymères cristallins et de polymères amorphes.

Exemples: le polybutylène téréphtalate (PBT) et le polyamide (Nylon).

4. 2. 2. Les thermodurcissables

Ces polymères sont des produits (poudre de moulage solide ou résine liquide) qui se transforment de manière irréversible par polymérisation en un réseau tridimensionnel infusible et insoluble, appelés matériaux thermodurcissables. Au premier refroidissement, ils prennent une forme définitive: ils deviennent durs et ne peuvent pas être fondus et modifiés à nouveau en raison de la forte liaison moléculaire. Les matériaux produits sont très solides et très résistants à la chaleur et aux agressions chimiques, ce qui les rend non recyclables (Ghosh *et*

al., 2013). Ils possèdent une structure moléculaire réticulée et sont polymérisés en deux étapes: la formation d'un polymère avec des chaînes linéaires, et la formation de la structure réticulée finale qui peut être rendue rigide ou flexible. La polymérisation est contrôlée pour obtenir des chaînes courtes fortement réticulées pour les produits durs et des chaînes longues légèrement réticulées pour les produits mous et flexibles (Amin S et Amin M, 2011).

Exemples: les époxydes, le polyuréthane (PUR) et le phénol-formaldéhyde (PF) (Olatunji, 2022).

4. 2. 3. Les élastomères

Les élastomères sont des polymères linéaires ou ramifiés transformés par vulcanisation (réticulation des élastomères) en un réseau tridimensionnel faiblement réticulé, infusible et insoluble. Leur particularité réside dans leur capacité à subir de grandes déformations réversibles sous l'effet de contraintes mécaniques, ce qui les distingue des thermodurcissables. Ils peuvent atteindre des allongements extrêmement importants (jusqu'à 500 %) tout en étant capables de récupérer leur forme initiale en restituant l'énergie qui leur a été apportée lors de la déformation. Ces polymères amorphes et souples présentent des liaisons covalentes qui assurent leur cohésion. Toutefois, leur structure tridimensionnelle covalente limite leur utilisation (Chassanieux *et al.*, 2008).

Exemples: le caoutchouc naturel, le silicone, le polybutadiène (BR) et le néoprène.

4. 2. 4. Les élastomères thermoplastiques

Les élastomères thermoplastiques sont des polymères linéaires ou ramifiés présentant à la fois les propriétés d'utilisation d'un thermoplastique et d'élasticité d'un élastomère (Spontak et Patel, 2000). Ils peuvent être des copolymères dont la structure solide résulte de l'association de deux phases distinctes non miscibles: une phase souple (ayant une température de transition vitreuse comprise entre -90 °C et -40°C) combinée à une phase rigide (ayant une température de transition vitreuse ou température de fusion supérieure à 90 °C) (Morawetz, 1992; Aiswarya *et al.*, 2022).

Exemple: le styrène-butadiène-styrène (SBS).

4. 3. Classification en fonction des types de résine

Une résine est un monomère utilisé pour produire les maillons des matériaux plastiques. Ces maillons représentent les unités de base qui composent la structure polymérique du plastique.

On peut distinguer sept catégories de plastiques en fonction du type de résine. Pour chaque catégorie, un numéro est attribué et fait référence au code d'identification des plastiques, au code d'identification des résines ou au code de recyclage des plastiques (Bhogayata, 2024).

4. 3. 1. Polyéthylène téréphtalate (PET)

Le polyéthylène téréphtalate est un thermoplastique principalement utilisé dans les applications alimentaires, d'où l'importance de maintenir la qualité du produit. Cependant, des cycles de recyclage répétés peuvent altérer sa qualité, c'est pourquoi un seul et unique recyclage est privilégié. La résine primaire utilisée dans le PET est généralement l'ester.

4. 3. 2. Polyéthylène haute densité (PEHD)

Le polyéthylène haute densité est un thermoplastique qui peut résister à des températures élevées sans fondre. Il est produit à partir de monomères d'éthylène.

4. 3. 3. Polychlorure de vinyle (PVC)

Le polychlorure de vinyle est le deuxième polymère le plus utilisé pour la fabrication de plastiques. Il peut être de nature rigide ou flexible. Il est couramment employé dans la confection des tuyaux, des fils, des câbles, des cadres de portes et de fenêtres, et, dans certains cas, pour la fabrication des bouteilles. Le PVC est classé sur la base de son poids moléculaire comme faible, moyen et élevé.

4. 3. 4. Polyéthylène basse densité (PEBD)

Le polyéthylène basse densité est produit à partir de monomères d'éthylène et est largement utilisé comme matériau d'emballage, notamment pour les denrées alimentaires pendant une longue période de conservation. Il se présente sous forme opaque et translucide.

4. 3. 5. Polypropylène (PP)

Le polypropylène est produit à partir de monomères de propylène et est largement utilisé pour l'emballage et l'étiquetage. Il peut également être utilisé sous forme de film. Généralement, les films BOPP (polypropylène à orientation biaxiale) sont utilisés avec des couches supplémentaires de matériaux tels que des couches métallisées ou d'autres plastiques. Ces films sont couramment employés dans l'emballage des snacks pour maintenir la fraîcheur et la qualité des aliments en les protégeant de l'humidité. Ils sont fréquemment utilisés comme alternative au PVC dans le processus de moulage.

4. 3. 6. Polystyrène (PS)

Le polystyrène est fabriqué à partir de monomères de styrène sous forme de mousse ou de solide. Contrairement à d'autres plastiques, le PS présente une nature claire et dure mais cassante et est solide à température ambiante, commençant à s'écouler au-delà de 100 °C. Le taux de biodégradation des produits en PS est faible.

4. 3. 7. Autres

Les plastiques modernes, tels que l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS) et les élastomères, sont inclus dans cette catégorie. Elle comprend également les polycarbonates, les acryliques, les bioplastiques, etc. Lorsque ces plastiques sont utilisés pour fabriquer des produits, le symbole de recyclage indique qu'ils sont toujours recyclables et respectueux de l'environnement. Cependant, leur qualité dépend du traitement, des processus de fabrication ainsi que de la qualité de la matière première.

4. 4. Classification en fonction des propriétés de conception

Cette méthode de classification dépend de l'importance des matières plastiques dans le processus de fabrication et de conception. Ainsi, les plastiques peuvent être classés selon divers paramètres tels que la conductivité électrique, la durabilité, la résistance à la traction, la décomposition et la stabilité thermique (Ghosh et al., 2013).

4. 5. Classification en fonction des propriétés de dégradabilité

Les propriétés chimiques des plastiques sont des critères importants pour les différencier en polymères dégradables et non dégradables. Habituellement, les plastiques non dégradables sont connus sous le nom de plastiques synthétiques et sont dérivés de produits pétrochimiques. Ils se caractérisent par une répétition inhabituelle de petites unités monomères et ont un poids moléculaire très élevé. En revanche, les plastiques dégradables sont fabriqués à partir d'amidon et ont un poids moléculaire plus faible. Ils se décomposent généralement en interaction avec les rayons ultraviolets (UV), l'eau, les enzymes et les changements progressifs du pH (Ghosh et al., 2013).

Chapitre II: Polyéthylène basse densité et problématique des sacs en plastique

Le polyéthylène est le thermoplastique le plus utilisé à l'échelle mondiale. Ce polymère représente à lui seul environ un tiers de la production totale des matières synthétiques et constitue la moitié des emballages plastiques. Environ 80 millions de tonnes de polyéthylène sont produites chaque année (Piringer and Baner, 2008; Gaston, 2009).

1. Définition du polyéthylène

Le polyéthylène (PE) est une résine synthétique à longue chaîne obtenue par polymérisation de monomères d'éthylène (C_2H_4) (Figure 1). Dans sa forme la plus simple, une molécule de PE est constituée de chaînes d'atomes de carbone liés de manière covalente, avec une paire d'atomes d'hydrogène attachés à chaque atome de carbone ($-CH_2-$) (Figure 2). Les extrémités de ces chaînes sont terminées par des groupes méthyle ($-CH_3$) (Peacock, 2000). Le PE se caractérise par sa dureté, sa faible absorption d'humidité, sa bonne résistance chimique, sa bonne résistance électrique, son faible coefficient de frottement et sa facilité de traitement (Rosato Dominick et al., 2004).

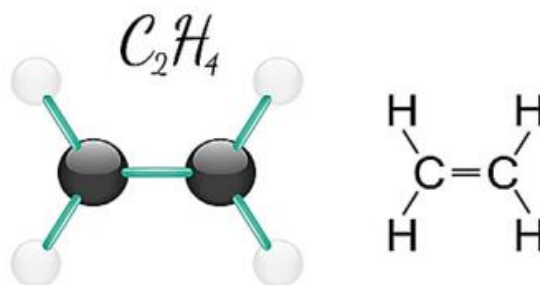


Figure 1. Structure d'une molécule d'éthylène (Das et Kumar, 2023)

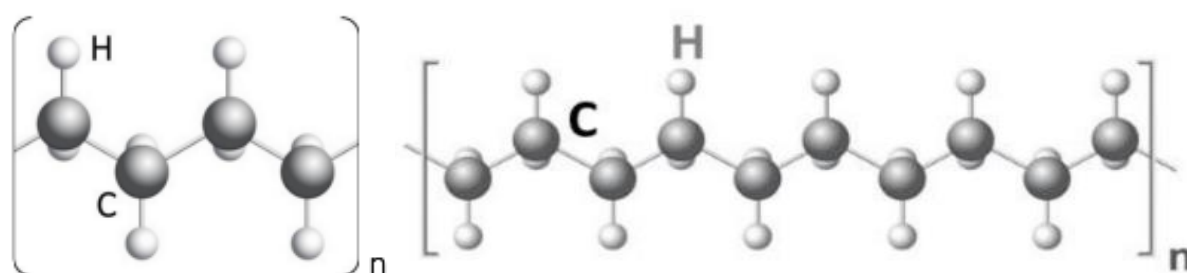


Figure 2. Structure d'une molécule de polyéthylène (Boriskina, 2019)

2. Processus de fabrication du polyéthylène

Le PE est un produit provenant de la distillation d'un pétrole brut dans une colonne de fractionnement aboutissant à sa séparation en différents produits selon leur densité, notamment en naphtha et en gaz naturel. Ces derniers subissent un vapo-craquage formant ainsi des sous-produits, entre autres l'éthylène qui subit à son tour une polymérisation qui peut s'effectuer selon la méthode Ziegler-Natta, la catalyse métallocène, la polymérisation en phase gazeuse ou en phase liquide, ou par polymérisation radicalaire, créant ainsi des chaînes de polymère linéaires ou ramifiées qui déterminent les propriétés finales du PE produit (Shaw et Sahni, 2014) (Figure 3).

La polymérisation Ziegler-Natta implique l'utilisation de complexes de métaux de transition, tels que le titane et le zirconium, combinés à des co-catalyseurs organo-aluminiques pour catalyser la réaction de polymérisation. Elle permet un contrôle précis de la structure du polymère et est couramment utilisée pour la fabrication du PEHD et du PEBD (Shamiri *et al.*, 2014).

La catalyse métallocène implique l'utilisation de complexes de métallocènes comme catalyseurs, généralement composés d'un métal de transition (titane, zirconium) lié à des ligands organiques cyclopentadiényle. Elle permet un contrôle plus précis sur la structure et les propriétés du polymère résultant et est souvent utilisée pour des applications nécessitant des polymères de haute performance. (Shamiri *et al.*, 2014).

La polymérisation en phase gazeuse consiste à introduire le monomère d'éthylène dans un réacteur à haute pression, généralement avec un catalyseur (titane) qui active les molécules d'éthylène et les transforme en radicaux réactifs. Ces radicaux réagissent entre eux pour former des chaînes de polymère de polyéthylène qui croissent lorsque de nouvelles molécules d'éthylène s'y fixent. Le PE produit se présente sous forme de poudre ou de granules (Alves *et al.*, 2021).

La polymérisation en phase liquide consiste à dissoudre le monomère d'éthylène dans un réacteur en présence d'un solvant liquide (heptane) et d'un catalyseur qui initie la réaction de polymérisation. Les molécules d'éthylène se lient entre elles pour former des chaînes de polymère dans le liquide. Ces chaînes se précipitent hors de la solution sous forme de granules de polyéthylène à mesure qu'elles croissent en taille. Les granules sont ensuite récupérés et purifiés pour éliminer tout résidu de catalyseur et autres impuretés (Zhong *et al.*, 2018).

La polymérisation radicalaire implique l'initiation de la réaction par des radicaux libres et est souvent utilisée pour produire des polymères de faible poids moléculaire et de basse densité (Su, 2013).

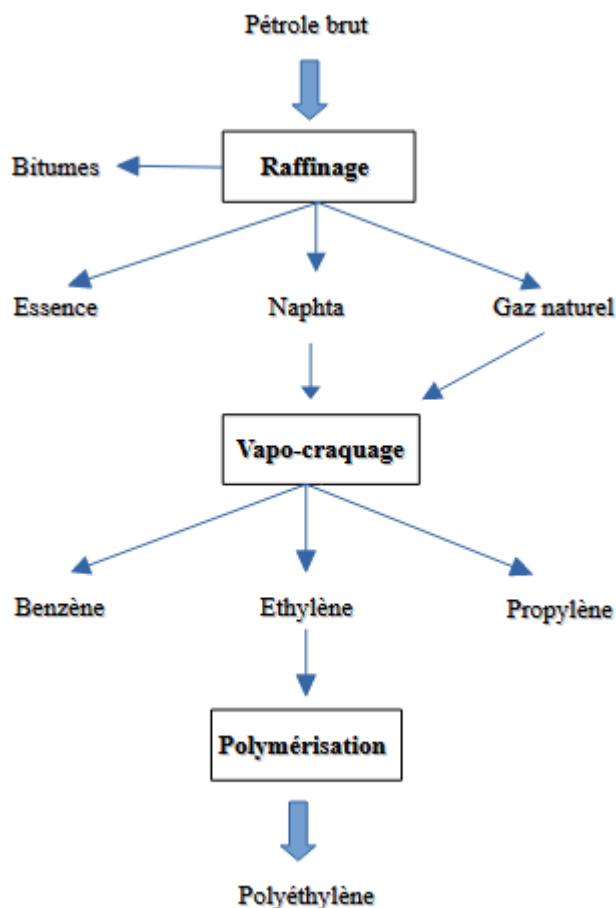


Figure 3. Procédés de fabrication du polyéthylène à partir du pétrole brut

3. Classification du polyéthylène

Selon les différents modes de polymérisation, on peut distinguer le PE linéaire, ramifié et réticulé, qui peuvent être subdivisés en plusieurs types selon des propriétés distinctes (William, 2003; Vasile et Pascu, 2005; James, 2007).

3. 1. Classification des polyéthylènes linéaires ou ramifiés

Le polyéthylène peut être linéaire ou ramifié et peut être classé en fonction de sa densité et de sa masse molaire.

3. 1. 1. Classification en fonction de la densité

Elle dépend du nombre et de la longueur des ramifications présentes sur les chaînes moléculaires et on peut distinguer cinq types:

- Le polyéthylène à très basse densité (PETBD): 0.890-0.915 g/cm³
- Le polyéthylène basse densité linéaire (PEBDL): 0.910-0.925 g/cm³
- Le polyéthylène basse densité (PEBD): 0.910-0.925 g/cm³
- Le polyéthylène moyenne densité (PEMD): 0.926-0.940 g/cm³
- Le polyéthylène haute densité (PEHD): 0.942-0.965 g/cm³

3. 1. 2. Classification en fonction de la masse molaire

En fonction de leur masse molaire, les PE peuvent être classés en trois types:

- Le polyéthylène à masse molaire très basse
- Le polyéthylène à masse molaire élevée
- Le polyéthylène à masse molaire très élevée (PEUHPM)

3. 2. Classification des polyéthylènes réticulés (PEX)

Le polyéthylène peut être classé en fonction de son taux de réticulation, qui est lié à la présence de liaisons covalentes transversales entre les chaînes du polymère, formant une structure tridimensionnelle ou un réseau créé par des réactions chimiques après la polymérisation. Ces liaisons croisées confèrent au polymère une rigidité et une résistance mécanique accrues. Cette classification permet de distinguer trois principaux groupes:

- Le polyéthylène non réticulé
- Le polyéthylène faiblement réticulé
- Le polyéthylène fortement réticulé

4. Polyéthylène basse densité

Parmi les différents types de polyéthylène, le polyéthylène basse densité (PEBD) est le plus couramment utilisé. C'est le premier plastique commercialisé dans les emballages à la fin des années 1940. Il a été inventé en 1933 par les ingénieurs anglais Fawcett et Gibson ([Selke et Hernandez, 2001](#); [Feldman, 2008](#)).

4. 1. Définition

Bien que sa structure chimique soit similaire à celle du PEHD, le PEBD possède une fréquence plus élevée de ramification avec plus d'atomes de carbone tertiaires dans sa structure (**Figure 4**). Cette ramification empêche le rapprochement des molécules de polymère et entraîne une diminution de la cristallinité (Peacock, 2000). Ce matériau est relativement doux, flexible mais aussi résistant. Il est largement utilisé pour la fabrication de sacs de transport, de matériaux d'emballage et du plastique agricole. On estime que 500 milliards de tonnes de PEBD sont produites annuellement sous forme de sacs en plastique (Knight, 2013). Ce polymère est également utilisé pour le paillage du sol comme matériau de couverture pour empêcher l'évaporation de l'eau du sol et maintenir le niveau d'humidité pendant la culture (Qiang *et al.*, 2023).

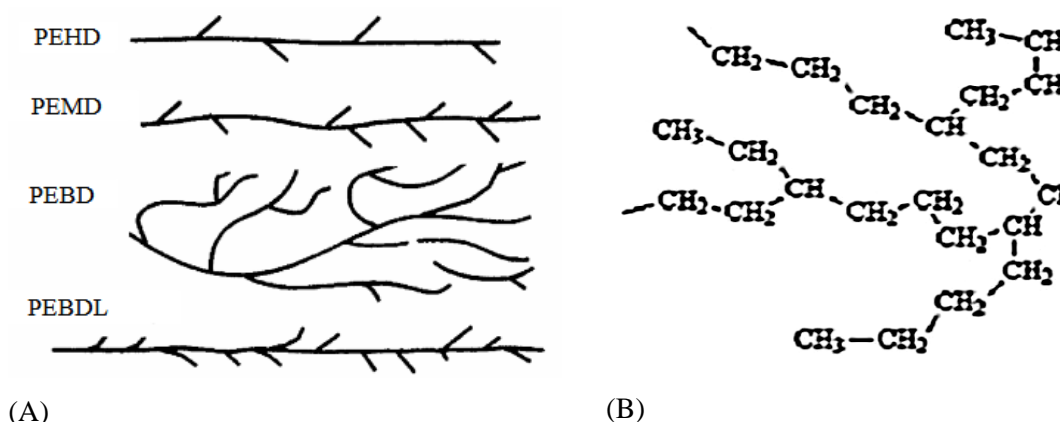


Figure 4. Structures des différents types de polyéthylène (A); structure chimique du PEBD (B) (William, 2003; Sen et Raut, 2015)

4. 2. Propriétés du polyéthylène basse densité

Le polyéthylène basse densité (PEBD) est un polymère thermoplastique obtenu par polymérisation radicalaire de l'éthylène à très haute pression (Na *et al.*, 2018). C'est un matériau semi-cristallin blanchâtre fabriqué en des variations transparentes (films de PEBD) ou semi-opaques (matériau plus épais). Il est relativement souple, flexible et dur. Ce polymère est non-réactif aux températures ambiantes sauf en présence d'agents fortement oxydants (certains solvants le font gonfler). Il peut être utilisé à des températures allant jusqu'à 95°C pendant de courtes périodes et à 80°C en continu. Cependant, sa température de fusion est comprise entre 105-115°C (Vasile et Pascu, 2005; Sen et Raut, 2015). Il est très peu perméable à la vapeur

d'eau, mais sa propriété barrière est assez faible pour d'autres gaz. En général, le PEBD présente une bonne résistance chimique aux acides faibles, aux acides forts non oxydants, aux bases faibles et fortes, et aux solvants organiques en dessous de 80°C. Il présente une bonne résistance électrique et est considéré comme un excellent isolant électrique (Hernandez, 1997; Carrega, 2009).

4. 3. Applications

Grâce à son faible coût de production, le PEBD est utilisé à grande échelle dans plusieurs secteurs pour la fabrication de divers produits utilisés quotidiennement dans la vie courante, notamment:

- Les emballages alimentaires, industriels et les produits hygiéniques
- Les emballages à clapets
- Les adhésifs
- L'isolation des câbles d'énergie et de télécommunications
- Le gainage des câbles téléphoniques
- Les meubles d'extérieur, revêtements, carrelages
- Les articles ménagers souples: sacs en plastique, films, bidons, récipients et bouteilles souples (sauces, shampoing, crèmes, etc.) (Hernandez, 1997; Jambeck, 2015; Bhogayata, 2024).

Toutefois, l'utilisation la plus répandue de ce polymère est celle de la fabrication des sacs en plastique (Khruengsai *et al.*, 2021).

5. Problématique des sacs en plastique

5. 1. Définition d'un sac plastique

Un sac plastique est un conteneur non tissé en matière plastique destiné au stockage, au transport et à l'emballage d'une large gamme d'articles et de matériaux. Sa production est faite le plus souvent à partir du polyéthylène d'origine pétrolière. Ce polymère est formé de plusieurs molécules d'éthylène couramment extraites du gaz naturel. Le sac plastique est fabriqué en polyéthylène haute densité ou en polyéthylène basse densité. En fonction de son usage, on trouve les sacs poubelles, les sacs de caisse, les sacs sous vide, etc. Leur principal impact environnemental est qu'ils mettent plus de temps à se décomposer dans la nature (Battsetseg *et al.*, 2022).

5. 2. Composition d'un sac plastique

Le sac plastique est constitué de polyéthylène ainsi que des pigments qui servent à le teindre. Les pigments blancs tels que le dioxyde de titane (TiO_2) et le carbonate de calcium (CaCO_3) peuvent être ajoutés, respectivement, en tant qu'agent de renforcement et d'opacité et comme élément améliorant la résistance et la rigidité du sac (Kimmel, 2014).

5. 3. Processus de fabrication d'un sac plastique

Les sacs plastiques sont le plus souvent fabriqués à partir de granules de PEBD et/ou de PEHD par le procédé d'extrusion de film soufflé (Figure 5). Le processus consiste à chauffer les granules dans une extrudeuse à une température particulière. Une fois fondue, la matière obtenue est extrudée avec précision et soufflée à travers une filière circulaire pour former un film tubulaire de plusieurs mètres de haut. La matière refroidit graduellement le long du tube, arrivée en haut, elle prend un aspect solide mais souple. Au sommet, le film est pris dans des rouleaux successifs, travaillé, puis enroulé et coupé en rouleaux individuels de sacs plastiques. Chaque rouleau est acheminé vers un autre département où il est façonné et subit diverses opérations de finition et de personnalisation selon les besoins (impression sur la matière, découpe et soudure sur les plis). Les sacs sont ensuite envoyés à la baie d'emballage et d'expédition où ils sont emballés par lots et expédiés vers des entrepôts de distribution ou des points de vente de la grande distribution et seront disponibles pour les consommateurs (Deshkar *et al.*, 2018).

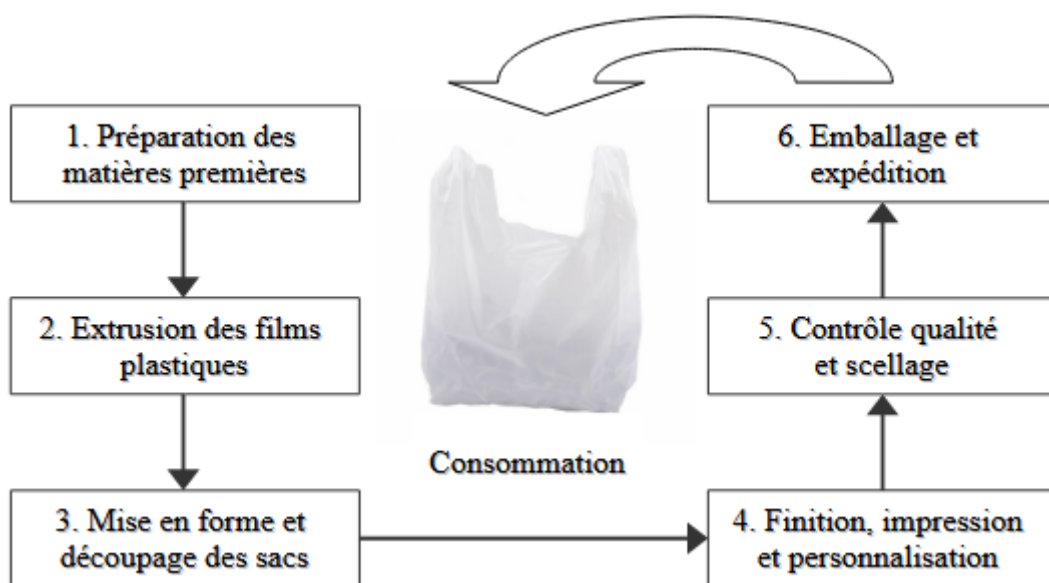


Figure 5. Processus de fabrication des sacs en plastique (Deshkar *et al.*, 2018)

5. 4. Pollution par les sacs plastiques

La surconsommation de sacs plastiques est une problématique environnementale de plus en plus prégnante. Depuis les années 1960, ces polymères ont connu une utilisation exponentielle en tant que matière d'emballage (Dilkes-Hoffman *et al.*, 2019). Cependant, les mêmes propriétés qui ont été à l'origine de leur succès, à savoir la durabilité et le faible coût, en ont fait une source majeure de pollution atmosphérique, terrestre et marine (Bergmann *et al.*, 2015). En effet, un sac plastique peut être fabriqué en seulement une seconde et est souvent utilisé pendant environ 20 minutes, mais il se décompose durant 400 ans dans l'environnement, d'où la nécessité de reconsidérer l'utilisation de ces matériaux. D'ailleurs, de nombreux pays ont pris des mesures spécifiques pour lutter contre les sacs en plastique en introduisant des interdictions ou des taxes/frais à leur utilisation (Lewis, 2012, Bergmann *et al.*, 2015). Ils peuvent bloquer les cours d'eau et accentuer les catastrophes naturelles. De plus, en bouchant les égouts et en fournissant des aires de reproduction pour les moustiques et les parasites, les sacs en plastique peuvent augmenter la transmission de maladies à transmission vectorielle comme le paludisme (Clapp et Swanston, 2009). Par ailleurs, des concentrations élevées de matières plastiques, en particulier de sacs en plastique, ont été retrouvées dans les voies respiratoires et l'estomac de centaines d'espèces animales. En effet, ces polymères sont souvent ingérés par les tortues et les dauphins qui les prennent pour de la nourriture (Hussain *et al.*, 2020).

D'autres part, des études ont montré que les produits chimiques toxiques ajoutés lors de la fabrication du plastique sont transférés dans les tissus animaux pour finalement entrer dans notre chaîne alimentaire. Les produits en polystyrène, qui contiennent des produits chimiques cancérigènes comme le styrène et le benzène, sont très toxiques lorsqu'ils sont ingérés et endommagent le système nerveux, les poumons et les organes reproducteurs. Les toxines contenues dans les récipients en polystyrène peuvent s'infiltrer dans les aliments et les boissons. Dans les pays pauvres, les déchets plastiques sont souvent brûlés pour le chauffage ou la cuisine, exposant ainsi les personnes à des émissions toxiques. L'élimination des déchets plastiques par incinération dans des fosses à ciel ouvert libère des gaz nocifs comme le furane et la dioxine (Verma *et al.*, 2016, Hussain *et al.*, 2020).

En outre, les océans sont considérés comme une destination finale des déchets plastiques non traités qui sont menés par différentes voies telles que les rivières, les eaux de ruissellement, les eaux usées et parfois par des phénomènes météorologiques extrêmes comme les crues et les tsunamis. D'ailleurs, une estimation de 4.8 à 12.7 millions de tonnes de ces polymères récalcitrants est retrouvée en mer chaque année (Jambeck *et al.*, 2015). Par ailleurs, de

nombreux fonds marins et sédiments ont été contaminés par du plastique (Matsuguma *et al.*, 2017; Gerigny *et al.*, 2019; Harris 2020). En effet, l'exemple le plus connu étant la pollution de la fosse océanique la plus profonde connue à ce jour: la fosse des Mariannes. Un sac plastique a été trouvé à près de 11 000 mètres de profondeur, et plus inquiétant encore, des microplastiques ont été détectés dans les intestins d'amphipodes situés entre 7000 et 10890 mètres (Chiba *et al.*, 2018; Jamieson *et al.*, 2019).

5. 5. Gestion des déchets plastiques

Les déchets plastiques causent des dommages considérables lorsqu'ils pénètrent dans l'environnement. C'est pourquoi il est crucial de prendre des mesures pour faire face à ces polymères récalcitrants. Au niveau mondial, la production globale de plastique entre 1950 et 2018 a généré 6.3 milliards de tonnes de déchets plastiques, dont 14 % ont été recyclés, 14 % ont été incinérés et 72 % ont été éliminés dans des sites d'enfouissement ou rejetés dans l'environnement (Geyer 2020; Ali *et al.*, 2021) (Figure 6).

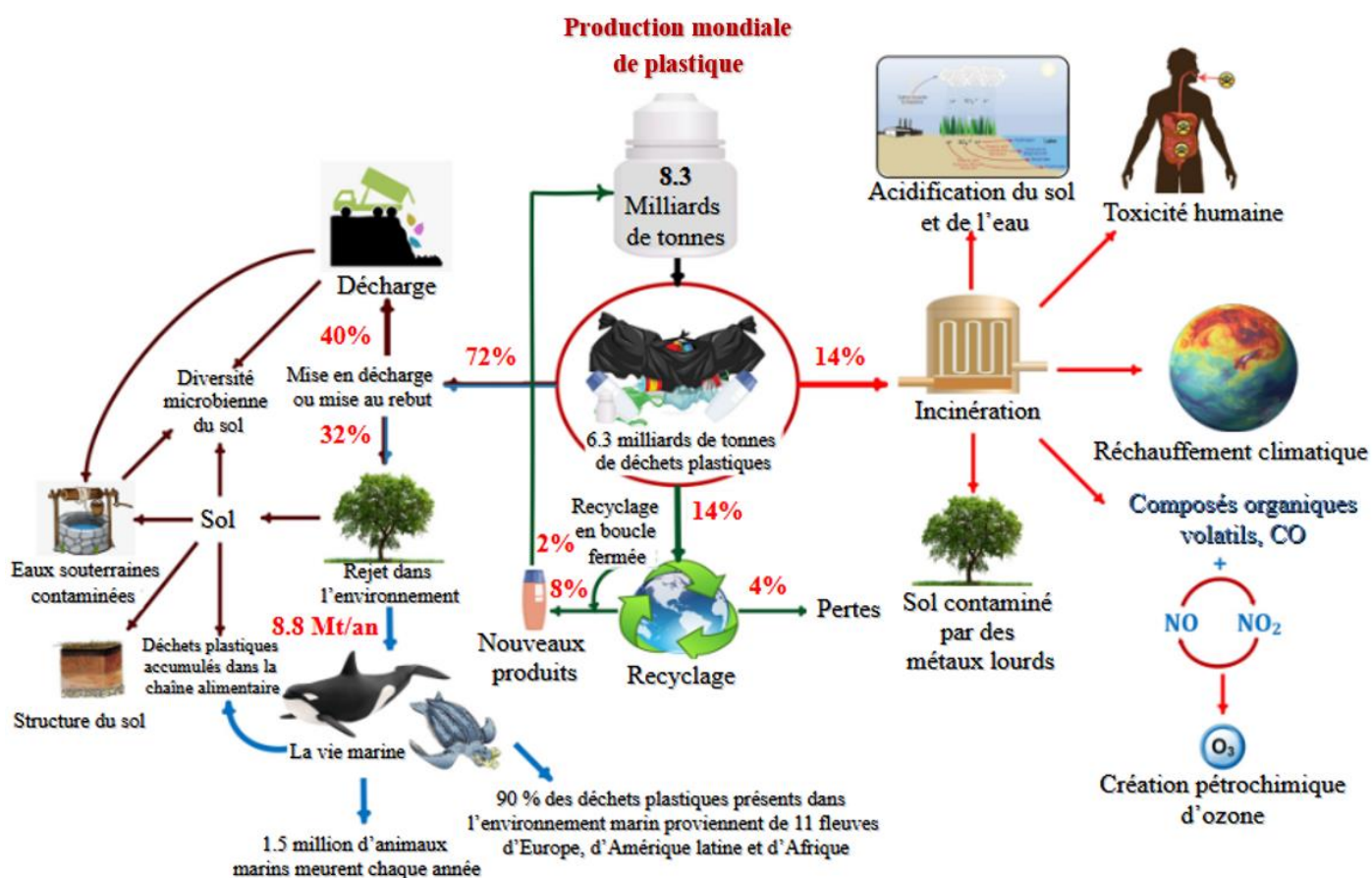


Figure 6. Devenir des déchets plastiques et leurs impacts sur l'environnement (Ali *et al.*, 2021)

5. 5. 1. Recyclage

Le recyclage fait référence à la méthode de gestion des déchets qui consiste à collecter et convertir les déchets en matières premières potentiellement réutilisables pour créer d'autres produits de valeur. Les termes « renouvellement » et « réutilisation » sont également utilisés pour prévenir les effets néfastes sur la société et préserver l'environnement. En tant que produits à base de carbone et autres polymères, les plastiques ne sont pas biodégradables et comprennent des bouteilles, des sacs plastiques et d'autres matériaux qui peuvent être fondus et transformés en d'autres produits tels que les tables et les chaises en plastique. Ce processus s'effectue en six étapes: la collecte des déchets plastiques, le tri ou le classement des plastiques par catégories, le lavage pour l'élimination des impuretés, le déchiquetage et le redimensionnement, l'identification et la séparation des plastiques, et enfin le compoundage (Evode *et al.*, 2021).

Le recyclage des déchets plastiques présente plusieurs avantages obtenus lorsque le plastique est réutilisé plutôt que jeté dans des endroits indésirables. L'un des avantages est la protection de la vie humaine en diminuant le dioxyde de carbone et d'autres gaz nocifs dans l'atmosphère qui peuvent se produire lors de l'incinération ou de la combustion des déchets (Vollmer *et al.*, 2020). Le recyclage réduit la pollution dans l'ensemble de l'écosystème; d'ailleurs, il nécessite moins d'énergie et contribue à la conservation de la nature. Il permet d'économiser de l'espace d'enfouissement et de réduire la demande de consommation de combustibles fossiles. De plus, il promeut un mode de vie durable et contribue à l'économie nationale. Bien qu'il présente différents avantages pour la communauté, le recyclage présente également certains inconvénients qui doivent être gérés et contrôlés. Au cours de ce processus, certains produits chimiques sont rejetés dans l'environnement, notamment des gaz volatils, des fumées et des cendres organiques qui affectent aussi bien la faune que la flore, notamment lorsqu'ils sont inhalés par différents animaux qui vivent à proximité de la zone de recyclage. En outre, il nécessite de la chaleur pour faire fondre les plastiques et, en revanche, il génère du soufre, du carbone et d'autres gaz qui peuvent provoquer le réchauffement climatique, l'effet de serre et les pluies acides qui nuisent à l'environnement de différentes manières. Ces conséquences peuvent également engendrer des problèmes de santé pour la population qui fréquente la zone de recyclage. Enfin, une fois que le processus est terminé, les matériaux recyclés peuvent être triés en fonction de leur qualité et de leur type. Cependant, certains plastiques recyclés peuvent être mélangés à d'autres matériaux ou contenir des contaminants qui les rendent inappropriés pour un autre cycle de recyclage de haute qualité. Ces plastiques peuvent être utilisés dans des applications moins exigeantes ou être dirigés vers les décharges (Evode *et al.*, 2021).

5. 5. 2. Incinération

L'incinération des déchets fait référence à leur combustion dans de l'oxygène, ce qui est chimiquement connu sous le nom de combustion complète qui libère des molécules d'eau et du dioxyde de carbone dans l'atmosphère (Saxena et Jotshi, 1994). Toutefois, certains déchets plastiques sont résistants à l'oxygène, à la chaleur et aux explosifs, par conséquent, ils ne peuvent pas être traités par incinération. La combustion de molécules organiques peut produire de l'énergie sous forme de carburants, qui peuvent être présents sous différents états physiques (liquide, solide et gaz) utilisés par les véhicules et pour la propulsion des avions. De plus, elle contribue énormément à la réduction des déchets dans l'écosystème et à la production de chaleur et d'électricité, ce qui est très nécessaire dans l'industrialisation moderne. En outre, l'incinération empêche la formation du méthane, et a joué un rôle essentiel dans la production d'énergie renouvelable à partir des ressources de biomasse. D'autre part, cette méthode, bien que coûteuse à installer, présente des inconvénients, notamment la libération de divers déchets, tels que des composés chimiques volatils, des cendres et une petite quantité d'acide chlorhydrique, qui peuvent nuire à la santé publique et polluer l'environnement (Evode *et al.*, 2021).

5. 5. 3. Mise en décharge

L'élimination des plastiques usagés dans différentes poubelles finit dans les décharges. Par définition, une décharge englobe les endroits et les zones où tous les déchets plastiques à usage unique sont jetés après utilisation avant d'être enterrés. Toutefois, l'aménagement des sites d'enfouissement est crucial pour garantir une gestion sûre et efficace des déchets afin de protéger l'environnement et d'éviter la contamination des eaux souterraines et la dégradation du sol. Au cours de ce traitement, chaque molécule organique passe par la biodégradation et la décomposition. Or, divers déchets plastiques prennent des années pour se dégrader en raison de leurs propriétés spécifiques et des conditions environnementales telles que la lumière du soleil, le vent et les changements climatiques. D'ailleurs, les sacs en plastique et d'autres déchets de polymères longs peuvent prendre environ dix à cent ans pour se dégrader dans les décharges (Evode *et al.*, 2021). Par conséquent, le recyclage est plus conseillé pour l'élimination des déchets plastiques. Pourtant, les sites d'enfouissement sont une excellente source d'énergie en raison du dioxyde de carbone et du méthane produits lors du processus de biodégradation. De plus, il s'agit d'une méthode rentable de gestion des déchets plastiques qui maintient l'hygiène et la propreté des villes, et sépare les déchets dangereux des autres types de déchets. Cependant, elle présente certains inconvénients, notamment le fait d'être partiellement responsable du

changement climatique, la libération de produits chimiques, de gaz et de toxines dangereux qui se mélangent au sol et aux eaux souterraines, provoquant une pollution terrestre et aquatique. En outre, les métaux infiltrés, l'ammonium, le carbone, le méthane et d'autres toxines altèrent la texture et la naturalité du sol et affectent les plantes et les animaux, tels que les oiseaux qui se nourrissent sur ces sites, ainsi que sur la santé humaine, pouvant provoquer de graves maladies comme le cancer, les troubles respiratoires et les défauts de développement chez les enfants après une exposition prolongée aux décharges (Vrijheid, 2000; Alabi *et al.*, 2019).

5. 5. 4. Dégradation

Selon l'ISO (International Standards Organisation), la dégradation d'un matériau peut être définie comme une « modification dans la structure chimique d'un plastique entraînant des changements de propriétés » (Vert *et al.*, 1992). De même, l'ASTM (American Society for Testing and Materials) définit la dégradation comme « un processus irréversible entraînant un changement important de la structure d'un matériau généralement caractérisé par une perte de propriétés (par exemple, poids moléculaire, structure ou résistance mécanique) et/ou une fragmentation. La dégradation est influencée par les conditions environnementales, et se poursuit sur une période de temps comprenant une ou plusieurs étapes ». En effet, il existe la dégradation abiotique causée par des facteurs physiques (oxygène, eau ou lumière) et la dégradation biotique due à l'action des micro-organismes. En conditions naturelles, ces deux types peuvent être combinés et mènent à la dégradation des polymères à différents degrés (fragilisation, fragmentation, solubilisation) (Artham et Doble, 2008).

Plusieurs études ont montré que les polymères plastiques peuvent être dégradés selon différents mécanismes tels que la photo-dégradation par les rayonnements UV ou la lumière solaire (Shang *et al.*, 2003), l'oxo-dégradation par oxydation chimique ou enzymatique (Enoki *et al.*, 2003), la thermo-dégradation par la chaleur (Lacoste et Carlsson, 1992), la dégradation mécanique sous l'effet de contraintes mécaniques (Fare *et al.*, 1999) et la biodégradation induite par l'action des micro-organismes (Bode *et al.*, 2001).

6. Pollution plastique en Algérie

6. 1. Problématique du plastique

Selon l'EUROMAP (European Committee of Machinery Manufacturers for the Plastics and Rubber Industries), l'Algérie est le deuxième importateur de matières plastiques, sous leurs formes primaires, en Afrique et au Moyen-Orient avec un taux d'importation estimé à 931 Kt en 2020. En outre, selon la VDM (Verband Deutscher Maschinen-und Anlagenbau), l'Algérie

est le premier importateur de plasturgie au Maghreb et l'un des principaux importateurs de technologies d'emballage en Afrique avec 126 M€ (**Figure 7**) et 127 M€ (**Figure 8**), respectivement, en 2022 (Plast Alger, 2024). En effet, l'augmentation des besoins en plastique est relativement liée à la croissance de la population (Hossain *et al.*, 2021). Or, les taux de production élevés et le manque de sensibilisation des consommateurs ont conduit à une production incontrôlée de déchets plastiques (Singh *et al.*, 2017).

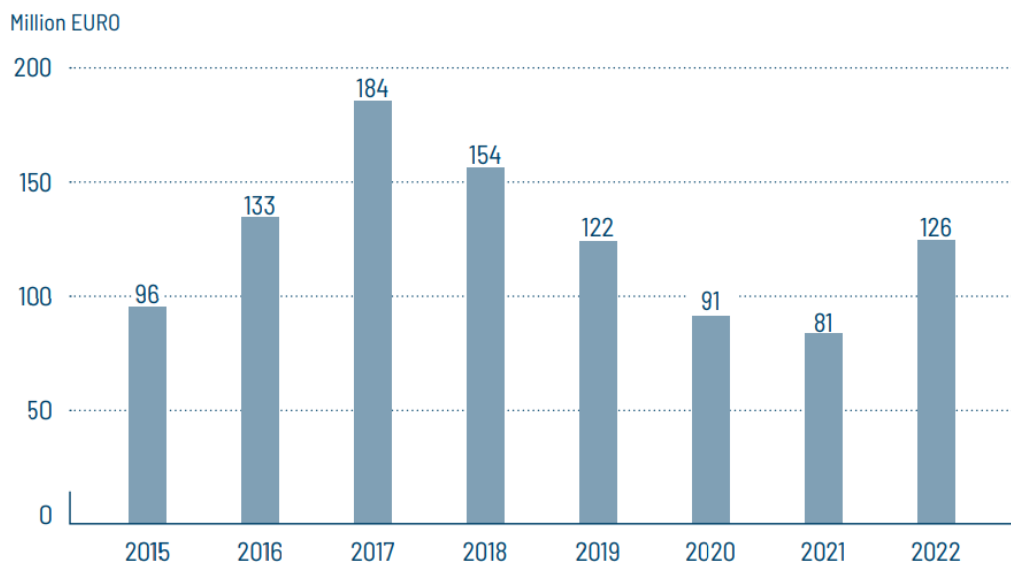


Figure 7. Importation de plastique en Algérie entre 2015 et 2022 (Plast Alger, 2024)

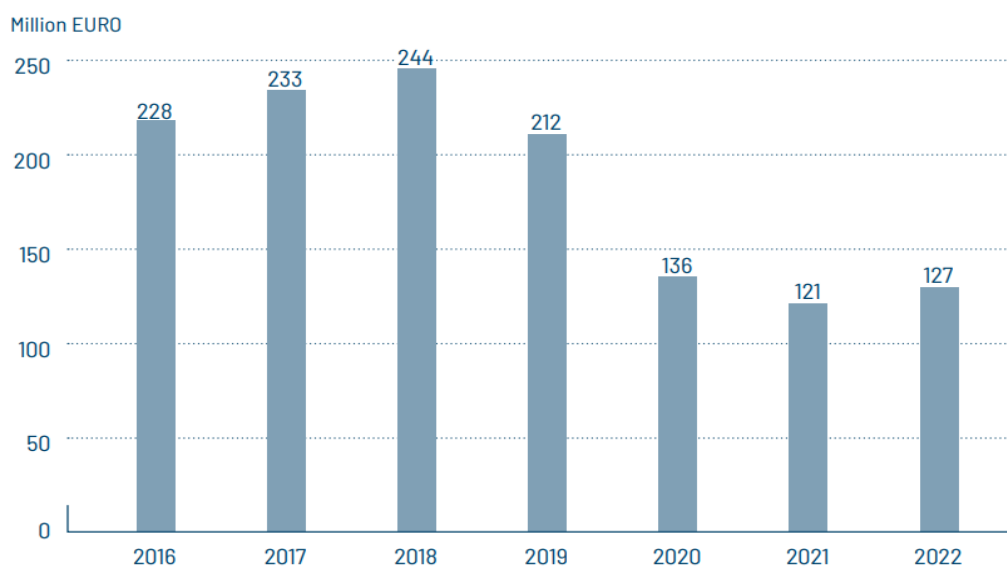


Figure 8. Importation des technologies d'emballage en Algérie entre 2016 et 2022 (Plast Alger, 2024)

Selon l'AND (Agence Nationale des Déchets), environ 2.1 millions de tonnes de déchets plastiques sont produits en Algérie, soit 15.31 % des déchets ménagers et assimilés (DMA) générés annuellement (**Figure 9**). La répartition de ces déchets révèle que le PEBD, représenté par les sacs en plastique, est majoritaire avec près de 8.14 % de la quantité globale des déchets produits (**Figure 10**). En effet, environ 23 milliards de sacs plastiques, tous types confondus, sont générés annuellement par les ménages, soit environ 557 sacs par habitant (AND, 2020).

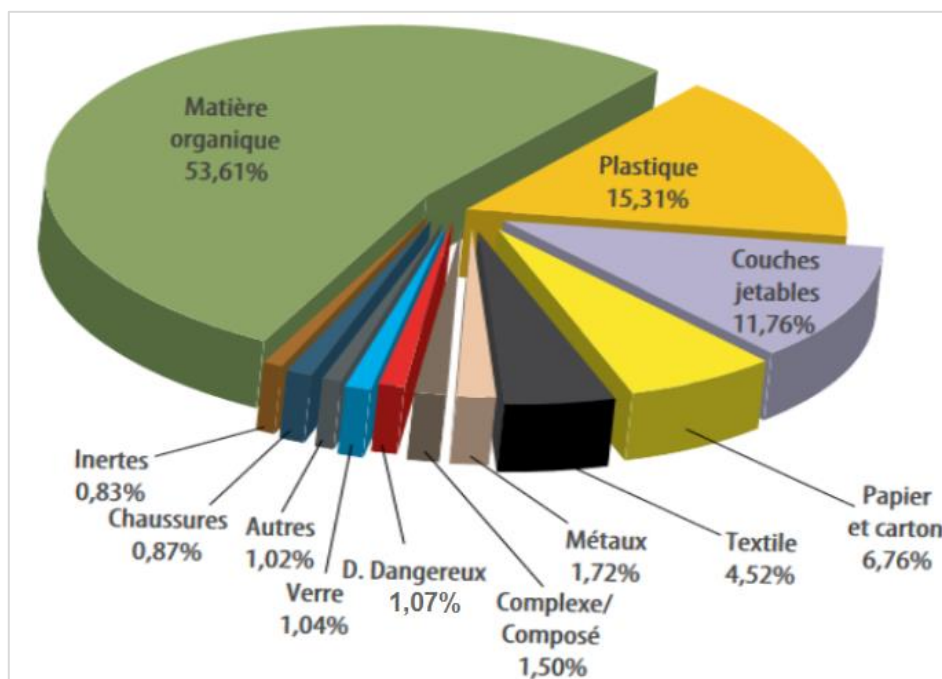


Figure 9. Composition des déchets ménagers et assimilés en Algérie entre Avril 2018 et Mars 2019 (Bouadam, 2022)

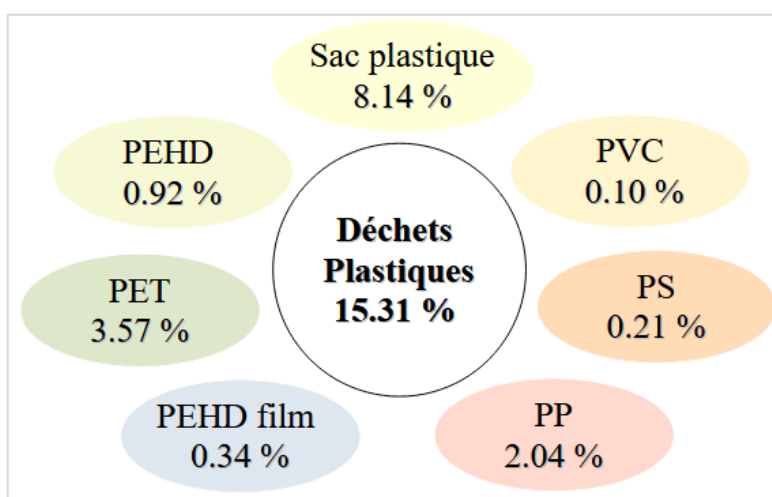


Figure 10. Répartition des déchets plastiques générés entre Avril 2018 et Mars 2019 (AND, 2020)

6. 2. Gestion des déchets en Algérie

En Algérie, la politique de gestion des déchets s'inscrit dans la Stratégie Nationale Environnementale (SNE) et dans le Plan National d'Actions Environnementales et du Développement Durable (PNAE-DD). Cette politique a été mise en place par la loi 01-19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets. Selon l'AND, seuls 1 % des déchets produits en 2014 ont été destinés au compostage, environ 7 % au recyclage, 36 % au centre d'enfouissement technique (CET), 46 % au décharges et 10 % ont été dirigés vers d'autres types de traitements (Bouadam, 2022). Toutefois, la gestion des déchets reste un défi important en Algérie en raison des niveaux élevés de déchets produits pour lesquels seule une petite fraction est collectée. Bien que l'Algérie ait investi 83 milliards de DA entre 2002 et 2017 pour améliorer les services de gestion des déchets, qui malheureusement ont montré des limites, les déchets continuent à croître et à s'accumuler sans cesse aussi bien dans les décharges contrôlées que dans les décharges sauvages. En outre, en raison de son coût d'installation très élevé, l'incinération avec récupération d'énergie n'est pas utilisée en Algérie. De plus, le taux de recyclage est très faible, avec seulement 2 à 3 % des déchets d'emballages plastiques recyclés, d'où la nécessité de développer des réseaux de valorisation des déchets. Une étude de l'AND a révélé que le taux de récupération du plastique est inférieur à 3 %, par rapport au nombre de recycleurs enregistrés. Cette étude a mentionné que le manque à gagner pour l'économie algérienne est d'environ 8 milliards de DA/an en raison des déchets non valorisés. Par conséquent, 34 millions de tonnes de déchets (0.8 kg/habitant) ont été générés en 2018, et ce taux est estimé être doublé d'ici l'an 2035 pour atteindre environ 73 millions de tonnes (1.23 kg/habitant) selon le Ministère de l'Environnement et des Energies Renouvelables (MEER) (Rahmani, 2023).

6. 3. Réglementations régissant les déchets

Le gouvernement algérien a défini une stratégie nationale en matière de protection de l'environnement. Les déchets plastiques et les déchets d'emballages sont régis par un ensemble de textes réglementaires (*Journal Officiel de la République Algérienne*):

Loi n° 2001-19 du 27 Ramadhan 1422 correspondant au 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets;

Décret exécutif n° 02-175 du 7 Rabie El Aouel 1423 correspondant au 20 mai 2002 portant création, organisation et fonctionnement de l'Agence nationale des déchets;

Décret exécutif n° 2002-372 du 6 Ramadhan 1423 correspondant au 11 novembre 2002 relatif aux déchets d'emballages;

Partie I. Synthèse bibliographique

Loi n° 2003-10 du 19 Joumada El Oula 1424 correspondant au 19 juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable;

Décret exécutif n° 2004-199 du Aouel Joumada Ethania 1425 correspondant au 19 juillet 2004 fixant les modalités de création, d'organisation, de fonctionnement et de financement du système public de traitement des déchets d'emballages;

Décret exécutif n° 2006-104 du 29 Moharram 1427 correspondant au 28 février 2006 fixant la nomenclature des déchets, y compris les déchets spéciaux dangereux;

Loi n° 19-14 du 14 Rabie Ethani 1441 correspondant au 11 décembre 2019 portant loi de finances pour 2020 et comporte des mesures visant à relever les taxes relatives aux déchets dangereux, produits pétroliers et sacs en plastique.

Chapitre III: Biodégradation

1. Définition

La biodégradation est la capacité des micro-organismes, tels que les bactéries et les champignons, à convertir des composés organiques complexes en composés plus simples qui peuvent être intégrés dans les cycles biogéochimiques naturels (Trigo *et al.*, 2009). Selon les conditions, les polymères sont transformés en eau, dioxyde de carbone, méthane et biomasse microbienne par le processus de minéralisation (Vert *et al.*, 2012) (**Figure 11**).

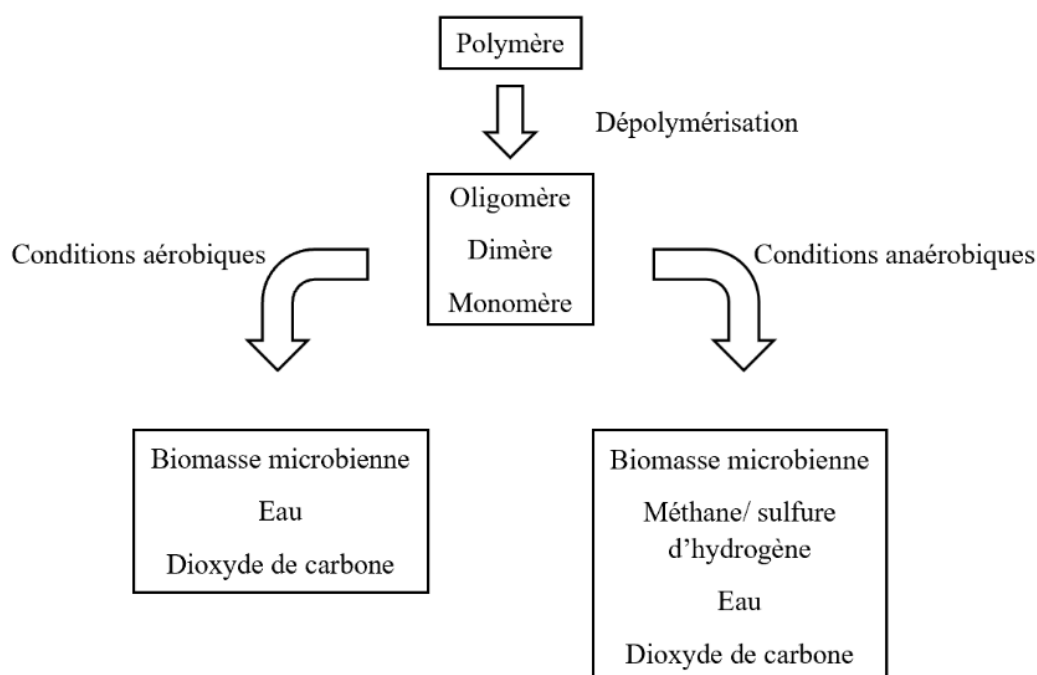


Figure 11. Schéma de la biodégradation d'un polymère en conditions aérobiques et anaérobiques (Gu, 2003)

La biodégradation nécessite plusieurs éléments clés pour se produire efficacement, notamment (Kaplan *et al.*, 1993; Van der Zee, 1997):

- Les micro-organismes: ils sont incontournables pour tout processus de biodégradation. Ils synthétisent des enzymes actives sur le polymère cible afin d'initier le processus de fragmentation et de minéralisation.
- L'environnement: l'efficacité de la biodégradation est stimulée par les conditions environnementales telles que la température, le pH, l'humidité, les sels minéraux et l'oxygène.

- Le substrat: la biodégradation est influencée par la structure du polymère, c'est-à-dire les liaisons chimiques, le degré et le type de ramification, la cristallinité, la stéréochimie, la distribution des masses moléculaires et d'autres aspects morphologiques.

2. Différentes étapes de la biodégradation

La biodégradation des polymères se déroule généralement en quatre étapes: la biodétérioration, la biofragmentation, l'assimilation et la minéralisation (Kaplan *et al.*, 1993; Van der Zee, 1997; Lucas *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2023) (Figure 12).

2. 1. Biodétérioration

Il s'agit de la première étape de la biodégradation qui implique la détérioration des polymères par des micro-organismes, notamment des bactéries et des champignons. Ces derniers colonisent et altèrent physiquement, chimiquement ou biologiquement les matériaux, les rendant ainsi plus susceptibles à la décomposition ultérieure. Ce processus peut inclure des phénomènes tels que la corrosion microbienne et la formation de biofilms.

2. 2. Biofragmentation

La biofragmentation ou dépolymérisation est la deuxième étape de la biodégradation. Elle se déroule généralement à l'extérieur des cellules microbiennes en raison de la taille et de l'insolubilité des macromolécules. Au cours de ce processus, les matériaux biodétériorés sont décomposés en fragments plus petits par le biais d'agents catalytiques, tels que les enzymes extracellulaires secrétées par les micro-organismes. Ces enzymes peuvent être des endoenzymes (clivage au hasard des liaisons internes des chaînes du polymère) ou des exoenzymes (clivage des unités monomères terminales de la chaîne principale). Le clivage des polymères permet de réduire progressivement leur taille et leur poids moléculaire, aboutissant à la production de petites molécules (dimères et monomères) facilement assimilables par les micro-organismes, ce qui favorise le processus global de la biodégradation. Durant cette étape, la réduction de la taille macromoléculaire se produit sans modifier la composition chimique ou la structure de l'unité monomère.

2. 3. Assimilation

L'assimilation est une étape clé de la biodégradation. Elle se produit dans le cytoplasme lorsque de petites molécules produites lors de la dépolymérisation s'intègrent au métabolisme microbien pour produire de l'énergie, de la biomasse et d'autres métabolites. Au cours de ce processus, les micro-organismes absorbent et métabolisent les fragments des polymères comme sources de carbone ou d'azote en convertissant le dioxyde de carbone CO_2 ou le nitrate NO_3^- en composés cellulaires et en énergie. Cette assimilation peut se produire par les trois voies cataboliques classiques selon les conditions environnementales: la respiration aérobie, la respiration anaérobie et/ou la fermentation, et est essentielle pour la croissance et la survie des micro-organismes impliqués dans la biodégradation, car elle fournit les ressources nécessaires pour maintenir leur activité métabolique et continuer le processus de dégradation des substrats organiques.

2. 4. Minéralisation

La minéralisation est la dernière étape de la biodégradation, elle peut se produire en même temps que l'assimilation. Au cours de ce processus, les composés organiques dégradés sont complètement décomposés en simples métabolites tels que le dioxyde de carbone, l'eau, les sels minéraux et la biomasse microbiennes, qui peuvent être absorbés à la fois par l'environnement et les micro-organismes. En effet, ces produits peuvent être réintégrés dans le cycle biogéochimique de l'environnement. De plus, l'énergie et les éléments nutritifs libérés sont essentiels et contribuent ainsi à la fertilité du sol et au fonctionnement des écosystèmes. Toutefois, cette étape est cruciale mais implique généralement différents micro-organismes avec des interactions complexes et une symbiose, ce qui rend difficile la simulation de la dégradation dans un environnement naturel en laboratoire.

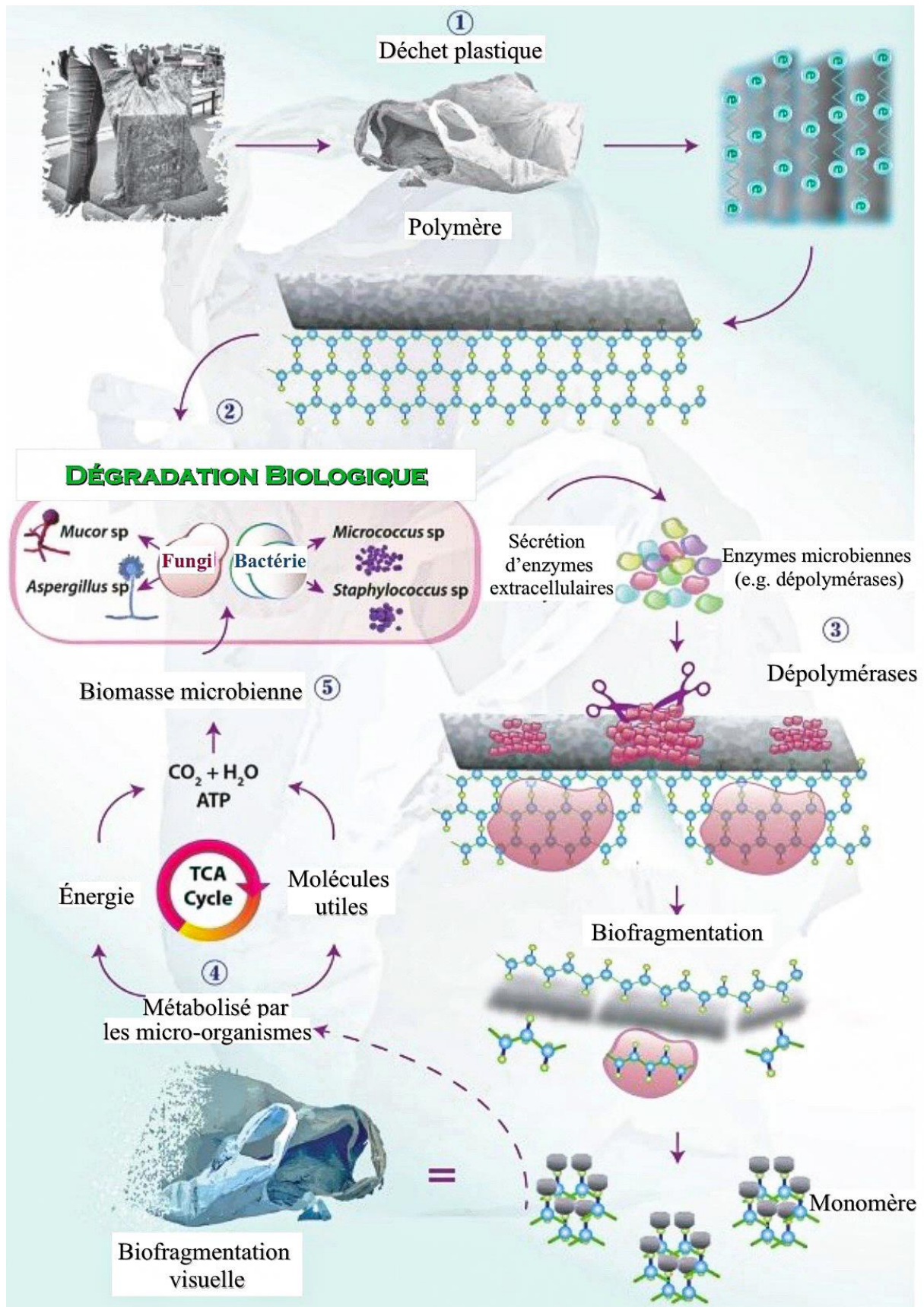


Figure 12. Les différentes étapes de la biodégradation d'un sac en plastique (Zeenat *et al.*, 2021)

3. Polymères biodégradables

Les polymères issus de la pétrochimie sont considérés comme non biodégradables. D'ailleurs, leur minéralisation nécessite plusieurs siècles dans l'environnement naturel, affectant ainsi tous les écosystèmes (Avérous et Pollet, 2012; Samir *et al.*, 2022). C'est pourquoi une autre alternative impliquant des polymères biodégradables a été développée. Ces matériaux sont fabriqués soit à base de polymères naturels modifiés afin d'en améliorer les propriétés mécaniques, soit à base de polymères synthétiques susceptibles d'être attaqués par les micro-organismes. Les biopolymères peuvent être divisés en trois familles distinctes: les polymères naturels, les polymères synthétiques et les polymères semi-synthétiques (Rajeswari *et al.*, 2017).

3. 1. Polymères naturels

Ils sont généralement formés dans la nature au cours des cycles de croissance de tous les organismes. Leur synthèse est généralement catalysée par une enzyme (Chandra et Rustgi, 1998). Les biopolymères les plus répandus sont les polysaccharides, avec différents types dont la cellulose et l'amidon, qui représentent les principaux types d'intérêt. La cellulose est le principal constituant des parois cellulaires des plantes. C'est un polymère linéaire très long qui consiste en la répétition d'une seule unité monomère. Elle est particulièrement cristalline et insoluble dans les solvants. La biodégradation de la cellulose se fait en présence d'une enzyme appelée la peroxydase (oxydation) et génère des produits inoffensifs pour l'environnement. D'autre part, l'amidon, un composé dérivé principalement de la pomme de terre, du maïs, du blé et du riz, contient de l'amylose (polymère linéaire et cristallin) et de l'amylopectine (polymère ramifié et amorphe). Selon leurs proportions, les matériaux obtenus à partir d'amidon auront des propriétés mécaniques et biodégradables différentes (Fredriksson *et al.*, 1998; Ratnayake *et al.*, 2001). La biodégradation de l'amidon se fait en présence d'amylase et de glucosidase et génère des produits qui ne sont pas toxiques. L'amidon présente ainsi de forts potentiels pour être utilisé comme matériau biodégradable (Chandra *et al.*, 1998; Yukata *et al.*, 1990).

D'autres polymères naturels peuvent être utilisés pour produire des matériaux biodégradables, comme les protéines (la gélatine, la caséine, la soie et la laine) (Chandra *et al.*, 1998). Ces polymères subissent des modifications chimiques afin d'augmenter les propriétés mécaniques ou d'ajuster la vitesse de biodégradation. La modification de la cellulose consiste à synthétiser des esters de cellulose, tels que l'acétate de cellulose, qui est obtenu par la réaction entre

l'anhydride acétique et la cellulose, avec possibilité de faire varier le degré de substitution. Toutefois, les propriétés mécaniques et de biodégradation évoluent en sens inverse du degré de substitution (Gu *et al.*, 1993a; Gu *et al.*, 1993b). L'amidon, quant à lui, est le plus souvent utilisé sous forme thermoplastique. Pour cela, l'amidon natif est mélangé à de l'eau et à un plastifiant, généralement le glycérol, et subit de fortes températures et pressions, aboutissant à la formation d'un matériau de l'état vitreux à caoutchouteux en fonction des conditions (Avérous et Fringant, 2001).

De même que pour les polysaccharides, il est possible de greffer des groupements sur les protéines afin d'ajuster la vitesse de dégradation. De nouveaux polymères carbohydrates plus complexes ont été produits par les bactéries et les champignons. En outre, les polyesters naturels, fabriqués par une grande variété de bactéries à partir de ressources renouvelables, ont connu un essor principalement sur les polyhydroxyalcanoates. Les constituants de cette famille de biopolymères thermoplastiques présentent des propriétés mécaniques qui varient d'une structure cassante et rigide à une structure flexible, suivant la taille du groupement alkyle. Leur composition, leur masse moléculaire et le rendement de production dépendent de la source de carbone et des nutriments. La biodégradation de ces polymères naturels implique généralement le détachement successif des groupements monomères de la chaîne polymère, souvent par l'intervention d'enzymes d'origine fongique ou bactérienne (Chandra *et al.*, 1998; Lenz, 1993).

3. 2. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont issus de la pétrochimie et ne sont pas biodégradables. En revanche, ils renferment des liaisons hydrolysables telles que les esters ou les amides, qui sont susceptibles d'être biodégradables dans certaines conditions (Luckachan et Pillai, 2011). Les premières recherches concernant les polyesters ont porté sur les polyesters aliphatiques, comme le poly (acide glycolique), le poly (acide lactique) et le polycaprolactone ainsi que sur leurs mélanges. Ces polymères sont utilisés principalement dans le domaine médical (Vert *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que les polyesters dérivant d'unités monomères moyennes (C₆-C₁₂) sont attaqués majoritairement par des espèces fongiques (*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*). Malgré leur grande taille, la flexibilité des chaînes aliphatiques permet aux liaisons esters d'être facilement attaquées par les enzymes (Chandra *et al.*, 1998).

3. 3. Polymères semi-synthétiques

Ils sont obtenus à partir de polymères naturels qui ont subi des traitements chimiques pour modifier leurs propriétés physiques, tels que l'amidon (Rajeswari *et al.*, 2017). Parmi les polymères semi-synthétiques d'importance commerciale, on trouve l'éthyl-cellulose (EC) et la méthyl-cellulose (MC), destinés à des applications pharmaceutiques (Brady *et al.*, 2017).

4. Applications des polymères biodégradables

De nos jours, la vigilance écologique et l'impact environnemental liés aux polymères plastiques d'origine fossile ont conduit à davantage d'études et de recherches sur le développement de matériaux d'origine biologique et de sources renouvelables, connus sous le nom de plastiques biodégradables ou bioplastiques. Actuellement, ces biopolymères représentent près de 1 % de la production annuelle totale des plastiques, mais des études prévoient qu'une capacité de production totale de six millions de tonnes sera atteinte dans les années à venir. Les biopolymères présentent plusieurs avantages par rapport aux plastiques conventionnels en raison de leur dégradabilité, leur durabilité, leur biocompatibilité, et leur nature non toxique (Alaswad *et al.*, 2022). Ils peuvent ainsi avoir de nombreuses applications dans divers domaines, notamment dans la fabrication des emballages alimentaires jetables tels que les sacs, la fabrication des films agricoles et de mulch, la fabrication de textiles biodégradables pour les vêtements et les articles ménagers, ou pour la mise en œuvre des articles jetables tels que les ustensiles de cuisine. Ils sont également utilisés dans les emballages non alimentaires tels que les sacs poubelles. En outre, les polymères biodégradables sont employés dans le domaine médical, notamment dans les sutures, les implants et dans les emballages de produits pharmaceutiques, et certains sont utilisés dans les produits cosmétiques tels que les microbilles dans les exfoliants et les gels coiffants. Enfin, ils sont empruntés dans des applications environnementales telles que les sacs de compostage, les géotextiles et les produits de lutte contre l'érosion. Ces applications contribuent à réduire la pollution plastique et à promouvoir la durabilité environnementale (Rai *et al.*, 2021).

5. Paramètres d'évaluation de la biodégradation

Les paramètres d'évaluation de la biodégradation sont utilisés pour mesurer, quantifier et/ou confirmer le processus de dégradation des matériaux par des organismes vivants tels que les micro-organismes (Müller, 2005; Mahalakshmi, 2014; Ameen *et al.*, 2015; Zeghal *et al.*, 2021):

5. 1. Méthodes standards d'évaluation de la biodégradation des plastiques

5. 1. 1. Observations visuelles

L'évaluation des changements visibles dans les plastiques peut être effectuée dans presque tous les tests. Ces changements comprennent la rugosité de la surface, la formation de trous et de fissures, ou la formation de biofilms. Cependant, ces critères ne prouvent pas forcément un métabolisme de biodégradation, mais peuvent être utilisés comme première indication d'une éventuelle attaque microbienne.

5. 1. 2. Mesures de perte de masse/poids

Ce paramètre consiste à mesurer la diminution de la masse d'un polymère sur une période de temps spécifique pendant laquelle le matériau est exposé à des conditions contrôlées en présence de micro-organismes. La perte de poids est généralement exprimée en pourcentage de la masse initiale du matériau plastique.

5. 1. 3. Mesure de la consommation d'O₂ et/ou de la production de CO₂

Ce test respiratoire consiste à mesurer la consommation d'oxygène (O₂) et/ou la production de dioxyde de carbone (CO₂) afin d'évaluer l'activité métabolique des micro-organismes présents dans un environnement donné. Une augmentation de ces deux paramètres est indicative de la dégradation des polymères.

5. 1. 4. Formation de zones de clairance

Les zones de clairance se forment lorsque les micro-organismes sont capables de dégrader ou de métaboliser une substance organique présente dans un substrat solide ou semi-solide. Ce processus entraîne la formation d'une zone décolorée ou transparente autour de la colonie microbienne où le substrat organique a été dégradé ou consommé. Ce paramètre peut être utilisé comme indicateur visuel de l'activité des micro-organismes dégradant le substrat organique. Plus la zone de clairance est étendue et visible, plus l'activité de biodégradation est forte.

5. 1. 5. Traçage du carbone marqué

Il s'agit d'une méthode avancée qui implique l'utilisation de polymères marqués avec des isotopes stables du carbone tels que le carbone-13 (¹³C), afin de suivre le devenir du carbone dans le polymère lors de sa dégradation par les micro-organismes. Cependant, les matériaux marqués sont chers et ne sont pas toujours disponibles.

5. 2. Techniques analytiques d'évaluation de la biodégradation

5. 2. 1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette technique implique l'émission d'un faisceau d'électrons de haute intensité vers la surface d'un polymère en la balayant. Elle permet d'observer les changements morphologiques apparus sur la surface des polymères après leur dégradation par les micro-organismes. Cela inclut la formation de fissures, de pores, de déformations ou d'autres altérations de la structure du polymère.

5. 2. 2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge est une technique utilisée pour obtenir un spectre infrarouge d'absorption ou d'émission d'un polymère, permettant ainsi une analyse détaillée des changements chimiques produits pendant le processus de biodégradation.

5. 2. 3. Microscopie à force atomique (AFM)

Il s'agit d'une technique d'imagerie à l'échelle nanométrique qui permet de visualiser et de caractériser la surface d'un polymère avec une très haute résolution spatiale. L'AFM peut être utilisée pour observer la topographie de la surface d'un polymère afin de détecter les changements morphologiques apparus après la biodégradation. Elle peut également mesurer quantitativement la rugosité de la surface avant et après la dégradation, ou encore révéler la présence de nanostructures, telles que les nanoparticules formées pendant ce processus.

5. 2. 4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN peut être utilisée comme un outil complémentaire pour évaluer la biodégradation des polymères. Elle fournit des informations sur les changements moléculaires induits par le processus de biodégradation, notamment en identifiant les groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présents dans les échantillons dégradés.

5. 2. 5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Cette technique permet d'analyser les produits de dégradation formés lors du processus de biodégradation et d'identifier les composés organiques présents dans les échantillons.

Chapitre IV: Les champignons

1. Généralités

Le règne Fungi (dérivé du latin "fungus") ou mycètes (du grec "mykes"), désignant les "champignons", est l'un des plus vastes groupes d'organismes sur terre avec une grande diversité regroupant l'ensemble des champignons (macro/microscopiques), des levures et des moisissures. Ces organismes ubiquitaires jouent un rôle crucial dans les écosystèmes, notamment dans la décomposition de la matière organique, la régulation des cycles biogéochimiques et les interactions symbiotiques avec d'autres organismes (Schmit et Mueller, 2007; Das *et al.*, 2022).

Les mycètes regroupent des organismes eucaryotes, dont les cellules possèdent un noyau et d'autres organites cellulaires délimités par une membrane (**Figure 13**). Leur paroi cellulaire est composée principalement de chitine, une substance qui les distingue des autres organismes eucaryotes. La chitine offre aux champignons une structure solide et contribue à leur intégrité cellulaire, leur permettant de s'adapter à une variété d'environnements et de remplir divers rôles écologiques. Les champignons sont des organismes hétérotrophes dépourvus de chlorophylle et, par conséquent, contrairement aux plantes, ils ne peuvent pas produire leur propre nourriture. Ils se nourrissent ainsi en absorbant des nutriments à partir de matière organique morte (saprophytes), de matière vivante (parasites) ou en établissant des associations symbiotiques avec d'autres organismes. Ils peuvent également adopter le mode de nutrition osmotrophe, qui consiste à libérer dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur et à digérer les aliments complexes en substrats simples à l'extérieur de la cellule (pénétration des nutriments sous forme soluble) (Carlile et Watkinson, 1994; Redecker, 2002; Walker et White, 2005).

Il s'agit d'organismes thallophytes à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Ils se reproduisent généralement par des spores qui peuvent être produites dans une variété de structures spécialisées telles que les sporanges, les basides ou les asques. Ces spores peuvent jouer un rôle dans la dispersion des champignons ainsi que dans leur survie lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Madelin, 1994).

Les mycètes présentent une grande diversité morphologique allant des levures unicellulaires aux champignons filamenteux multicellulaires. Toutefois, certains forment des structures visibles à l'oeil nu tels que les champignons à chapeau. Les champignons microscopiques, quant à eux, comprennent deux principaux groupes, notamment les levures et les moisissures

(Singh, 2006). Ces micro-organismes, en particulier les levures, sont essentiels dans plusieurs procédés industriels qui impliquent une fermentation (exemple: la fabrication d'antibiotiques) (Kavanagh, 2005).

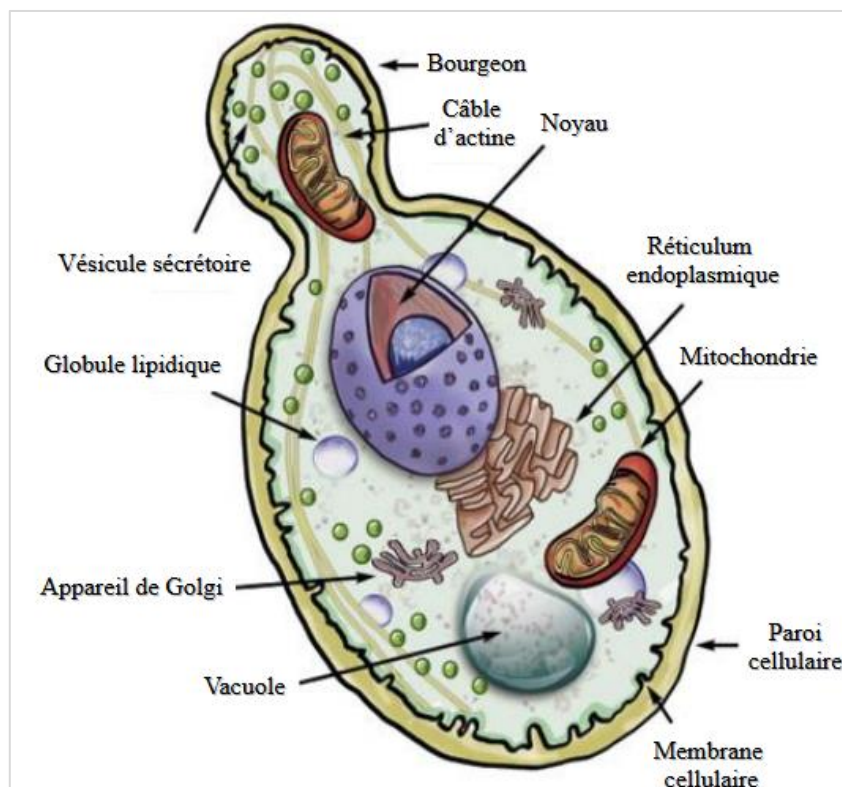


Figure 13. Schéma d'une cellule fongique (Mankar *et al.*, 2022)

2. Taxonomie

Les champignons ont longtemps été classés parmi les membres primitifs du règne végétal, légèrement plus avancés que les bactéries (Carris *et al.*, 2012). Cependant, les études taxonomiques récentes basées sur des méthodes phylogénétiques montrent que les champignons représentent un groupe à part au sein du super-règne Opisthokonta (Baldauf *et al.*, 2013). Ces mycètes sont classés selon différents rangs taxonomiques hiérarchiques (règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre et espèce). Toutefois, la détermination du nom scientifique d'un micro-organisme se fait par la nomenclature binomiale proposée par le naturaliste suédois Carl Von Linné en 1753, qui fait référence au genre et à l'espèce (Martinez-Goss et Arguelles, 2020). En outre, la nomenclature des différents taxons fongiques présente une terminologie codifiée: *-mycota* pour le phylum, *-mycotina* pour la sous-division, *-mycètes* pour la classe, *-ales* pour l'ordre, et *-aceae* pour la famille (Rajeswari *et al.*, 2021).

Le règne des « champignons vrais » ou Fungi, appelé *Eumycota*, englobe la grande majorité des champignons et constitue actuellement un sous-règne, *Dikarya*, comprenant deux phylums: *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Le phylum des *Ascomycota* inclut trois sous-divisions: *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* et *Taphrinomycotina*, et comprend les levures et les moisissures. Tandis que le phylum des *Basidiomycota* inclut trois sous-divisions: *Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* et *Agaricomycotina*, et comprend les champignons à spores nues (Hibbett *et al.*, 2007). De plus, les champignons imparfaits ou Fungi imperfecti, anciennement appelé *Deuteromycota*, sont maintenant inclus dans le règne des *Eumycota* et plus particulièrement dans le phylum des *Ascomycota*, lorsqu'une forme sexuée connue est identifiée (Charya, 2015).

3. Classification des champignons

Les champignons microscopiques présentent des caractéristiques morphologiques distinctes qui peuvent être observées sous microscope. Toutefois, la plupart de ces micro-organismes possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines. Les polysaccharides sont majoritairement la chitine et les glucanes. Ils assurent la protection des mycètes contre les agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines permettent la liaison et l'adhérence des cellules fongiques à leur environnement, et enfin les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi et contribuent ainsi à sa stabilité et son intégrité (Samanta, 2015). En fonction de leurs propriétés morphologiques, les champignons peuvent être classés en quatre groupes: les levures, les champignons filamenteux (moisissures), les champignons ressemblant à des levures et les champignons dimorphiques (Mankar *et al.*, 2022).

3. 1. Les levures

Les levures sont des champignons unicellulaires qui se présentent généralement sous forme de cellules sphériques ou ovales. Elles peuvent former des colonies visibles à l'œil nu lorsqu'elles se multiplient sur des milieux de culture appropriés. Les levures se reproduisent par bourgeonnement ou fission, et sexuellement par fermentation (Knop, 2011). Leur taille peut varier selon l'espèce et les conditions de croissance; généralement, elles sont microscopiques et mesurent quelques micromètres de diamètre (3-4 μm). Ces micro-organismes appartenant au règne des Fungi sont classés dans les phylums *Ascomycota* et *Basidiomycota* (Dix et Webster, 1995).

3. 2. Les champignons filamenteux (moisissures)

Les moisissures sont des champignons multicellulaires qui possèdent un appareil végétatif appelé thalle. Ce dernier est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, formant un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre allant de 2 à 10 μm et sont plus ou moins ramifiés (Samanta, 2015; Portnoy et Jara, 2015). Chez certaines moisissures, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, et présente ainsi un thalle coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, le thalle est cloisonné ou « septé ». Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. D'autre part, les moisissures peuvent former un réseau de mycélium visible à l'œil nu lorsqu'elles se développent sur des substrats tels que les aliments en décomposition. Elles peuvent également se reproduire en formant des structures telles que les sporangiophores ou les conidiophores qui libèrent des spores pour la dispersion (Mankar *et al.*, 2022).

3. 3. Les champignons ressemblant à des levures

Les champignons ressemblant à des levures ou "yeast-like fungi" sont des organismes fongiques qui partagent des caractéristiques morphologiques similaires à celles des levures, mais qui peuvent également présenter d'autres formes de croissance, telles que des pseudo-hyphes ou de véritables hyphes. Un exemple de ces micro-organismes est *Candida*. Il forme un bourgeon qui reste attaché à la cellule mère et s'allonge, suivi d'un bourgeonnement répété formant des chaînes de cellules allongées, appelées "pseudo-hyphes". Ils peuvent être des basidiomycètes tels que *Cryptococcus neoformans* ou des ascomycètes tels que *Candida albicans*. Cependant, certaines espèces comme *C. albicans* produisent également de véritables hyphes. Le test de dépistage rapide de *C. albicans* a montré la capacité de cet isolat à former un tube germinatif en deux heures lorsqu'il est incubé dans du sérum humain à 37°C (Mankar *et al.*, 2022).

3. 4. Les champignons dimorphiques

Les champignons dimorphiques sont des organismes fongiques qui peuvent adopter deux formes différentes de croissance, généralement une forme de levure à température élevée (supérieure ou égale à 37°C) et une forme filamenteuse à température ambiante (20-25°C). Cette capacité est souvent associée à des adaptations écologiques et à des stratégies de survie dans des environnements variés. Toutefois, certains champignons dimorphiques sont des agents pathogènes opportunistes chez les humains et les animaux (Cleare *et al.*, 2017).

4. Développement des champignons

Les champignons microscopiques peuvent passer par plusieurs phases de développement qui varient en fonction des espèces et des conditions environnementales.

4. 1. Germination des spores

La phase de germination des spores correspond au premier stade du développement des champignons microscopiques. Pendant cette phase, les spores, des cellules de reproduction dormantes, commencent à se développer pour former un nouvel organisme fongique. Lorsque les conditions environnementales sont favorables, telles que l'humidité et la présence de nutriments, les spores absorbent de l'eau et commencent à gonfler. Elles développent une structure de croissance appelée tube germinatif ou germe, qui émerge de la spore et commence à se développer dans le substrat environnant. Ce processus marque le début de la croissance active du champignon et est crucial pour l'initiation du cycle de vie fongique (Jung *et al.*, 2014).

4. 2. Phase végétative

La phase végétative est essentielle pour la survie et la propagation des champignons. Elle correspond à la phase de croissance active des champignons, au cours de laquelle l'appareil végétatif colonise le substrat environnant par extension et ramification des hyphes. La ramification peut se faire par dichotomie (division à partir de l'apex) ou par bourgeonnement (division latérale à partir des côtés des hyphes). Il s'agit également d'une phase de nutrition où les hyphes absorbent à travers leur paroi l'eau et les éléments nutritifs contenus dans le substrat après l'avoir dégradé par sécrétion d'enzymes et d'acides. La forme mycélienne en expansion, qui constitue une phase active de développement, est responsable de la dégradation et de l'altération du substrat (Jung *et al.*, 2014; Walker et White, 2018). Il peut s'agir d'un mycélium végétatif qui pénètre à la surface du milieu et absorbe les nutriments, un mycélium aérien qui se développe au-dessus de la surface des géloses, ou d'un mycélium fertile présentant un hyphe aérien capable de former des structures reproductrices telles que des conidies ou des sporanges (Bueno et Silva, 2014).

4. 3. Phase reproductive

Elle comprend deux types de reproduction: la reproduction asexuée, correspondant à la forme anamorphe, et la reproduction sexuée, correspondant à la forme téléomorphe (Kirschner, 2018).

4. 3. 1. Reproduction asexuée

Elle se fait sans fusion de gamètes et implique généralement la production et la dispersion de spores asexuées par mitose, permettant la propagation des champignons afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction correspond à la sporulation, au cours de laquelle se produisent des spores en grande quantité par des structures spécialisées développées à partir du mycélium. Ces spores sont de petites cellules déshydratées à métabolisme réduit et sont entourées d'une paroi protectrice les isolant du milieu environnant. Leur taille varie en fonction des espèces et du type de spores produites (Koul et Sumbali, 2001).

La reproduction asexuée peut se présenter sous différentes formes, donnant lieu à la production de différents types de spores (Money, 2016):

- Reproduction par fragmentation: elle implique la production de spores à partir de fragments de mycélium cassés ou séparés, formant ainsi des arthrospores, des structures de résistance, qui peuvent germer pour former de nouveaux individus fongiques sous des conditions favorables.
- Reproduction par endogénèse: elle implique la production de sporangiospores à l'intérieur d'une structure spéciale appelée sporangium, qui se développe à l'intérieur du mycélium.
- Reproduction par exogénèse: elle implique la production de conidiospores à partir de structures spécialisées appelées phialides, des cellules situées à l'extrémité des conidiophores.

Les spores peuvent se détacher du mycélium sous l'effet d'un léger choc mécanique, d'un frottement ou d'un courant d'air, se propageant ainsi de différentes manières selon leur structure et leurs caractéristiques spécifiques. Après leur dispersion et leur dépôt sur un nouveau substrat, les spores peuvent rester inertes lorsque les conditions environnementales ne sont pas favorables à leur développement. Cependant, une fois que les conditions deviennent favorables, ces spores germent comme des graines et commencent à former un réseau de filaments ou un mycélium (Money, 2016).

4. 3. 2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée des champignons implique la fusion de deux cellules sexuelles différenciées ou gamètes, appelées "gametangia", les gamètes males: antheridies, et les gamètes femelles: oogonies. Ils peuvent se développer en phase terminale ou sub-terminale en position intercalaire sur les hyphes principaux ou ramifiés, en tant qu'appendices terminaux ou latéraux

du thalle non mycélien, ou former le thalle entier. La reproduction sexuée est un processus qui se déroule généralement en trois phases distinctes: la plasmogamie, la karyogamie et la méiose (Janaki, 2022; Mankar *et al.*, 2022):

- La plasmogamie: elle correspond à l'union des protoplastes d'hyphes ou de cellules reproductrices mâles et femelles pour former un zygote diploïde. Cependant, les deux noyaux ne fusionnent pas l'un avec l'autre, créant ainsi une cellule appelée "dikaryon". L'état dikaryotique est unique aux champignons et peut se poursuivre pendant plusieurs générations lorsque les deux noyaux (dikaryon) se divisent simultanément lors de la division cellulaire.
- La karyogamie: cette étape correspond à la fusion des deux noyaux haploïdes précédemment réunis par plasmogamie, entraînant la formation d'un zygote diploïde, ou "karyon".
- La méiose est le processus de division cellulaire qui réduit le nombre de chromosomes dans le noyau diploïde formé lors de la karyogamie. Cette phase aboutit à la formation de quatre spores haploïdes génétiquement différentes, qui peuvent se développer en gamètes ou subir la germination pour former de nouveaux individus haploïdes.

5. Habitat et conditions de développement

Les champignons sont cosmopolites et hétérotrophes; leur développement dépend de plusieurs facteurs, nutritifs et environnementaux. Ils présentent différents types d'habitats où ils établissent des interactions diverses avec leur environnement. Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote sous forme de composés organiques, ainsi que les ions minéraux tels que le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer et le soufre. Toutefois, les molécules simples telles que les acides aminés peuvent pénétrer dans la cellule fongique sans transformation, tandis que les molécules complexes telles que l'amidon, la cellulose et les protéines nécessitent une digestion enzymatique préalable via des enzymes ou des acides sécrétés par les moisissures. Cela permet une altération du substrat. Cette capacité de décomposition permet aux espèces fongiques de s'adapter à différents habitats et de jouer un rôle clé dans le cycle des éléments nutritifs (Tahezadeh *et al.*, 2023).

5. 1. Modes de nutrition

Les champignons peuvent se nourrir selon différents modes (Rai et Agarkar, 2014; Janaki, 2022):

- Le saprophytisme: les champignons dégradent la matière organique morte ou en décomposition afin de prélever les minéraux essentiels. Ils jouent un rôle crucial dans le recyclage des matières mortes telles que les débris végétaux et animaux.
- La symbiose: les champignons obtiennent leurs nutriments grâce à un autre organisme en échange de certains bénéfices, tels que la protection, l'eau ou les sels minéraux. Les deux organismes sont alors qualifiés de symbiotes.
- Le commensalisme: les champignons commensaux tirent un bénéfice de leur hôte sans lui nuire ni lui apporter un quelconque avantage. Les bénéfices observés peuvent être la récupération des débris nutritifs de l'hôte, le transport ou le refuge.
- Le parasitisme: les champignons extraient leurs nutriments de la matière vivante, souvent au détriment de leur hôte, entraînant parfois sa mort.

5. 2. Conditions de développement environnementales

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer la croissance et le développement des champignons (Mannaa et Kim, 2018; Walker et White, 2018):

- L'humidité relative (HR) est le facteur environnemental le plus important. Elle est évaluée par la formule suivante: $HR (\%) = a_w \times 100$, où "aw" représente l'activité de l'eau. Une valeur élevée de l'aw est nécessaire à la croissance de la plupart des champignons, avec un minimum d'environ 0.65.
- La température et les exigences thermiques varient d'un champignon à un autre. La plupart sont mésophiles et se développent généralement à des températures autour de 25°C. Cependant, certaines espèces sont thermophiles, thermotolérantes ou psychrophiles.
- L'oxygène: la plupart des champignons dépendent de l'oxygène pour leur métabolisme et leur croissance, et sont dits aérobies. Cependant, quelques espèces sont anaérobies, mais elles sont beaucoup moins courantes.
- Le pH: les champignons peuvent se développer dans un pH compris entre 3 et 8, bien que leur pH optimal se situe généralement entre 4 et 6.

6. Métabolites fongiques

Les métabolites fongiques sont des composés chimiques produits par les champignons, tels que les enzymes, les pigments, les toxines et les antibiotiques. Ces métabolites peuvent avoir des applications industrielles, médicales et agricoles importantes (Jewett *et al.*, 2006; Azizan *et al.*, 2016). Parmi ces composés, on trouve:

- Les enzymes ligninolytiques telles que les laccases et les peroxydases, qui sont essentielles pour la décomposition de la lignine dans les écosystèmes forestiers et peuvent également être utilisées dans des processus industriels, tels que le blanchiment du papier (Cagide et Castro-Sowinski, 2020).
- Les hydrolases, y compris les estérases et les cutinases, qui sont importantes pour la dégradation des esters et des polymères présents dans les matières organiques. Elles ont des applications dans divers domaines industriels, notamment le lavage des textiles et la dégradation des polluants environnementaux (Martínez et Maicas, 2021).
- Les oxydases comme les mono-oxygénases et les di-oxygénases, qui catalysent des réactions d'oxydation et sont impliquées dans la dégradation de composés aromatiques. Ces enzymes sont également utilisées dans des applications industrielles telles que le traitement des eaux usées (Leja et Lewandowicz, 2010).
- Les pigments, tels que la mélanine, jouent plusieurs rôles essentiels dans la survie des champignons et leur adaptation aux environnements hostiles. Ce pigment confère des avantages écologiques, médicaux, cosmétiques et biotechnologiques aux champignons producteurs (Toledo *et al.*, 2017).

7. Rôle des champignons dans la dégradation des plastiques

Les capacités métaboliques des champignons sont extrêmement diversifiées et leur permettent de jouer des rôles écologiques essentiels, notamment dans le cycle des nutriments, la décomposition de la matière organique et la bioremédiation (Shourie et Vijayalakshmi, 2022).

7. 1. Mécanismes de la biodégradation

Les champignons jouent un rôle crucial dans la biodégradation des plastiques grâce à plusieurs mécanismes enzymatiques et métaboliques (Amobonye *et al.*, 2020; Jaiswal *et al.*, 2020; Temporiti *et al.*, 2022; Varshney *et al.*, 2023):

7. 1. 1. Adhésion, colonisation et formation de radicaux libres

7. 1. 1. 1. Adhésion et colonisation

La première étape de la dégradation des plastiques par les champignons consiste en la sécrétion de substances adhésives et d'hydrophobines qui leur permettent de s'attacher et d'adhérer à la surface du polymère. Les hyphes fongiques peuvent alors se développer et se ramifier à la surface, formant des biofilms qui favorisent la colonisation du plastique. Cependant, la capacité des champignons à coloniser le plastique dépend de la nature du polymère et de ses propriétés physico-chimiques.

7. 1. 1. 2. Production et sécrétion d'enzymes extracellulaires

Les champignons sécrètent des enzymes telles que les laccases, les estérases et les cutinases qui peuvent attaquer et décomposer les polymères complexes des plastiques. Ces enzymes clivent les liaisons chimiques des polymères, transformant les plastiques en molécules plus petites et plus simples.

7. 1. 1. 3. Formation des radicaux libres

Certaines enzymes fongiques, notamment les laccases et les peroxydases, catalysent la formation de radicaux libres. Ces radicaux sont des espèces hautement réactives qui peuvent initier la dégradation des polymères plastiques. Les laccases, entre autres, catalysent l'oxydation de substrats phénoliques, générant des radicaux phénoxyles qui peuvent attaquer les liaisons polymériques. Quant aux peroxydases, elles utilisent le peroxyde d'hydrogène pour générer des radicaux hydroxyles (OH) et d'autres espèces réactives de l'oxygène qui attaquent les chaînes polymériques des plastiques.

7. 1. 2. Dégradation oxydative et hydrolytique

Les enzymes fongiques peuvent catalyser des réactions d'oxydation et d'hydrolyse importantes pour la rupture des chaînes de polymères. Les oxydases et les peroxydases sont particulièrement efficaces pour la dégradation des plastiques.

- Oxydation: les radicaux libres générés par les enzymes fongiques provoquent l'oxydation des chaînes polymériques. Ces réactions oxydatives entraînent la formation de groupes fonctionnels tels que les hydroxyles, les carbonyles et les carboxyles sur les chaînes polymériques, les rendant plus susceptibles à la dégradation.

- Hydrolyse: les enzymes hydrolytiques, telles que les estérases et les amidases, clivent les liaisons ester et amide dans les polymères, produisant des fragments plus petits. L'oxydation préalable facilite souvent ces réactions hydrolytiques.

7. 1. 3. Fragmentation des polymères

Les réactions enzymatiques et la formation de radicaux libres entraînent la fragmentation des chaînes polymériques en oligomères, dimères et monomères. Ces fragments plus petits sont plus facilement assimilés par les champignons.

7. 1. 4. Assimilation et minéralisation

Les fragments de plastique dégradés sont transportés dans les cellules fongiques et intégrés dans les voies métaboliques centrales comme la glycolyse et le cycle de krebs. Les fragments organiques sont finalement convertis en dioxyde de carbone, eau et biomasse fongique. La minéralisation complète réduit les fragments plastiques en composants inoffensifs pour l'environnement.

7. 1. 5. Synergie microbienne

Les champignons peuvent collaborer avec des bactéries et d'autres micro-organismes pour dégrader plus efficacement les plastiques. Les communautés microbiennes coopératives peuvent métaboliser les fragments de plastiques que les champignons seuls ne peuvent pas décomposer complètement. Cette synergie permet d'optimiser le processus de dégradation.

7. 2. Exemples de champignons impliqués dans la dégradation des polymères

L'étude de la capacité des champignons à dégrader les plastiques remonte à plusieurs décennies, et plusieurs espèces ont été identifiées pour leur potentiel de dégradation de ces polymères. En effet, les premières études sur la biodégradation des plastiques par les micro-organismes ont commencé dans les années 1970. Les chercheurs ont découvert que certains champignons pouvaient coloniser et dégrader divers types de plastiques, suscitant un intérêt croissant pour le potentiel de ces mycètes en bioremédiation (Miri *et al.*, 2022; Vaksmaa *et al.*, 2023a), (**Tableau 1**).

Tableau 1. Exemples d'espèces fongiques et les types de plastiques qu'elles dégradent

Phylums	Espèces fongiques	Polymères dégradés	Références	
Ascomycota	<i>Aspergillus glaucus</i>	PE	Kathiresan, 2003	
	<i>Aspergillus japonicus</i>		Raaman <i>et al.</i> , 2012	
	<i>Aspergillus nidulans</i>	PEBD	Muhonja <i>et al.</i> , 2018a	
	<i>Aspergillus oryzae</i>		Muhonja <i>et al.</i> , 2018b	
		PE	Raghavan et Torma, 1992	
		PEBD	Sáenz <i>et al.</i> , 2019	
		PEHD	Rani et Singh, 2015	
		PVC	Ali <i>et al.</i> , 2014	
		<i>Candida guilliermondii</i>	PHB	Matavuly et Molitoris, 2015
			PEBD	Zahra <i>et al.</i> , 2010
Zygomycota	<i>Fusarium solani</i>	PEHD	Rani <i>et al.</i> , 2020	
		PCL	Murphy <i>et al.</i> , 1996	
	<i>Penicillium oxalicum</i>	PEBD, PEHD	Ojha <i>et al.</i> , 2017	
	<i>Mucor sp.</i>	PVC	Pardo-Rodriguez et Zorro-Mateus, 2021	
	<i>Rhizopus delemar</i>	PET	Tokiwa <i>et al.</i> , 2009	

PCL: polycaprolactone; **PE:** polyéthylène; **PEBD:** polyéthylène basse densité; **PEHD:** polyéthylène haute densité; **PET:** polyéthylène téréphtalate; **PHB:** polyhydroxybutyrate; **PVC:** polychlorure de vinyle

MATERIEL
ET
METHODES

1. Echantillonnage

Trois échantillons de sol ont été collectés à partir de trois sites différents de la décharge publique de Boumehadjer (36°59'35"N, 6°33'23"E), située à l'entrée de la ville de Collo, à l'Est de Skikda (Nord-Est de l'Algérie) (**Figures 14, 15 et 16**). Les échantillons ont été prélevés en Avril 2021, après avoir éliminé les cinq premiers centimètres de la surface du sol. Chaque échantillon a été transporté au laboratoire dans un sac en plastique noir stérile, conservé à 4 °C, et utilisé dans les 24 heures suivant le prélèvement (*Boughachiche et al., 2005*).



Figure 14. Localisation géographique de la décharge de Boumehadjer (Collo)



Figure 15. Photographies de la décharge publique de Boumehadjer (Collo)



Figure 16. Echantillons de sol prélevés de la décharge de Boumehadjer (Collo)

2. Isolement des champignons indigènes du sol

Dix grammes de sol ont été ajoutés à 90 ml d'eau physiologique stérile (EPS). Le mélange contenu dans un Erlenmeyer stérile de 250 ml, a été soumis à une agitation pendant 30 minutes, suivie d'une heure de repos. Cette préparation a servi de solution mère. Ensuite, une série de dilutions décimales 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} a été préparée à partir de la solution mère, et 0.1 ml de chaque dilution a été inoculé à la surface d'une boîte de Petri contenant le milieu Potato-Dextrose-Agar (PDA, pH 5.6 ± 0.2) additionné de 20 $\mu\text{g/ml}$ de la gentamicine pour inhiber la croissance bactérienne. Les boîtes ont été incubées à 27°C pendant une semaine (Davet et Rouxel, 1997). Ces étapes ont été appliquées pour les trois échantillons de sol (Figure 17).

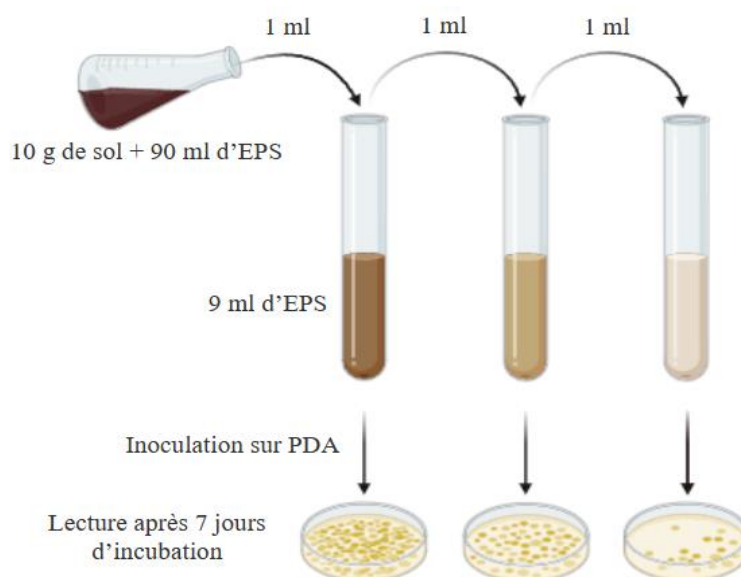


Figure 17. Schéma représentatif des étapes de l'isolement des isolats fongiques

2. 1. Purification des isolats fongiques

La purification des isolats fongiques a été faite par des repiquages de thalles et de colonies bien isolées sur boîtes de Petri de PDA (pour les champignons filamenteux) et Sabouraud (pour les levures), respectivement (**Annexe I**). Ces boîtes ont été incubées à 27°C pendant 72 heures. La pureté des isolats a été confirmée par une observation des aspects macroscopiques et microscopiques de chaque isolat ([Shumi *et al.*, 2004](#)).

2. 2. Conservation des isolats fongiques

Deux méthodes de conservation des isolats fongiques ont été employées :

➤ Conservation de courte durée

Les isolats purifiés ont été ensemencés sur gélose inclinée (PDA), incubés à 27°C pendant sept jours, et conservés à 4°C pendant 6 à 12 mois ([Botton *et al.*, 1990](#)).

➤ Conservation de longue durée

La conservation à long terme des isolats fongiques a été réalisée à – 20°C dans des microtubes stériles de 1.5 ml contenant 1 ml de solution de glycérol à 20 %.

3. Identification des isolats fongiques

L'identification des isolats a été réalisée en fonction de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques pour déterminer leurs genres fongiques ([Pardo-Rodríguez et Zorro-Mateus, 2021](#)). De plus, une analyse moléculaire a été réalisée pour identifier les espèces fongiques sélectionnées pour les tests de la biodégradation.

3. 1. Identification macroscopique

L'observation macroscopiques des isolats fongiques cultivés sur gélose PDA, pour les moisissures, et sur gélose Sabouraud, pour les levures, a été basée sur plusieurs critères et aspects distinctifs à l'œil nu ([Alsohaili et Bani-Hasan, 2018](#)) à savoir:

- L'aspect des thalles / colonies: les champignons filamenteux forment des thalles duveteux avec une texture épaisse, laineuse, ou veloutée ; quant aux levures, les colonies sont souvent crémeuses, lisses et brillantes;
- Le relief des colonies peut être plat ou surélevé;
- La taille des colonies peut varier en fonction des genres fongiques;
- La couleur des colonies: les couleurs les plus fréquentes sont vert-olive, brunes ou noires, blanches ou jaunes;
- Les pigments diffusés dans le milieu de culture.

3. 2. Identification microscopique

L'identification microscopique consiste à étaler une culture fongique jeune sur une lame contenant une goutte d'EPS et la recouvrir d'une lamelle. L'observation a été réalisée en utilisant un microscope optique (Zeiss Axiostar Plus) avec les objectifs 10x et 40x (**Figure 18**). Cette identification a été basée sur l'observation de plusieurs caractères tels que ([Alsohaili et Bani-Hasan, 2018](#)):

- L'appareil végétatif (thalle): la structure du mycélium (septé ou siphonné) et le type de conidiophores;
- Les organes de fructification: la formation des conidies et leurs formes, présence ou absence d'organes protecteurs des conidies;
- Les spores: mode de production et aspect des spores, présence ou absence de chlamydospores;
- Taille, forme et mode de reproduction des levures.



Figure 18. Microscope optique Zeiss Axiostar Plus

3. 3. Caractérisation moléculaire des isolats fongiques

L'identification moléculaire de quatre isolats fongiques a été réalisée au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne (LUBEM) de l'Université de Bretagne Occidentale (Brest, France). Un cinquième isolat a été identifié au Laboratoire Gene Life Sciences (Sidi Bel Abbès, Algérie).

3. 3. 1. Extraction de l'ADN fongique

L'extraction de l'ADN a été effectuée en utilisant un kit commercial FastDNA Spin (MP Biomedicals) (**Figure 19 et 20**) en suivant les directives du fabricant (**Annexe II.1**).

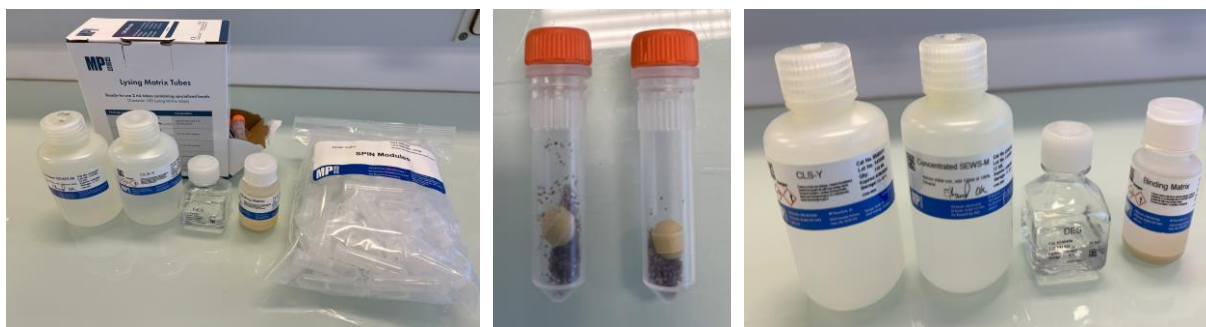


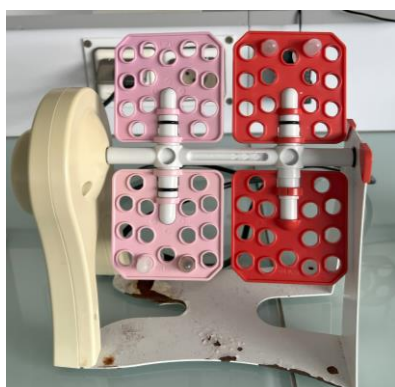
Figure 19. Composants du Kit FastDNA Spin utilisés pour l'extraction de l'ADN fongique



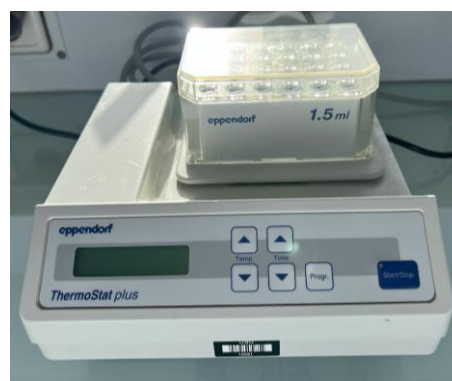
A. Vibro-broyeur (Retsch MM400)



B. Centrifugeuse (Sigma 1-14)



C. RotoFlex, R2001



D. Eppendorf ThermoStat Plus

Figure 20. Appareillage utilisé pour l'extraction de l'ADN fongique

3. 3. 2. Dosage et standardisation de la concentration d'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN fongique ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000) avant de procéder à l'amplification des gènes par PCR (Polymerase Chain Reaction). La pureté de l'ADN a été déterminée lorsque le rapport de densité optique (DO) 260/280 nm est compris entre 1.8 et 2. Une purification a été réalisée par un kit commercial NucleoSpin Inhibitor Removal (Macherey-Nagel) pour un isolat fortement

pigmenté (pigment noir, inhibiteur de PCR), et des dilutions ont été nécessaires pour les isolats très concentrés.

3. 3. 3. Amplification des gènes d'intérêt par PCR

Chaque isolat a été identifié sur la base de deux gènes d'intérêt: (i) les ITS ont été amplifiés et séquencés pour tous les isolats, et (ii) un marqueur complémentaire a été amplifié et séquencé en fonction des informations taxonomiques issues des observations macro- et microscopiques, soit l'actine, la β -tubuline, la grande sous-unité ribosomale (28S), et la région D1/D2 de la grande sous-unité ribosomale des levures (26S) (**Figure 21**).

3. 3. 3. 1. Amorces utilisées

Les gènes ITS, actine; ITS, LSU; ITS, β -tubuline et ITS, D1/D2 ont été ciblés pour l'amplification par PCR. Pour chaque gène, deux amorces ont été utilisées (**Tableau 2**):

Tableau 2. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes ITS, Actine, LSU, β -tubuline et D1/D2

Gènes (régions)	Amorces	Séquences (5'→3')	Taille des gènes (pb)	Références
ITS	ITS1	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	600	Gardes et Bruns, 1993
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Actine	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	300	Shi <i>et al.</i> , 2017
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT		
LSU (28S)	LR0R	ACCCGCTGACTTAAGC	680	Vilgalys et Hester, 1990 ; Rehner et Samuels, 1994
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG		
β-tubuline	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCT TTC	500	Glass et Donaldson, 1995
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTT GGC		
D1/D2	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAA AAG	500	Kurtzman et Robnett, 1997
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		

3. 3. 3. 2. Préparation de la solution Mix PCR

Pour chaque isolat, un microtube contenant le mélange réactionnel de la PCR a été préparé. Ce mélange est constitué de 24 μ l de la solution Mix PCR additionnée de 1 μ l d'ADN fongique pour les gènes ITS, Actine, β -tubuline et D1/D2. Pour le gène LSU, le mélange réactionnel est composé de 23 μ l de la solution Mix PCR + 2 μ l d'ADN.

La composition de la solution Mix PCR est présentée dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Composition du mélange réactionnel de la PCR

Réactifs	Volume à prélever (μ l)				
	ITS	Actine	ITS/LSU	β -tubuline	D1/D2
Eau ultra pure	15.38	13.75	14.1	15.875	16.6875
Tampon	5	5	5	5	5
MgCl ₂	2	2	1.5	1.5	1.5
Amorce 1	0.5	1.25	1	0.5	0.5
Amorce 2	0.5	1.25	1	0.5	0.5
dNTP	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5
Taq polymérase	0.125	0.25	0.2	0.125	0.0625
ADN génomique	1	1	2	1	1

3. 3. 3. 3. Conditions d'amplification des gènes d'intérêt

Les réactions d'amplification par PCR comprennent plusieurs étapes qui diffèrent dans le temps et la température selon le gène à amplifier. Les conditions d'amplification de chaque gène sont présentées dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Conditions d'amplification des gènes d'intérêt

Étapes	ITS		Actine		ITS / LSU		β -tubuline		D1/D2	
	T(°C)	t	T(°C)	t	T(°C)	t	T(°C)	t	T(°C)	t
Dénaturation initiale	95	5 min	95	8 min	95	5 min	94	5 min	95	2 min
Nombre de Cycles	30		30		35		40		37	
Dénaturation	95	1 min	95	15 s	95	30 s	94	1 min	95	1 min
Hybridation	55	1 min	58	20 s	55-52	30 s	61	1 min	52	1.5 min
Elongation	72	1 min	72	60 s	72	45 s	72	1 min	72	2 min

Elongation finale	72	10 min	72	5 min	72	7 min	72	5 min	72	10 min
Stockage avant révélation	16	∞	16	∞	10	∞	16	∞	16	∞

T: Température (°C); t: temps (min, s)

3. 3. 4. Révélation des produits PCR

La présence des produits de l'amplification a été confirmée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (**Annexe II.2**). Pour chaque échantillon, 5 µl ont été déposés dans un puits sur gel d'agarose placé dans une cuve de migration contenant du TAE (Tris-Acétate, EDTA) à 1x. Des marqueurs de taille de 1 kb et 100 pb ont été utilisés pour estimer la taille des gènes d'intérêt. De plus, un témoin négatif (eau ultra pure) et un témoin positif (ADN fongique) ont été utilisés. Après 30 minutes de migration à 100 V, les fragments ont été visualisés sous lumière UV dans un Quantum ST4 avec le logiciel Quantum-Capt.

3. 3. 5. Séquençage des produits PCR

3. 3. 5. 1. Analyse bioinformatique

Le séquençage des amplicons a été réalisé par la société Eurofins (Allemagne) par approche Sanger. Les séquences obtenues ont été vérifiées et corrigées manuellement à l'aide du logiciel Geneious. Les séquences résultantes ont été analysées en utilisant l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) pour vérifier leur homologie avec les séquences de la banque NCBI (National Center for Biotechnology Information). L'outil BLAST permet d'aligner nos séquences avec celles les plus proches dans la base de données du NCBI et propose un ensemble de séquences ADN ayant un taux d'identité (pourcentage de ressemblance) élevé (**Annexe II.3**).

3. 3. 5. 2. Analyse phylogénétique

Les séquences des gènes ont été assemblées et alignées à l'aide du logiciel MEGA 11. Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (ML) avec une analyse bootstrap de 1000 répétitions et en appliquant le modèle Tamura-Nei.

3. 3. 5. 3. Numéros d'accèsion des séquences nucléotidiques

Les séquences représentatives des isolats ont été soumises à la base de données nucléotidique NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et des numéros d'accèsion ont été attribués pour chaque isolat.

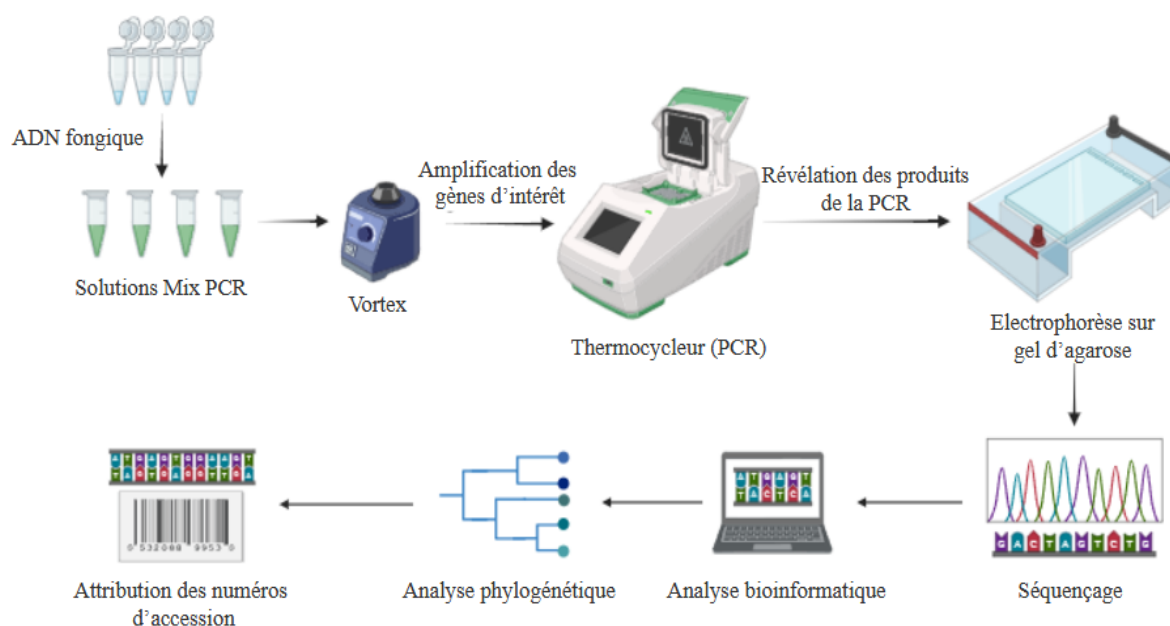


Figure 21. Protocole expérimental de l'amplification et du séquençage des gènes d'intérêt

Remarque: L'isolat identifié au Laboratoire Gene Life Sciences (Sidi Bel Abbes, Algérie) a subi un protocole différent.

- L'extraction de son ADN a été effectuée en utilisant un kit commercial NucleoSpin Plant II de "Macherey-Nagel" (Allemagne);
- Deux gènes ont été ciblés pour l'identification de cet isolat: ITS et LSU. Les amorces utilisées pour chaque gène, la composition de la solution mix PCR ainsi que les conditions d'amplification par PCR sont décrites, respectivement, dans les **tableaux 2, 3 et 4**;
- Les produits de la PCR ont été visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 %, puis colorés avec du GelRed (Biotium, États-Unis). L'imagerie a été effectuée sous lumière UV avec le système GelDoc de Biorad (États-Unis);
- Les produits amplifiés ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up de "Macherey-Nagel" (Allemagne);
- Les échantillons purifiés ont été séquencés via la technique de Sanger en utilisant le kit BigDye v3.1 et les mêmes amorces utilisées pour la PCR;

- Les séquences ont été analysées avec le logiciel CHROMAS PRO, assemblées et alignées avec le logiciel MEGA7. L'approche du maximum de vraisemblance (ML), utilisant 1000 répétitions bootstrap et le modèle Tamura-Nei sur MEGA7, a été utilisée pour construire l'arbre phylogénétique des séquences ITS-LSU combinées dérivées des résultats d'alignement. Les séquences générées ont été soumises à GenBank pour obtenir des numéros d'accèsion (Hurdeal *et al.*, 2021; Sadrati *et al.*, 2023; Saidi *et al.*, 2023).

4. Tests de biodégradation des films de PEBD

Les espèces fongiques isolées ont été testées pour leurs capacités à dégrader des films d'un sac en plastique de type PEBD. Les essais de biodégradation ont été effectués *in vitro* et *ex situ*. Les tests réalisés *in vitro* ont été menés dans un milieu minimum solide et liquide (cultures discontinues et culture continue). Quant aux tests réalisés *ex situ*, ils ont été menés dans des échantillons d'eau de mer, d'eau du robinet et dans un échantillon de sol. Chacun de ces milieux a été additionné d'un film de PEBD. Ces films représentent la seule source de carbone dans les cultures *in vitro* (Khruengsai *et al.*, 2021).

Les Erlenmeyers dépourvus des isolats fongiques ont servi de témoins négatifs.

Chaque expérience a été réalisée avec trois répétitions pour assurer la fiabilité des résultats.

4. 1. Préparation du milieu minimum liquide et solide

Le milieu minimum liquide (MML) a été préparé par l'ajout de 16 g K_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 , 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.475 g $MgSO_4$, 0.2 g NaCl, 0.01 g $CuSO_4$, 1 g $CaCO_3$ et 1 g $ZnSO_4$ à 1000 ml d'eau distillée. Le milieu minimum solide (MMS) a été obtenu en ajoutant 20 g d'agar-agar à 1 l du MML. Ces milieux ont été homogénéisés pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Ensuite, ils ont été répartis dans des flacons de 250 ml et stérilisés pendant 20 minutes dans un autoclave à 120°C (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

4. 2. Sélection des isolats pour les tests de biodégradation

Les premiers essais de biodégradation ont été réalisés sur des granulés de PEBD translucides à blancs de type "TASNEE LD 1925AS", fournis par la société algérienne de fabrication du plastique "Serrar Plast " (Figure 22). Il s'agit d'un thermoplastique obtenu par polymérisation de l'éthylène à l'aide d'un procédé à haute pression, présentant une densité de 0.925 g/cm³ et une température de fusion suggérée entre 160-190°C (Tableau 5). Les propriétés de ce polymère en font un matériau idéal pour la production de sacs en plastique utilisés comme modèle d'étude.

Les tests de biodégradation ont été réalisés *in vitro* en ajoutant des disques d'isolats fongiques (disques d'agar fongique obtenus à partir des isolats cultivés sur milieu PDA ou Sabouraud. Ces isolats ont été prélevés à l'aide de la partie supérieure d'un embout stérile d'une micropipette de 1000 μ l) dans des Erlenmeyers stériles contenant chacun 150 ml du milieu minimum liquide et des granulés de PEBD de 0.13 g. Ces Erlenmeyers ont été incubés dans un incubateur agitateur (Edmund Bühler GmbH, TH15) à 27°C et à 150 tours/min pendant un mois. Les polymères ont été collectés chaque dix jours de manière aseptique et pesés à l'aide d'une balance analytique (Radwag ®).



Figure 22. Granulés de PEBD de type TASNEE LD 1925AS

Tableau 5. Propriétés typiques des granulés de PEBD de type TASNEE LD 1925AS

Propriétés		Valeurs
Physiques	Densité	0.925 g/cm ³
	Indice de fluidité	1.9 g/10min à 190°C / 2.16 kg
Thermiques	Température de fusion	111°C
	Module de traction	260 MPa
Mécaniques	Allongement à la rupture	250 %
	Contrainte à la limite d'élasticité	11 MPa

Les propriétés mécaniques sont mesurées sur un film soufflé de 50 μ m d'épaisseur, extrudé à une température de fusion de 180°C et un rapport de soufflage de 2:1.

4. 3. Préparation du polymère à tester

Dans cette étude, des sacs en plastique ordinaires de couleur blanche, fabriqués en PEBD de marque SABIC® LDPE, ont été utilisés comme modèle expérimental (**Figure 23, Tableau 6**). Ce polymère thermoplastique, dépourvu d'additifs, présente une densité de 0.922 g/cm³. Pour les tests de biodégradation, les sacs ont été découpés en petits morceaux de 0.2 g, désinfectés avec une solution d'éthanol à 70 % pendant 30 minutes, puis transférés dans de l'eau distillée stérile pendant 20 minutes afin d'éliminer toute contamination potentielle (Alshehrei, 2017).



Figure 23. Films de PEBD utilisés comme modèle d'étude

Tableau 6. Propriétés typiques des films de PEBD utilisés comme modèle d'étude

Propriétés	Valeurs	
Physiques	Densité	0.922 g/cm ³
	Indice de fluidité	0.33 g/10min à 190°C / 2.16 kg
Thermiques	Température de fusion	190°C
Mécaniques	Module sécant	190 MPa
	Allongement à la rupture	450 %
	Contrainte à la limite d'élasticité	11 MPa

Les propriétés du polymère sont mesurées sur un film soufflé de 50 µm d'épaisseur.

4. 4. Tests de biodégradation des films de PEBD *in vitro*

Les espèces fongiques sélectionnées ont été évaluées pour leurs capacités à dégrader des films de PEBD dans un MML (cultures discontinues et culture continue) et un MMS contenant un film de PEBD comme seule source de carbone (Khruengsai *et al.*, 2021).

4. 4. 1. Sur milieu minimum solide

Un film de PEBD a été ajouté dans une boîte de Petri contenant le MMS. Ces boîtes ont ensuite été inoculées avec les espèces fongiques sélectionnées et incubées pendant 30 jours à $27\pm 2^\circ\text{C}$ (Bourzama *et al.*, 2021). Les boîtes de Petri contenant le MMS sans les films de PEBD ont servi de témoins négatifs. La croissance des espèces dans les boîtes contenant les films de PEBD indique l'utilisation de ces polymères comme source de carbone par les isolats fongiques.

4. 4. 2. Sur milieu minimum liquide

4. 4. 2. 1. Optimisation de la biodégradation en culture discontinue (culture en batch)

Les tests de biodégradation *in vitro* consistent à ajouter des disques d'isolats fongiques dans des Erlenmeyers stériles contenant chacun 150 ml du MML et un film de PEBD. Ces Erlenmeyers ont été incubés dans un incubateur agitateur (Edmund Bühler GmbH, TH15) à 27°C et à 150 tours/min pendant un mois. Les films ont été collectés de manière aseptique à intervalles réguliers (tous les dix jours pendant un mois) et pesés à l'aide d'une balance analytique (Radwag ®) (**Figure 24**).

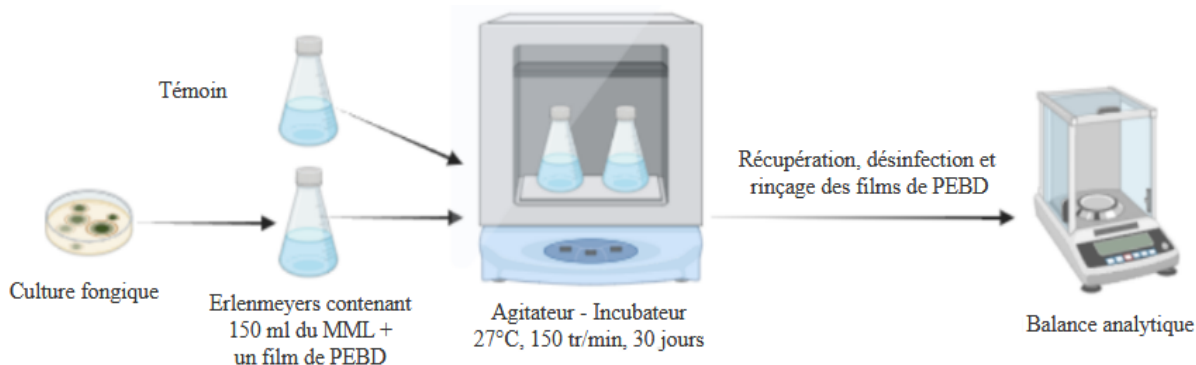


Figure 24. Protocole expérimental de la biodégradation *in vitro* des films de PEBD sur MML

Plusieurs facteurs peuvent influencer la dégradation des films de PEBD, notamment la température, le pH, l'agitation du milieu, la présence d'une source de carbone autre que le PEBD, le poids des films et la biomasse fongique.

4. 4. 2. 1. 1. Influence de l'agitation

Le premier facteur à tester étant l'agitation du milieu. En effet, l'agitation permet l'oxygénation du milieu et donc un apport d'oxygène nécessaire au bon fonctionnement des espèces

fongiques. Les Erlenmeyers ont été incubés pendant un mois dans deux conditions: la première dans un agitateur incubateur à 150 tours/min, et la deuxième sans agitation.

4. 4. 2. 1. 2. Influence du poids des films

Ce test consiste à peser les films de PEBD par une balance analytique de 0.0001g de précision. Pour cela des films de 0.2, 0.4 et 0.6g ont été incubés avec chaque isolat fongique afin de déterminer le poids optimal de la biodégradation.

4. 4. 2. 1. 3. Influence du pH initial

Ces expériences ont été réalisées afin de déterminer le pH optimal pour la dégradation fongique du polymère. Pour cela, les champignons ont été incubés pendant un mois dans un MML ajusté à des intervalles de pH réguliers de 2, 4, 6 jusqu'à pH=12, après avoir confirmé la croissance de chaque isolat dans les valeurs de pH données. Ces valeurs ont été ajustées en utilisant des solutions de 0.1N de NaOH (solution basique) et 0.1N de HCL (solution acide) à l'aide d'un pH mètre Ohaus Starter 2C (**Figure 25**).



Figure 25. Ajustement du pH du MML par un pH mètre Ohaus Starter2C

4. 4. 2. 1. 4. Influence de la température

Ces expérimentations ont été réalisées pour déterminer la température de dégradation optimale de chaque isolat. Les échantillons de PEBD ont été incubés pendant un mois dans le MML avec les espèces sélectionnées à 5°C, 15°C, 25°C et 35±2°C après avoir confirmé la croissance de chaque isolat à chacune des températures décrites.

4. 4. 2. 1. 5. Influence de la biomasse fongique

Pour déterminer l'influence de la biomasse fongique sur le processus de biodégradation, 1, 3 et 5 disques de chaque espèce fongique ont été incubés dans des Erlenmeyers contenant les films de PEBD. La biomasse fongique contenue dans chaque disque a été déterminée par dénombrement sur cellule de Malassez (**Annexe III**).

4. 4. 2. 1. 6. Influence de la composition du milieu

Le carbone est un élément essentiel à la croissance fongique. Ce test consiste à ajouter une source de carbone autre que les films de PEBD dans le milieu pour comparer la dégradation engendrée par les espèces fongiques dans les deux conditions. Pour cela, le MML a été remplacé par le bouillon Czapek Dox. Ce bouillon a été préparé en ajoutant 30 g de sucrose, 3 g de NaNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl, 0.01 g de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ et 1 g de K_2HPO_4 à 1000 ml d'eau distillée (El-Wakil *et al.*, 2020).

4. 4. 2. 1. 7. Influence des caractéristiques du polymère

Les isolats sélectionnés ont été testés pour leurs capacités à dégrader le même type de polymère (PEBD) présentant des caractéristiques différentes. Il s'agit d'un sac en plastique (Dow™ LDPE 310E) présentant une densité de 0.923 g/cm^3 et une température de fusion suggérée entre $160\text{-}195^\circ\text{C}$. Les propriétés de ce polymère (PEBD2) sont présentées dans le **tableau 7**. Ces propriétés diffèrent d'un polymère à un autre et peuvent influencer le processus de biodégradation.

Tableau 7. Propriétés typiques des films de PEBD2

Propriétés		Valeurs
Physiques	Densité	0.923 g/cm^3
	Indice de fluidité	0.75 g/10min à 190°C / 2.16 kg
Thermiques	Température de fusion	$160\text{-}195^\circ\text{C}$
Mécaniques	Module sécant	175 MPa
	Allongement à la rupture	390 %
	Contrainte à la limite d'élasticité	11 MPa

Les propriétés mécaniques sont mesurées sur un film soufflé de $50 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

4. 4. 2. 2. Culture continue

Le test de biodégradation en culture continue a été réalisé selon [Ouartsu *et al.*, \(2019\)](#), avec quelques modifications, pour une seule espèce représentant le potentiel de dégradation le plus élevé en culture discontinue. Ce test a été réalisé dans un bioréacteur à lit fluidisé, comme illustré dans la **Figure 26**. L'expérimentation s'est déroulée dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Elle consiste en l'utilisation d'un filtre construit à partir d'une colonne de verre de 45 cm de hauteur (diamètre intérieur de 8.5 cm, surface intérieure de 56.75 cm²), rempli de 1000 ml de MML comme milieu de culture, de 33 disques par litre (5 mm de diamètre) de l'isolat fongique testé (culture jeune de 7 jours), et de six films de PEBD (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) d'un poids connu (0.2 g chacun). La recirculation de cette phase aqueuse a été contrôlée par une pompe péristaltique (MasterFlex; Cole-Parmer). L'air comprimé a été distribué à l'aide d'un compresseur et contrôlé par un débitmètre (Aalborg) à un débit de 20 litres/min. La température du réacteur a été maintenue à 25°C. La culture a été incubée pendant 90 jours, et les films de PEBD ont été collectés et pesés de manière aseptique après 10, 20, 30, 60 et 90 jours.

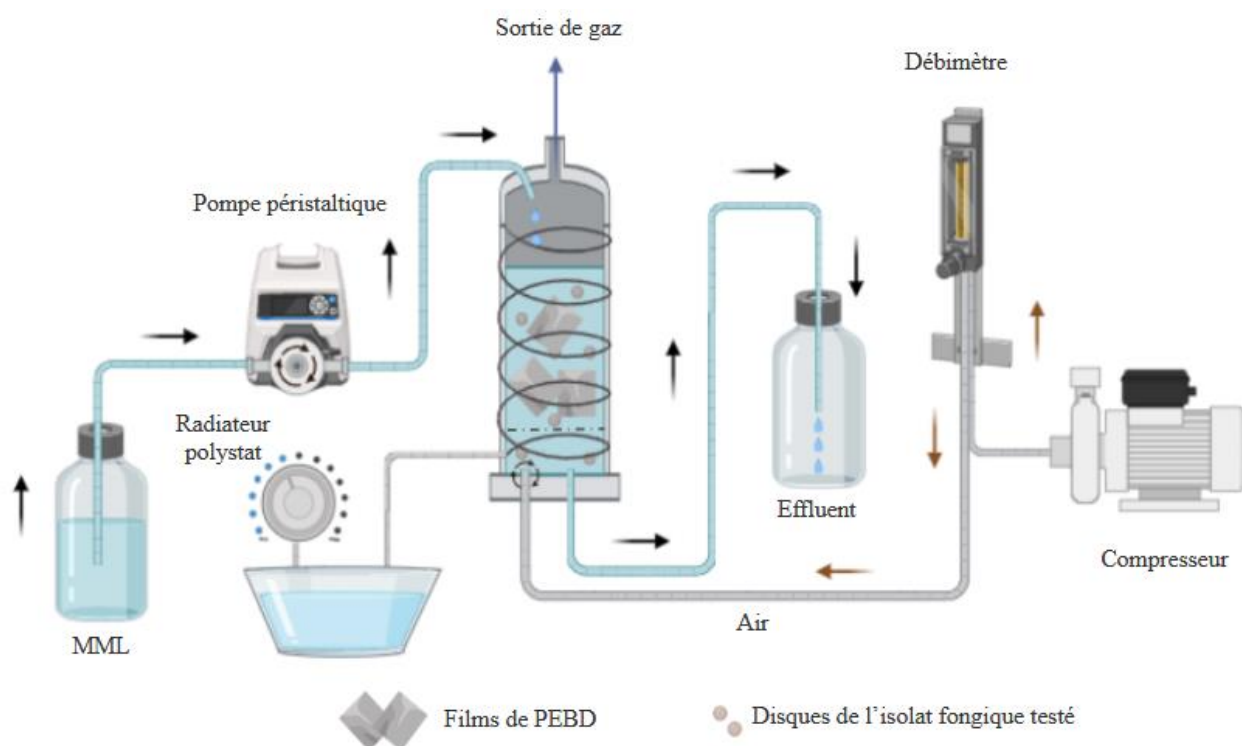
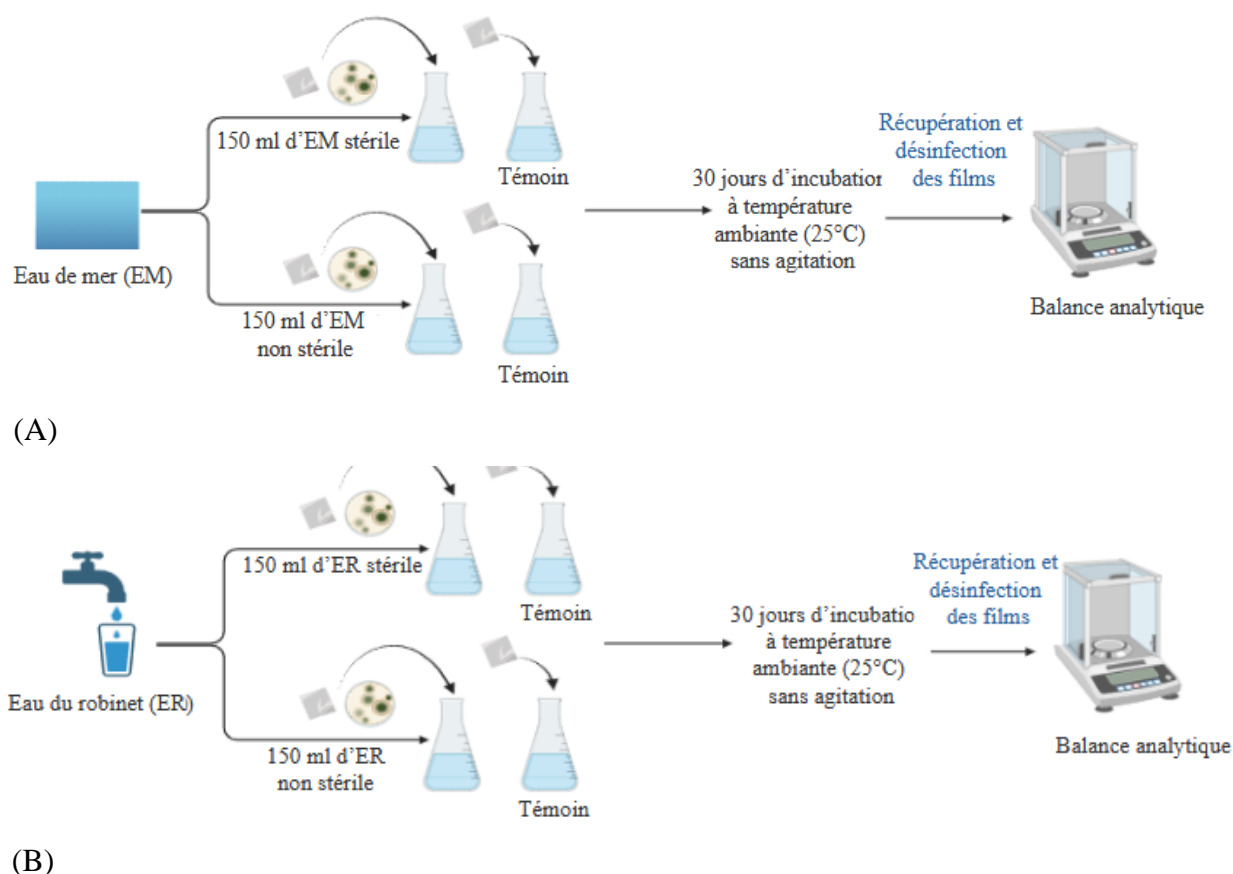


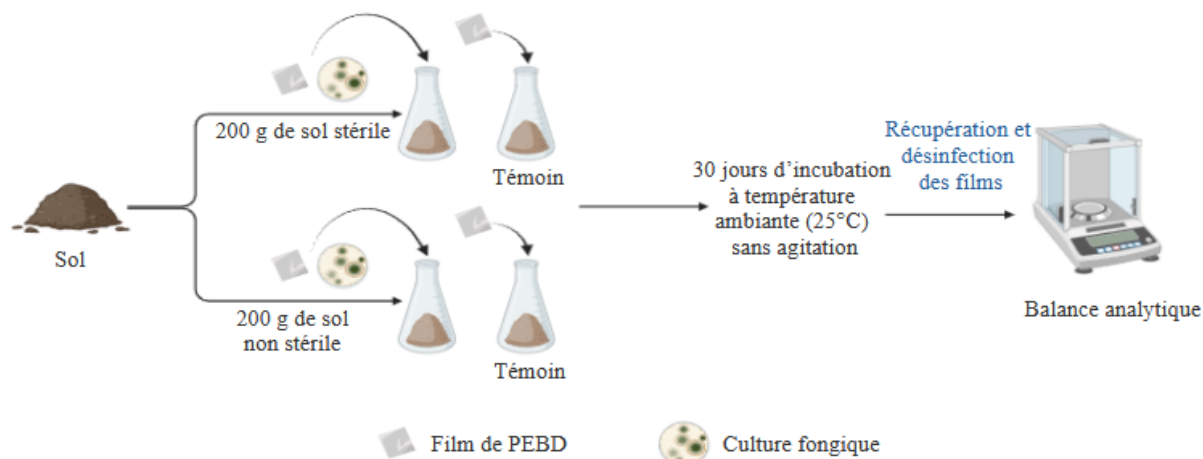
Figure 26. Dispositif de la culture continue

4. 5. Tests de biodégradation *ex situ*

Les espèces fongiques ont été testées pour leurs capacités à dégrader des films de PEBD de 0.2 g dans différents milieux naturels (eau de mer, eau du robinet et un échantillon de sol) (**Figure 27**). Pour chaque Erlenmeyer contenant 150 ml d'eau de mer (stérile et non stérile), 150 ml d'eau du robinet (stérile et non stérile) et 200 g de sol (stérile et non stérile), un film de PEBD et un disque de l'espèce fongique à tester ont été ajoutés. Les films, incubés à température ambiante sans agitation, ont été récupérés de manière aseptique et pesés tous les 10 jours pendant un mois.

Les Erlenmeyers contenant les films de PEBD avec 150 ml d'eau de mer (stérile et non stérile), 150 ml d'eau du robinet (stérile et non stérile) et 200 g de sol (stérile et non stérile), sans ajout des isolats fongiques, ont servi de témoins négatifs.





(C)

Figure 27. Protocole expérimental de la biodégradation *ex situ*: (A) dans l'eau de mer, (B) dans l'eau du robinet et (C) dans un échantillon de sol

4. 6. Suivi de la biodégradation des films de PEBD après trois mois d'incubation

Les films de PEBD, incubés avec les isolats sélectionnés *in vitro* et *ex situ* pendant 30 jours, ont été ré-incubés pendant deux mois supplémentaires afin d'évaluer l'influence de la période d'incubation sur la biodégradation dans les cultures discontinues.

5. Evaluation de la biodégradation des films de PEBD

Après la période d'incubation, les films de PEBD ont été retirés de leurs milieux respectifs, désinfectés avec de l'éthanol à 70 % pendant 30 minutes, puis nettoyés doucement pour éliminer tout biofilm fongique formé à leur surface. Ensuite, les films ont été rincés à l'eau distillée stérile et séchés à l'air libre à température ambiante avant chaque analyse.

5. 1. Pourcentage de perte de poids

Le poids de chaque film récupéré a été déterminé à l'aide d'une balance analytique Radwag® (AS 60/220/C/2). La perte de poids d'un film de PEBD (W) a été définie sur la base de son poids initial (W_0), avant la dégradation, et son poids final (W_1), après sa dégradation, et a été calculée selon la formule suivante (Dsouza *et al.*, 2021):

$$W (\%) = [(W_0 - W_1) / W_0] \times 100$$

Les valeurs obtenues ont été comparées aux témoins.

Toutefois, seuls les films de PEBD présentant un pourcentage de perte de poids important ($\geq 1\%$) ont été analysés par microscopie électronique à balayage (MEB), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) et par diffractométrie des rayons X (DRX).

5. 2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les films de PEBD présentant des pourcentages de perte de poids importants ont été analysés par microscope électronique à balayage (Quanta 250) (**Figure 28**) à l'École Nationale Supérieure des Mines et de la Métallurgie d'Annaba (ENSMM, Algérie) pour détecter tout changement à la surface des polymères. Les films de PEBD ont été fixés avec un support scotch-charbon et placés dans une chambre ionisée avec pulvérisation d'eau. Ces films ont été capturés à un grossissement de 1000x, 1500x et 2000x (Dsouza *et al.*, 2021).

Deux films de PEBD, celui incubé en culture continue présentant le meilleur pourcentage de perte de poids ainsi que le film incubé en culture discontinue avec la même espèce fongique, ont été analysés par spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS) pour analyser leur composition élémentaire.



Figure 28. Microscopie électronique à balayage Quanta 250

5. 3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les structures chimiques et les groupes fonctionnels des films sélectionnés ont été déterminés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) à l'École Nationale Polytechnique de Constantine -Malek Bennabi (Algérie), à l'aide du spectromètre FTIR INVENIO-R (329) (Bruker, Allemagne) (**Figure 29**), avec 30 scans à une résolution de 4 cm^{-1} pour chaque échantillon. Les films de PEBD ont été testés pour une gamme

de nombres d'onde allant de 200 à 5000 cm^{-1} . Les différents pics dans les graphes obtenus correspondent aux groupes fonctionnels de chaque échantillon. L'analyse FTIR a été réalisée pour l'échantillon témoin et les échantillons dégradés (Dsouza *et al.*, 2021).

De plus, la valeur de l'indice carbonyle a été calculée sous la forme -IC- pour le film cultivé en culture continue présentant le meilleur pourcentage de perte de poids, ainsi que pour les films cultivés en cultures discontinues *in vitro* et *ex situ* avec les espèces fongiques identifiées. L'IC est défini comme le rapport entre l'absorbance de la bande intégrée du pic carbonyle (C=O) de 1 850 à 1 650 cm^{-1} et celle du pic de méthylène (CH_2) de 1 500 à 1 420 cm^{-1} . Les valeurs d'IC ont été calculées à l'aide de l'équation suivante (Almond *et al.*, 2020):

$$\text{IC} = \frac{\text{Zone sous la bande } 1850-1650 \text{ cm}^{-1}}{\text{Zone sous la bande } 1500-1420 \text{ cm}^{-1}}$$

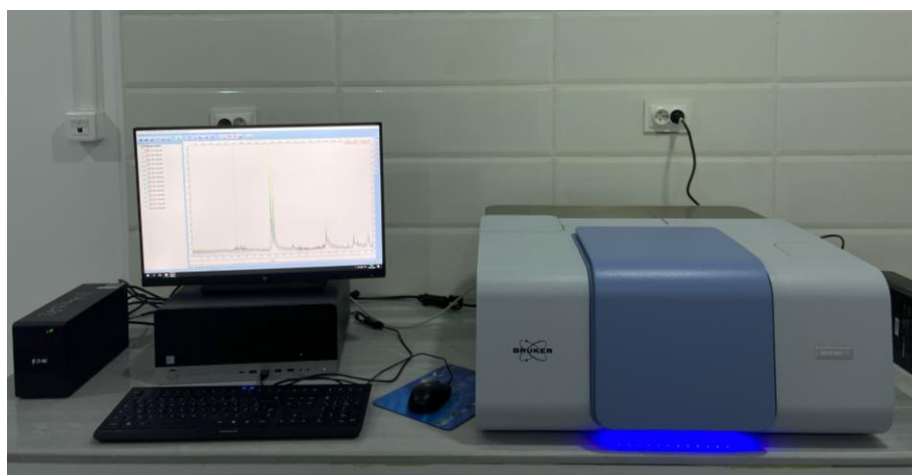


Figure 29. Spectromètre INVENIO-R (329) -Bruker-

5. 4. Diffractométrie (Cristallographie) des rayons X (DRX)

Les films de PEBD présentant des taux de dégradation importants ont été soumis à une analyse DRX. La diffractométrie des rayons X a été utilisée pour déterminer la cristallinité des films de PEBD avant et après la dégradation. Les échantillons ont été examinés à l'aide d'un diffractomètre à rayons X de type D8 ADVANCE (Bruker, Allemagne) (**Figure 30**) à l'École Nationale des Sciences et Technologies Avancées de Borj Cedria (Tunisie). Chaque film a été désinfecté et positionné sur un support en verre, puis placé sur un porte-échantillon dans la chambre DRX où il a été soumis à des rayons X. Le rayonnement X est produit par une anticathode de cuivre dont la longueur d'onde est $\lambda_{\text{K}\alpha} (\text{Cu}) = 1.5418 \text{ \AA}$. L'échantillon est

analysé à un angle 2θ dont la valeur varie de 5° à 80° (El-Sayed *et al.*, 2021). Le pourcentage de cristallinité a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage de cristallinité} = \frac{T_c}{T_c + T_a} \times 100 \text{ (Kyaw } et al., 2012):$$

Ta: Zone intégrée de tous les pics (amorphes et cristallins)

Tc: Zone intégrée des pics cristallins.

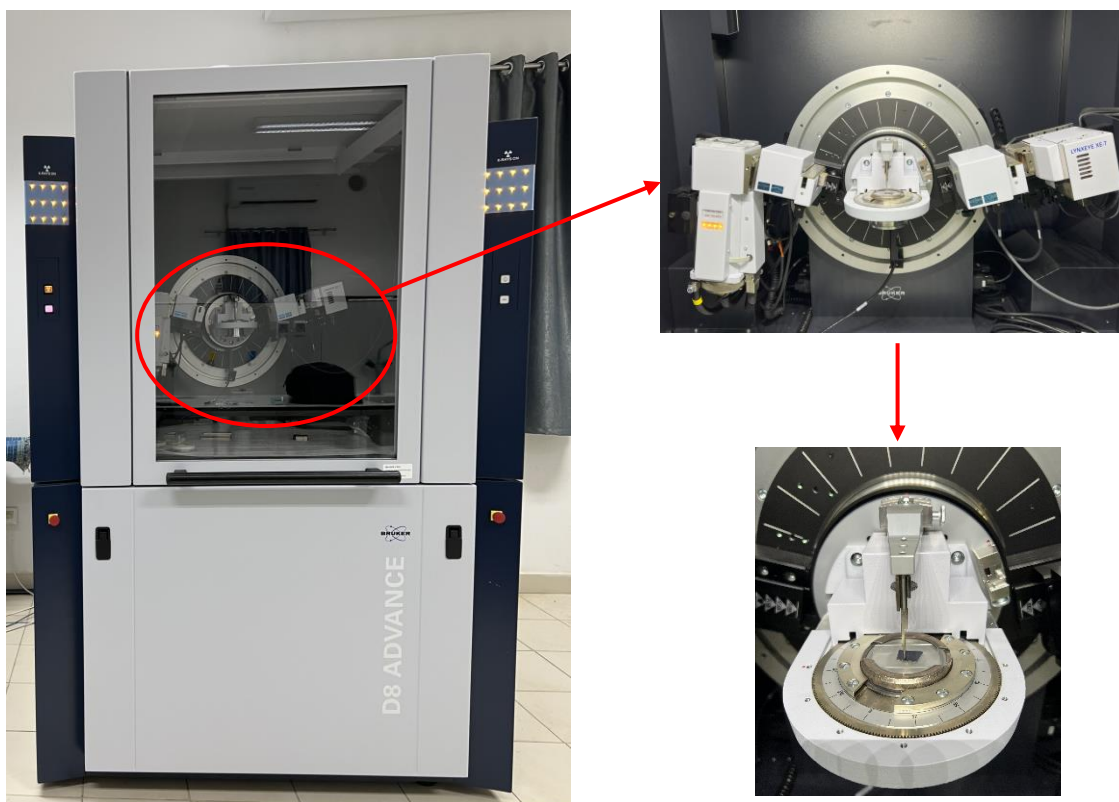


Figure 30. Diffractomètre à rayons X D8 ADVANCE -Bruker-

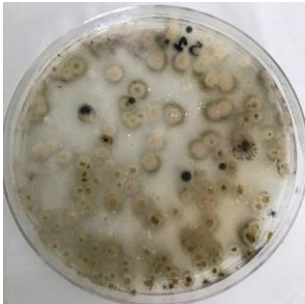





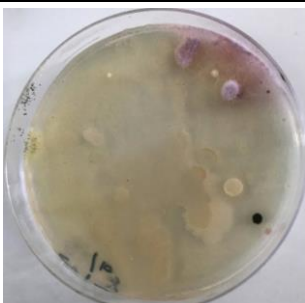
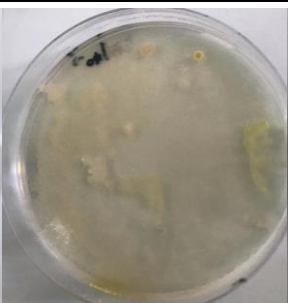

RESULTATS


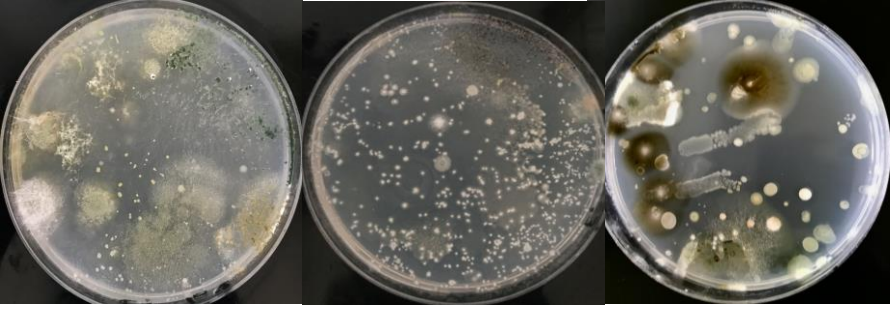


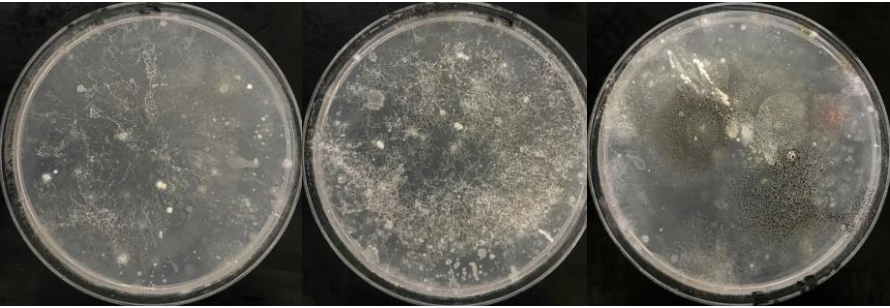
1. Obtention d'isolats fongiques à partir du sol d'une décharge publique

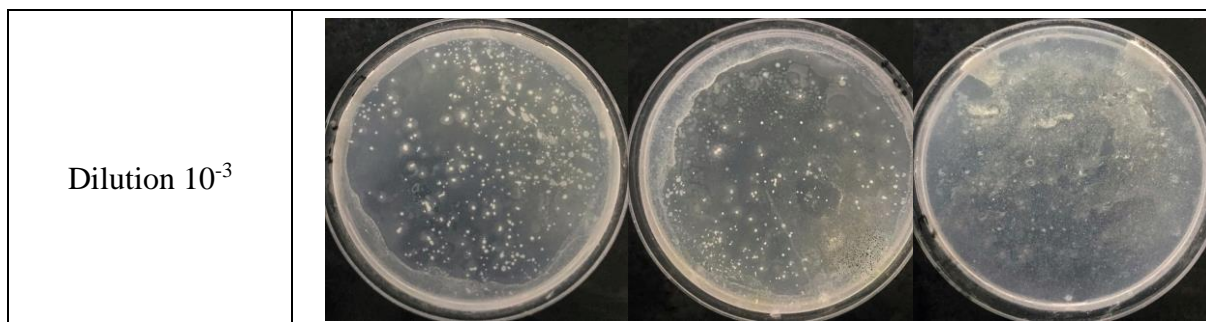
L'isolement des espèces fongiques a été effectué à partir de trois échantillons de sol prélevés de trois sites différents, tous pollués par des déchets plastiques, notamment des sacs en plastique, dans la décharge publique de Boumehadger (Collo, Algérie).

Après sept jours d'incubation à 27 °C, une multitude d'espèces ont crû à la surface des boîtes de Petri contenant le milieu PDA, après dilution des échantillons à 10^{-1} et 10^{-2} . Cependant, une légère croissance de quelques espèces a été observée à la dilution 10^{-3} (**Tableau 8**). L'apparition et la croissance des champignons (neuf isolats) ont été repérées par leurs aspects macroscopiques caractéristiques. Les isolats ont ensuite été purifiés afin d'obtenir des cultures pures.

Tableau 8. Lecture des boîtes après isolement sur gélose PDA et incubation à 27°C pendant sept jours

Dilution	Observation		
	Site 1		
Dilution 10^{-1}			
Dilution 10^{-2}			
Dilution 10^{-3}			

Site 2	
Dilution 10^{-1}	
Dilution 10^{-2}	
Dilution 10^{-3}	
Site 3	
Dilution 10^{-1}	
Dilution 10^{-2}	



D'après les résultats obtenus, le nombre réduit de champignons dans le sol de la décharge de Boumehadjer peut s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment les conditions extrêmes et la présence de divers polluants et contaminants. En effet, cette décharge contient une variété de déchets, y compris des cadavres de bêtes, des déchets ménagers, des céramiques, des métaux, du verre et des tonnes de plastique. Certains de ces matériaux sont potentiellement toxiques pour les champignons, ce qui peut entraîner une diminution de leur abondance. De plus, certaines conditions extrêmes peuvent limiter la survie et la croissance de ces micro-organismes, telles que les températures élevées, une forte acidité ou alcalinité, et une teneur élevée en toxines. Cependant, la présence des champignons dans ces environnements leur permet de participer à plusieurs processus, notamment en tant qu'agents de dépollution.

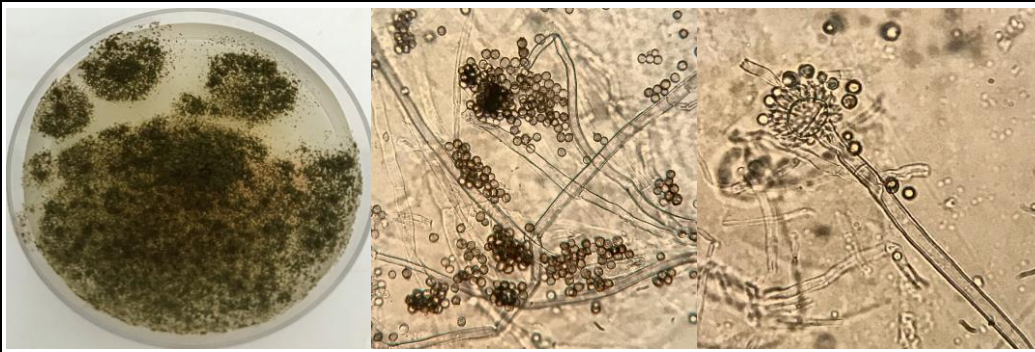
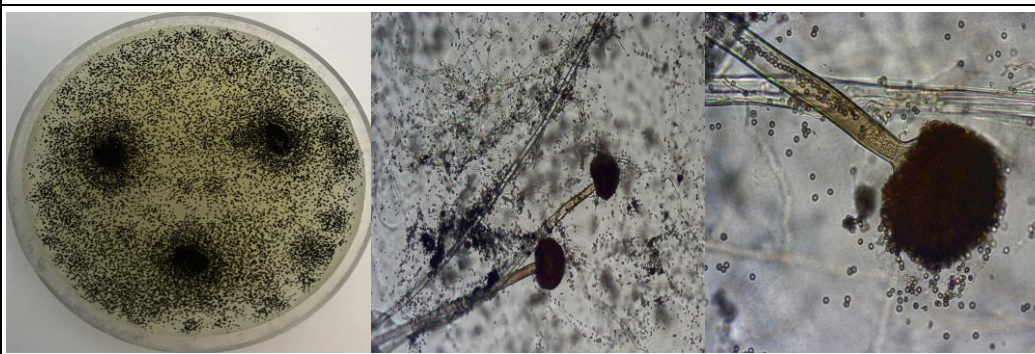
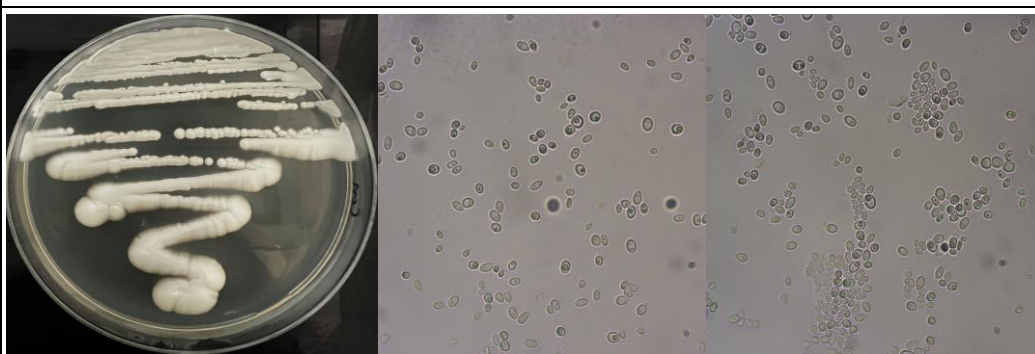

2. Identification des isolats fongiques

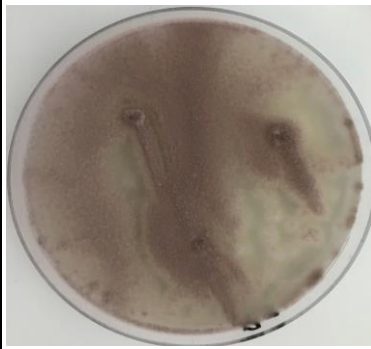
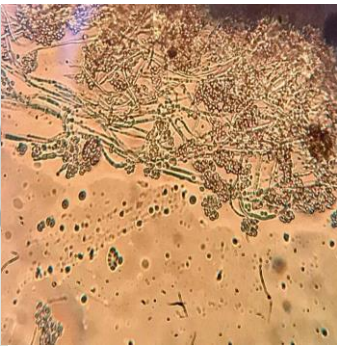
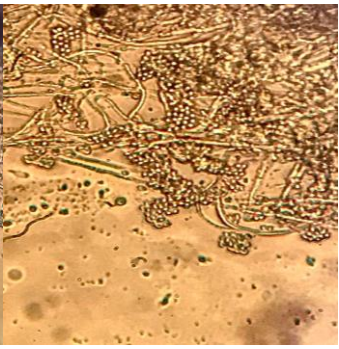
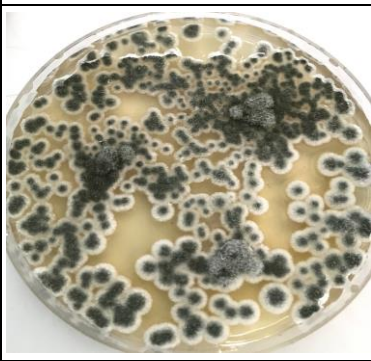
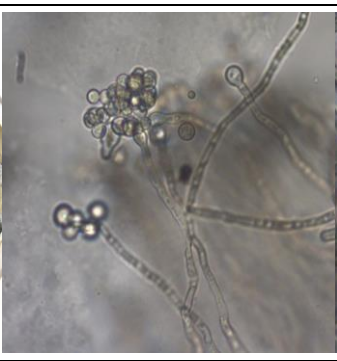
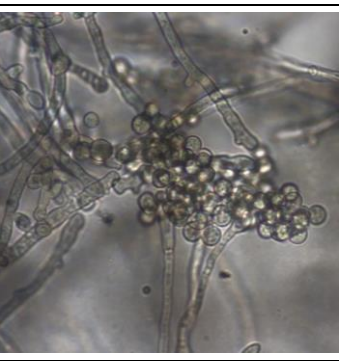




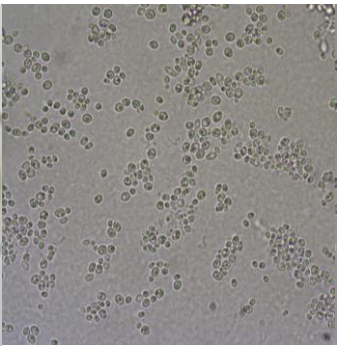

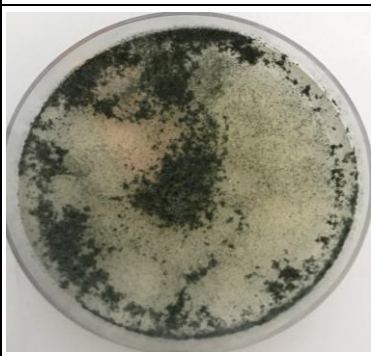


Neuf isolats fongiques, comprenant sept moisissures et deux levures, ont été obtenus à partir des trois échantillons de sol de la décharge de Boumehadjer. Ces micro-organismes ont été purifiés et identifiés en fonction de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Les isolats sélectionnés pour les tests de biodégradation ont été identifiés par une approche moléculaire.

2. 1. Identification macroscopique et microscopique

Les caractéristiques macroscopiques (observées sur gélose PDA et sabouraud) et microscopiques (visualisées sous microscope optique aux grossissements 100x et/ou 400x) des isolats purifiés ont été examinées après une période d'incubation de sept jours et sont présentées dans le **tableau 9**.

Tableau 9. Observations macroscopiques (sur PDA et sabouraud) et microscopiques (100x, 400x) des isolats fongiques purifiés après sept jours d'incubation à 27°C

Isolats	Observations macroscopiques et microscopiques		
<p>Isolat A1 PDA (400x)</p>			
<p>Isolat A2 PDA (100x, 400x)</p>			
<p>Isolat C1 Sabouraud (400x)</p>			
<p>Isolat C2 PDA (400x)</p>			

<p>Isolat F1 PDA (400x)</p>			
<p>Isolat P1 PDA (400x)</p>			
<p>Isolat R1 PDA (100x, 400x)</p>			
<p>Isolat R2 Sabouraud (400x)</p>			
<p>Isolat T1 PDA (400x)</p>			

Les observations macroscopiques et microscopiques des isolats obtenus ont révélé les caractéristiques suivantes (**Tableau 10**):

Tableau 10. Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques purifiés

Aspects Macroscopiques et Microscopiques des isolats fongiques	
Isolat A1	
Macroscopique	Colonies poudreuses, duveteuses et granuleuses, de couleur jaunâtre au départ, puis elles virent vers des tons vert-jaune et, avec le temps, elles deviennent plus foncées.
Microscopique	Des conidiophores incolores, très longs, à paroi épaisse et d'aspect rugueux, avec une vésicule globuleuse autour de laquelle sont insérées les phialides. Les phialides sont monosériées, avec une seule rangée de conidies. Les conidies sont de forme globuleuse et lisse, formant des chaînes relativement longues.
<i>Aspergillus flavus</i>	
Isolat A2	
Macroscopique	Colonies à croissance rapide ayant un aspect de velours ou de feutre, de couleur blanche, cotonneuses au départ, puis elles deviennent poudreuses avec l'apparition de spores noires.
Microscopique	Un conidiophore lisse et très long, portant une vésicule globuleuse de couleur marron, autour de laquelle sont insérées les phialides. Présence également des conidies globuleuses et échinulées. L'ensemble forme la tête aspergillaire.
<i>Aspergillus sp.</i>	
Isolat C1	
Macroscopique	Colonies blanches, crémeuses, lisses, rondes et bombées.
Microscopique	Colonies de forme arrondie ou ovale, éventuellement bourgeonnantes.
<i>Candida sp.</i>	
Isolat C2	
Macroscopique	Colonies à croissance lente ayant un aspect velouté de couleur vert olive à noir
Microscopique	Des filaments mycéliens cloisonnés, une conidiogenèse de type blastique acropète et de petites conidies ovales.
<i>Cladosporium sp.</i>	

Isolat F1	
Macroscopiques	Colonies d'un aspect duveteux ou laineux, de couleur blanche au départ, puis elles deviennent rose pâle.
Microscopiques	Des filaments mycéliens fins et septés avec des blastospores abondantes groupées en chaînettes ou en amas. Présence également de microconidies unicellulaires et isolées.
<i>Fusarium sp.</i>	
Isolat P1	
Macroscopique	Colonies de couleur verte avec une marge blanche, à croissance moyenne et un aspect velouté
Microscopique	un mycélium cloisonné avec des conidiophores isolés et ramifiés. Ces conidiophores sont composés de branches qui mènent aux metula, qui à leur tour conduisent aux phialides libérant des conidies.
<i>Penicillium sp.</i>	
Isolat R1	
Macroscopique	Thalle de couleur blanche avec un centre marron à noir, présentant un aspect duveteux, et un mycélium lâche et étendu envahissant toute la boîte.
Microscopique	Des sporocystes marron à noir sont présents à la surface du mycélium. Le sporocyste est globulaire et coiffé d'une columelle distincte, il libère des conidies qui peuvent donner naissance à un autre mycélium.
<i>Rhizopus sp.</i>	
Isolat R2	
Macroscopique	Colonies crémeuses et pigmentées en rose, avec une surface lisse ou finement plissée.
Microscopique	Cellules de forme ovoïde, assez allongées, avec des bourgeonnements
<i>Rhodotorula sp.</i>	
Isolat T1	
Macroscopique	Colonies envahissantes à croissance rapide ayant l'aspect d'un enduit verdâtre pulvérulent.
Microscopique	Hyphes septés et conidiophores ramifiés sur lesquels sont insérées les phialides. Ces dernières ont la forme d'une bouteille renflée à la base et sont isolées ou groupées
<i>Trichoderma sp.</i>	

2. 2. Identification moléculaire

Les isolats fongiques ont été identifiés sur la base de deux gènes d'intérêt en fonction des informations taxonomiques issues des observations macro et microscopiques (**Tableau 11**).

Tableau 11. Gènes d'intérêt pour chaque isolat fongique

Isolats	Gènes d'intérêt
A2	Espaceur transcrit interne (ITS), Actine
C1	Espaceur transcrit interne (ITS), région D1/D2
P1	Espaceur transcrit interne (ITS), β -tubuline
R1	Espaceur transcrit interne (ITS), Grande sous unité (LSU)
R2	Espaceur transcrit interne (ITS), région D1/D2

L'isolat fongique A2 a été identifié au niveau de l'espèce grâce à l'analyse des fragments partiels de l'espaceur transcrit interne (ITS) et de l'actine. Ces séquences nucléotidiques ont été utilisées comme requête et ont été comparées avec des séquences connues dans le National Center for Biotechnology Information (NCBI) à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search tool).

La recherche d'homologie de séquences ITS a révélé que l'isolat A2 présente une homologie complète (100 %) avec *Aspergillus niger* A228 (KT898794). Le « Query coverage » est de 100 % avec un « E-value » zéro. Les séquences de la région ITS (517 pb) et Actine (301 pb) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accèsion PP854571 et PP893245, respectivement. Le test bootstrap de phylogénie, basé sur le modèle Tamura-Nei, a été réalisé à l'aide d'une analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences ITS des espèces *Aspergillus*.

Comme l'illustre la **Figure 31**, l'arbre phylogénétique des régions ITS, généré par des analyses de maximum de vraisemblance, valide la classification de SLNEA02 au sein du clade *Aspergillus niger*. Cette constatation a été étayée par une valeur significative de maximum de vraisemblance (ML) de 74 %.

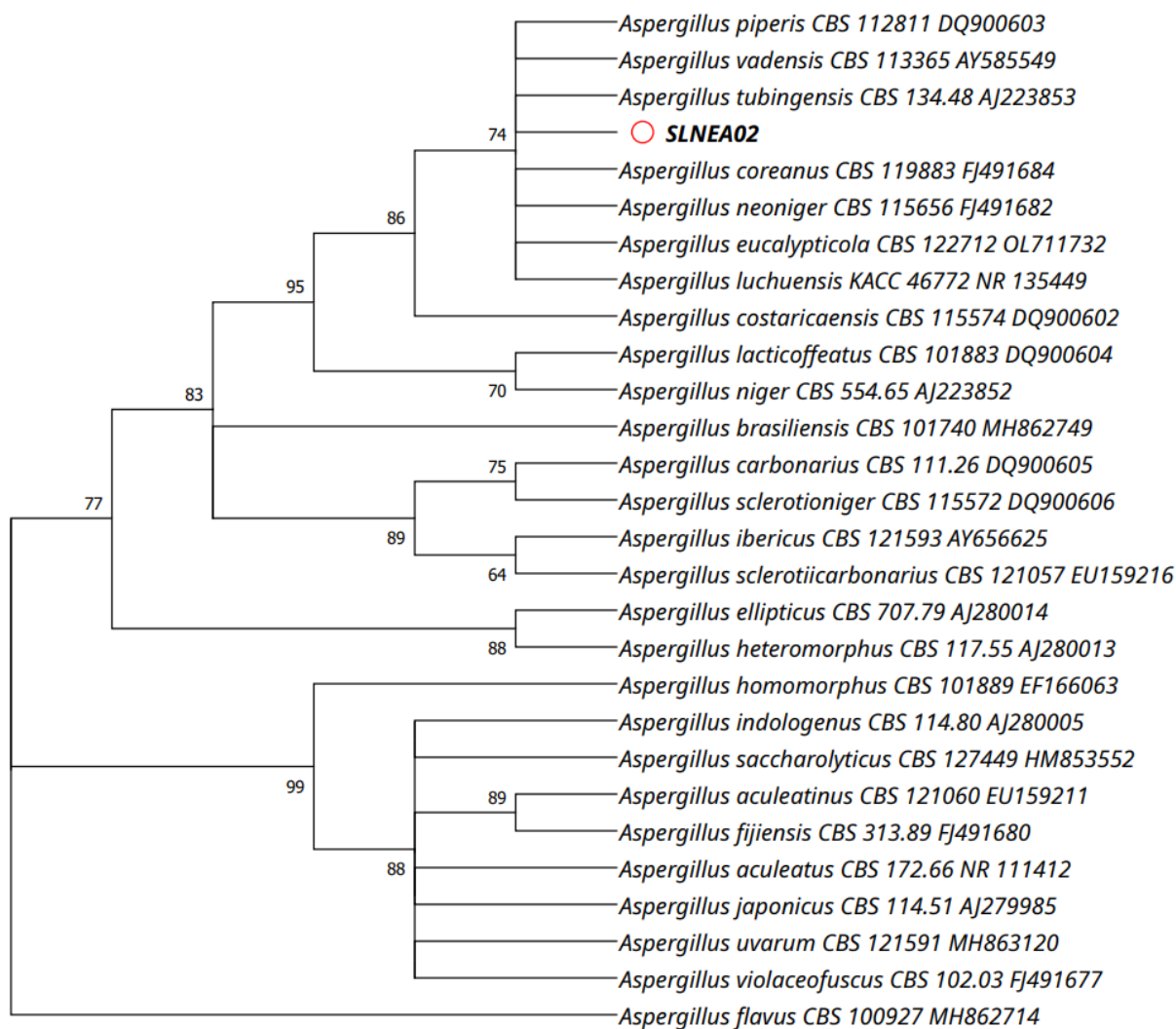


Figure 31. Arbre phylogénétique généré par l’analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences ITS des espèces du genre *Aspergillus*. L’arbre a été enraciné à l’aide de *Aspergillus flavus* CBS 100927. Les valeurs bootstrap ML supérieures à 50 % sont affichées près des nœuds. L’isolat SLNEA02 est indiqué en gras.

L'isolat fongique C1 a été identifié au niveau de l'espèce grâce à l'analyse des fragments partiels d'espaceur transcrit interne (ITS) et de la région D1/D2 de l'ARN 26S. Ces séquences nucléotidiques ont été utilisées comme requête et ont été comparées avec des séquences connues dans le National Center for Biotechnology Information (NCBI) à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search tool).

La recherche d'homologie de séquences des régions D1/D2 a révélé que l'isolat C1 présente une homologie très élevée (99.63 %) avec *Candida tropicalis* NRRL Y-12968 (U45749). Le « Query coverage » est de 96 % avec un « E-value » zéro. Les séquences de la région ITS (468 pb) et D1/D2 (484 pb) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accèsion PP854593 et PP882831, respectivement. Le test bootstrap de phylogénie, basé sur le modèle Tamura-Nei, a été réalisé à l'aide d'une analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences D1/D2 des espèces *Candida* et *Rhodotorula*.

Comme l'illustre la **Figure 32**, l'arbre phylogénétique des régions D1/D2, généré par des analyses de maximum de vraisemblance, valide la classification de SLNEA04 au sein du groupe *Candida tropicalis*. Cette constatation a été étayée par une valeur significative de maximum de vraisemblance (ML) de 64 %.

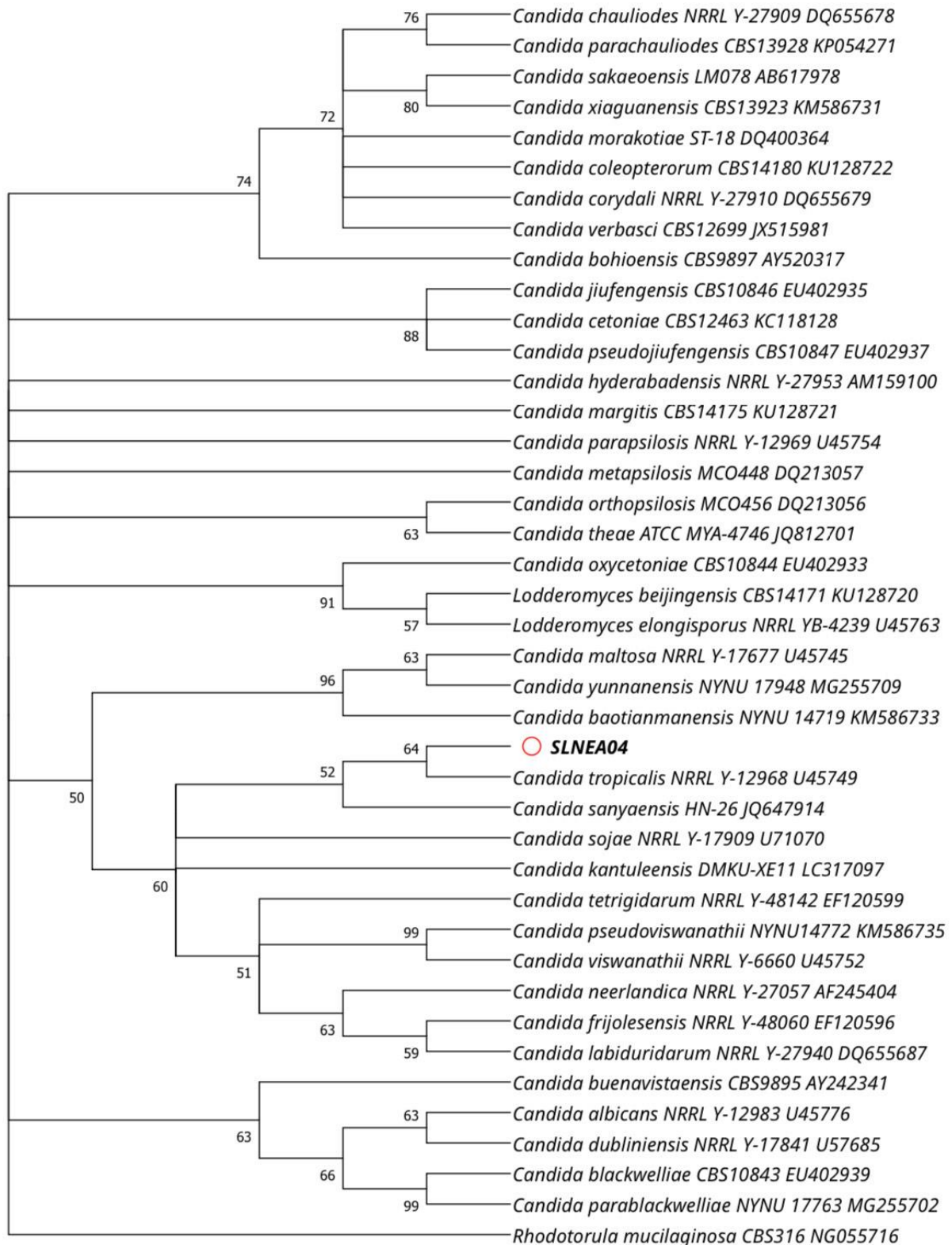


Figure 32. Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences D1/D2 des espèces du genre *Candida*. L'arbre a été enraciné à l'aide de *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316. Les valeurs bootstrap ML supérieures à 50 % sont affichées près des nœuds. L'isolat SLNEA04 est indiqué en gras.

L'isolat fongique P1 a été identifié au niveau de l'espèce grâce à l'analyse des fragments partiels d'espaceur transcrit interne (ITS) et des séquences de β -tubuline. Ces séquences nucléotidiques ont été utilisées comme requête et ont été comparées avec des séquences connues dans le National Center for Biotechnology Information (NCBI) à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search tool).

La recherche d'homologie de séquences BenA a révélé que l'isolat P1 présente une homologie très élevée (98.37 %) avec la souche type de *Penicillium hordei* CBS 70168 (AY674347). Le « Query coverage » est de 100 % avec un « E-value » zéro. Les séquences de la région ITS (523 pb) et β -tubuline (363 pb) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accèsion PP853661 et PP893244, respectivement. Le test bootstrap de phylogénie, basé sur le modèle Tamura-Nei, a été réalisé à l'aide d'une analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences BenA des espèces *Penicillium*.

Comme l'illustre la **Figure 33**, l'arbre phylogénétique des régions BenA, généré par des analyses de maximum de vraisemblance, valide la classification de SLNEA03 au sein du groupe *Penicillium hordei*. Cette constatation a été étayée par une valeur significative de maximum de vraisemblance (ML) de 95 %.

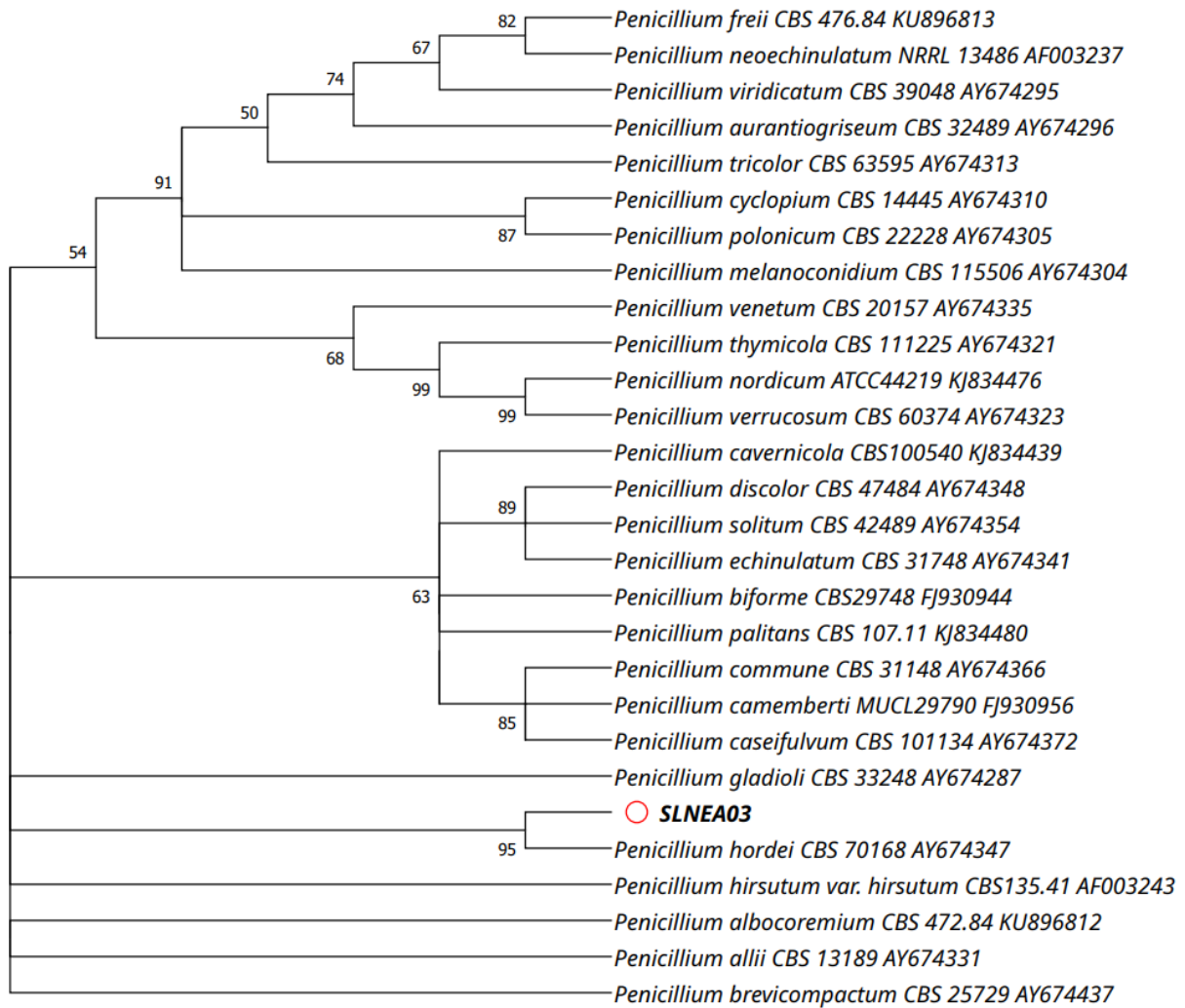


Figure 33. Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences BenA des espèces du genre *Penicillium*. L'arbre a été enraciné à l'aide de *Penicillium brevicompactum* CBS 25729. Les valeurs bootstrap ML supérieures à 50 % sont affichées près des nœuds. L'isolat SLNEA03 est indiqué en gras.

L'isolat fongique R1 a été identifié au niveau de l'espèce grâce à l'analyse des fragments partiels d'espaceur transcrit interne (ITS) et la grande sous-unité ribosomale (LSU). Ces séquences nucléotidiques ont été utilisées comme requête et ont été comparées avec des séquences connues dans le National Center for Biotechnology Information (NCBI) à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search tool).

La recherche d'homologie de séquences ITS-LSU a révélé que l'isolat R1 présente une homologie très élevée (99.48 %) avec la souche type de *Rhizopus arrhizus* CBS 112.07T (JN206323). Le « Query coverage » est de 98 % avec un « E-value » zéro. Les séquences de la région ITS (588 pb) et LSU (649 pb) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accès OR584306 et OR584305, respectivement. Le test bootstrap de phylogénie, basé sur le modèle Tamura-Nei, a été réalisé à l'aide d'une analyse de maximum de vraisemblance des données combinées de séquences ITS-LSU des espèces *Rhizopus* et *Phycomyces*.

Comme l'illustre la **Figure 34**, l'arbre phylogénétique concaténé des régions ITS-LSU, généré par des analyses de maximum de vraisemblance, valide la classification de SLNEA1 au sein de *Rhizopus arrhizus sensu lato* (complexe d'espèces de *Rhizopus arrhizus*) et a été placé dans le groupe *Rhizopus arrhizus*. Cette constatation a été étayée par une valeur significative de maximum de vraisemblance (ML) de 90 %.

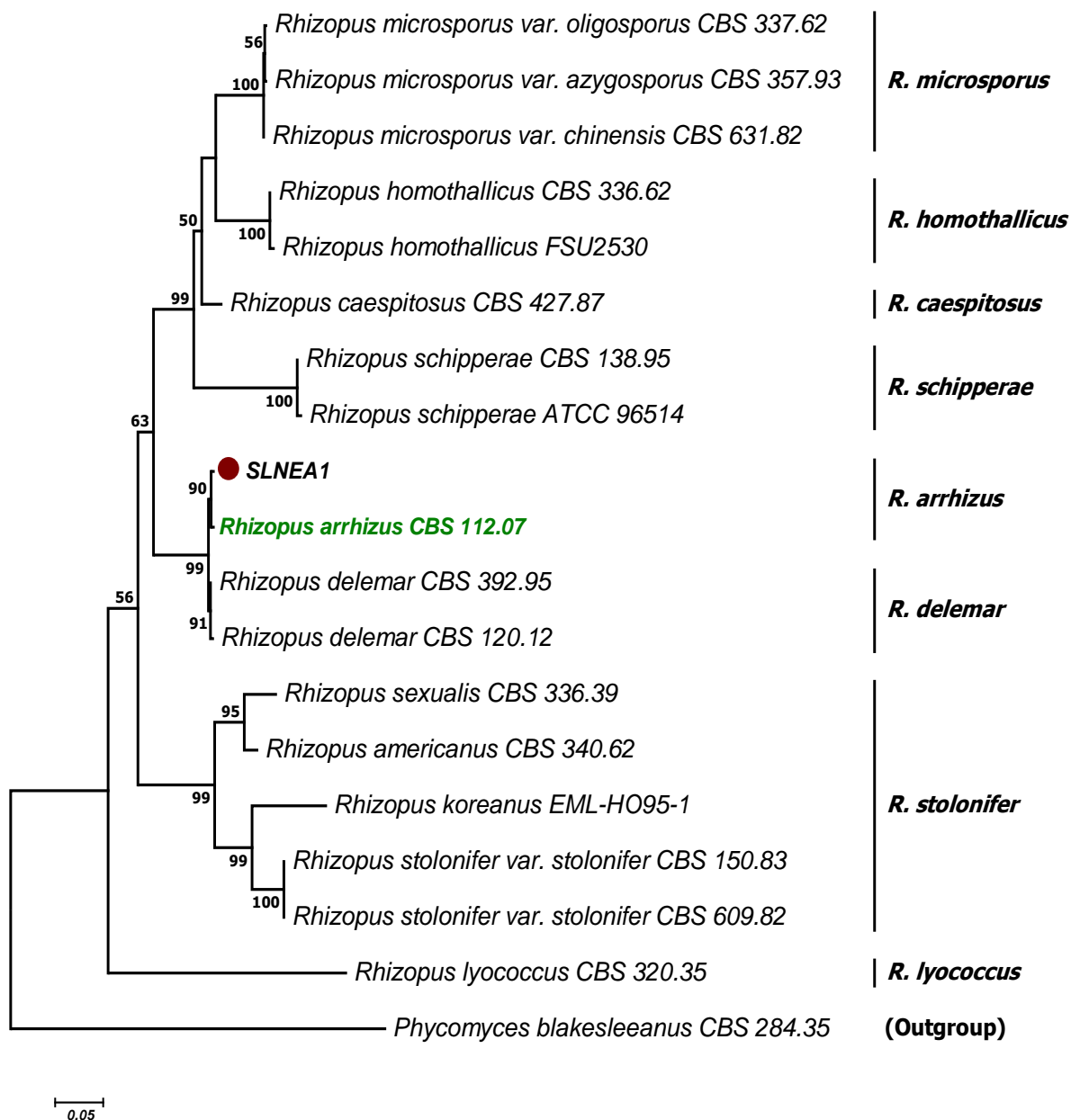


Figure 34. Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données combinées des séquences ITS-LSU des espèces du genre *Rhizopus*. L'arbre a été enraciné à l'aide de *Phycomyces blakesleeanus* CBS 284.35. Les valeurs bootstrap ML supérieures à 50 % sont affichées près des nœuds. L'isolat SLNEA1 est indiqué en gras.

L'isolat fongique R2 a été identifié au niveau de l'espèce grâce à l'analyse des fragments partiels d'espaceur transcrit interne (ITS) et de la région D1/D2 de l'ARN 26S. Ces séquences nucléotidiques ont été utilisées comme requête et ont été comparées avec des séquences connues dans le National Center for Biotechnology Information (NCBI) à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search tool).

La recherche d'homologie de séquences des régions D1/D2 a révélé que l'isolat R2 présente une homologie complète (100 %) avec *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 2772 (KY109129). Le « Query coverage » est de 100 % avec un « E-value » zéro. Les séquences de la région ITS (519 pb) et D1/D2 (507 pb) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accèsion PP854582 et PP882834, respectivement. Le test bootstrap de phylogénie, basé sur le modèle Tamura-Nei, a été réalisé à l'aide d'une analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences D1/D2 des espèces *Rhodotorula* et *Candida*.

Comme l'illustre la **Figure 35**, l'arbre phylogénétique des régions D1/D2, généré par des analyses de maximum de vraisemblance, valide la classification de SLNEA05 au sein du groupe *Rhodotorula mucilaginosa*. Cette constatation a été étayée par une valeur significative de maximum de vraisemblance (ML) de 94 %.

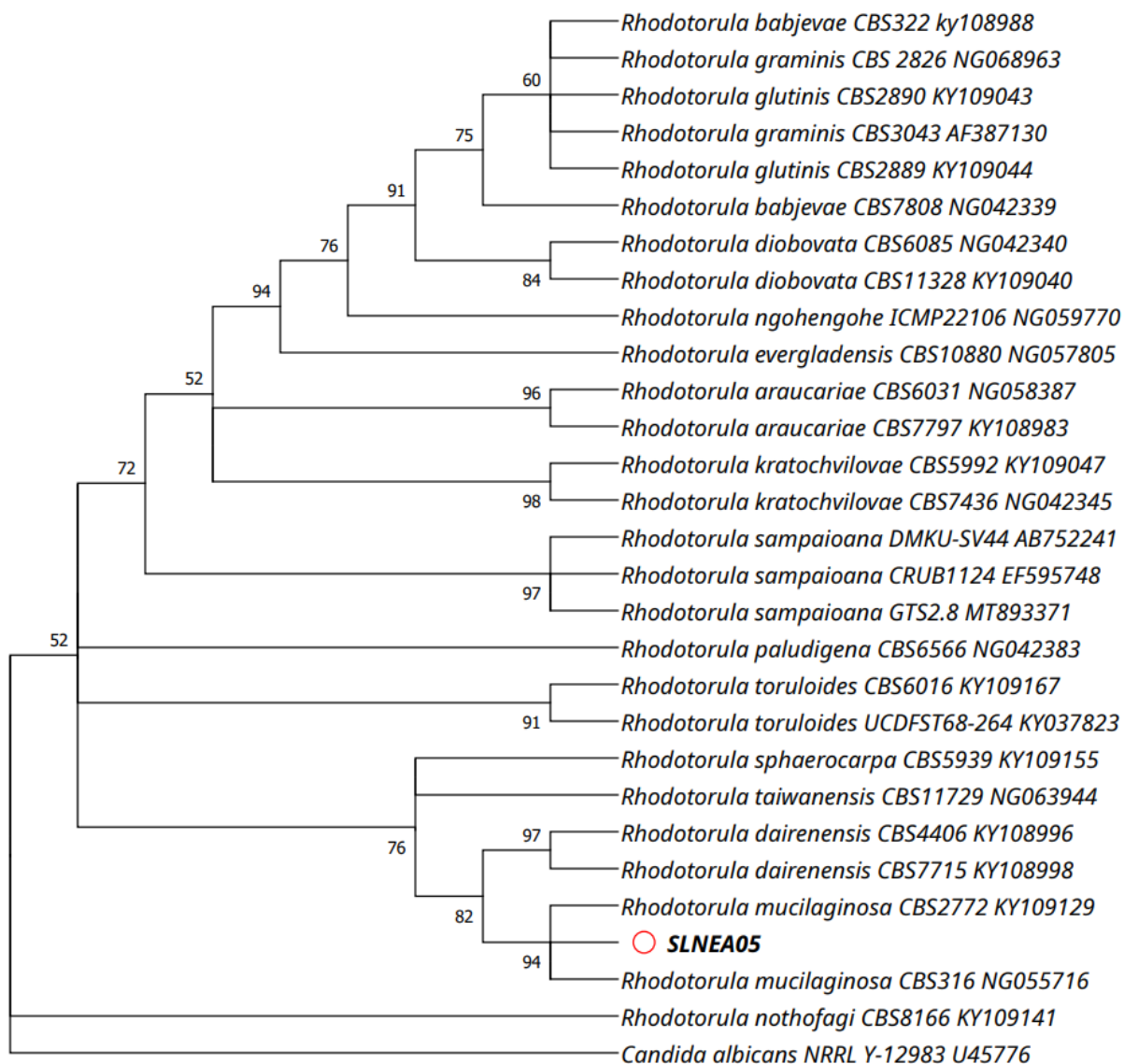


Figure 35. Arbre phylogénétique généré par l'analyse de maximum de vraisemblance des données de séquences D1/D2 des espèces du genre *Rhodotorula*. L'arbre a été enraciné à l'aide de *Candida albicans* NRRL Y-12983. Les valeurs bootstrap ML supérieures à 50 % sont affichées près des nœuds. L'isolat SLNEA05 est indiqué en gras.

3. Sélection des isolats pour les tests de biodégradation

Les espèces fongiques identifiées ont été testées pour leurs capacités à dégrader les granulés de polyéthylène, qui représentent les composants élémentaires des sacs plastiques. Les essais ont été menés *in vitro* dans un MML à pH neutre avec agitation continue (150 tours/min) dans un incubateur agitateur à 27°C pendant un mois. Le pourcentage de perte de poids des granulés de polyéthylène a été évalué tous les 10 jours, par rapport au témoin (**Figure 36**).

Les granulés de polyéthylène inoculés avec les espèces identifiées ont montré une perte de poids pendant toute la période d'incubation, mais avec des pourcentages différents comparés au témoin, où aucun changement de poids n'a été observé. Après 30 jours d'incubation, les pourcentages de perte de poids ont été estimés à 0,15 %, 6,12 %, 1,36 %, 0,51 %, 0,56 %, 3,34 %, 6,14 %, 1,39 % et 0,66 % pour *A. flavus*, *A. niger*, *C. tropicalis*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *P. hordei*, *R. arrhizus*, *R. mucilaginosa* et *Trichoderma* sp. Les films incubés avec les champignons filamenteux *A. niger*, *R. arrhizus* et *P. hordei*, ainsi qu'avec les levures *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*, présentent les pourcentages de perte de poids les plus élevés. Ceci est attribué à la bonne adaptation de ces espèces dans le milieu et à leur capacité à produire des enzymes extracellulaires qui décomposent les granulés de polyéthylène en petites molécules qui peuvent être utilisées comme source de carbone par ces isolats fongiques.

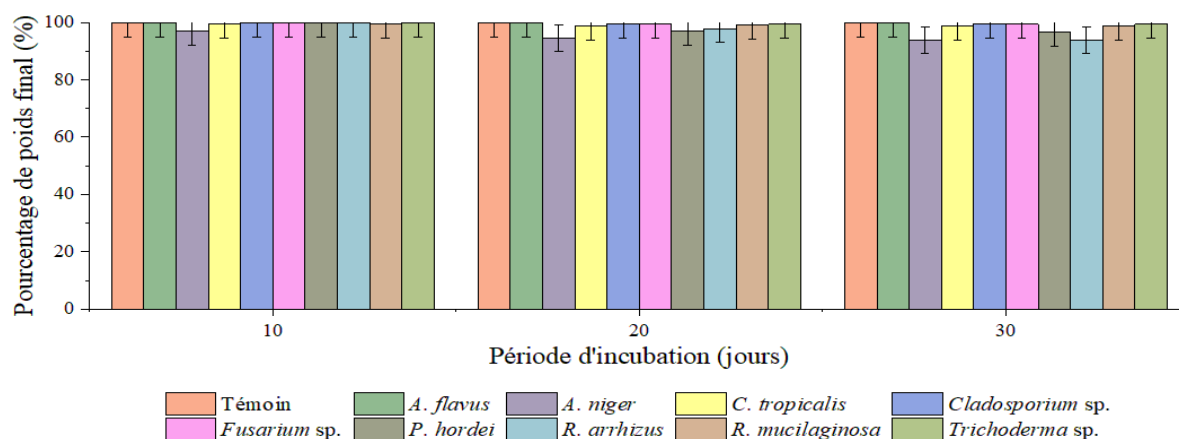


Figure 36. Pourcentages des poids finaux des granulés de polyéthylène après 30 jours d'incubation avec *A. flavus*, *A. niger*, *C. tropicalis*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *P. hordei*, *R. arrhizus*, *R. mucilaginosa* et *Trichoderma* sp., comparés au témoin

4. Résultats des tests de la biodégradation

Les isolats fongiques: *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa* ont été sélectionnés pour les tests de la biodégradation.

4. 1. Biodégradation *in vitro*

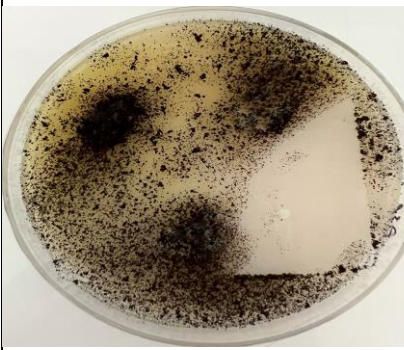
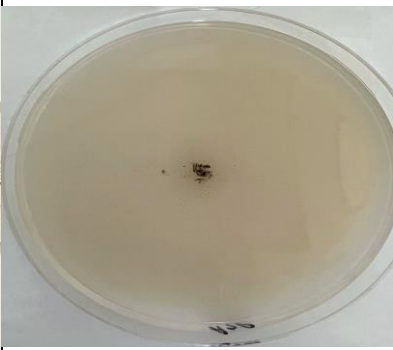

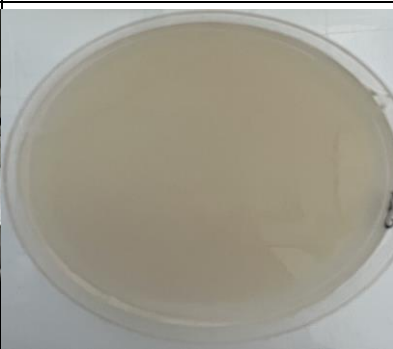




Les tests de biodégradation *in vitro* ont été réalisés sur milieu minimum solide (MMS) et dans un milieu minimum liquide (MML).

4. 1. 1. Biodégradation sur milieu minimum solide

Les tests de biodégradation sur MMS ont été menés afin de confirmer l'utilisation des polymères plastiques par les isolats fongiques dans un milieu où le film de PEBD est la seule source de carbone. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 12**.

Après un mois d'incubation à 27°C, la croissance des espèces fongiques a été observée dans les boîtes contenant un film de PEBD. *A. niger* est apparu sous forme de thalle ayant un aspect de velours ou de feutre avec des spores noires. *R. arrhizus* s'est présenté comme un enchevêtrement de filaments blancs et de petits points noirs et blancs. De même, *P. hordei* a évolué lentement et a pris un aspect différent de celui en milieu PDA. Ceci peut être attribué à la différence des sources de carbone présentes dans chaque milieu. Les levures ont également poussé: *C. tropicalis* s'est développée en colonies lisses et crémeuses de couleur blanchâtre. Quant à *R. mucilaginosa*, une lente croissance a été observée avec des colonies lisses de couleur rose. Cependant, aucune croissance n'a été observée dans les boîtes témoins dépourvues des films de PEBD.

Tableau 12. Résultats des tests de biodégradation sur milieu minimum solide après 30 jours d'incubation à 27°C

Isolats fongiques	MMS avec film de PEBD	Témoins
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Candida tropicalis</i>		
<i>Penicillium hordei</i>		
<i>Rhizopus arrhizus</i>		



4. 1. 2. Biodégradation sur milieu minimum liquide (cultures en batch)

Après avoir confirmé l'utilisation des films de PEBD par les isolats fongiques comme source de carbone, d'autres tests visant à optimiser la biodégradation ont été réalisés en agissant sur différents paramètres qui influencent ce processus biologique.

4. 1. 2. 1. Influence de l'agitation du milieu

Les films de PEBD ont été incubés avec les isolats fongiques sélectionnés pendant 30 jours à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ avec agitation (AG) et sans agitation (SAG) du milieu. Les pourcentages des poids obtenus après incubation sont illustrés dans la **figure 37**.

La **figure 37 (A)** représente les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *A. niger*, avec et sans agitation du milieu. Après 10 jours d'incubation, le poids des films de PEBD a diminué de 3.51 % pour la culture avec agitation et de 0.89 % pour la culture sans agitation. Le poids des films des deux cultures a continué à diminuer, et au 30^{ème} jour, il a atteint 7.89 % et 3.57 % pour la culture AG et SAG, respectivement.

La **figure 37 (B)** représente les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *C. tropicalis*, avec et sans agitation du milieu. Après 10 jours d'incubation, le poids des films de PEBD a diminué de 0.37 % pour la culture avec agitation et de 0.94 % pour la culture sans agitation. Après 20 jours, le poids du film de la culture AG a continué à diminuer, atteignant 4.11 % au 30^{ème} jour. En revanche, le poids du film incubé sans agitation n'a pas changé après 20 jours (0,94%), mais a atteint une diminution de 1.89 % après 30 jours.

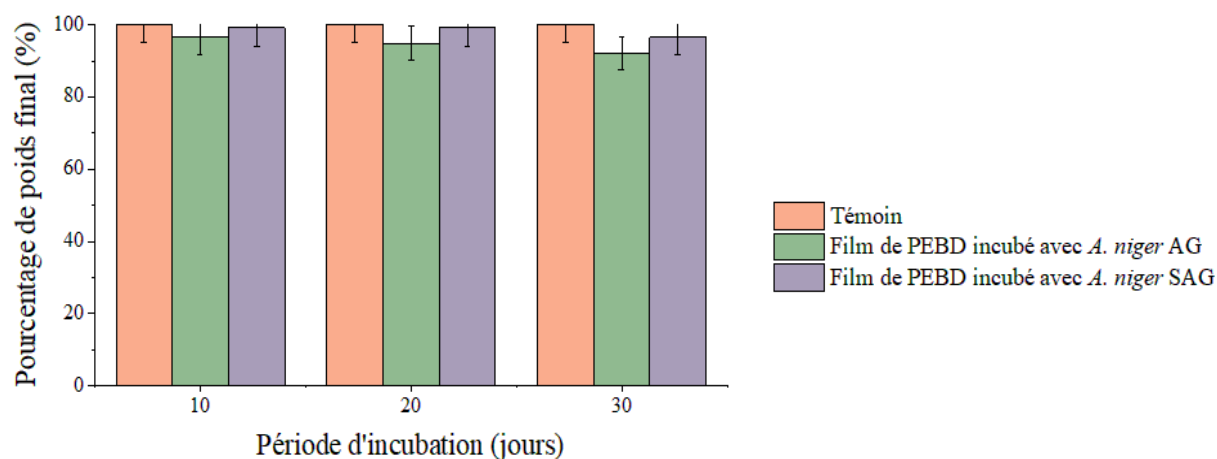
La **figure 37 (C)** représente les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *P. hordei*, avec et sans agitation du milieu. Après 10 jours d'incubation, le poids des films de PEBD a diminué de 0.64 % pour la culture avec agitation et de 0.44 % pour la culture sans agitation. Le poids du film incubé avec agitation a continué à diminuer, atteignant 1.41 % au

30^{ème} jour. Cependant, le poids du film de la culture sans agitation n'a pas changé (0.44 %) après 20 et 30 jours d'incubation.

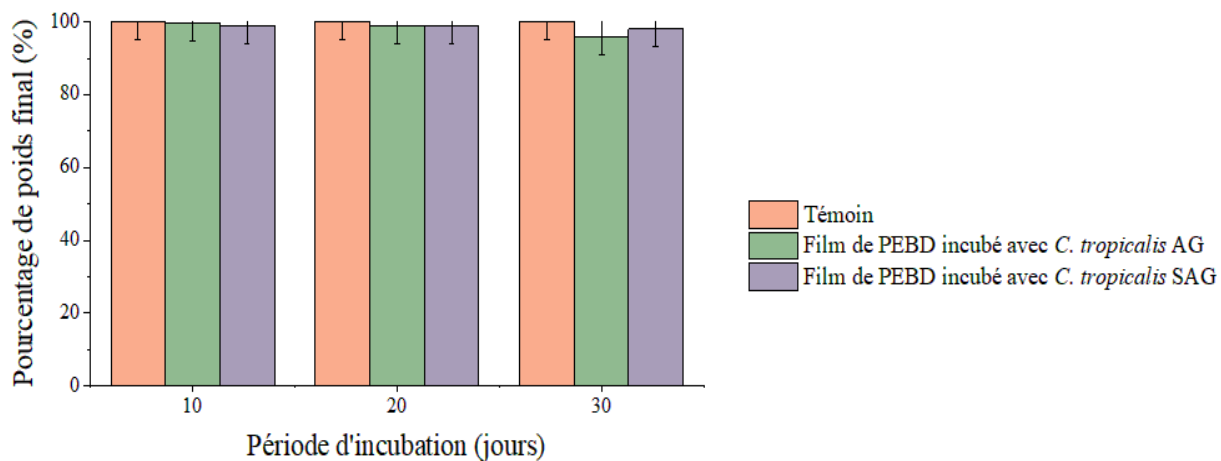
La **figure 37 (D)** représente les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus*, avec et sans agitation du milieu. Après 10 jours d'incubation, le poids du film de PEBD soumis à l'agitation a diminué de 1.71 %, tandis qu'aucun changement de poids n'a été observé pour le film incubé sans agitation. Après 20 jours, le poids des films des deux cultures a diminué, atteignant 8.55 % et 4.12 % après un mois d'incubation dans la culture AG et SAG, respectivement.

La **figure 37 (E)** représente les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. mucilaginosa*, avec et sans agitation du milieu. Après 10 jours d'incubation, le poids des films de PEBD a diminué de 0.61 % pour la culture avec agitation et de 0.95 % pour la culture sans agitation. Après 30 jours, le pourcentage de perte de poids a atteint 2.44 % et 1.90 % pour la culture AG et SAG, respectivement.

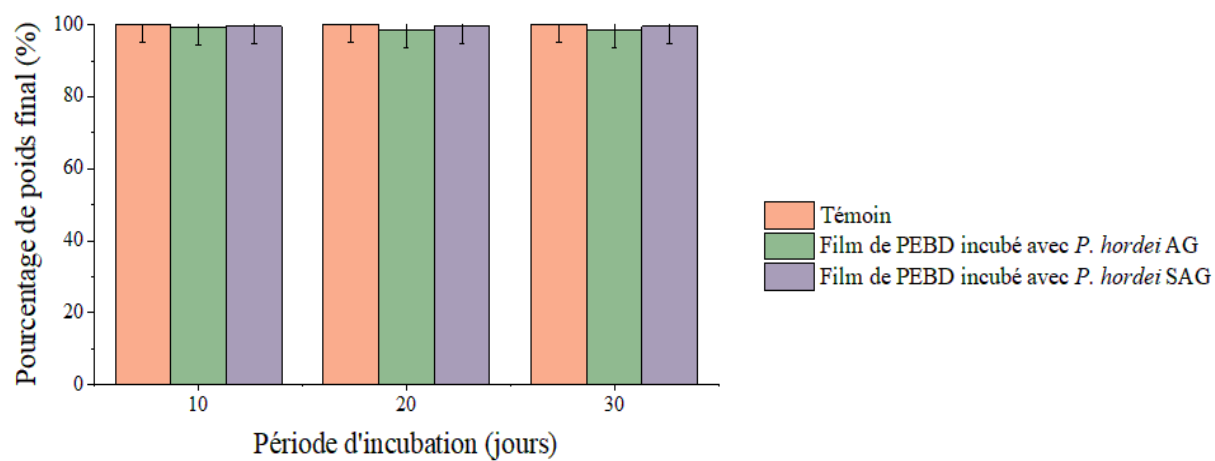
Enfin, aucune perte de poids n'a été observée dans les films témoins.



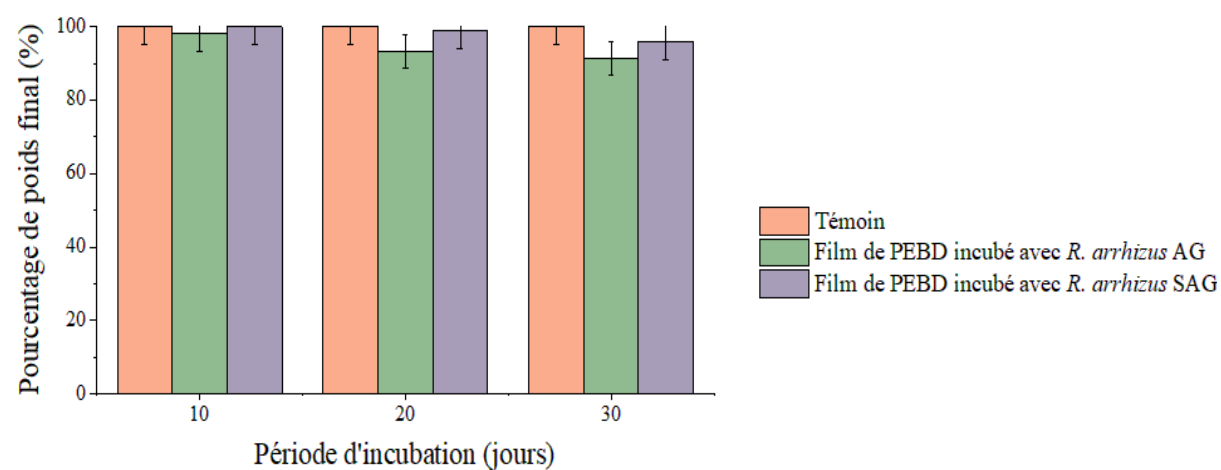
(A)



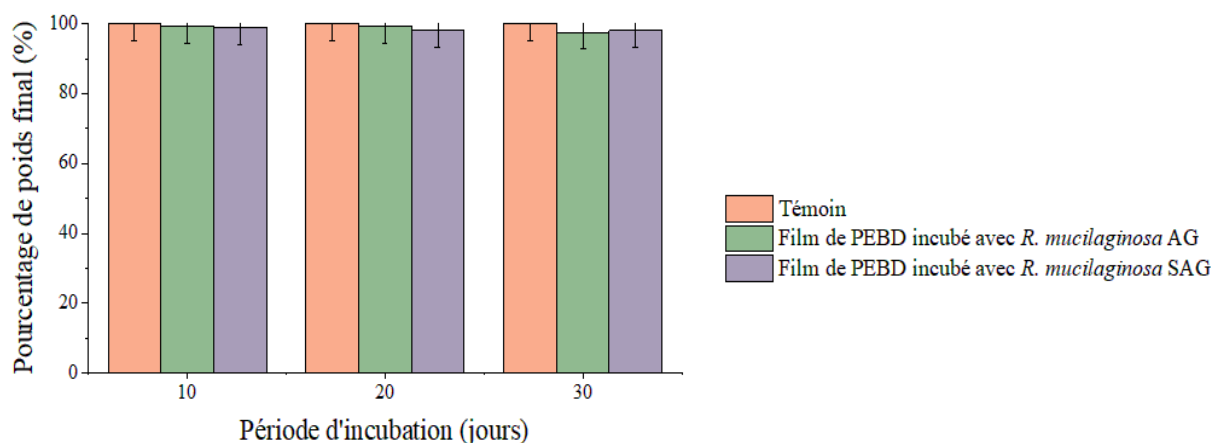
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 37. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation avec et sans agitation du milieu avec: (A) *A. niger*, (B) *C. tropicalis*, (C) *P. hordei*, (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 1. 2. 2. Influence du poids des films de PEBD

Les films de PEBD (0.2, 0.4 et 0.6 g) ont été incubés avec les isolats fongiques sélectionnés pendant 30 jours à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ avec agitation continue. Les pourcentages des poids finaux obtenus après incubation sont représentés dans la **figure 38**.

La **figure 38 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2, 0.4 et 0.6 g incubés avec *A. niger*. Le poids du film de 0.2 g a diminué de 7.32 % après 10 jours d'incubation, atteignant 8.55 % après un mois. Quant au film de 0.4 g, le poids a diminué de 0.60 %, 0.87 % et 2.83 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. De même, le film de 0.6 g a montré une légère diminution de poids estimée à 0.09 %, 1.67 % et 1.86 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

La **figure 38 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2, 0.4 et 0.6 g incubés avec *C. tropicalis*. Le poids du film de 0.2 g a diminué de 0.35 % après 10 jours d'incubation, atteignant 4.82 % après un mois. Quant au film de 0.4 g, le poids a diminué de 0.58 %, 1.30 % et 1.59 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. De même, le film de 0.6 g a montré une légère diminution de poids estimée à 0.18 %, 0.76 % et 1 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

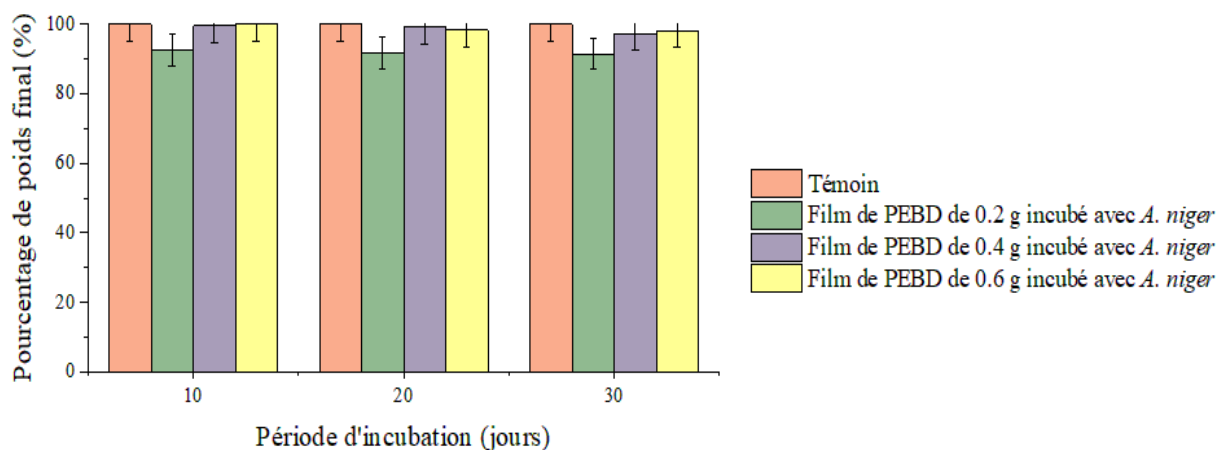
La **figure 38 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2, 0.4 et 0.6 g incubés avec *P. hordei*. Le poids du film de 0.2 g a diminué de 0.17 % après 10 jours d'incubation, atteignant 2.69 % après un mois. Quant au film de 0.4g, le poids a diminué de

0.31 %, 0.72 % et 1.15 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Cependant, le film de 0.6 g a montré une faible diminution de poids estimée à 0.20 %, 0.62 % et 0.98 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

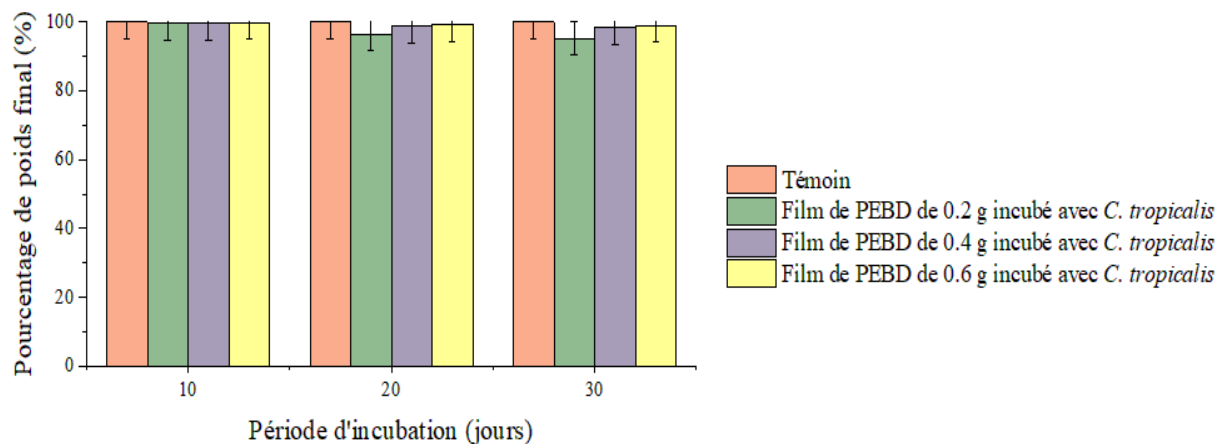
La **figure 38 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2, 0.4 et 0.6 g incubés avec *R. arrhizus*. Le poids du film de 0.2 g a diminué de 16.34 % après 10 jours d'incubation, atteignant 21.79 % après un mois. Quant au film de 0.4 g, le poids a diminué de 7.40 %, 7.94 % et 8.13 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. De même, le film de 0.6 g a montré une diminution de poids estimée à 4.31 %, 4.36 % et 4.52 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

La **figure 38 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2, 0.4 et 0.6 g incubés avec *R. mucilaginosa*. Le poids du film de 0.2 g a diminué de 0.10 % après 10 jours d'incubation, atteignant 3.15 % après un mois. Quant au film de 0.4 g, le poids a diminué de 0.64 %, 1.41 % et 1.83 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. De même, le film de 0.6 g a montré une faible diminution de poids estimée à 0.19 %, 0.63 % et 1.04 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

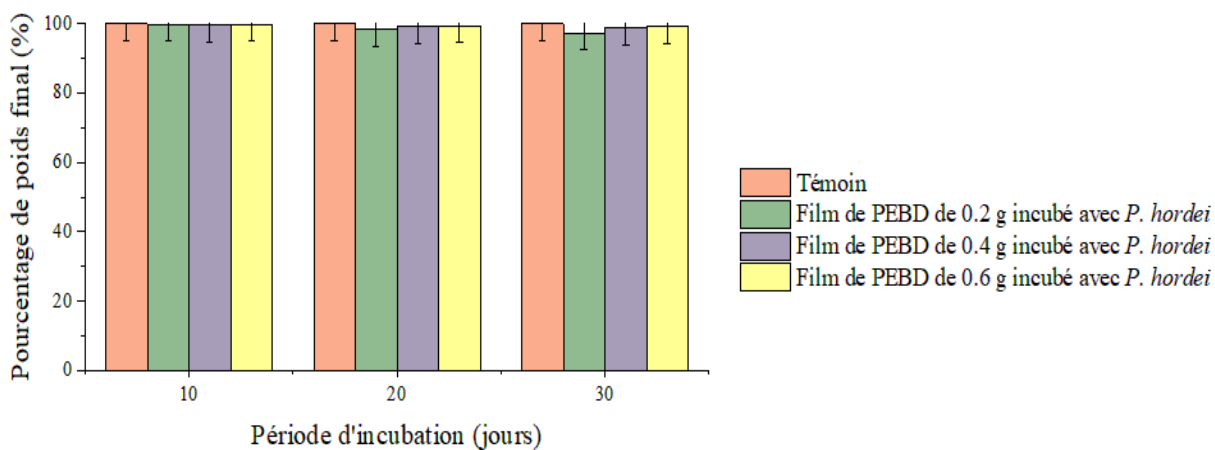
Cependant, aucun changement de poids n'a été observé dans les films témoins.



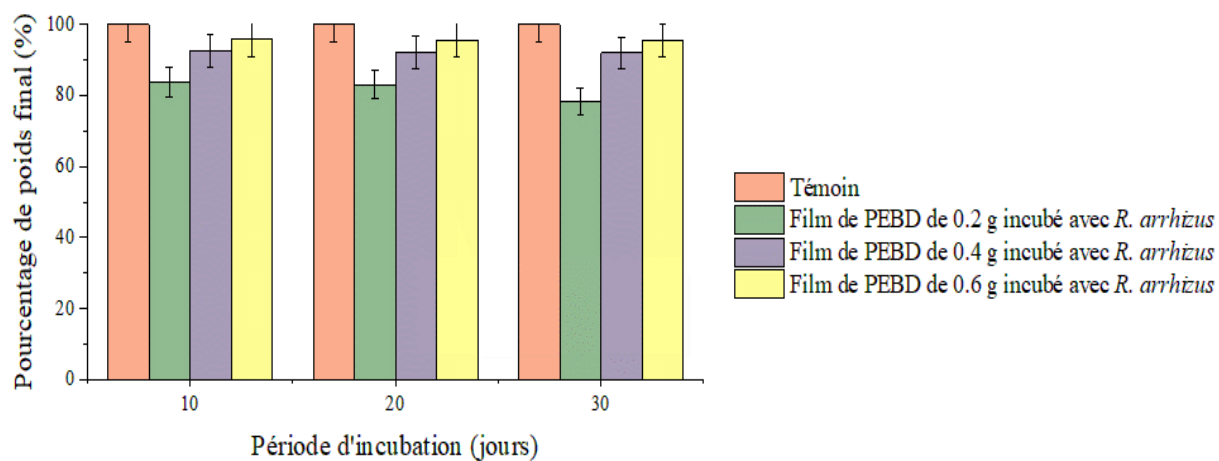
(A)



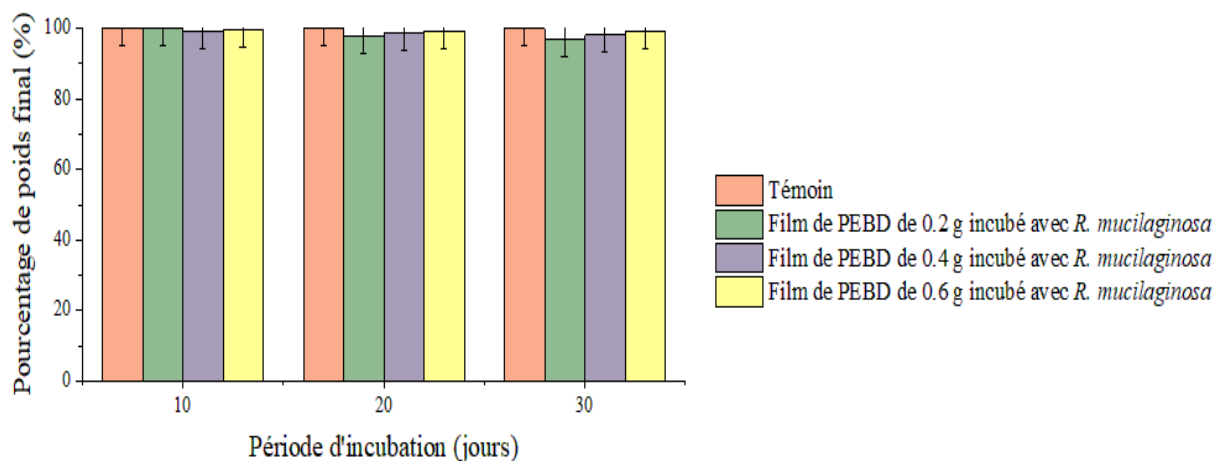
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 38. Pourcentages des poids finaux des films de PEBC (0.2 g, 0.4 g et 0.6 g) après 30 jours d'incubation avec: (A) *A. niger*, (B) *C. tropicalis*, (C) *P. hordei*, (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 1. 2. 3. Influence du pH du milieu

4. 1. 2. 3. 1. Test de croissance

Avant de procéder aux tests de biodégradation avec variation du pH du milieu, les isolats fongiques ont été testés pour leur croissance dans un milieu PDA à des pH de 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 13**.

Tableau 13. Evaluation de la croissance des isolats fongiques sur milieu PDA à différents pH

pH	2	4	6	8	10	12	14
<i>A. niger</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	+	+	-
<i>P. hordei</i>	-	+	+	+	+	+	-
<i>R. arrhizus</i>	-	+	+	+	+	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	-	+	+	+	+	+	-

(+) croissance fongique, (-) absence de croissance fongique

4. 1. 2. 3. 2. Test de biodégradation

Les films de PEBC de 0.2 g ont été incubés avec les isolats fongiques sélectionnés, avec variation du pH du MML, pendant 30 jours à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ avec agitation continue. Les pourcentages des poids obtenus après incubation sont représentés dans la **figure 39**.

La **figure 39 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2 g incubés avec *A. niger* dans un MML à pH 2, 4, 6, 8, 10 et 12. Le poids du film incubé dans un MML à pH 2 a diminué de 2.71 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 4.53 %. Quant au film incubé dans un MML à pH 4, son poids a diminué de 0.83 %, 2.37 % et 6.55 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé dans un MML à pH 6 après 30 jours d'incubation, estimé à 10.35 %. D'autre part, les films incubés dans un MML à pH basiques 8, 10 et 12 ont montré des pourcentages de perte de poids moins élevés, estimés à 4.03 %, 1.86 % et 1.81 %, respectivement, après un mois d'incubation.

La **figure 39 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2 g incubés avec *C. tropicalis* dans un MML à pH 4, 6, 8, 10 et 12. Le poids du film incubé dans un MML à pH 4 a diminué de 1.19 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, où elle a atteint un pourcentage de 3.38 %. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé dans un MML à pH 6 après 30 jours d'incubation, estimé à 5.42 %. Quant au film incubé dans un MML à pH 8, son poids a diminué de 0.75 %, 1.64 % et 2.25 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. D'autre part, les films incubés dans un MML à pH basiques 10 et 12 ont montré des pourcentages de perte de poids faibles, estimés, respectivement, à 1.01 % et 0.94 % après un mois d'incubation.

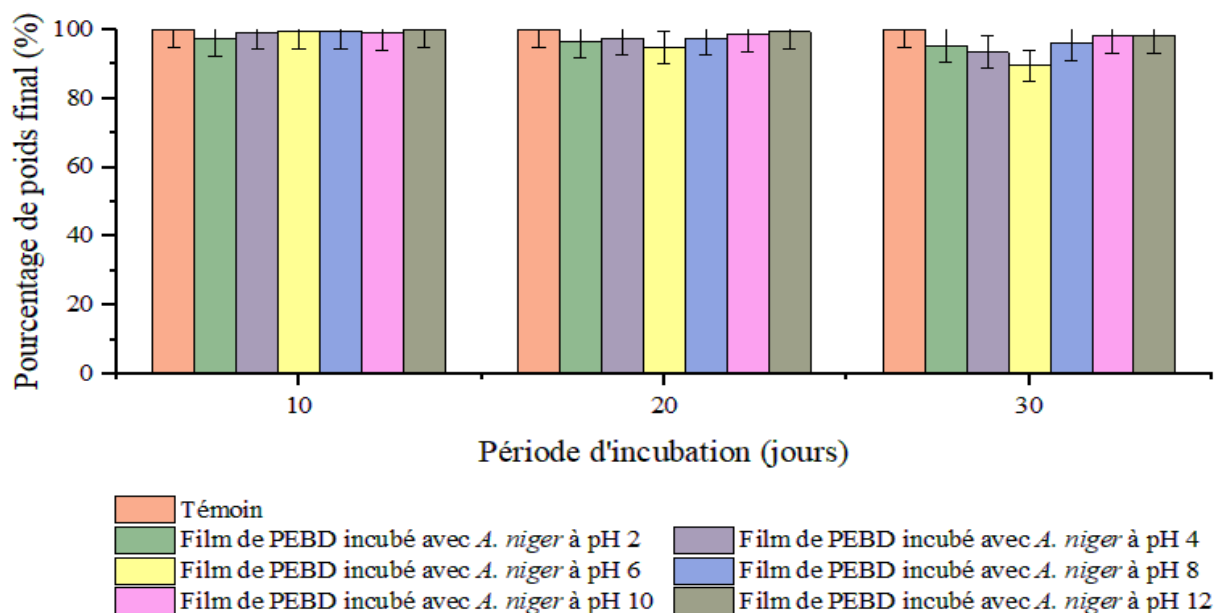
La **figure 39 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2 g incubés avec *P. hordei* dans un MML à pH 4, 6, 8, 10 et 12. Le poids du film incubé dans un MML à pH 4 a diminué de 1.03 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant 3.04 %. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé dans un MML à pH 6 après 30 jours d'incubation, estimé à 5.15 %. Quant au film incubé dans un MML à pH 8, son poids a diminué de 0.65 %, 1.29 % et 2.46 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. En revanche, les films incubés dans un MML à pH 10 et 12 ont montré des pourcentages faibles de perte de poids, estimés, respectivement, à 1.14 % et 1.05 % après un mois d'incubation.

La **figure 39 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2 g incubés avec *R. arrhizus* dans un MML à pH 4, 6, 8 et 10. Le poids du film incubé dans un MML à pH 4 a diminué de 1.89 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant 8.76 %. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé dans un MML à pH 6 après 30 jours d'incubation, estimé à 20.04 %. Quant au film incubé dans un MML à pH 8, la perte de poids a été de 3.31 %, 3.63 % et

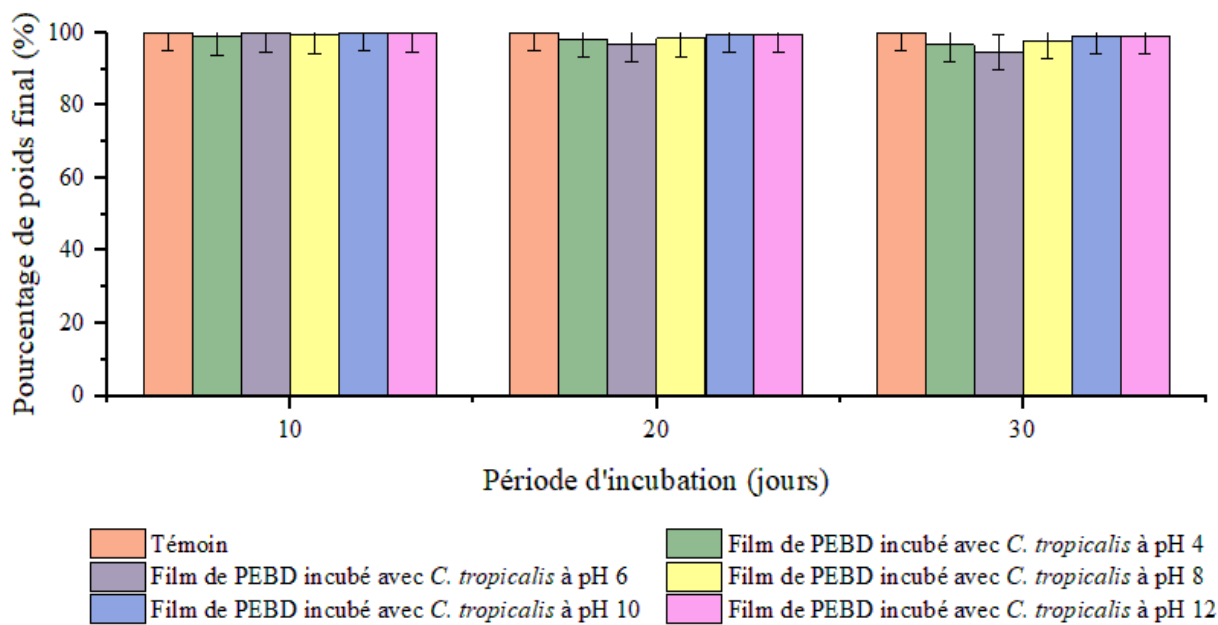
5.28 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. En revanche, le film incubé dans un MML à pH 10 a montré le pourcentage de perte de poids le plus faible, estimé à 2.50 % après un mois d'incubation.

La **figure 39 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD de 0.2 g incubés avec *R. mucilaginosa* dans un MML à pH 4, 6, 8, 10 et 12. Le poids du film incubé dans un MML à pH 4 a diminué de 0.95 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant 2.27 %. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé dans un MML à pH 6 après 30 jours d'incubation, estimé à 4.05 %. Quant au film incubé dans un MML à pH 8, la perte de poids a été de 0.19 %, 0.98 % et 1.55 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. En revanche, les films incubés dans un MML à pH 10 et 12 ont montré des pourcentages faibles de perte de poids, estimés, respectivement, à 0.96 % et 0.85 % après un mois d'incubation.

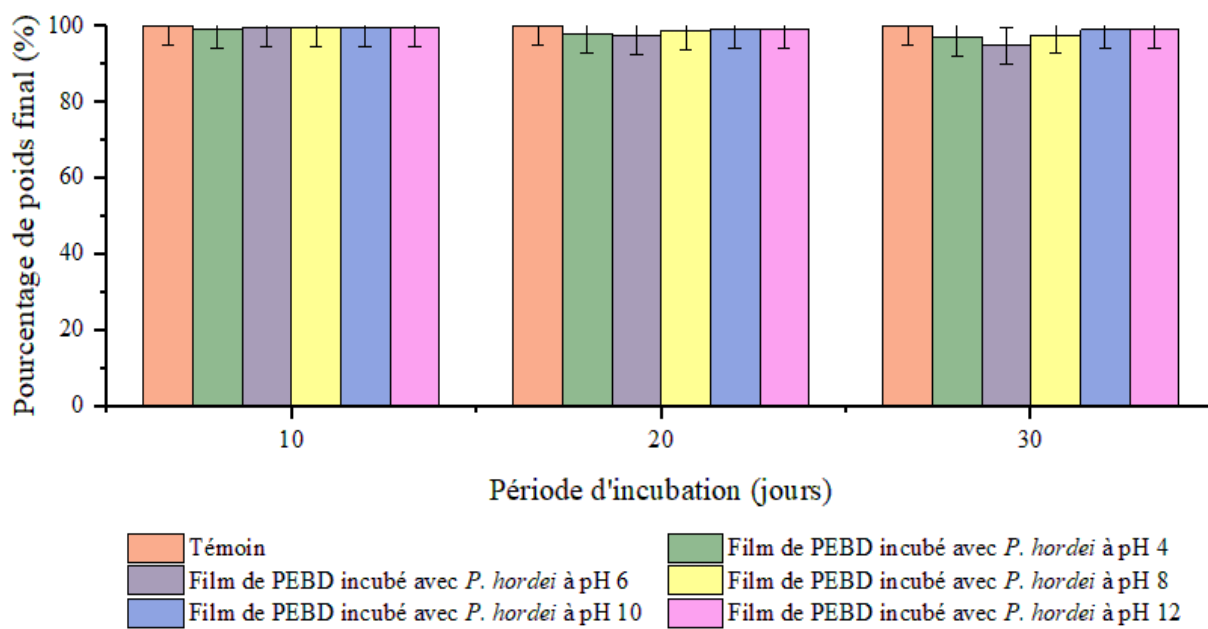
Cependant, aucun changement de poids n'a été observé dans les films témoins.



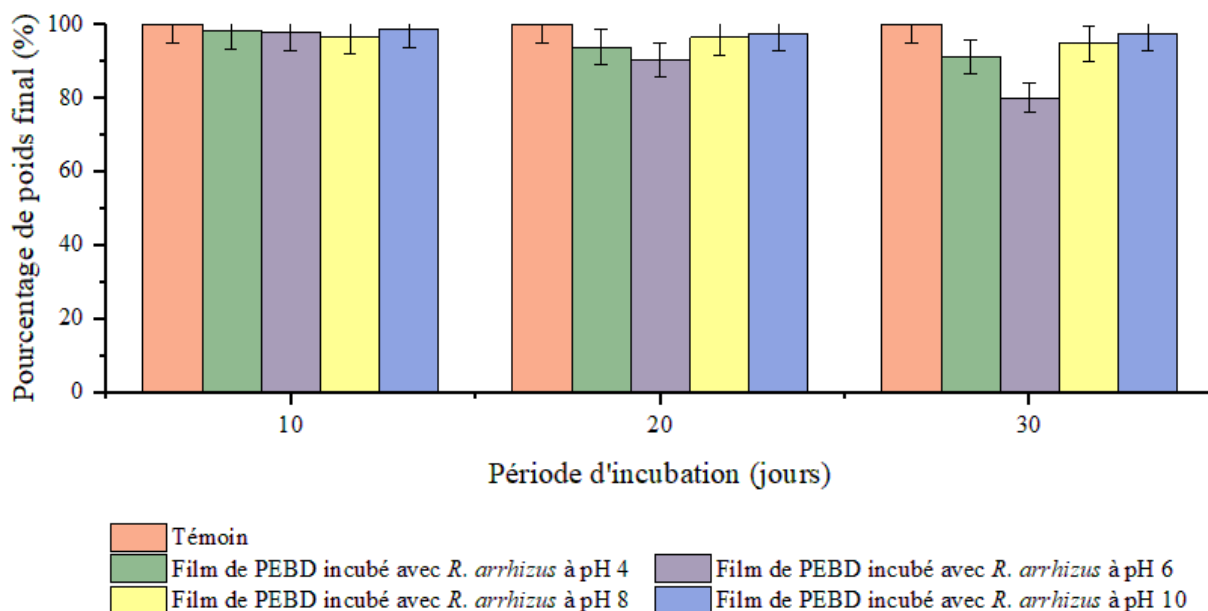
(A)



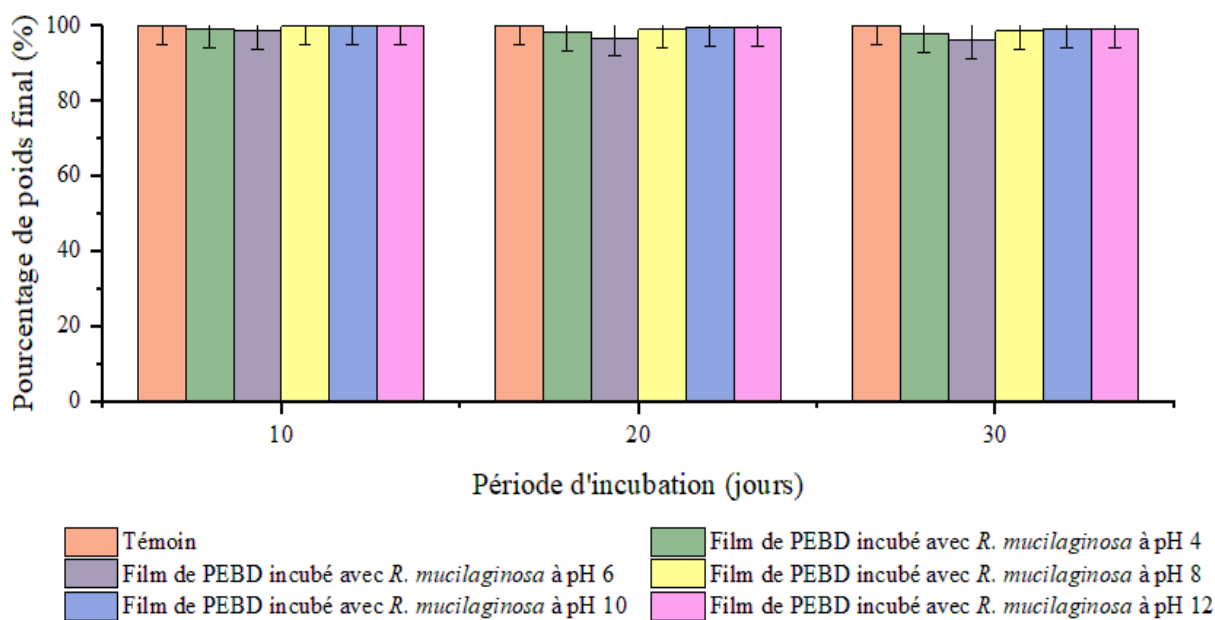
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 39. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD en fonction du pH du milieu après 30 jours d'incubation avec: (A) *A. niger*, (B) *C. tropicalis*, (C) *P. hordei*, (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 1. 2. 4. Influence de la température

4. 1. 2. 4. 1. Test de croissance

Avant de procéder aux tests de biodégradation avec variation de la température d'incubation, les isolats fongiques ont été testés pour leur croissance dans un milieu PDA après incubation à 0, 5, 15, 25, 35 et 45 ± 2°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 14**.

Tableau 14. Evaluation de la croissance des isolats fongiques sur milieu PDA après incubation à différentes températures

pH	0±2 °C	5±2 °C	15±2 °C	25±2 °C	35±2 °C	45±2 °C
<i>A. niger</i>	-	-	+	+	+	-
<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	+	-
<i>P. hordei</i>	-	+	+	+	-	-
<i>R. arrhizus</i>	-	+	+	+	+	-
<i>R. mucilaginosa</i>	-	+	+	+	+	-

(+) croissance fongique, (-) absence de croissance fongique

4. 1. 2. 4. 2. Test de biodégradation

Les films de PEBD de 0.2 g ont été incubés avec les isolats fongiques sélectionnés dans un MML à pH 6 pendant 30 jours avec agitation continue à différentes températures. Les pourcentages des poids obtenus après incubation sont représentés dans la **figure 40**.

La **figure 40 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *A. niger* à 15, 25 et 35°C. Le poids du film incubé à 15°C a diminué de 0.83 % après 10 jours d'incubation, atteignant 2.97 % après un mois. Quant au film incubé à 25°C, son poids a diminué de 1.16 %, 5.27 % et 9.73 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé à 35°C après 30 jours d'incubation, estimé à 11.41 %.

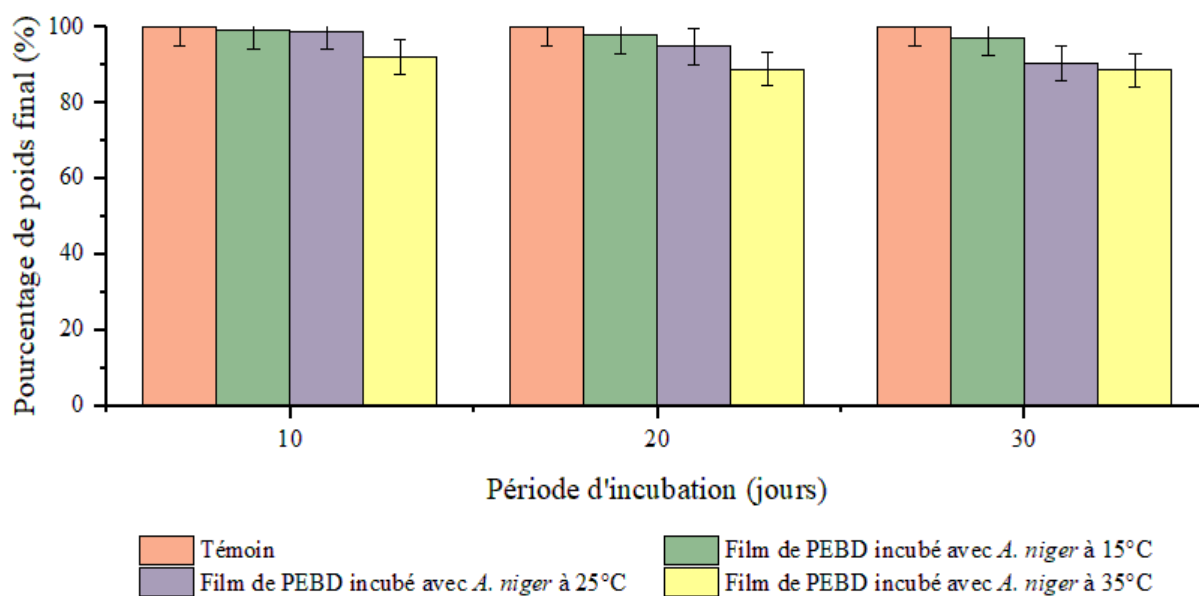
La **figure 40 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *C. tropicalis* à 5, 15, 25 et 35°C. Les pourcentages de perte de poids des films incubés à 5 et 15°C ont été les plus faibles, estimés, respectivement, à 0.90 % et 0.95 %. Quant au film incubé à 25°C, il a présenté le pourcentage de perte de poids le plus élevé, estimé à 4.85 %. Tandis qu'à 35°C, le poids du film a diminué de 0.20 %, 0.76 % et 1.27 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

La **figure 40 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *P. hordei* à 5, 15 et 25°C. Le pourcentage de perte de poids du film incubé à 5°C a été le plus faible, estimé à 1.01 %. Quant au poids du film incubé à 15°C, il a diminué de 0.25 % après 10 jours d'incubation, atteignant 1.68 % après un mois. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé à 25°C après 30 jours d'incubation, estimé à 5.10 %.

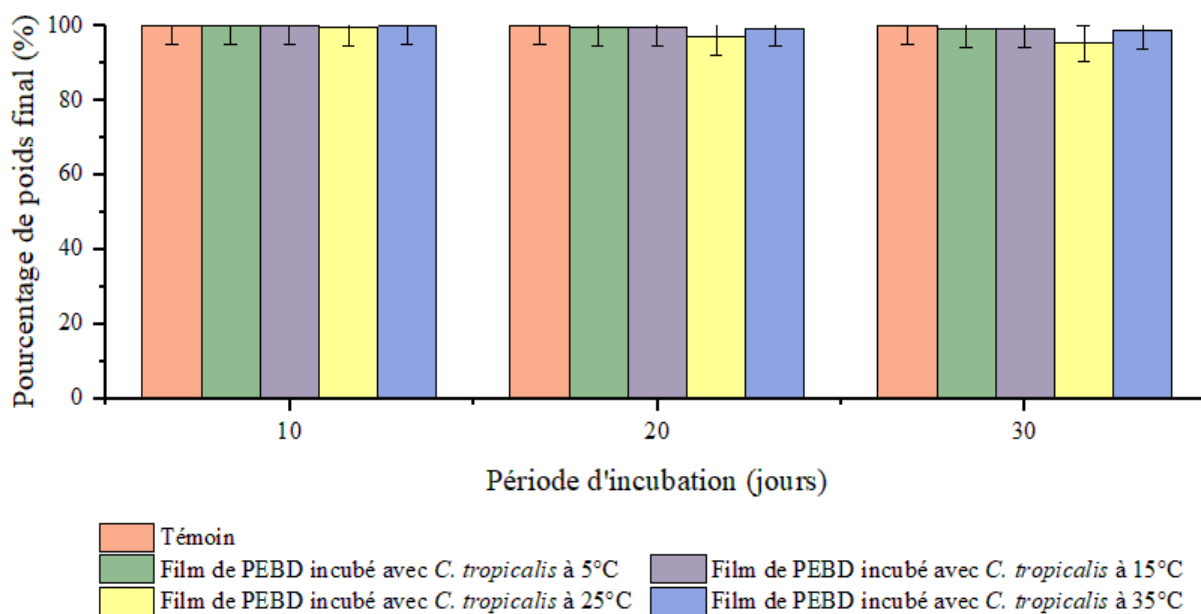
La **figure 40 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* à 5, 15, 25 et 35°C. Le pourcentage de perte de poids du film incubé à 5°C a été le plus faible, estimé à 1 %. Quant au film incubé à 15°C, son poids a diminué de 2.19 %, 2.87 % et 3.06 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé à 25°C après 30 jours d'incubation, estimé à 20.50%. Tandis qu'à 35°C, le poids du film a diminué de 3.57 %, 9.06 % et 11.80 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

La **figure 40 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. mucilaginosa* à 5, 15, 25 et 35°C. Le poids du film incubé à 5°C a diminué de 1.39 % après un mois d'incubation. Quant au film incubé à 15°C, son poids a diminué de 0.38 %, 0.85 % et 1 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé à 25°C après 30 jours d'incubation, estimé à 3.91%. Tandis qu'à 35°C, le poids du film a diminué de 0.30 %, 1.34 % et 2.53 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

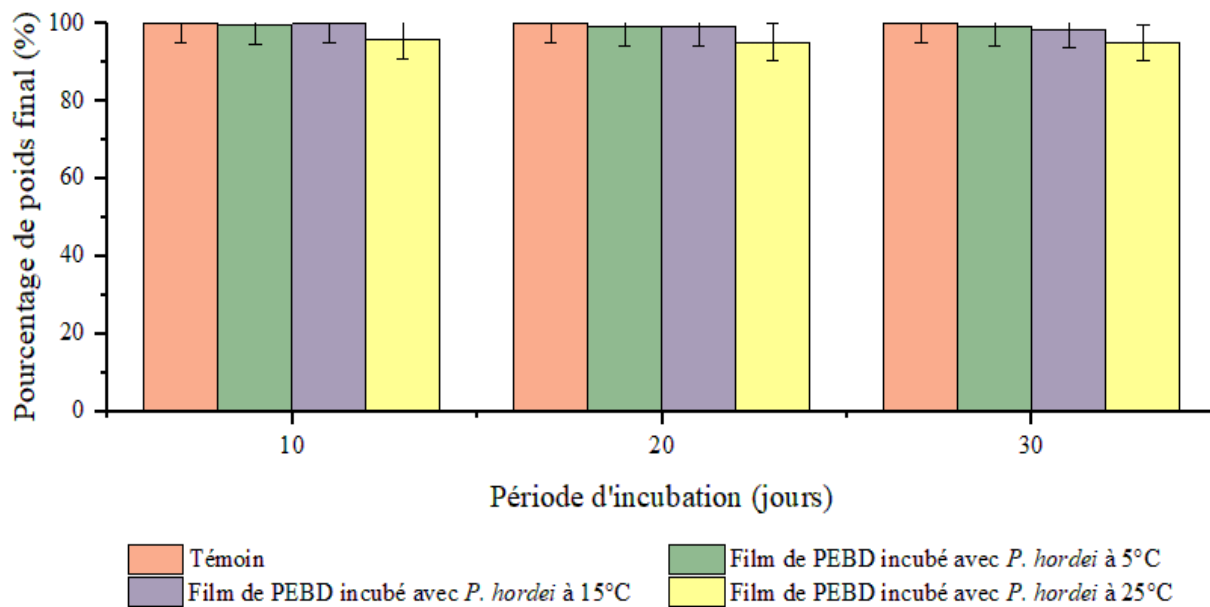
Cependant, aucun changement de poids n'a été observé dans les films témoins.



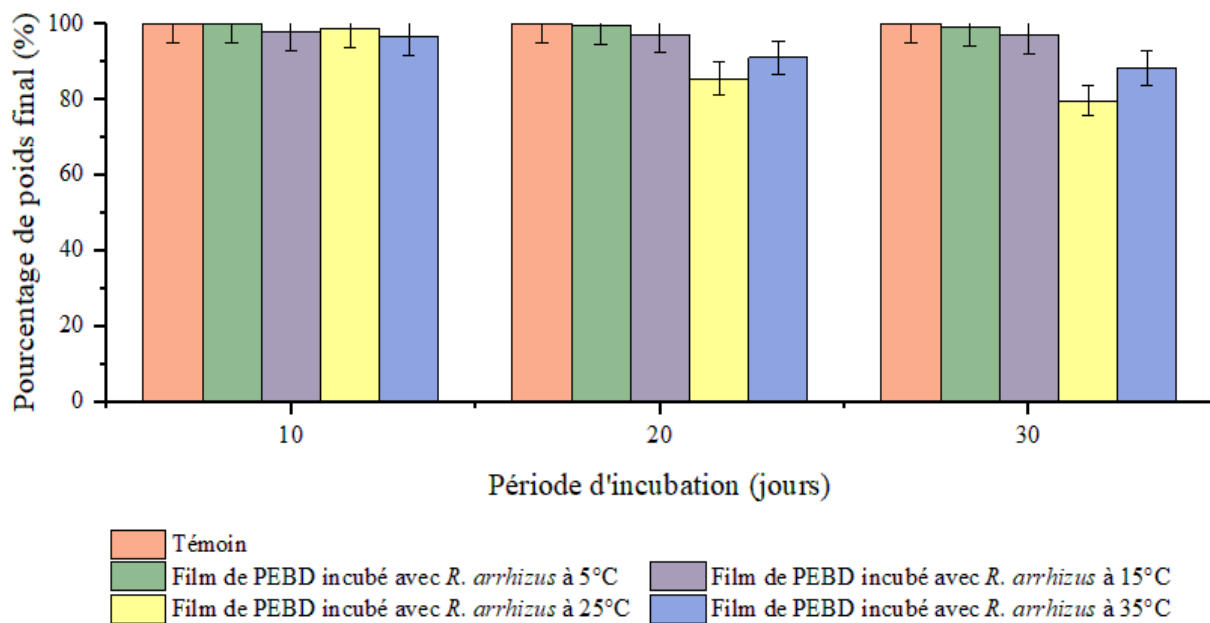
(A)



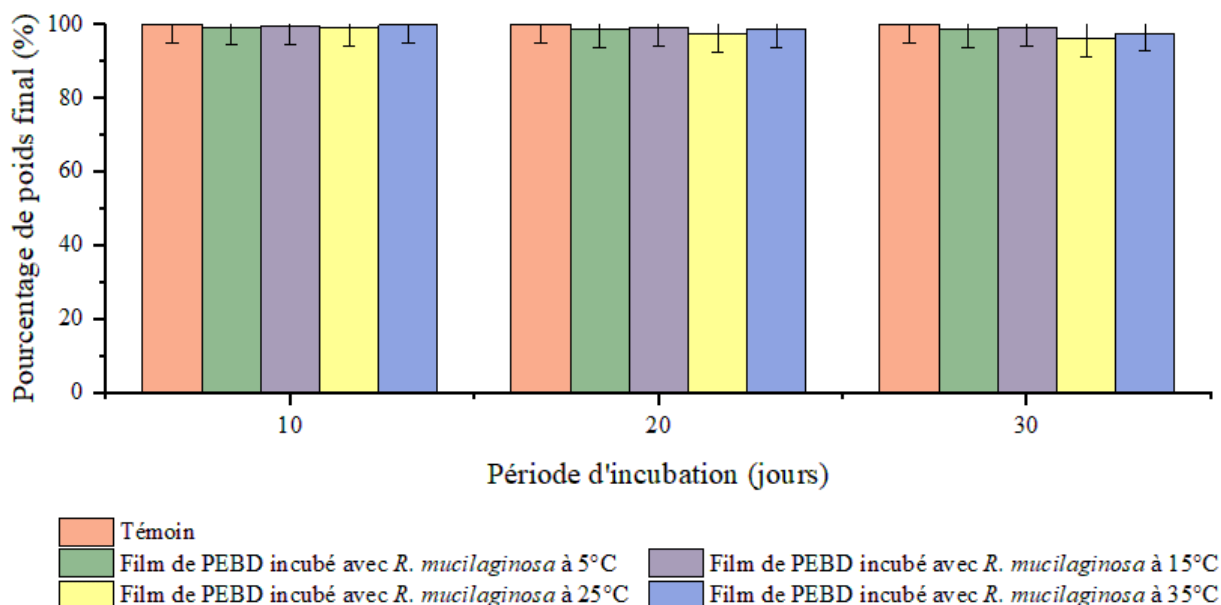
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 40. Pourcentages des poids finaux des films de PEBC en fonction de la température après 30 jours d'incubation avec: (A) *A. niger*, (B) *C. tropicalis*, (C) *P. hordei*, (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 1. 2. 5. Influence de la biomasse fongique

Les films de PEBC de 0.2 g ont été incubés dans un MML à pH 6 pendant 30 jours avec agitation continue à 25°C (pour *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa*) et à 35°C (pour *A. niger*) avec variation de la biomasse fongique (1, 3 et 5 disques) afin de déterminer son influence sur le processus de biodégradation. Les pourcentages des poids après incubation sont représentés dans la **figure 41**.

La **figure 41 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBC incubés avec *A. niger* à 1 disque (75×10^6 cellules/ml), 3 disques (225×10^6 cellules/ml) et 5 disques (375×10^6 cellules/ml). Le poids du film incubé avec un seul disque (1D) a diminué de 1.68 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant 11.45 %. Quant au film incubé avec 3 disques (3D), son poids a diminué de 3.10 %, 13.09 % et 14.96 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé avec 5 disques (5D) après 30 jours d'incubation, estimé à 17.21 %.

La **figure 41 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBC incubés avec *C. tropicalis* à 1 disque (86.25×10^6 cellules/ml), 3 disques (258.75×10^6 cellules/ml) et 5 disques (431.25×10^6 cellules/ml). Le poids du film incubé avec un seul disque (1D) a diminué de 0.95

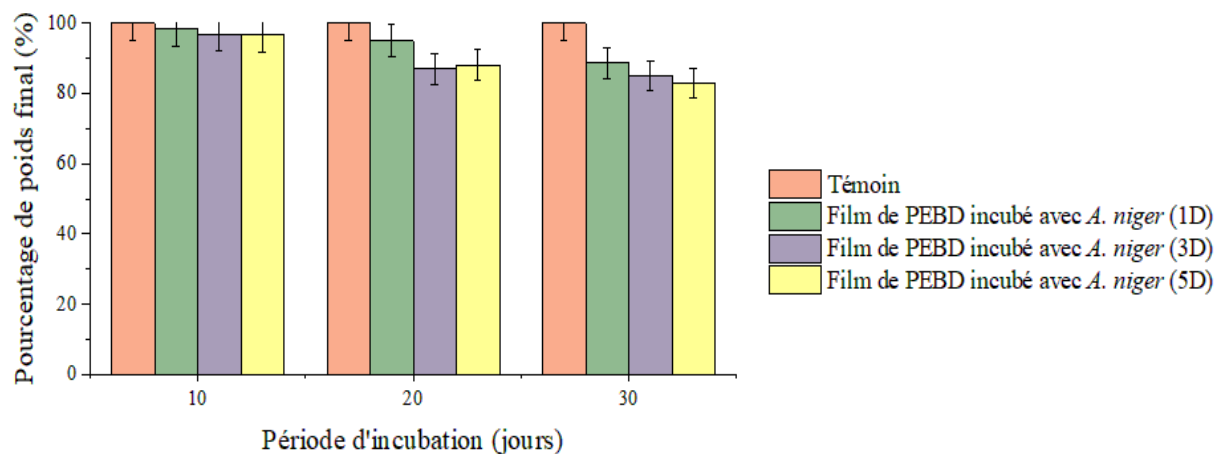
% après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant 4.18 %. Quant au film incubé avec 3 disques (3D), son poids a diminué de 1.25 %, 3.27 % et 6.23 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé avec 5 disques (5D) après 30 jours d'incubation, estimé à 7.60 %.

La **figure 41 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *P. hordei* à 1 disque (18.5×10^6 cellules/ml), 3 disques (55.5×10^6 cellules/ml) et 5 disques (92.5×10^6 cellules/ml). Le poids du film incubé avec un seul disque (1D) a diminué de 1.02 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 5.08 %. Quant au film incubé avec 3 disques (3D), son poids a diminué de 1.75 %, 4.83 % et 6.75 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé avec 5 disques (5D) après 30 jours d'incubation, estimé à 7.77 %.

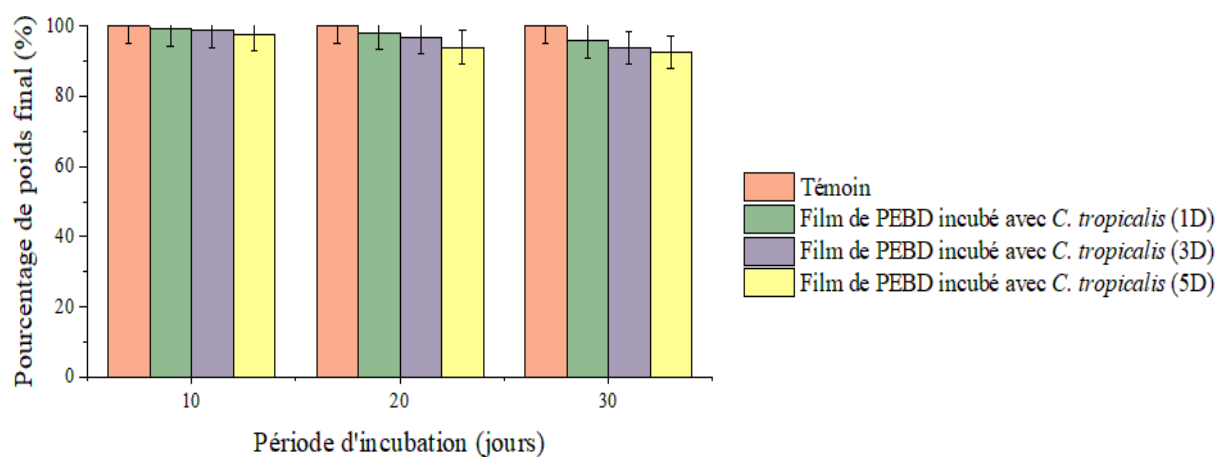
La **figure 41 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* à 1 disque (9×10^6 cellules/ml), 3 disques (27×10^6 cellules/ml) et 5 disques (45×10^6 cellules/ml). Le poids du film incubé avec un seul disque (1D) a diminué de 7.88 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 20.06 %. Quant au film incubé avec 3 disques (3D), son poids a diminué de 8.96 %, 17.63 % et 22.36 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé avec 5 disques (5D) après 30 jours d'incubation, estimé à 23.77 %.

La **figure 41 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. mucilaginosus* à 1 disque (83×10^6 cellules/ml), 3 disques (249×10^6 cellules/ml) et 5 disques (415×10^6 cellules/ml). Le poids du film incubé avec un seul disque (1D) a diminué de 0.88 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant 3.50 %. Quant au film incubé avec 3 disques (3D), son poids a diminué de 1.10 %, 3.29 % et 4.86 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le pourcentage de perte de poids le plus élevé a été observé pour le film incubé avec 5 disques (5D) après 30 jours d'incubation, estimé à 5.53 %.

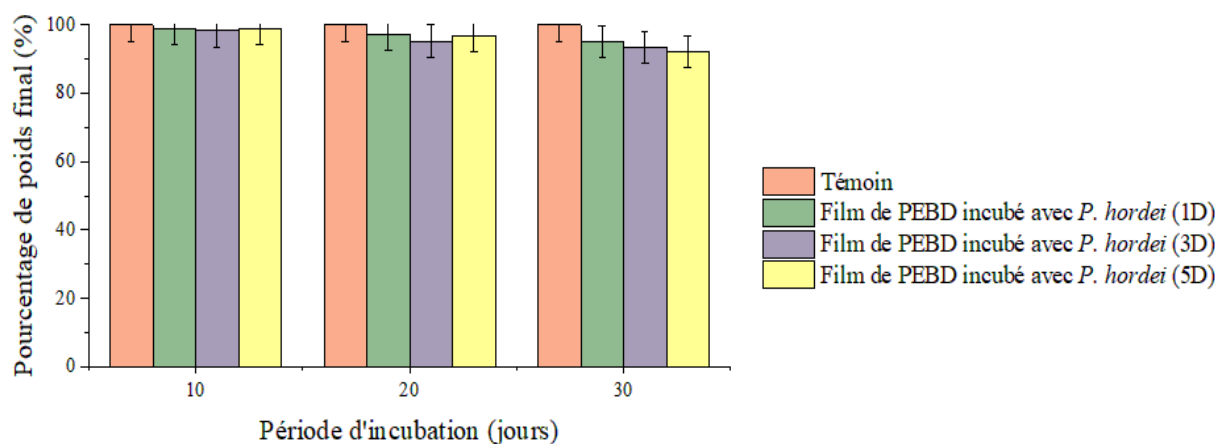
Cependant, aucun changement de poids n'a été observé dans les films témoins.



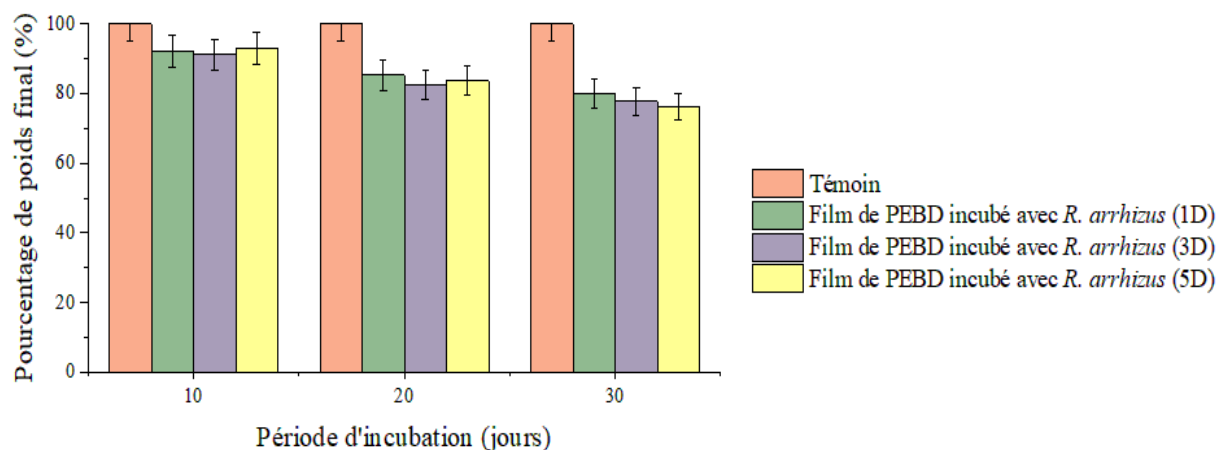
(A)



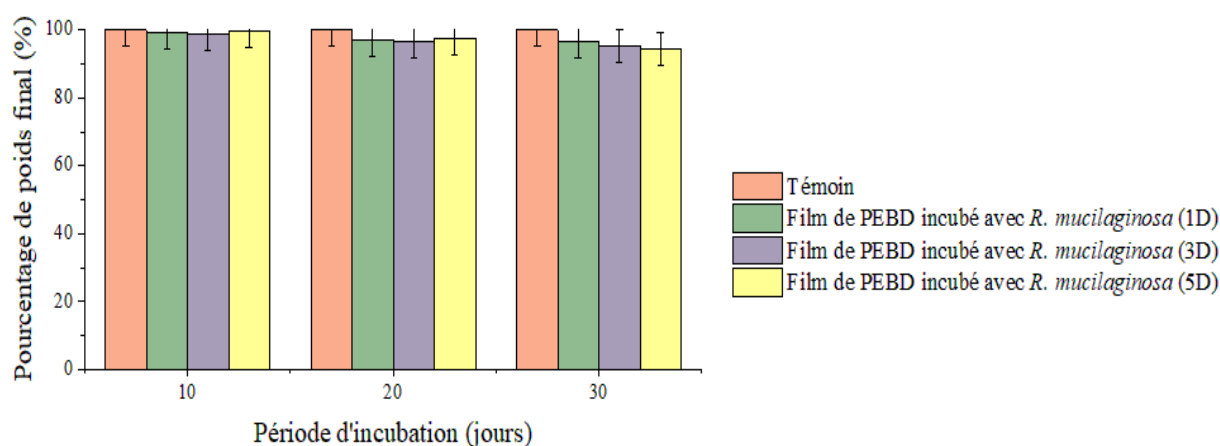
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 41. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation en fonction de la biomasse fongique de: (A) *A. niger*, (B) *C. tropicalis*, (C) *P. hordei*, (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 1. 2. 6. Influence de la composition du milieu: Milieu Czapek Dox

Les films de PEBD de 0.2 g ont été incubés avec les espèces fongiques sélectionnées dans un milieu contenant une source de carbone (saccharose), bouillon Czapek Dox, de pH 6, avec agitation continue pendant 30 jours afin de déterminer l'influence de la composition du milieu sur le processus de biodégradation. Les pourcentages des poids finaux sont représentés dans la **figure 42**.

Une très faible perte de poids des films de PEBD a été observée après un mois d'incubation avec les isolats fongiques. Le pourcentage de perte de poids du film incubé avec *P. hordei* a été le plus faible avec 0.31 %, suivi de ceux des films incubés avec *R. mucilaginosa* et *C. tropicalis*, avec 0.34 % et 0.37 %, respectivement. Par ailleurs, le poids des films incubés avec *A. niger* et

R. arrhizus a diminué de 0.41 % et 0.50 %, respectivement. Quant au témoin, aucun changement de poids n'a été observé.

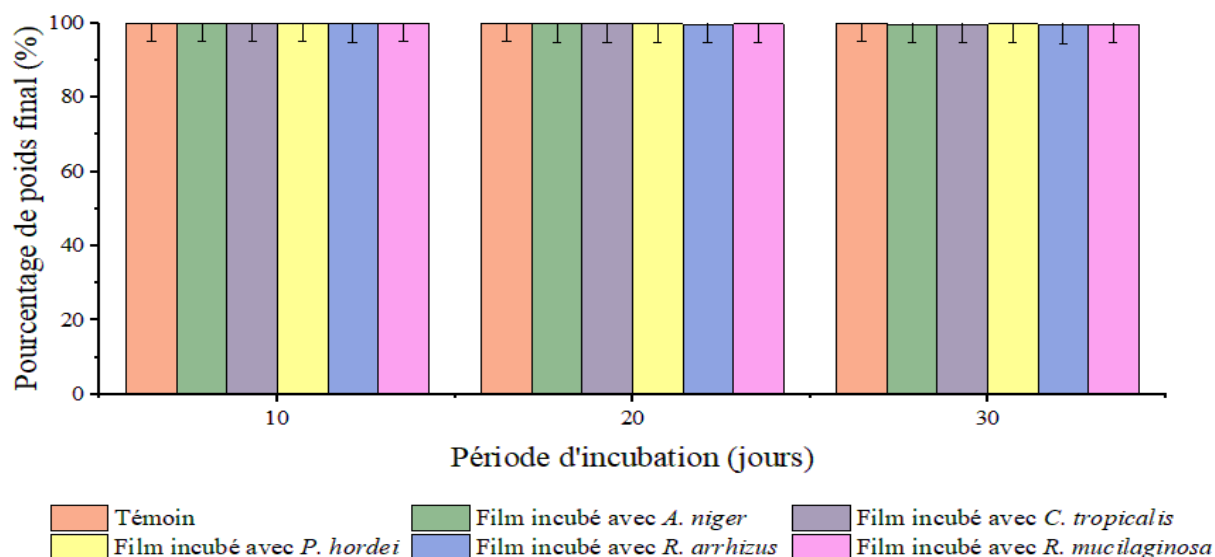


Figure 42. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans le milieu Czapek avec *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa*, comparés au témoin

4. 1. 2. 7. Influence des caractéristiques du polymère

Les films de PEBD2 de 0.2 g ont été incubés avec les isolats fongiques sélectionnés dans un MML à pH 6 pendant 30 jours avec agitation continue afin d'évaluer la capacité des espèces identifiées à dégrader des films d'un autre sac plastique (PEBD2). Les pourcentages des poids finaux des films après incubation avec les isolats fongiques sont représentés dans la **figure 43**. Le pourcentage de perte de poids du film incubé avec *A. niger* est estimé à 2.20 %, 5.44 % et 8.52 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement. Quant au film incubé avec *R. arrhizus*, la perte de poids n'a été constatée qu'après un mois d'incubation, atteignant 5 %. Cependant, de faibles pourcentages de perte de poids estimés à 0.42 %, 0.75 % et 0.61 %, ont été observés, respectivement, pour les films incubés avec *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*. D'autre part, le poids du film témoin n'a pas changé.

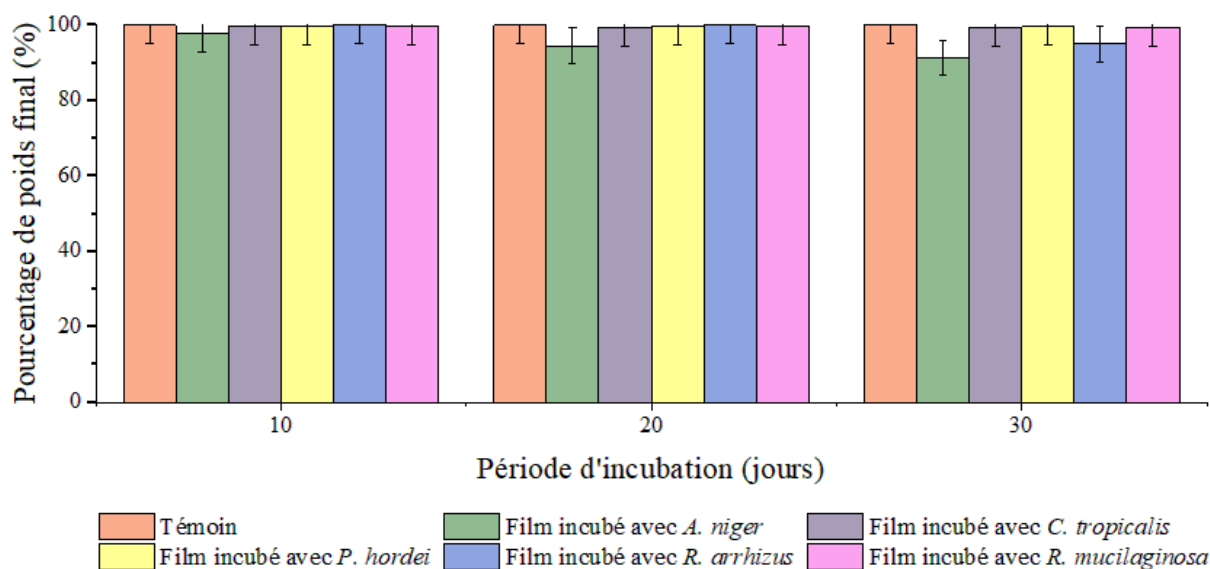


Figure 43. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD2 après 30 jours d'incubation dans un MML avec *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa*, comparés au témoin

4. 1. 3. Biodégradation sur milieu minimum liquide dans une culture continue

Les films de PEBD (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) ont été incubés avec l'isolat fongique *R. arrhizus* dans une culture continue pendant 90 jours. La perte de poids de chaque film a été évaluée à l'aide d'une balance analytique après 10, 20, 30, 60 et 90 jours d'incubation (**Figures 44 et 45**).

Le poids du film témoin n'a pas changé. Cependant, tous les films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* ont montré une perte de poids pendant toute la période d'incubation. Après 10 jours d'incubation, les poids des films F1, F2, F3, F4, F5 et F6 ont diminué, respectivement, de 5.80 %, 2.45 %, 7.85 %, 3.44 %, 9.43 % et 10 %. Après 20 jours, le poids de chaque film a continué à diminuer. Après un mois, F5 a montré le pourcentage de perte de poids le plus élevé avec 25.61 %, tandis que le poids de F1, F2, F3 et F6 a diminué de 23.91 %, 17.74 %, 23.59 % et 25.56 %, respectivement. Cependant, le pourcentage de perte de poids le plus faible (11.67 %) a été observé pour le film F4.

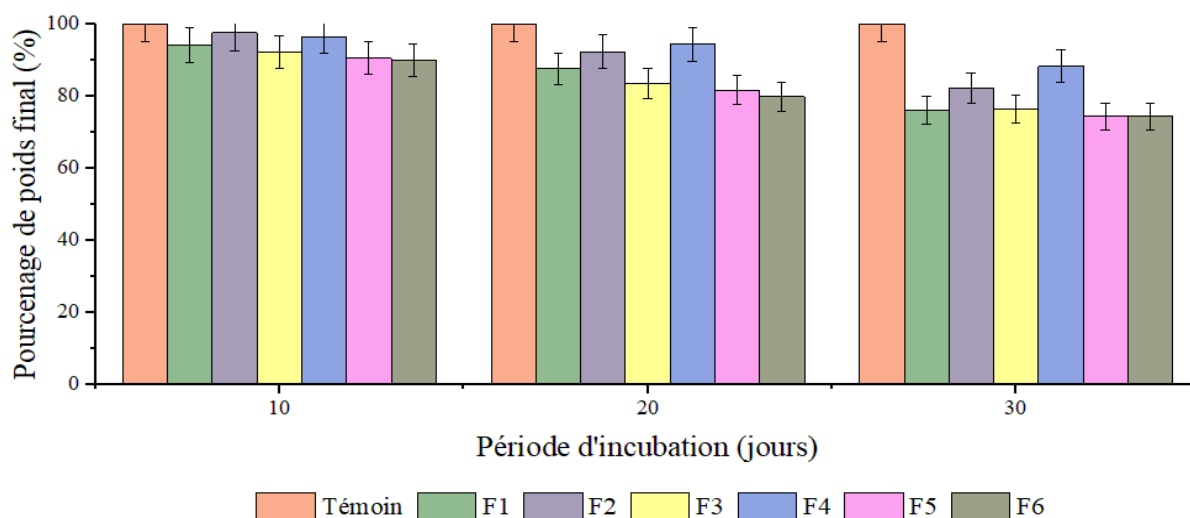


Figure 44. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) après 30 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans une culture continue, comparés au témoin

L'évaluation de la biodégradation des films de PEBD après trois mois d'incubation avec *R. arrhizus* dans une culture continue a révélé une véritable perte de poids tout au long de la période d'incubation. Après deux mois, le poids de F1, F2, F3, F4, F5 et F6 a diminué, respectivement, de 24.75 %, 20.09 %, 24.19 %, 12.88 %, 28.80 % et 25.75 %. Après trois mois, F5 a montré le pourcentage de perte de poids le plus élevé avec 29.74 %, tandis que le poids de F1, F2, F3 et F6 a diminué de 24.80 %, 27.76 %, 25.41 % et 26.03 %, respectivement. En outre, F4 a présenté le pourcentage de perte de poids le plus faible estimé à 16.50 % (**Figure 45**). Cette diminution de poids a été attribuée à plusieurs facteurs inhérents, notamment la régénération des nutriments qui permettent à l'isolat fongique une croissance active et assurent une production continue d'enzymes de dégradation, l'élimination des produits de dégradation et des métabolites inhibiteurs, ainsi que le maintien et la prolongation des conditions optimales. La culture continue a offert un environnement dynamique et stable, propice à une dégradation prolongée et continue des films de PEBD par l'espèce fongique.

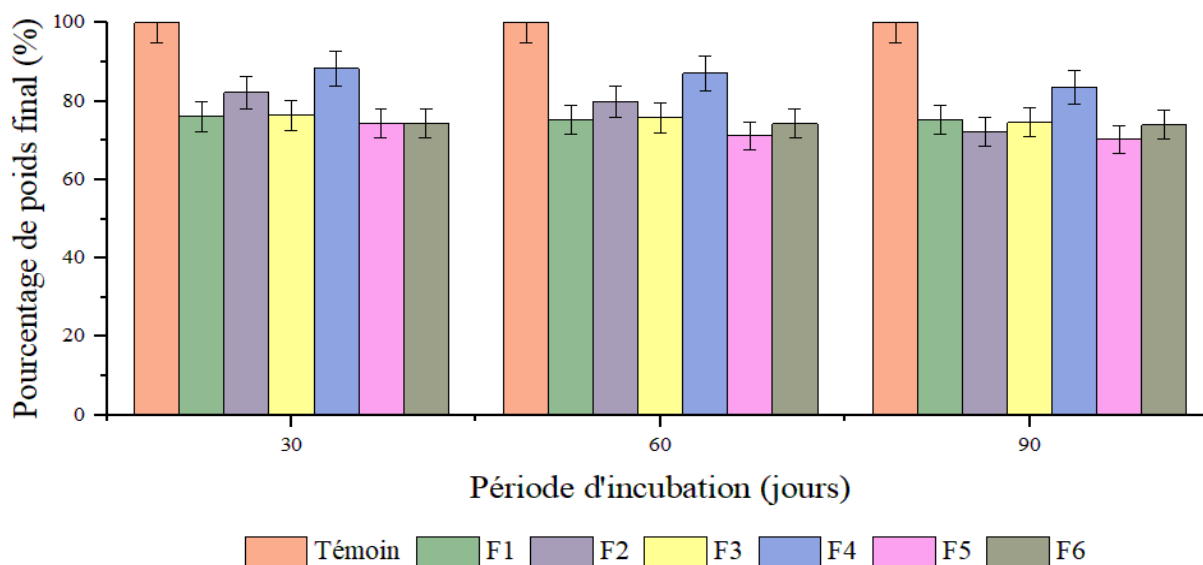


Figure 45. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD (F1, F2, F3, F4, F5 et F6) après 90 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans une culture continue, comparés au témoin

4. 2. Biodégradation ex situ

Les tests de biodégradation ont également été réalisés *ex situ* pour évaluer la capacité des espèces sélectionnées à dégrader les films de PEBD dans des milieux naturels : eau de mer, eau du robinet et dans un échantillon de sol.

4. 2. 1. Eau de mer

Les films de PEBD de 0.2 g ont été incubés avec les isolats fongiques dans l'eau de mer à pH 7.50 pendant 30 jours sans agitation du milieu et à température ambiante. Les pourcentages des poids finaux après incubation sont représentés dans la **figure 46**.

La **figure 46 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *A. niger* dans l'eau de mer stérile (EMS) et non stérile (EMNS). Le poids du film incubé dans l'EMS a diminué de 0.10 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 1.90 %. Quant au film incubé dans l'EMNS, son poids a diminué de 0.05 %, 0.33 % et 2.26 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

La **figure 46 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *C. tropicalis* dans l'eau de mer stérile (EMS) et non stérile (EMNS). Après 10 jours d'incubation, aucun changement de poids n'a été observé pour le film incubé dans l'EMS. Cependant, il a diminué de 0.09 % et 0.19 après 20 et 30 jours d'incubation, respectivement. Par ailleurs, le

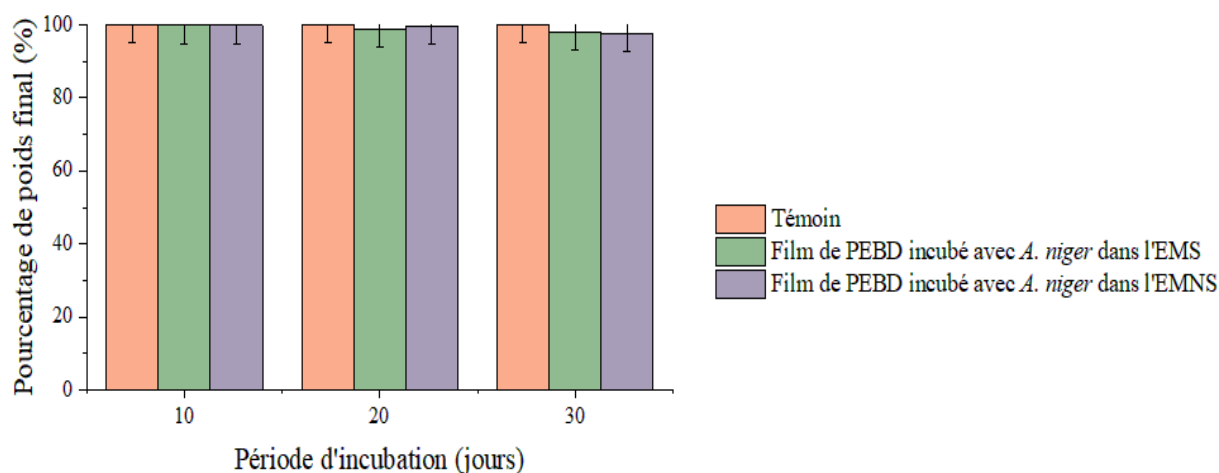
pois du film incubé dans l'EMNS a diminué après 20 jours d'incubation de 0.19 %, atteignant 0.42 % après un mois.

La **figure 46 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *P. hordei* dans l'eau de mer stérile (EMS) et non stérile (EMNS). Après 10 jours d'incubation, le poids du film incubé dans l'EMS n'a pas changé. Par ailleurs, il a diminué, respectivement, de 0.25 % et 0.44 % après 20 et 30 jours d'incubation. Quant au film incubé dans l'EMNS, son poids a diminué de 0.09 %, 0.42 % et 0.47 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

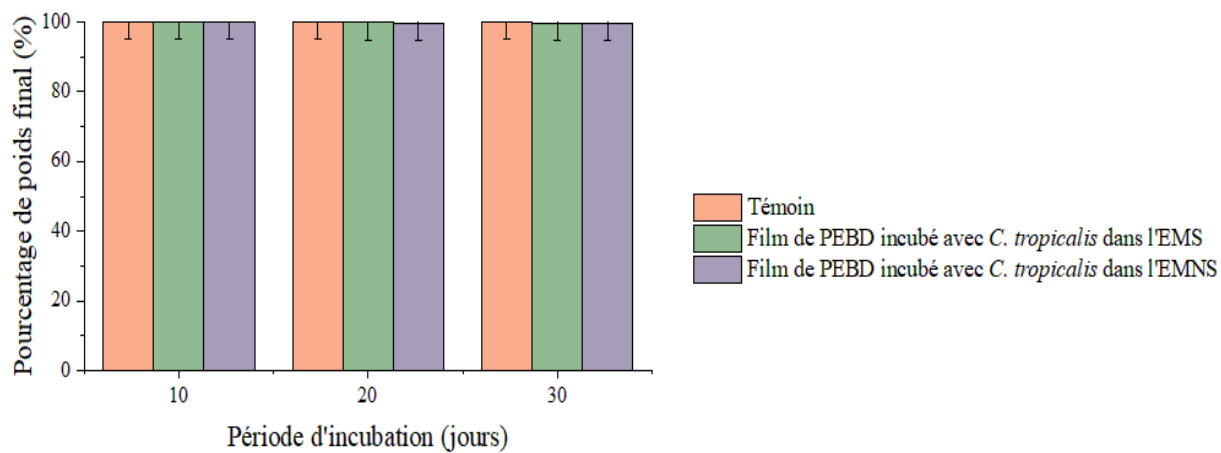
La **figure 46 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* dans l'eau de mer stérile (EMS) et non stérile (EMNS). Le poids du film incubé dans l'EMS a diminué de 0.20 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 2.50 %. Quant au film incubé dans l'EMNS, son poids a diminué de 0.14 %, 1.81 % et 2.74 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

La **figure 46 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. mucilaginosa* dans l'eau de mer stérile (EMS) et non stérile (EMNS). Le poids du film incubé dans l'EMS a diminué de 0.19 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 0.81 %. Quant au film incubé dans l'EMNS, son poids a diminué de 0.24 %, 0.66 % et 0.95 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

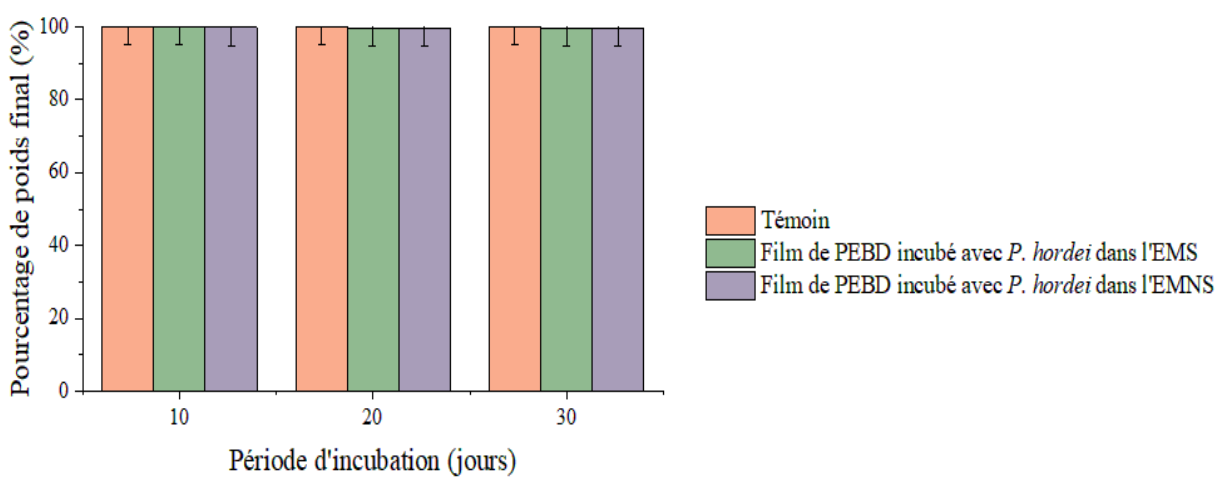
Cependant, aucune perte de poids n'a été observée dans les films témoins.



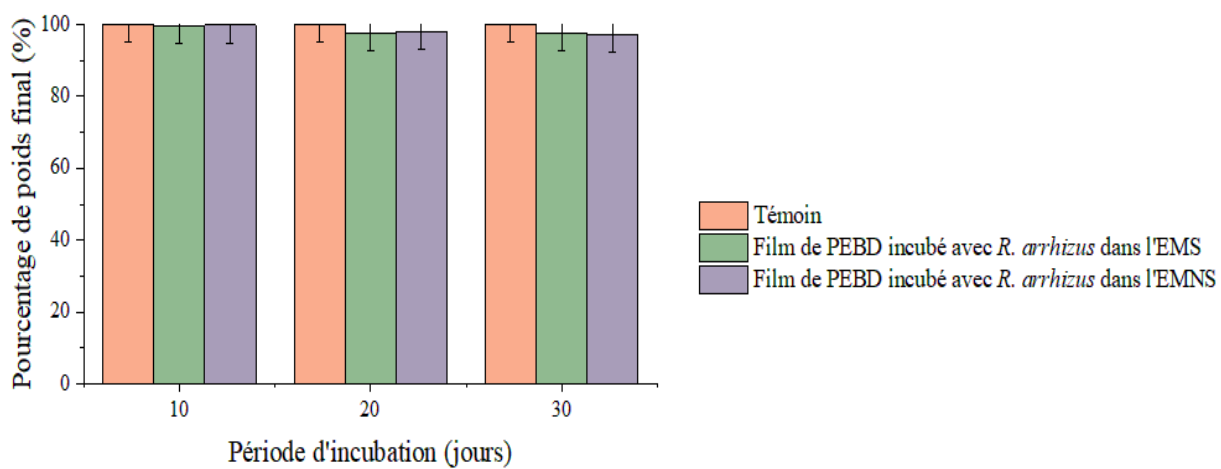
(A)



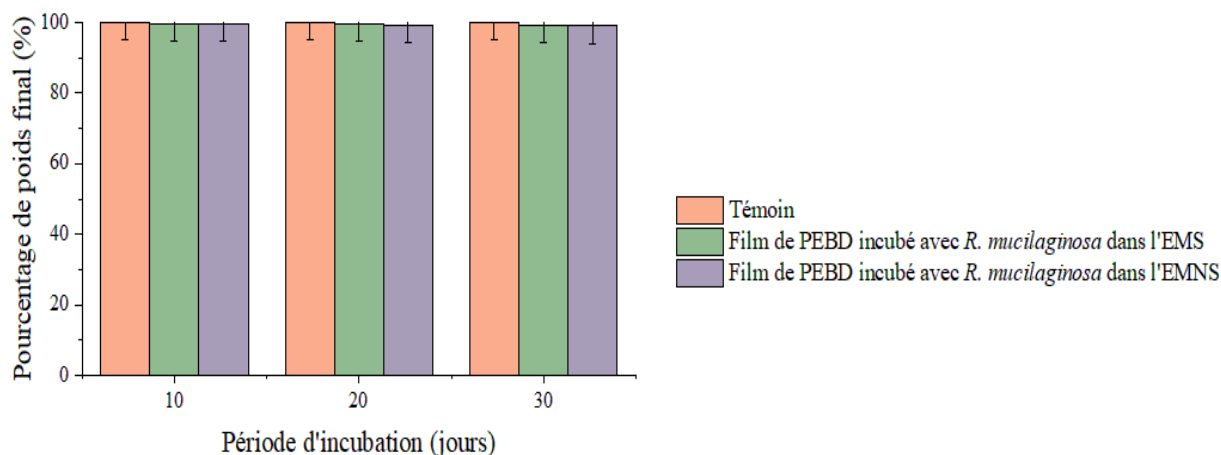
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 46. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans l'eau de mer stérile et non stérile avec: (A) *A. niger* ; (B) *C. tropicalis* ; (C) *P. hordei* ; (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginoso*, comparés aux témoins

4. 2. 2. Eau du robinet

Les films de PEBD de 0.2 g ont été incubés avec les isolats fongiques dans l'eau du robinet à pH 6.88 pendant 30 jours sans agitation du milieu et à température ambiante. Les pourcentages des poids finaux après incubation sont représentés dans la **figure 47**.

La **figure 47 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *A. niger* dans l'eau du robinet stérile (ERS) et non stérile (ERNS). Le poids du film incubé dans l'ERS a diminué de 0.05 % après 10 jours d'incubation, atteignant 1.72 % après un mois. Quant au film incubé dans l'ERNS, son poids a diminué de 0.24 %, 0.62 % et 1.81 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

La **figure 47 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *C. tropicalis* dans l'eau du robinet stérile (ERS) et non stérile (ERNS). Après 10 jours d'incubation, aucun changement de poids du film incubé dans l'ERS n'a été observé. Cependant, il a faiblement diminué de 0.15 % et 0.24 % après 20 et 30 jours d'incubation, respectivement. Par ailleurs, le poids du film incubé dans l'ERNS a diminué de 0.14 %, 0.33 % et 0.57 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

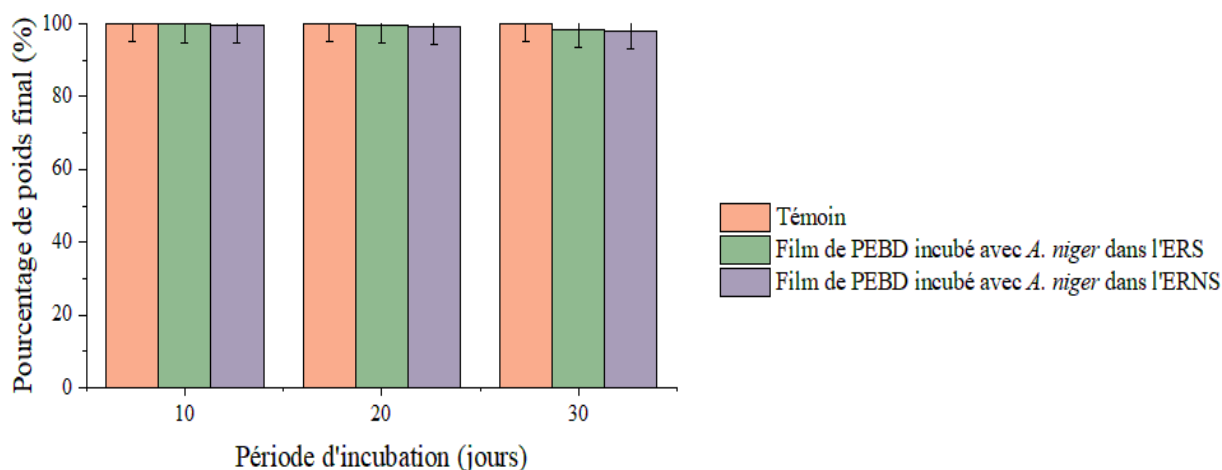
La **figure 47 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *P. hordei* dans l'eau du robinet stérile (ERS) et non stérile (ERNS). Une faible réduction de poids du film incubé dans l'ERS, estimée à 0.10 %, a été observée après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué après 20 jours d'incubation (0.49%) atteignant un pourcentage de 0.68

% après un mois. Quant au film incubé dans l'ERNS, son poids a diminué de 0.28 %, 0.55 % et 0.74 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

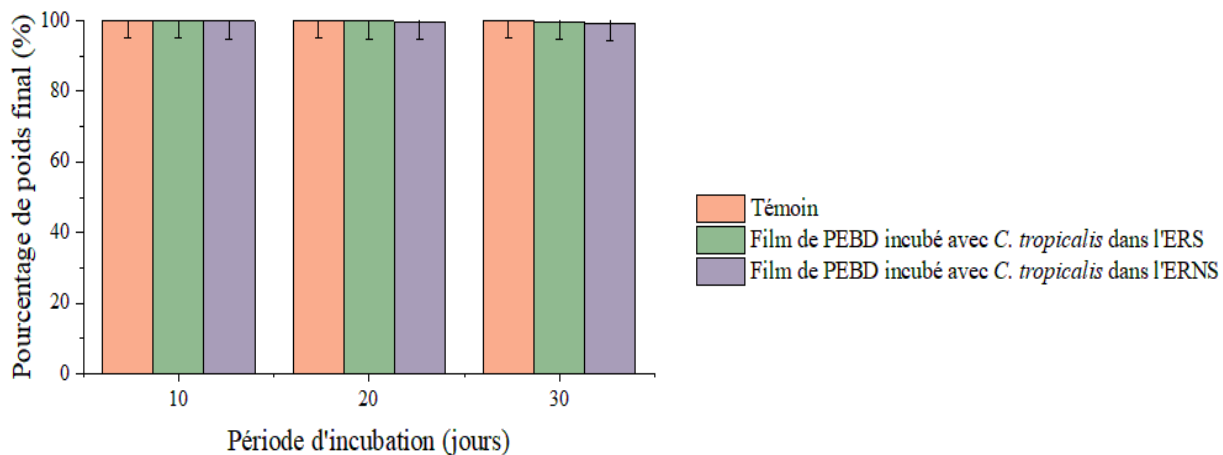
La **figure 47 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* dans l'eau du robinet stérile (ERS) et non stérile (ERNS). Une très faible perte de poids du film incubé dans l'ERS a été observée après 10 jours d'incubation, estimée à 0.05 %. Cette réduction de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 1.39 %. Quant au film incubé dans l'ERNS, son poids a diminué de 0.14 %, 0.28 % et 2.22 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement.

La **figure 47 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. mucilaginosa* dans l'eau du robinet stérile (ERS) et non stérile (ERNS). Une très faible perte de poids du film incubé dans l'ERS, estimée à 0.05 %, a été observée après 10 jours d'incubation, atteignant un pourcentage de 0.19 % après un mois. Quant au film incubé dans l'ERNS, son poids a diminué de 0.05 %, 0.28 % et 0.46 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

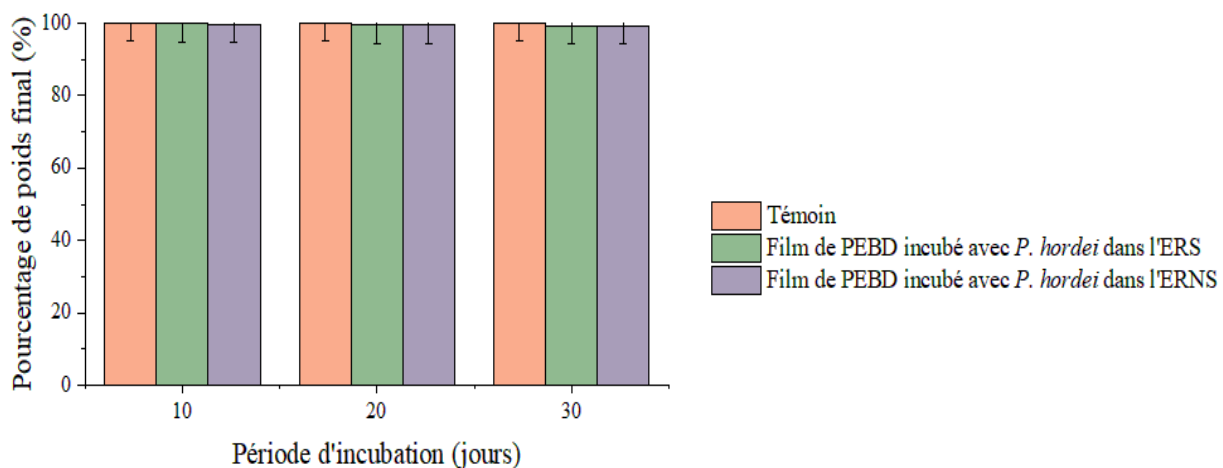
Cependant, aucune perte de poids n'a été observée dans les films témoins.



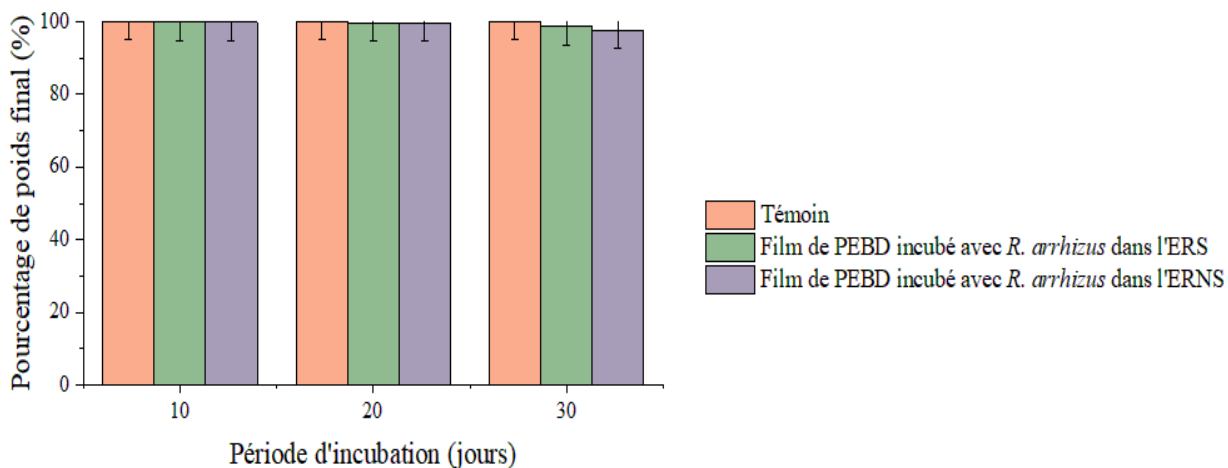
(A)



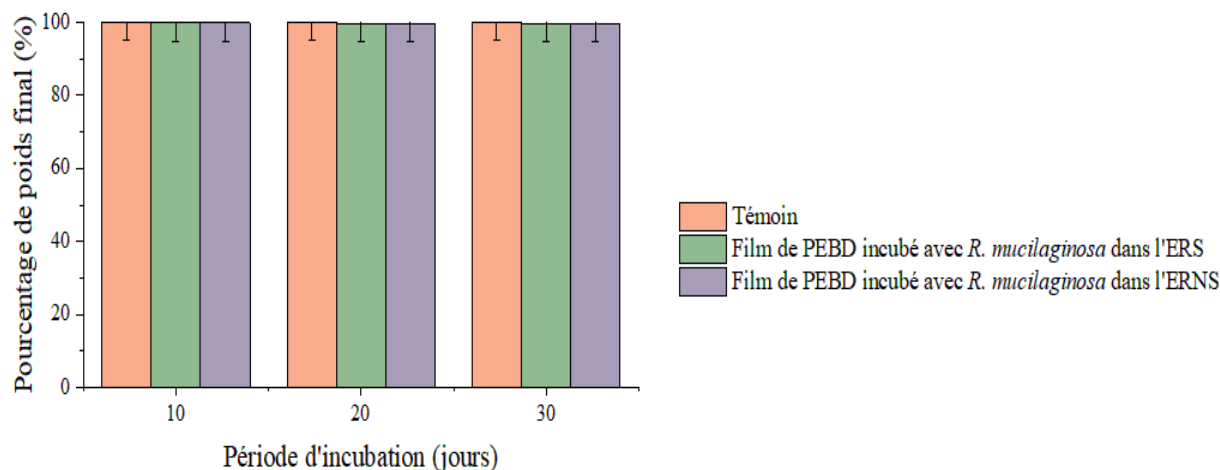
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 47. Pourcentages des poids finaux des films de PEBD après 30 jours d'incubation dans l'eau du robinet stérile et non stérile avec: (A) *A. niger* ; (B) *C. tropicalis* ; (C) *P. hordei* ; (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 2. 3. Sol

Les films de PEBD de 0.2 g ont été incubés avec les isolats fongiques dans un échantillon de sol pendant 30 jours sans agitation du milieu et à température ambiante. Les pourcentages des poids finaux sont représentés dans la **figure 48**.

La **figure 48 (A)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *A. niger* dans un échantillon de sol stérile (SS) et non stérile (SNS). Le poids du film incubé dans le SS a diminué de 0.10 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 1.03 %. Quant au film incubé dans le SNS, son poids n'a diminué qu'après 20 jours d'incubation de 0.18 %, atteignant 1.11 % après un mois.

La **figure 48 (B)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *C. tropicalis* dans un échantillon de sol stérile (SS) et non stérile (SNS). Après 10 jours d'incubation dans le SS, aucun changement de poids n'a été observé. Cependant, il a légèrement diminué de 0.15 % et 0.20 % après 20 et 30 jours, respectivement. Par ailleurs, le poids du film incubé dans le SNS a diminué de 0.09 %, 0.37 % et 0.75 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

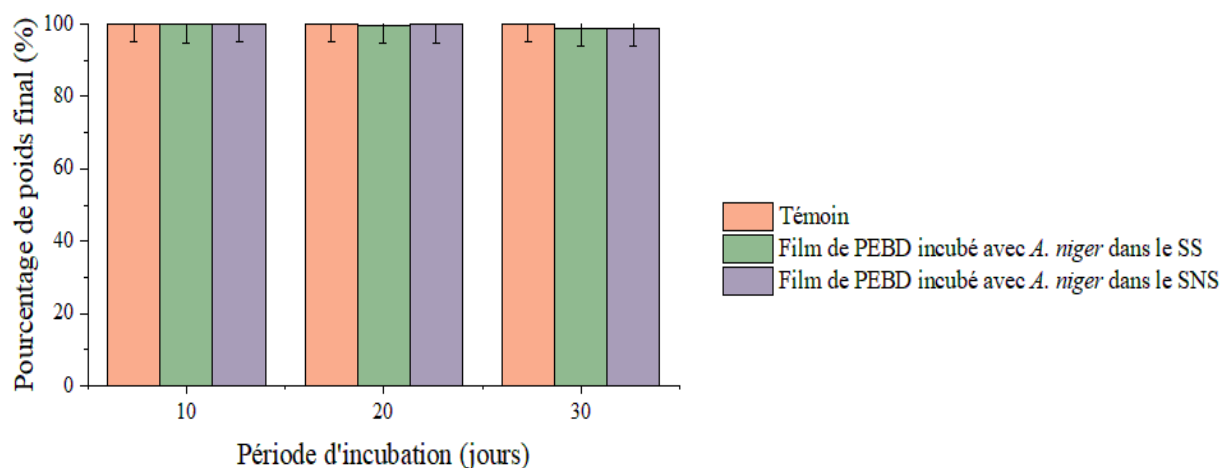
La **figure 48 (C)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *P. hordei* dans un échantillon de sol stérile (SS) et non stérile (SNS). Le poids du film incubé dans le SS a diminué de 0.10 % après 10 jours d'incubation, atteignant 0.20 % après un mois. Quant

au film incubé dans le SNS, son poids a diminué de 0.14 %, 0.37 % et 0.51 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

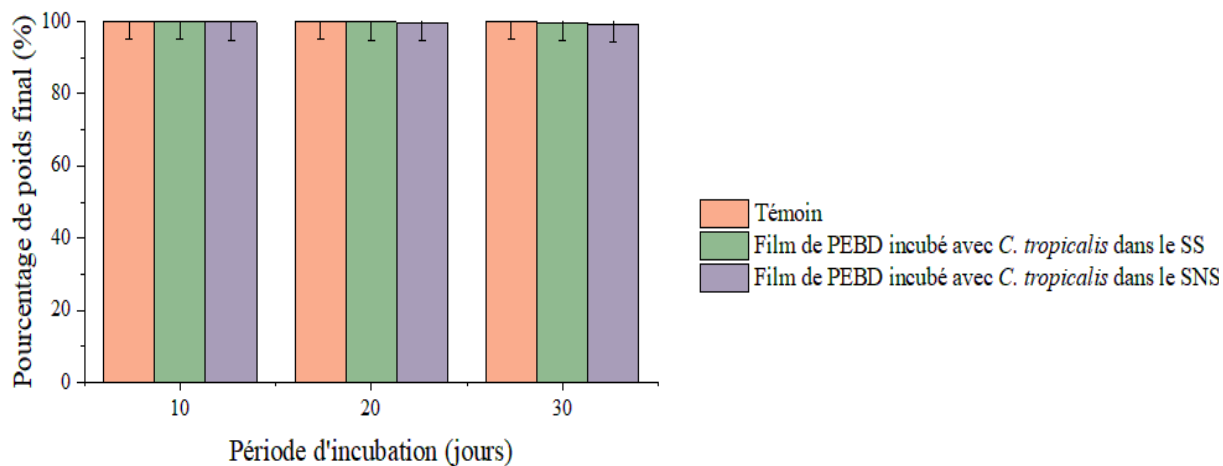
La **figure 48 (D)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* dans un échantillon de sol stérile (SS) et non stérile (SNS). Le poids du film incubé dans le SS a diminué de 0.10 % après 10 jours d'incubation. Cette perte de poids a continué jusqu'au 30^{ème} jour, atteignant un pourcentage de 2.05 %. Quant au film incubé dans le SNS, son poids a diminué de 0.05 %, 0.33 % et 2.19 % après 10, 20 et 30 jours, respectivement,

La **figure 48 (E)** montre les pourcentages des poids finaux des films de PEBD incubés avec *R. mucilaginosa* dans un échantillon de sol stérile (SS) et non stérile (SNS). Une faible perte de poids du film incubé dans le SS, estimée à 0.10 %, a été observée après 10 jours d'incubation et a atteint un pourcentage de 0.25 % après un mois. Quant au film incubé dans le SNS, son poids a diminué de 0.19 %, 0.47 % et 0.66 % après 10, 20 et 30 jours d'incubation, respectivement.

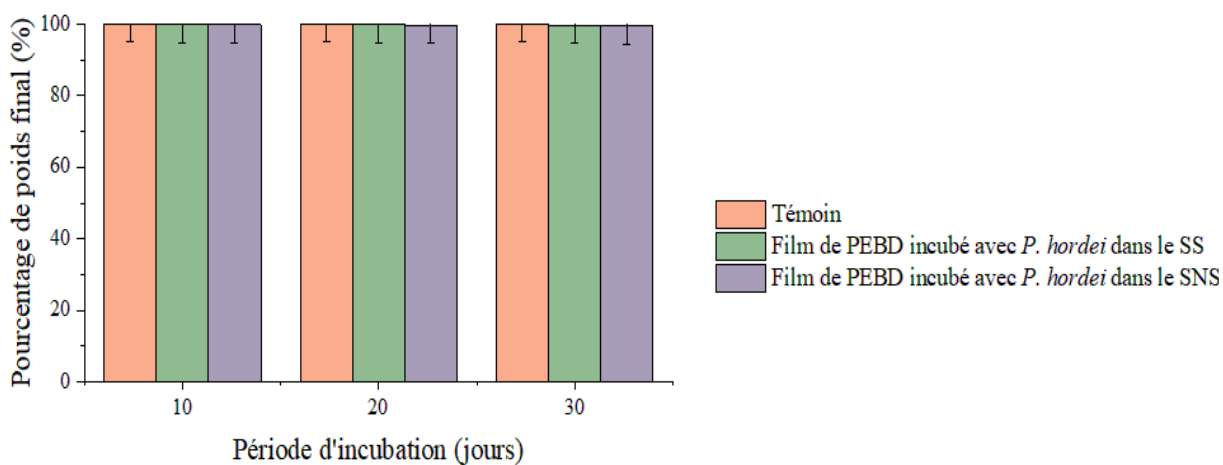
Cependant, aucune variation de poids n'a été observée dans les films témoins.



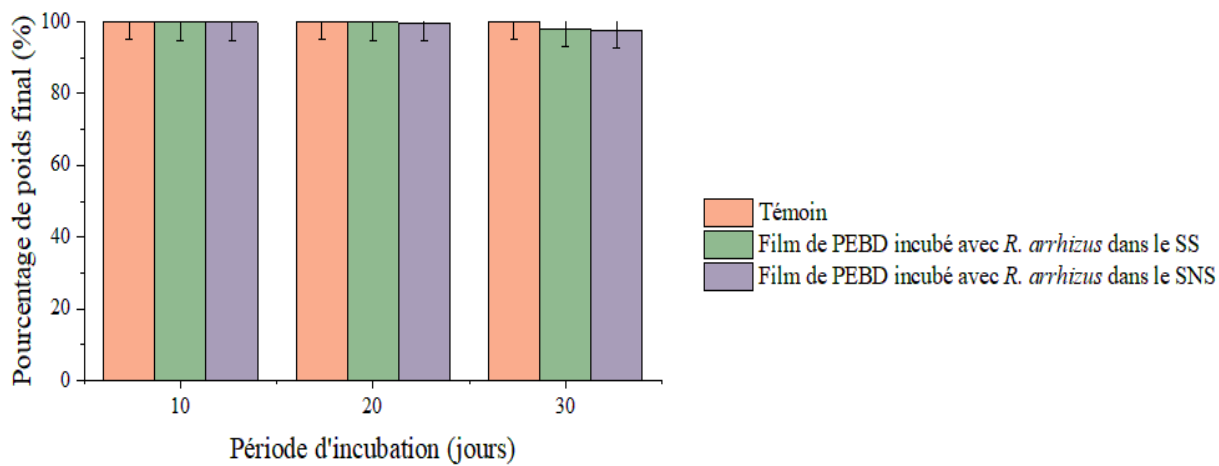
(A)



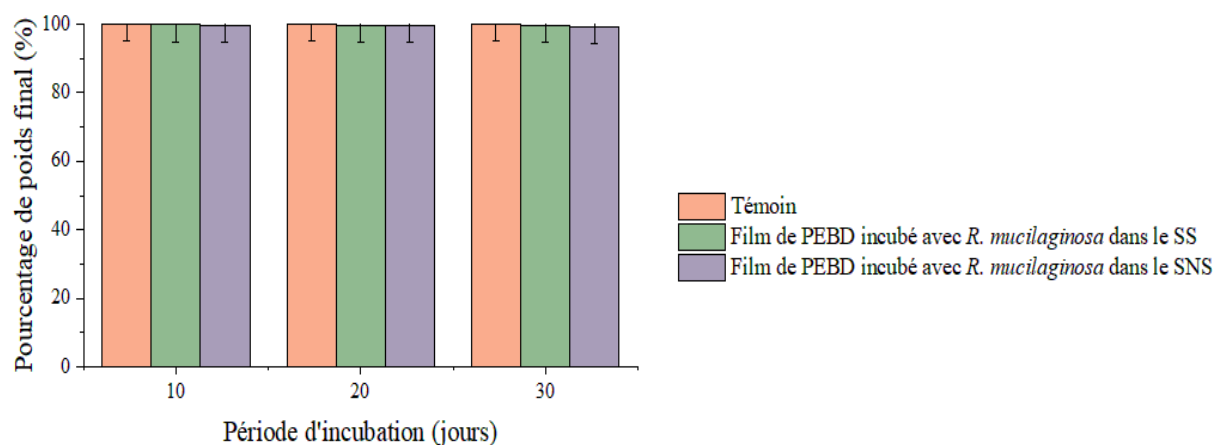
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 48. Pourcentages des poids finaux des films de PEBC après 30 jours d'incubation dans un échantillon de sol stérile et non stérile avec: (A) *A. niger* ; (B) *C. tropicalis* ; (C) *P. hordei* ; (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés aux témoins

4. 3. Suivi de la biodégradation des films de PEBC après trois mois d'incubation *in vitro* et *ex situ*

La biodégradation des films de PEBC a été évaluée après deux et trois mois d'incubation *in vitro* et *ex situ* dans des cultures discontinues (**Tableau 15**). Les résultats obtenus ont montré qu'au-delà d'un mois d'incubation, aucune perte de poids n'a été observée. Cela a été attribué à la saturation des sites actifs (zones amorphes, extrémités des chaînes polymériques, etc.), à l'épuisement des nutriments dans le milieu, et/ou à l'inhibition de l'activité enzymatique ou de la croissance fongique par les produits de dégradation sécrétés pendant le premier mois.

Tableau 15. Pourcentages de perte de poids des films de PEBC incubés avec *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa* pendant trois mois *in vitro* et *ex situ*

Tests	Cultures	Isolats fongiques	% de perte après 1 mois	% de perte après 2 mois	% de perte après 3 mois
<i>In vitro</i>	Discontinue (en batch)	<i>A. niger</i>	17.21	17.21	17.21
		<i>C. tropicalis</i>	7.60	7.60	7.60
		<i>P. hordei</i>	7.77	7.77	7.77
		<i>R. arrhizus</i>	23.77	23.77	23.77
		<i>R. mucilaginosa</i>	5.53	5.53	5.53

		<i>A. niger</i>	1.90 / 2.26	1.90 / 2.26	1.90 / 2.26
	Discontinue (Eau de mer stérile/ non stérile)	<i>C. tropicalis</i>	0.19 / 0.42	0.19 / 0.42	0.19 / 0.42
		<i>P. hordei</i>	0.44 / 0.47	0.44 / 0.47	0.44 / 0.47
		<i>R. arrhizus</i>	2.50 / 2.74	2.50 / 2.74	2.50 / 2.74
		<i>R. mucilaginosa</i>	0.81 / 0.95	0.81 / 0.95	0.81 / 0.95
		<i>A. niger</i>	1.72 / 1.81	1.72 / 1.81	1.72 / 1.81
<i>Ex situ</i>	Discontinue (Eau du robinet stérile/non stérile)	<i>C. tropicalis</i>	0.24 / 0.57	0.24 / 0.57	0.24 / 0.57
		<i>P. hordei</i>	0.68 / 0.74	0.68 / 0.74	0.68 / 0.74
		<i>R. arrhizus</i>	1.39 / 2.22	1.39 / 2.22	1.39 / 2.22
		<i>R. mucilaginosa</i>	0.19 / 0.46	0.19 / 0.46	0.19 / 0.46
		<i>A. niger</i>	1.03 / 1.11	1.03 / 1.11	1.03 / 1.11
	Discontinue (sol stérile/non stérile)	<i>C. tropicalis</i>	0.20 / 0.75	0.20 / 0.75	0.20 / 0.75
		<i>P. hordei</i>	0.20 / 0.51	0.20 / 0.51	0.20 / 0.51
		<i>R. arrhizus</i>	2.05 / 2.19	2.05 / 2.19	2.05 / 2.19
		<i>R. mucilaginosa</i>	0.25 / 0.66	0.25 / 0.66	0.25 / 0.66
		<i>A. niger</i>	1.03 / 1.11	1.03 / 1.11	1.03 / 1.11

5. Confirmation de la biodégradation

Afin de confirmer la biodégradation des films de PEBD par les isolats fongiques sélectionnés, ces polymères ont été analysés par microscopie électronique à balayage afin de détecter tout changement de surface, par spectroscopie infrarouge pour identifier toute altération de leur structure chimique, et par diffractométrie des rayons X pour détecter d'éventuels changements dans la structure cristalline du polymère induits par le processus de biodégradation.

5. 1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

5. 1. 1. Observations des films de PEBD sous microscope électronique à balayage

Les films de PEBD ont été soumis à des grossissements de 1000x, 1500x et 2000x sous microscope électronique à balayage afin d'observer la morphologie de la surface avant et après la dégradation.

L'observation des films témoins a montré une surface lisse sans changements apparents à tous les niveaux de grossissement (**Figure 49**). Quant aux films incubés avec les isolats fongiques, sous différentes conditions, ils ont montré diverses altérations telles que la rugosité de la surface (couche endommagée) (**Figures 50-62**).

En effet, l'adhésion et la pénétration fongiques ont été observées par la présence de spores et de fragments d'hyphes. Cependant, une érosion superficielle avec des aspects ridés et la formation de cavités sur la surface des films fortement perforés ont été remarquées. De plus, la présence de structures ressemblant à des fibres, des signes évidents de plissement et de piqûres visibles sous forme de fissures, de rainures, de trous et de crevasses a également été observée. Ainsi, l'évidente rupture des structures fibreuses à de nombreux endroits suggère que la chaîne carbonée du polyéthylène a été brisée (décomposée) par des actions fongiques. Il s'agit de critères typiques associés à la biodégradation du PEBD.

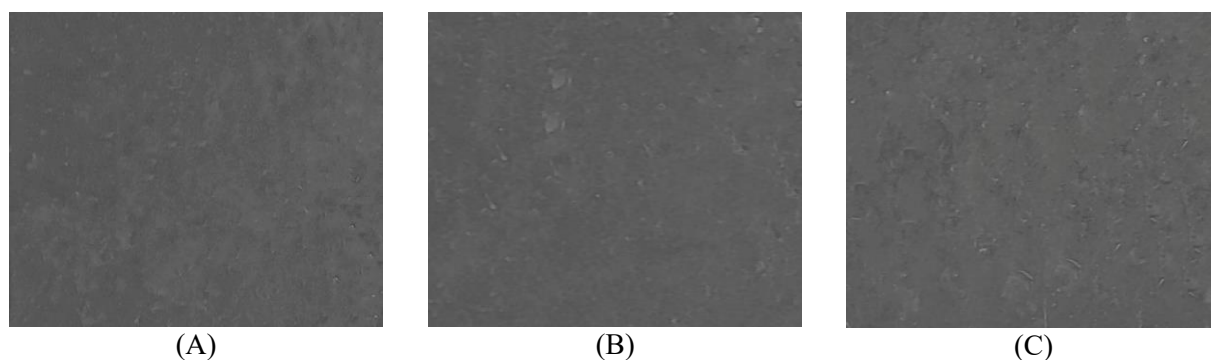


Figure 49. Observation du film témoin de PEBD sous microscope électronique à balayage aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

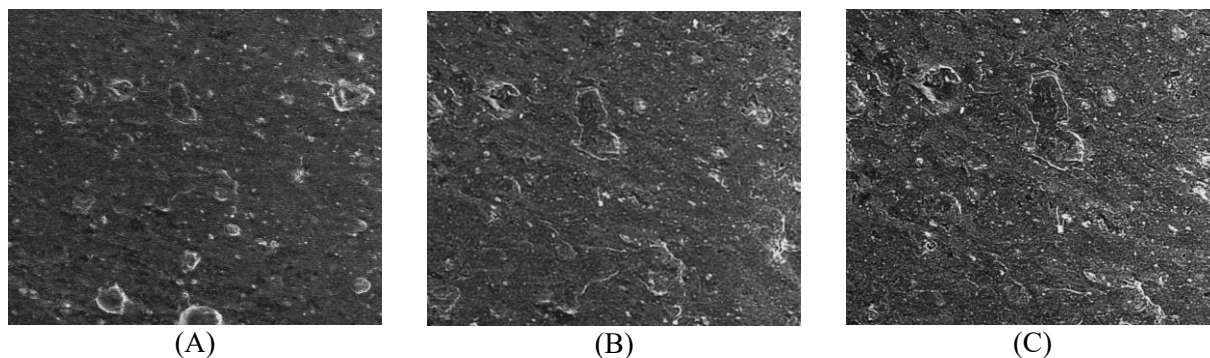


Figure 50. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *A. niger* dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

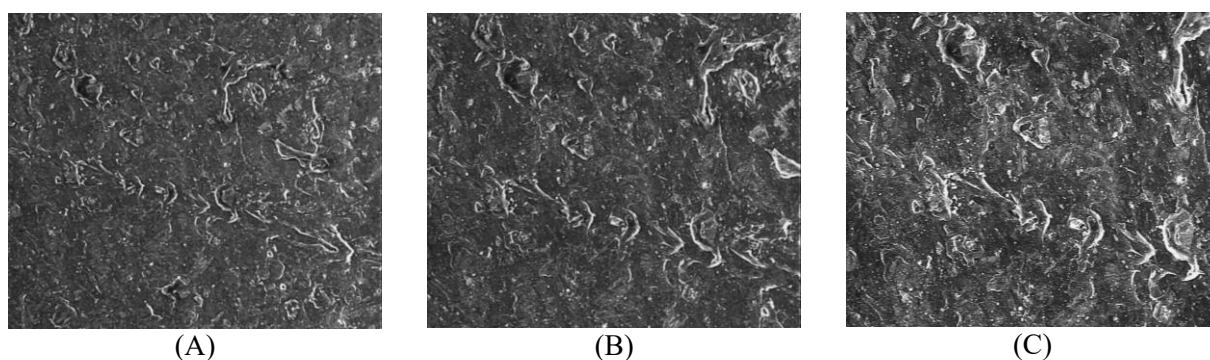


Figure 51. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *C. tropicalis* dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

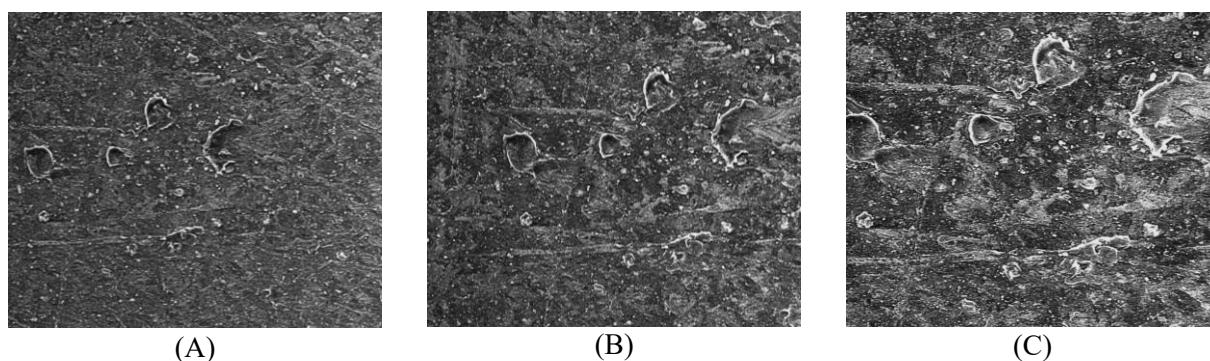


Figure 52. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *P. hordei* dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

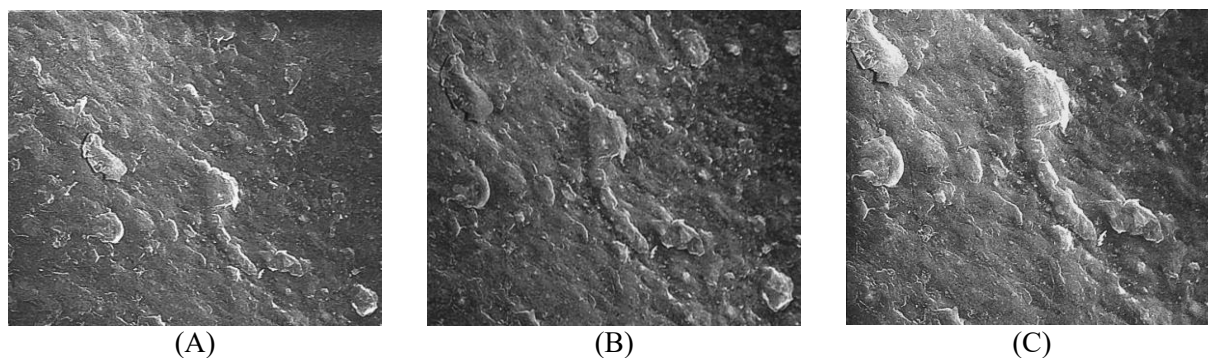


Figure 53. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

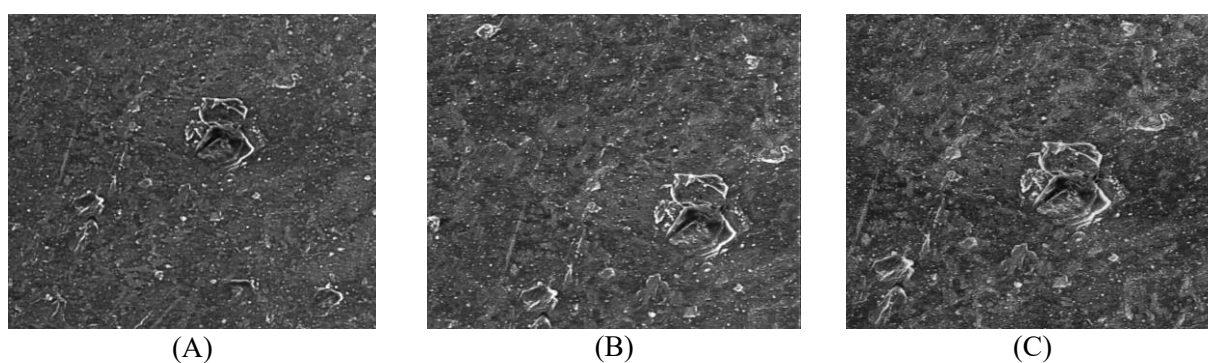


Figure 54. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *R. mucilaginosa* dans le MML (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

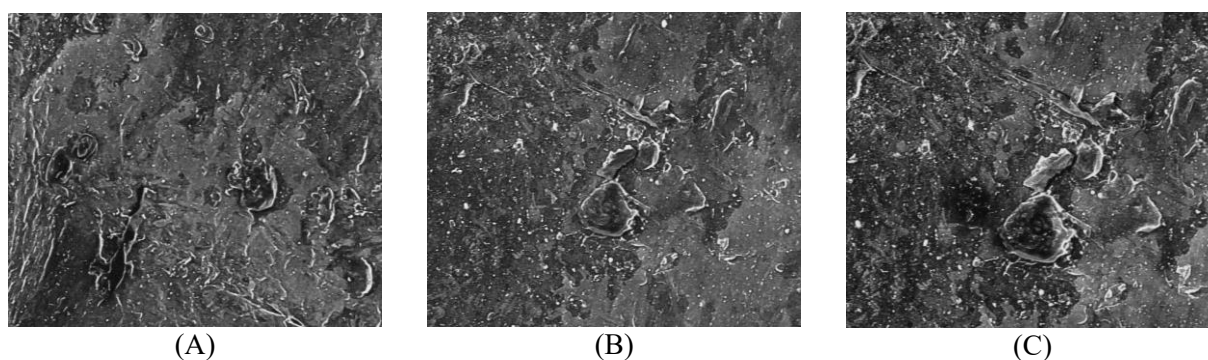


Figure 55. Observation du film de PEBD (F5) sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans le MML (culture continue) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

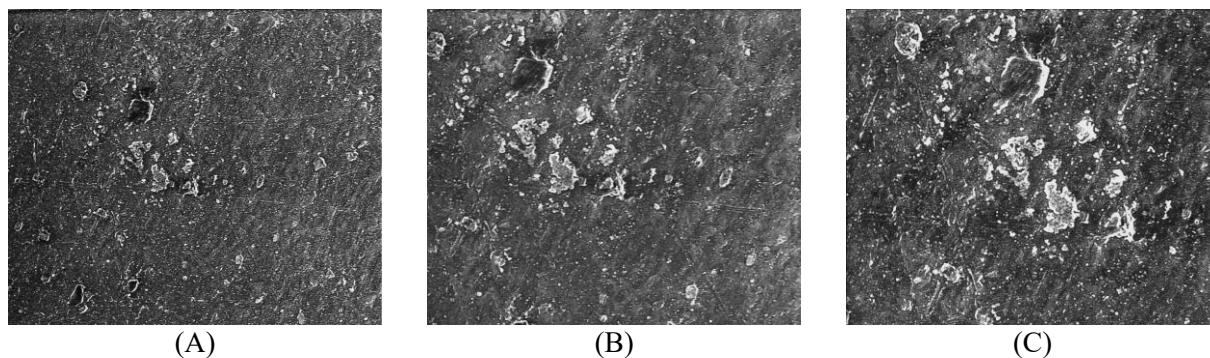


Figure 56. Observation du film de PEBD (F5) sous microscope électronique à balayage après 90 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans le MML (culture continue) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

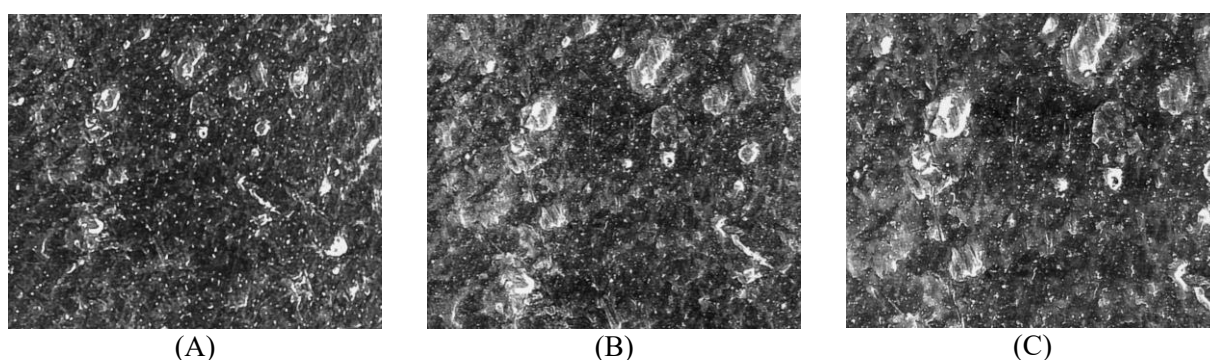


Figure 57. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *A. niger* dans l'eau de mer non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

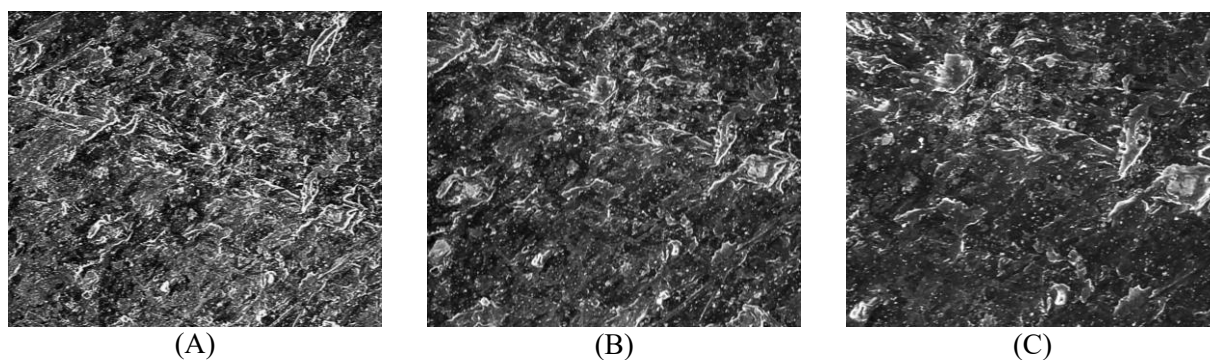


Figure 58. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *A. niger* dans l'eau du robinet non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

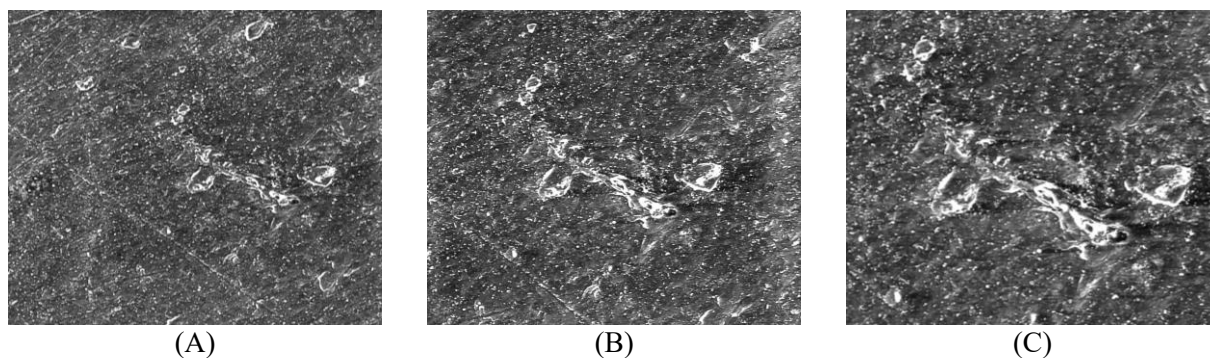


Figure 59. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *A. niger* dans un échantillon de sol non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

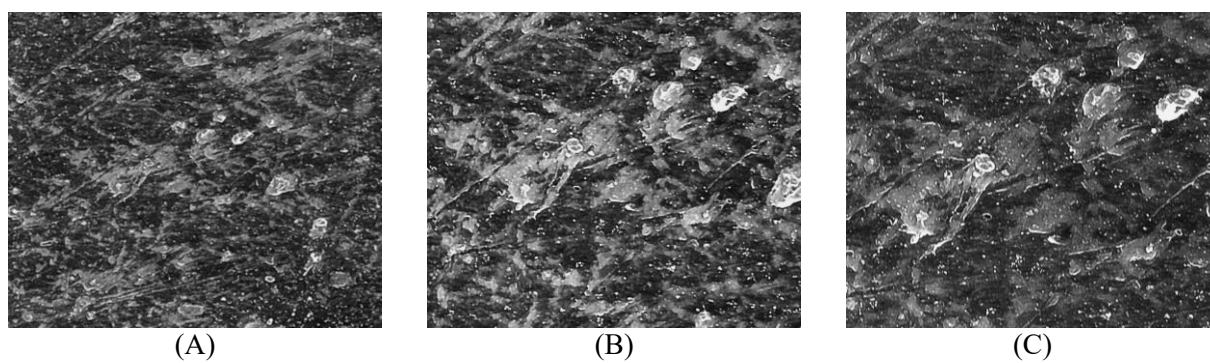


Figure 60. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans l'eau de mer non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

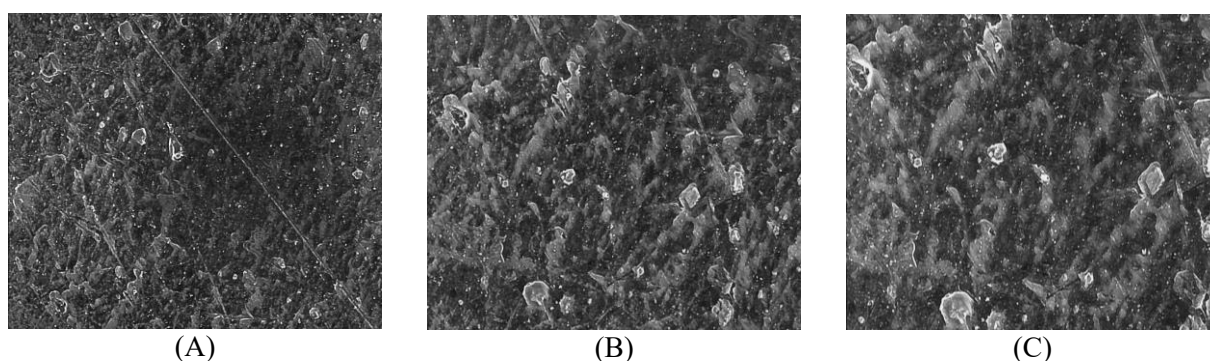


Figure 61. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans l'eau du robinet non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

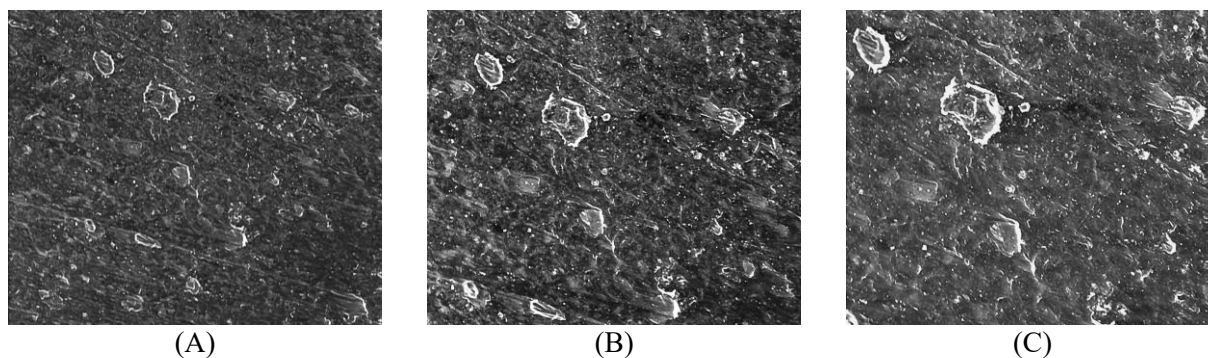


Figure 62. Observation du film de PEBD sous microscope électronique à balayage après 30 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans un échantillon de sol non stérile (culture en batch) aux grossissements: 1000x (A), 1500x (B) et 2000x (C)

5. 1. 2. Analyse des films de PEBD par spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS)

Dans cette étude, le film de PEBD incubé avec *R. arrhizus* dans une culture discontinue et le film F5 incubé dans une culture continue avec la même espèce fongique ont été exposés à un faisceau d'électrons à l'intérieur d'un microscope électronique à balayage (MEB) pour une analyse par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie (EDS). Les résultats ont révélé la présence de quatre éléments clés - le carbone, l'oxygène, le titane et le calcium - dans tous les films de PEBD, avec des pourcentages variables. Les sacs en PEBD contiennent généralement du polyéthylène $[C_2H_4]_n$, du dioxyde de titane (TiO_2) et du carbonate de calcium ($CaCO_3$), qui servent de pigments blancs pour assurer l'opacité du polymère.

L'analyse du film témoin a montré une composition constituée principalement de carbone, avec une proportion de 94.83 %. De plus, de petites quantités d'oxygène, de calcium et de titane ont été détectées avec 4.04 %, 0.93 % et 0.21 %, respectivement (**Figure 63**). Les films de PEBD cultivés avec *R. arrhizus* dans une culture discontinue et une culture continue ont présenté une composition similaire, bien qu'avec des pourcentages variables, en particulier en masse de carbone et d'oxygène. Plus précisément, les teneurs en carbone et en oxygène pour la culture discontinue ont été, respectivement, de 69.26 % et 19.87 %, tandis que pour la culture continue, elles ont été, respectivement, de 56.84 % et 26.30 % (**Figures 64 et 65**).

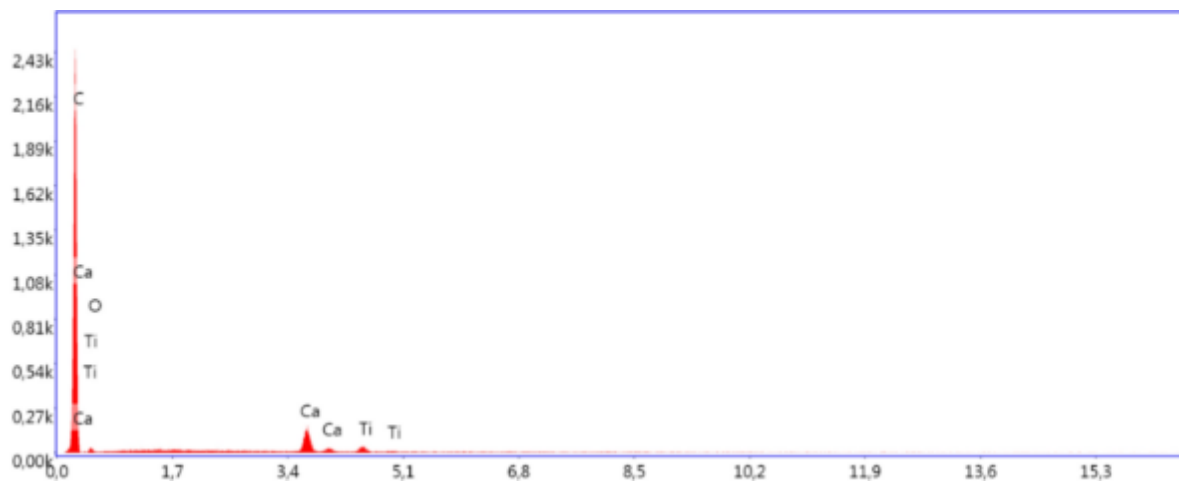


Figure 63. Analyse du film témoin par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie

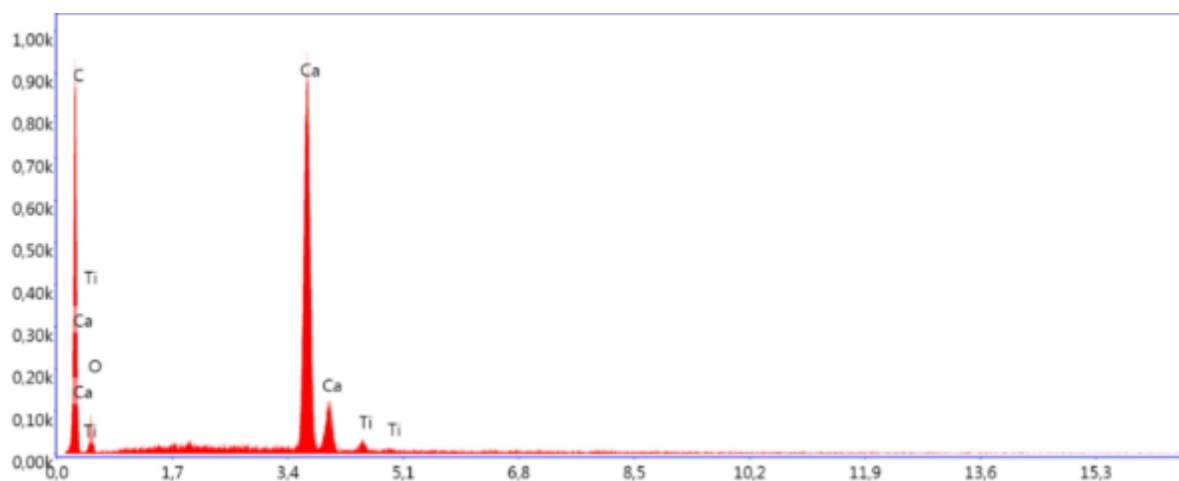


Figure 64. Analyse du film de PEBD par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie après incubation avec *R. arrhizus* dans une culture discontinue

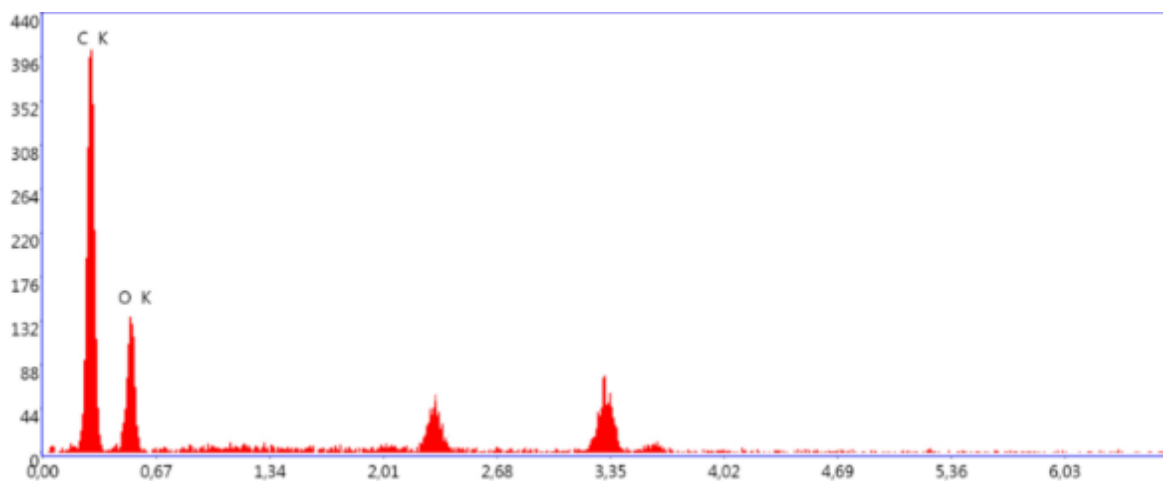


Figure 65. Analyse du film de PEBD (F5) par spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie après incubation avec *R. arrhizus* dans une culture continue

5. 2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

5. 2. 1. Analyse ATR-FTIR

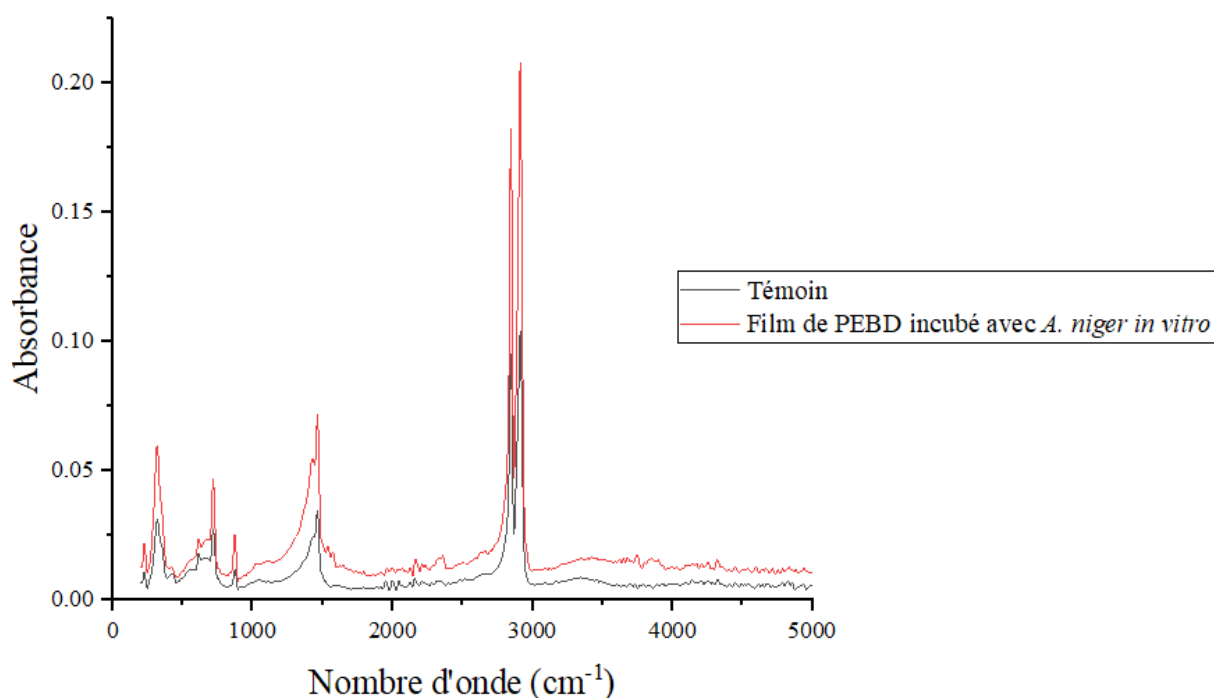
Les films de PEBD sélectionnés ont été soumis à une analyse ATR-FTIR pour confirmer leur dégradation par les espèces fongiques. Cette méthode permet de révéler les changements structurels qui se sont produits dans les films dégradés par rapport au film témoin.

Le spectre FTIR du film témoin de PEBD a montré des pics caractéristiques à 2912.478, 2845.155, 1463.002, 1432.965 et 718.746 cm^{-1} (**Figures 66-69**). Les bandes fortes à 2912 et 2845 cm^{-1} correspondent, respectivement, aux vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des groupements aliphatiques C-H dans les molécules d'alcane. Les pics intenses obtenus à 1463, 1432 et 718 cm^{-1} ont été, respectivement, attribués aux déformations asymétriques des liaisons C-H (groupement méthylène $-\text{CH}_2$) et à la vibration de déformation angulaire « Rocking » du groupement méthylène (CH_2). De plus, des bandes moyennes ont été observées dans la zone de 227 à 874 cm^{-1} , qui sont généralement associées aux vibrations de la structure du squelette du polymère. Ces vibrations sont principalement liées aux étirements, flexions et torsions des liaisons C-C et C-H dans les chaînes polymères.

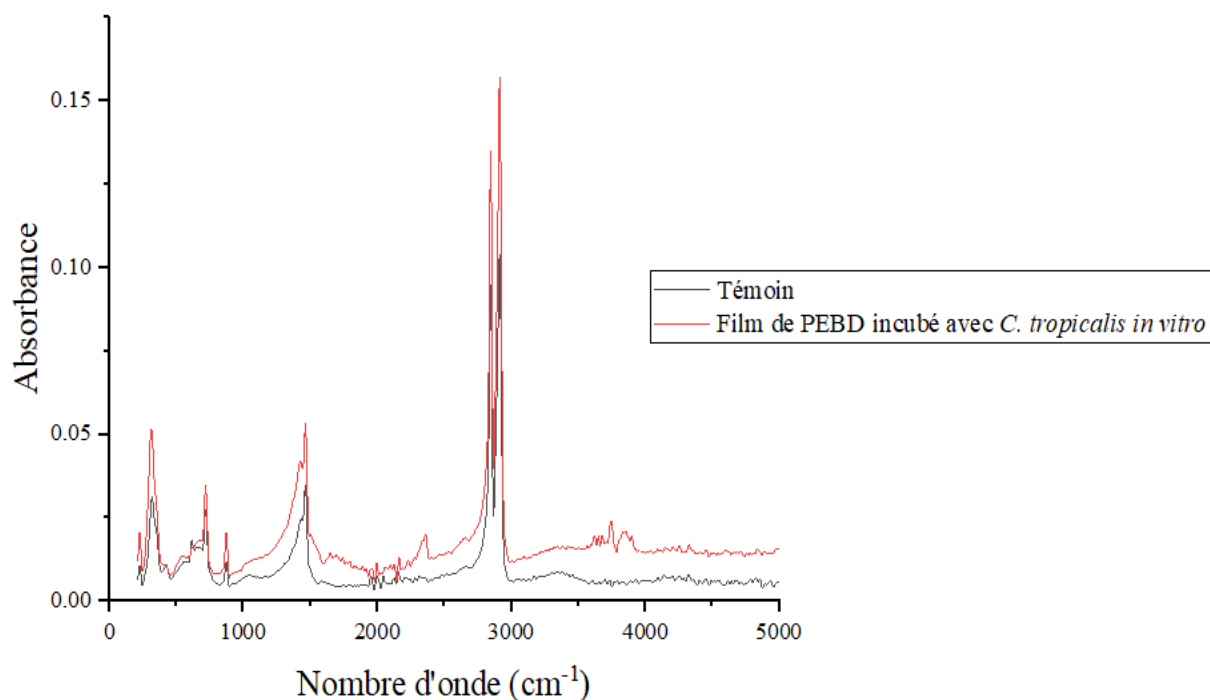
En outre, les films de PEBD cultivés avec les isolats fongiques *in vitro* (dans des cultures discontinues et une culture continue) et *ex situ* (dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans un échantillon de sol) ont montré les mêmes pics que le film témoin avec des intensités plus élevées, à l'exception du film incubé avec *R. mucilaginosa* qui a présenté une diminution de l'intensité des pics FTIR. Cette diminution peut être due à des ruptures de liaisons ou des modifications de groupes fonctionnels. De plus, le pic obtenu à 1432.965 cm^{-1} dans le film témoin s'est déplacé à 1429.108, 1425.251, 1435.158, 1425.251 et 1429.108 cm^{-1} avec des intensités assez fortes après incubation des films de PEBD, respectivement, avec *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa in vitro* en cultures discontinues. Cependant, de nouveaux pics de faible intensité sont apparus dans tous les échantillons incubés avec les isolats fongiques, comme représenté dans le **tableau 16**.

Tableau 16. Fréquences de vibrations de valence obtenues par ATR-FTIR des films de PEBD cultivés avec les isolats fongiques *in vitro*

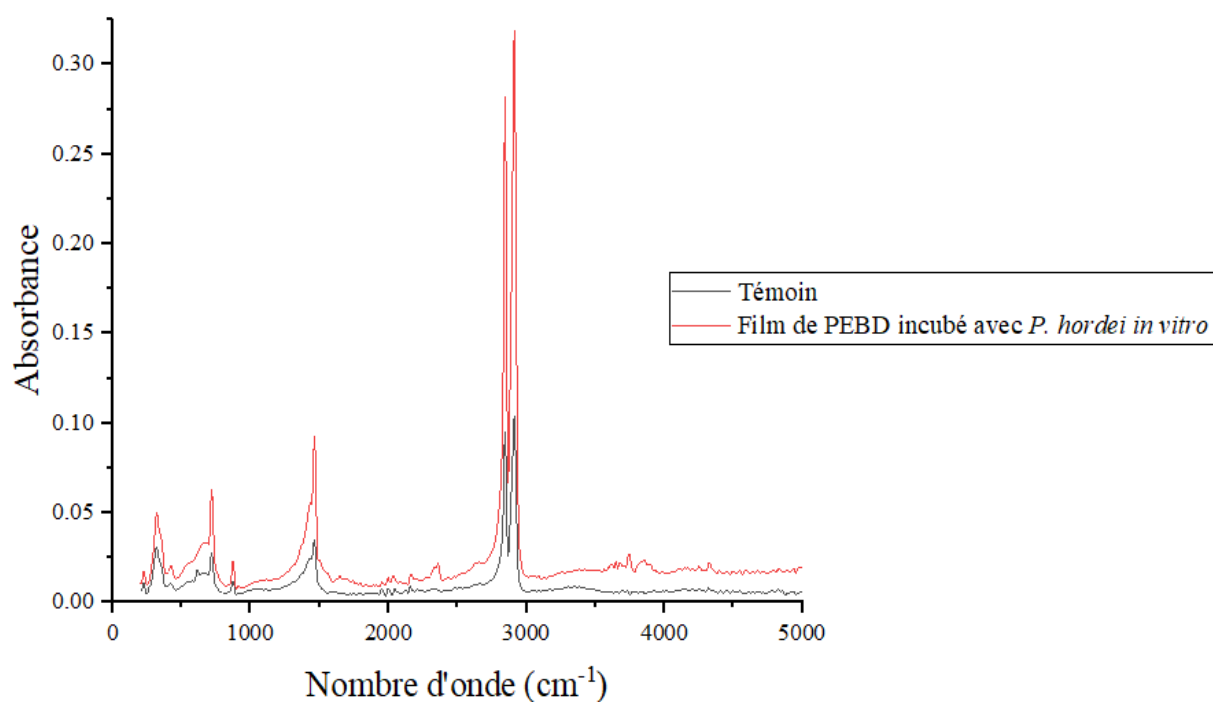
Isolat fongique	Fréquence (cm ⁻¹)	Liaison	Vibration	Groupes fonctionnels
<i>A. niger</i>	3850.144, 3746.397	O-H	Élongation	Alcools
	2357.348, 2161.383	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1579.250, 1538.904	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques
<i>C. tropicalis</i>	3855.907, 3740.634	O-H	Élongation	Alcools
	2360.633, 2335.560, 2155.619	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1648.971	C=C	Élongation	Alcènes
	1512.039	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques
<i>P. hordei</i>	3746.397, 3855.907, 4328.530	O-H	Élongation	Alcools
	2357.348, 2167.146	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1642.651	C=C	Élongation	Alcènes
<i>R. arrhizus</i>	3739.815, 3850.144	O-H	Élongation	Alcools
	2358.704, 2329.775	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1836.047, 1739.886	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
<i>R. mucilaginosa</i>	3621.951 - 3847.600	O-H	Élongation	Alcools
	2363.112 – 2335.560	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1700.288	C=O	Élongation	Cétones aromatiques
	1648.414	C=C	Élongation	Alcènes
	1504.322	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques



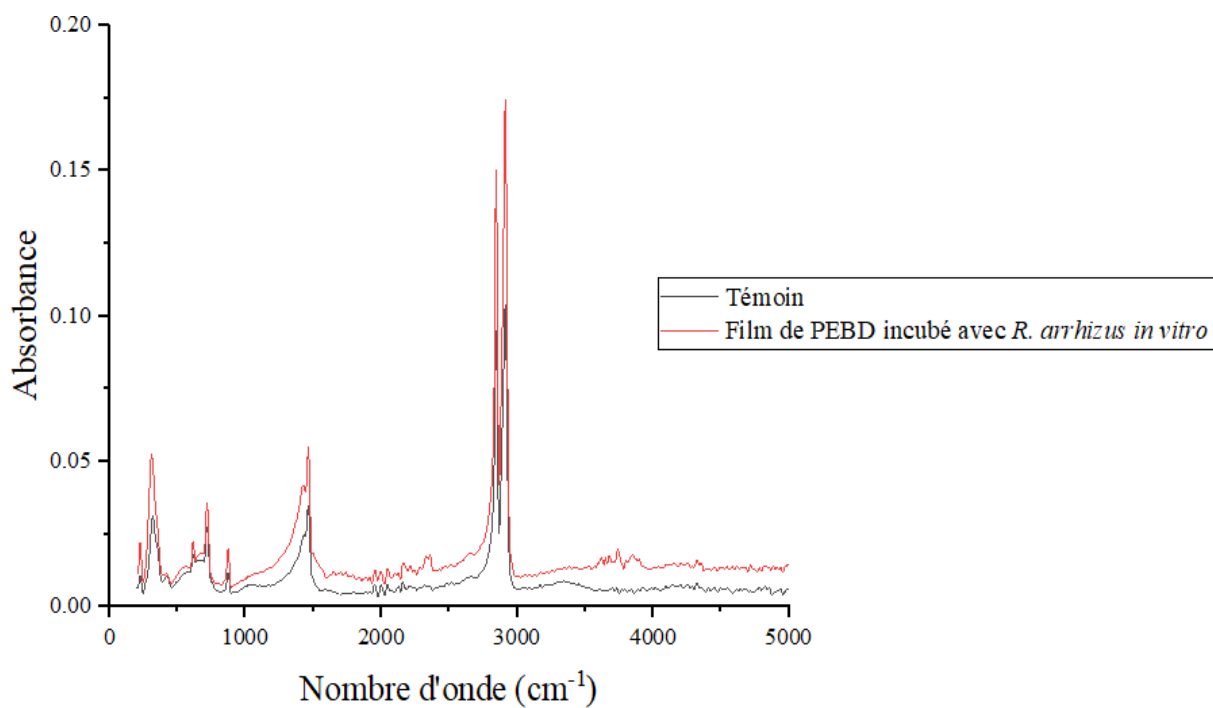
(A)



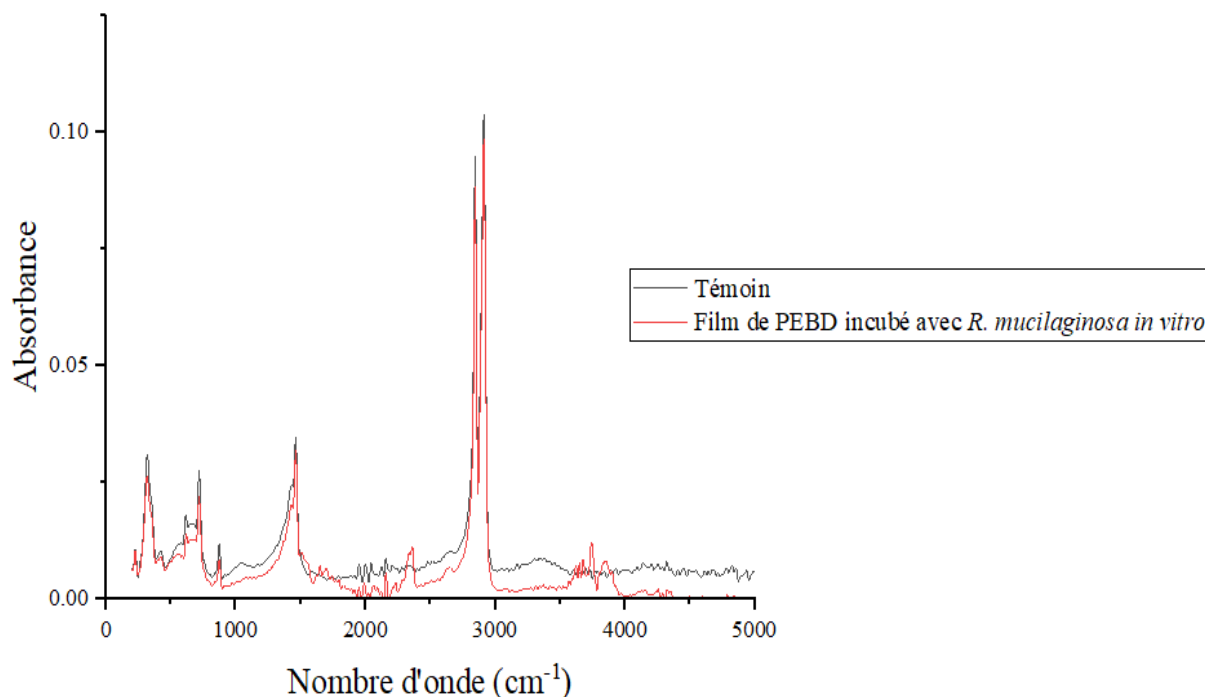
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 66. Analyse ATR-FTIR des films de PEBD incubés pendant un mois dans un MML en cultures discontinues avec: (A) *A. niger* ; (B) *C. tropicalis* ; (C) *P. hordei* ; (D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés au témoin

De même, l'analyse ATR-FTIR du film de PEBD (F5) cultivé avec *R. arrhizus* dans une culture continue a révélé l'apparition de nouveaux pics d'une intensité faible à 3648.309, 2359.765, 2159.014, 1836.047, 1741.5454, 1648.971, 1424.068, 1263.2472, et 1107.858 cm^{-1} . Ces pics correspondent, respectivement, à des vibrations d'élongation des groupements O-H, C-C (triple liaison), C=O (anhydride), C=C, des vibrations de flexion CH_2 et des vibrations d'élongation des liaisons C-O. Après 3 mois d'incubation, l'analyse du même film a montré les mêmes pics avec des intensités élevées. Cependant, les bandes obtenues à 3648, 2359 et 1107 cm^{-1} se sont déplacées à 3650.105, 2357.926 et 1105.495 cm^{-1} , respectivement. De plus, la bande obtenue à 2159 cm^{-1} a disparu. D'autre part, de nouveaux pics d'intensité moyenne sont apparus dans la zone 3347-4912 cm^{-1} et à 1262.660 cm^{-1} . Ces pics correspondent, respectivement, à l'élongation des liaisons O-H et à la vibration d'élongation des liaisons C-O (acides carboxyliques et dérivés). Des pics de faible intensité ont également été observés à 2208.931, 2161.667, 1841.833, 1648.742 et 800.906 cm^{-1} . Ces pics sont attribués, respectivement, à des vibrations d'élongation $\text{C}\equiv\text{C}$ (alcynes terminaux), C=O, C=C et à la déformation des liaisons C-H aromatique (bandes caractéristiques de type substitution) (**Figure 67**).

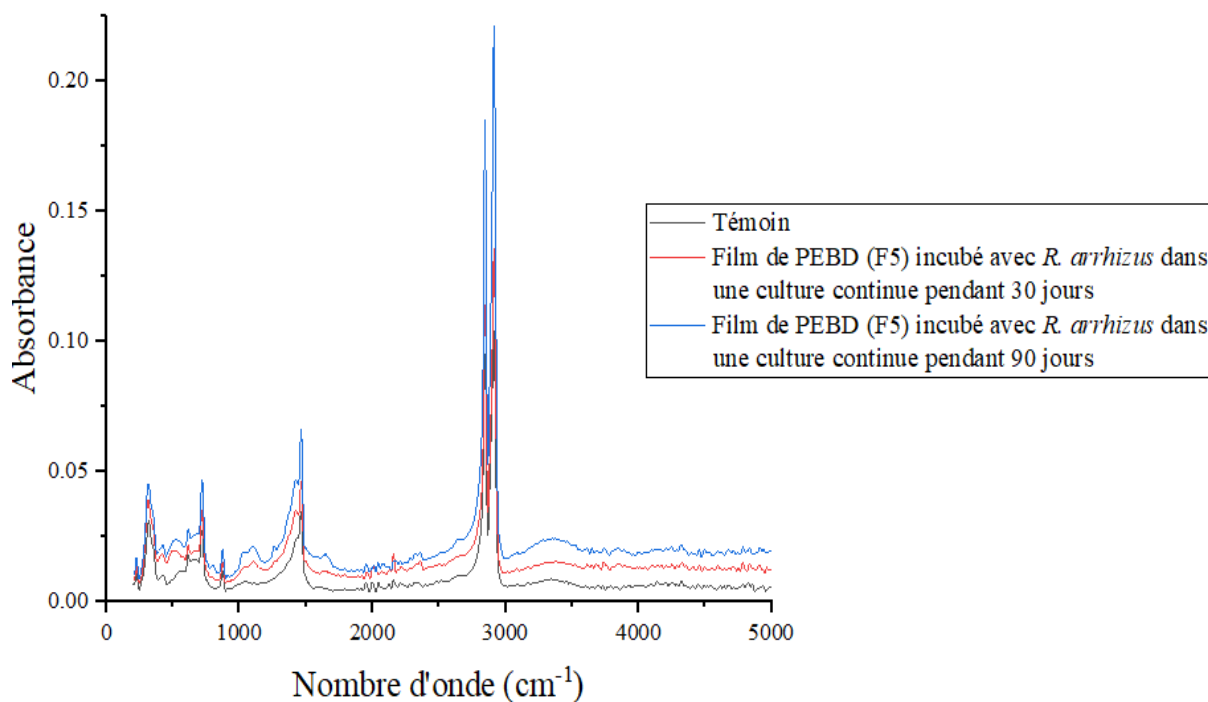


Figure 67. Analyse ATR-FTIR du film de PEBD (F5) incubé pendant 30 et 90 jours dans un MML en culture continue avec *R. arrhizus*, comparé au témoin

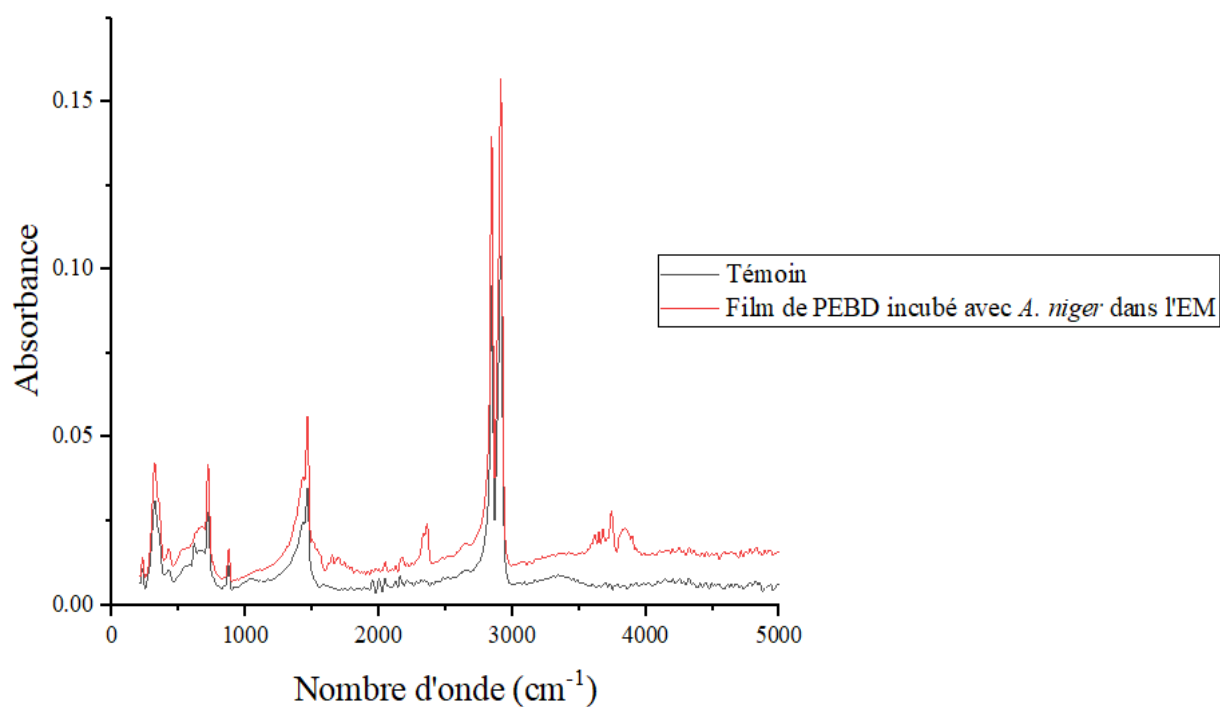
L'analyse des films de PEBD incubés *ex situ* avec *A. niger* et *R. arrhizus* a également montré l'apparition de nouvelles bandes d'une intensité moyenne à faible (**Figures 68** et **69**). Cependant, le pic obtenu à 1432.965 cm^{-1} dans le film témoin s'est déplacé à 1431.037 , 1423.322 et 1425.251 cm^{-1} , respectivement, dans les films incubés avec *A. niger* dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans l'échantillon de sol. Quant aux films incubés avec *R. arrhizus*, cette bande s'est déplacée à 1429.108 , 1425.251 et 1432.965 cm^{-1} , respectivement, pour les films cultivés dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans l'échantillon de sol. Ces pics correspondent aux déformations (flexions) des liaisons C-H des groupements alcanes (CH_2). Les fréquences de vibrations de valence obtenues pour chaque film sont représentées dans le **tableau 17**.

Tableau 17. Fréquences de vibrations de valence obtenues par ATR-FTIR des films de PEBD cultivés avec *A. niger* et *R. arrhizus ex situ*

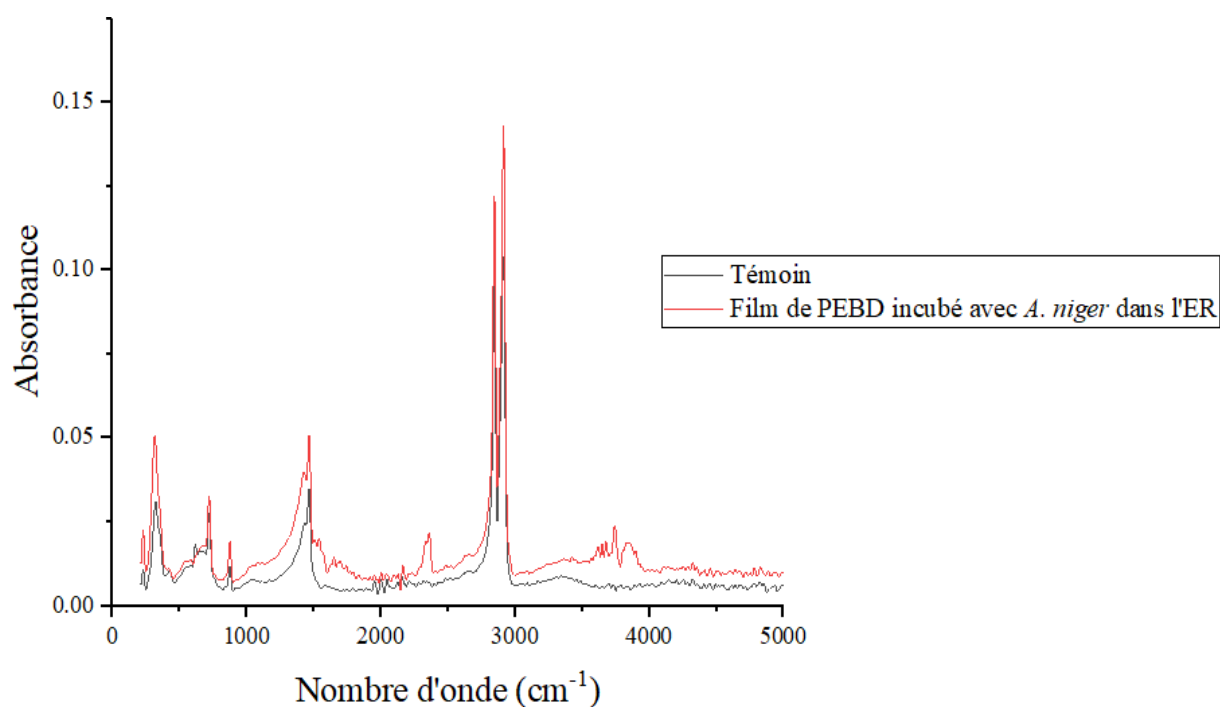
Isolat fongique	Fréquence (cm ⁻¹)	Liaison	Vibration	Groupes fonctionnels
	Eau de mer			
	3620.023 - 3897.744	O-H	Élongation	Alcools
	2360.633, 2335.560	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1834.119, 1741.545	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1648.971	C=C	Élongation	Alcènes
	1535.182, 1500.467	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques
	Eau du robinet			
	3620.023 - 3897.744	O-H	Élongation	Alcools
	2358.704, 2331.703	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1741.545	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
<i>A. niger</i>	1695.258	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1647.042	C=C	Élongation	Alcènes
	1539.040, 1504.324	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques
	Sol			
	3564.093 – 3897.744	O-H	Élongation	Alcools
	2360.633, 2335.560, 2160.056	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1832.190, 1741.545	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1648.971	C=C	Élongation	Alcènes
	1537.111, 1510.110	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques

Eau de mer				
	3566.021 – 3897.744	O-H	Élongation	Alcools
	2360.633, 2333.632	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1836.047, 1739.616	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1647.042	C=C	Élongation	Alcènes
	1498.539	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques
Eau du robinet				
	3521.663 – 3897.744	O-H	Élongation	Alcools
	2360.633, 2088.697 – 2023.124	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
<i>R. arrhizus</i>	1969.122, 1915.121	C=C	Élongation	Alcènes
	1741.545	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1648.971	C=C	Élongation	Alcènes
	1533.254, 1504.324	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques
Sol				
	3564.093 – 3897.744	O-H	Élongation	Alcools
	2360.633, 2335.560, 2239.129, 2206.343	C≡C	Élongation	Alcynes terminaux
	1741.545	C=O	Élongation	Esters aliphatiques
	1697.187	C=O	Élongation	Aldéhydes aromatiques
	1648.971	C=C	Élongation	Alcènes
	1533.254, 1500.467	C=C	Élongation	Alcènes aromatiques

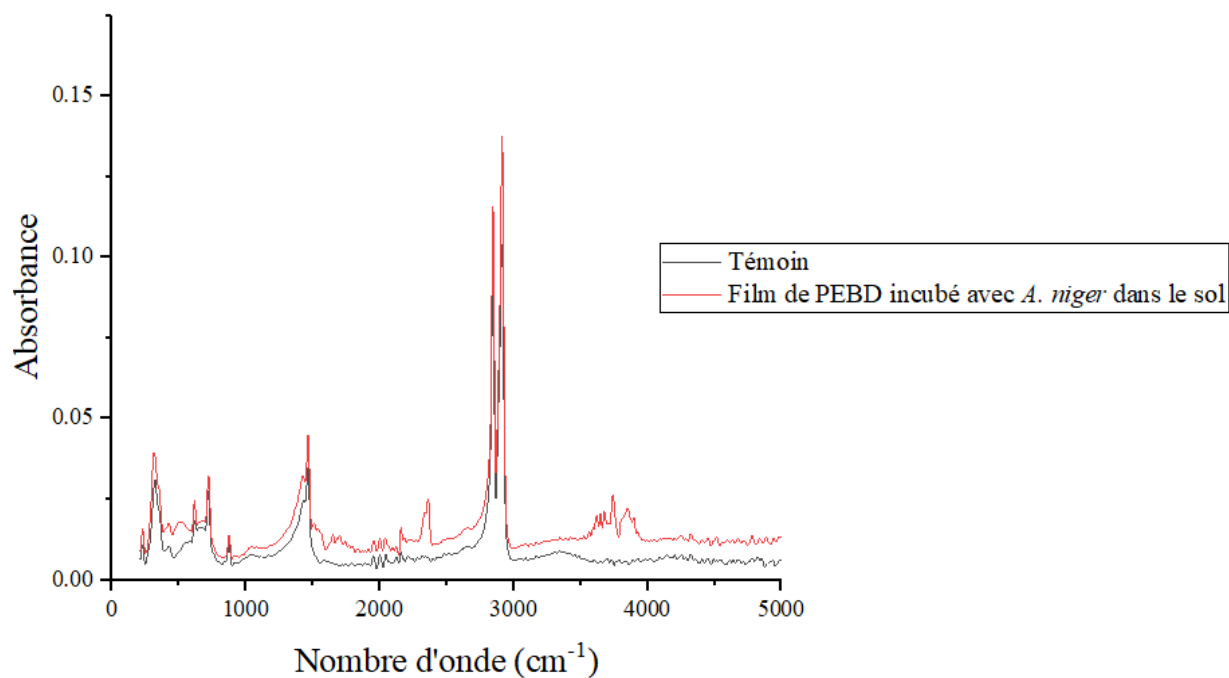
Ces changements dans la structure chimique des films de PEBD sont attribués à leur dépolymérisation par le biais des enzymes sécrétées par les isolats fongiques testés.



(A)

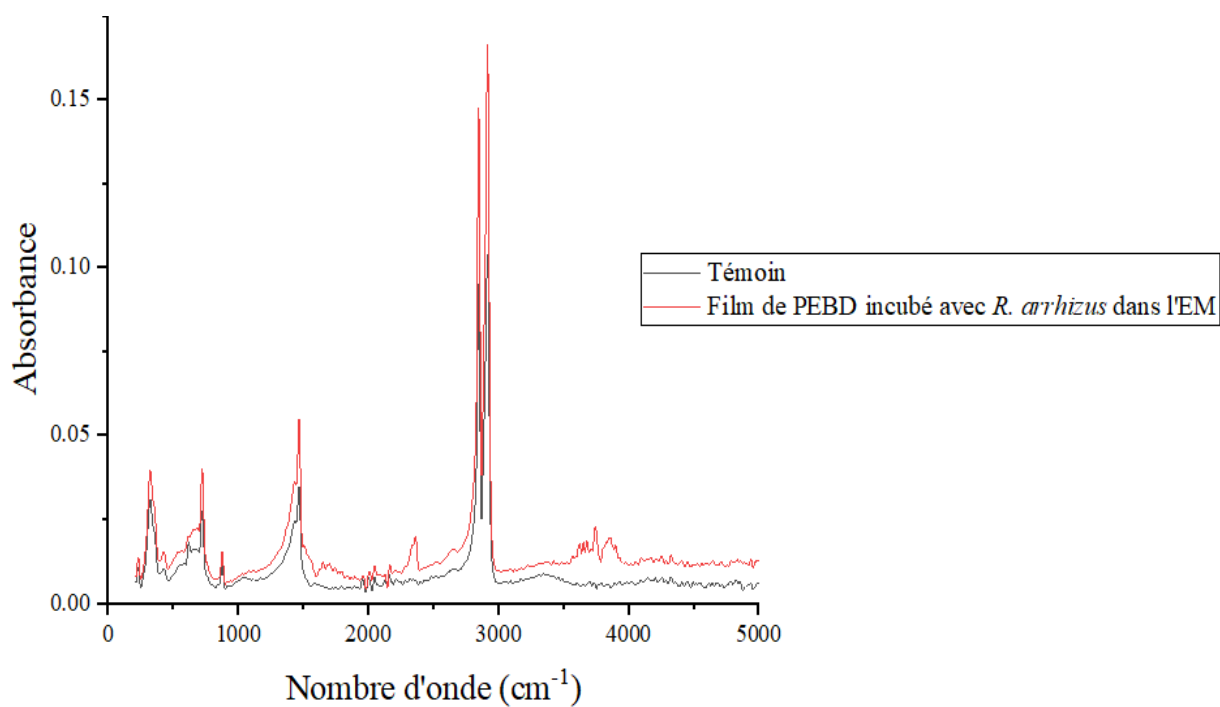


(B)



(C)

Figure 68. Analyse ATR-FTIR des films de PEBD incubés avec *A. niger* pendant 30 jours en cultures discontinues dans: (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin



(A)

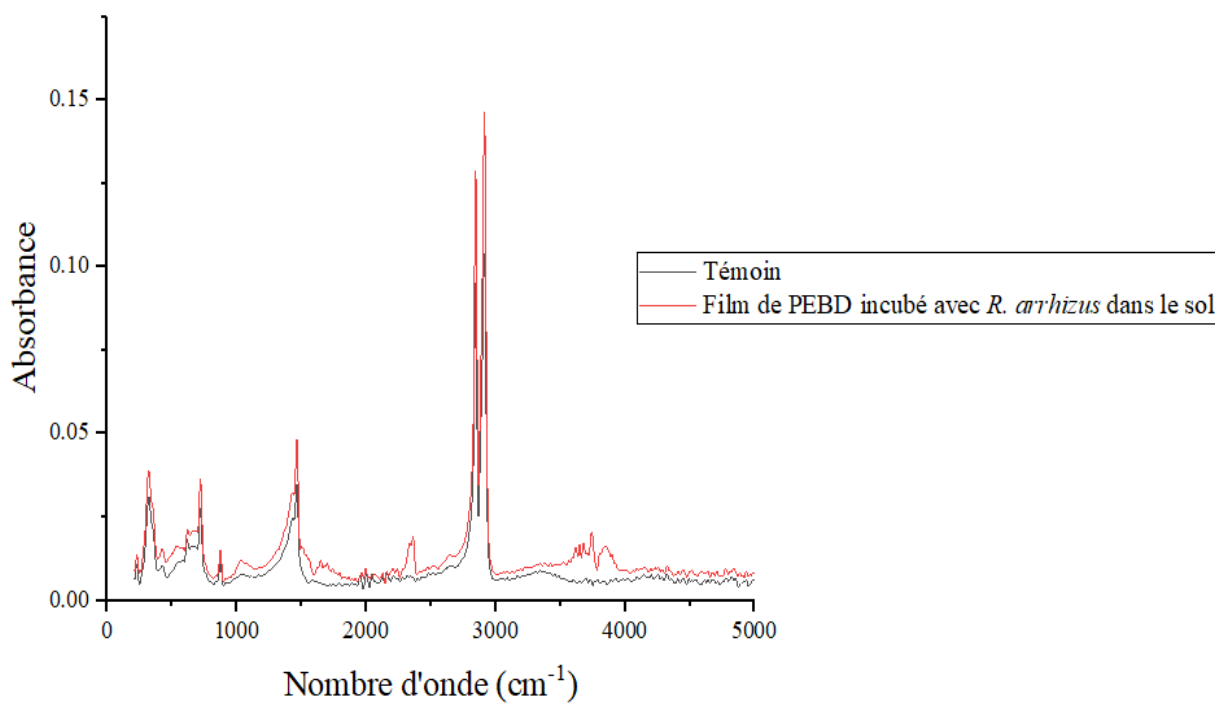
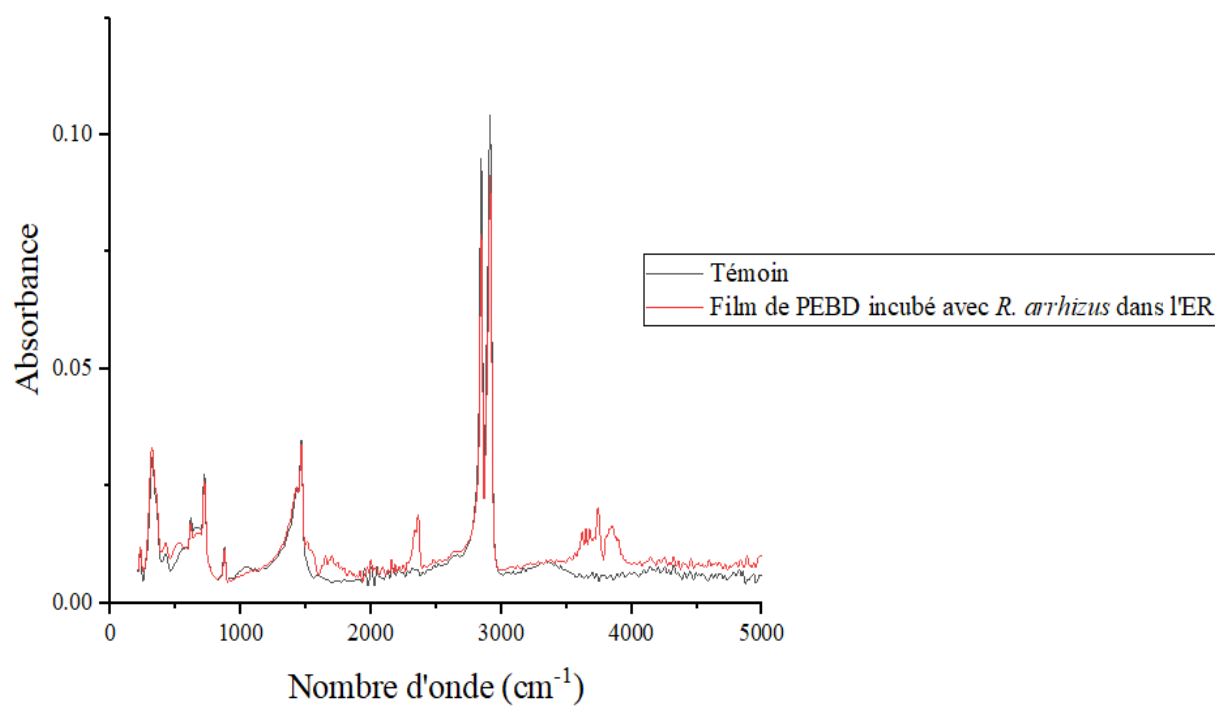


Figure 69. Analyse ATR-FTIR des films de PEBD incubés avec *R. arrhizus* pendant 30 jours en cultures discontinues dans: (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin

5. 2. 2. Mesure de l'indice carbonyle (IC)

L'indice carbonyle (IC) des films de PEBD a été calculé et est représenté dans le **tableau 18**. Le film témoin a présenté la valeur d'IC la plus faible, de 0.50. En revanche, les films de PEBD incubés avec les espèces fongiques *in vitro* et *ex situ* ont montré des valeurs d'IC plus élevées, atteignant 0.898 pour le film incubé avec *A. niger* dans un échantillon de sol pendant un mois. Ces augmentations de l'IC témoignent des modifications chimiques et structurales produites lors du processus de dégradation. Cela signifie que davantage de liaisons carbonyle se sont formées dans la structure des polymères, suite à la rupture et à l'oxydation des longues chaînes de polyéthylène par les isolats fongiques.

Tableau 18. Indice carbonyle des films de PEBD après incubation avec les isolats fongiques

Type de culture	Test	Isolat fongique	IC
Discontinue	<i>In vitro</i>	<i>A. niger</i>	0.554169
		<i>C. tropicalis</i>	0.790574
		<i>P. hordei</i>	0.507280
		<i>R. arrhizus</i>	0.709265
		<i>R. mucilaginosa</i>	0.553643
Continue	<i>In vitro</i>	<i>R. arrhizus</i> (30 jours)	0.809938
		<i>R. arrhizus</i> (90 jours)	0.763616
Discontinue	<i>Ex situ</i> (eau de mer)	<i>A. niger</i>	0.797158
		<i>R. arrhizus</i>	0.693254
	<i>Ex situ</i> (eau du robinet)	<i>A. niger</i>	0.744066
		<i>R. arrhizus</i>	0.848153
	<i>Ex situ</i> (sol)	<i>A. niger</i>	0.898054
		<i>R. arrhizus</i>	0.690998
Témoin			0.504906

5. 3. Diffractométrie des rayons X (DRX)

5. 3. 1. Analyse DRX

Les films de PEBD ont été soumis à une analyse par diffractométrie des rayons X afin de déterminer les changements de cristallinité liés à la dégradation par les isolats fongiques identifiés. Le profil DRX des films sélectionnés, incubés *in vitro*, dans des cultures discontinues et une culture continue, et *ex situ*, est illustré dans les **figures 70, 71, 72 et 73**, respectivement. Les différents diffractogrammes révèlent une structure semi-cristalline pour les films de PEBD, où la phase cristalline se manifeste par des pics de diffraction typiques, qui sont intenses et nettement aigus.

Le spectre DRX du film témoin a montré des pics caractéristiques des régions cristallines aux positions angulaires 2θ à 11.20°, 21.26°, 23.71°, 27.11°, 29.11°, 31.26°, 35.96° et 47.37°.

La **figure 70 (A)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *A. niger in vitro* dans une culture discontinue, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20°, 21.26°, 23.71° et 31.26°, et une faible intensité à 27.11°. Cependant, les pics obtenus à 29.11°, 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 29.06°, 35.91° et 47.22°.

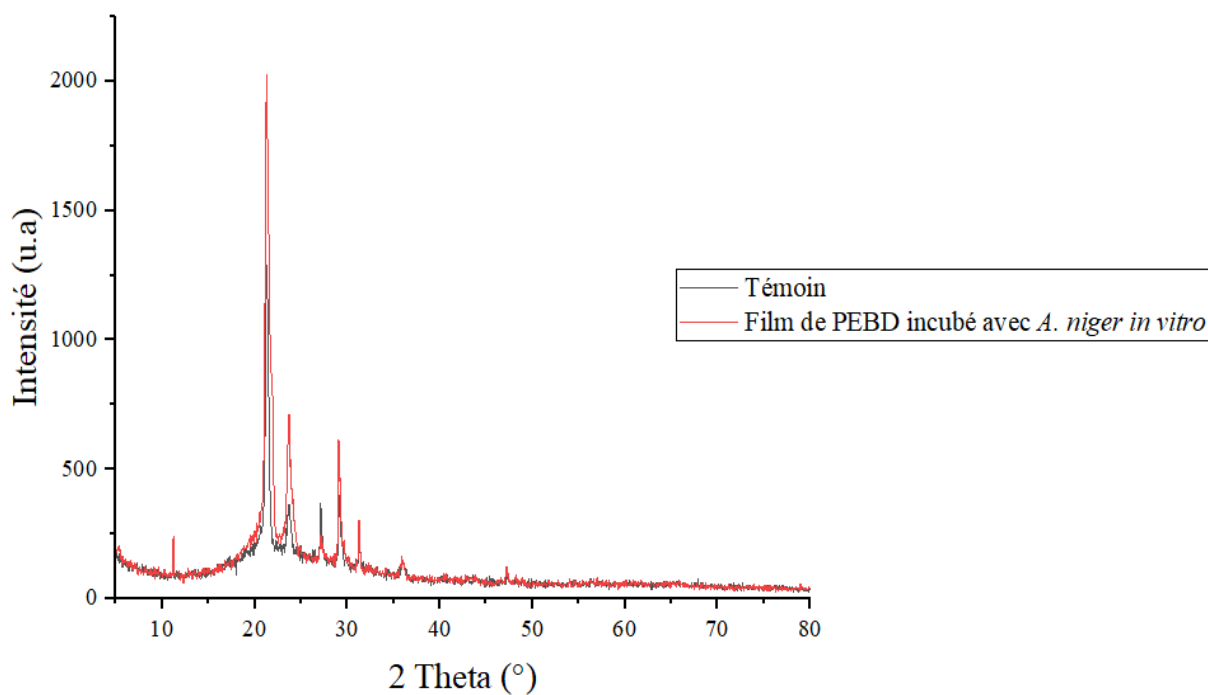
La **figure 70 (B)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *C. tropicalis in vitro* dans une culture discontinue, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20°, 21.26° et 31.26°. Cependant, les pics obtenus à 23.71°, 27.11°, 29.11° et 47.37° se sont déplacés (décalés), respectivement, à 23.61°, 27.06°, 29.06° et 47.12°.

La **figure 70 (C)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *P. hordei in vitro* dans une culture discontinue, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20°, 21.26°, 27.11° et 31.26°. Cependant, les pics obtenus à 23.71°, 29.11° et 35.96° se sont déplacés, respectivement, à 23.56°, 29.06° et 35.91°. Par ailleurs, le pic présent à la position $2\theta = 47.37^\circ$ a disparu et un nouveau pic est apparu à 56.28°.

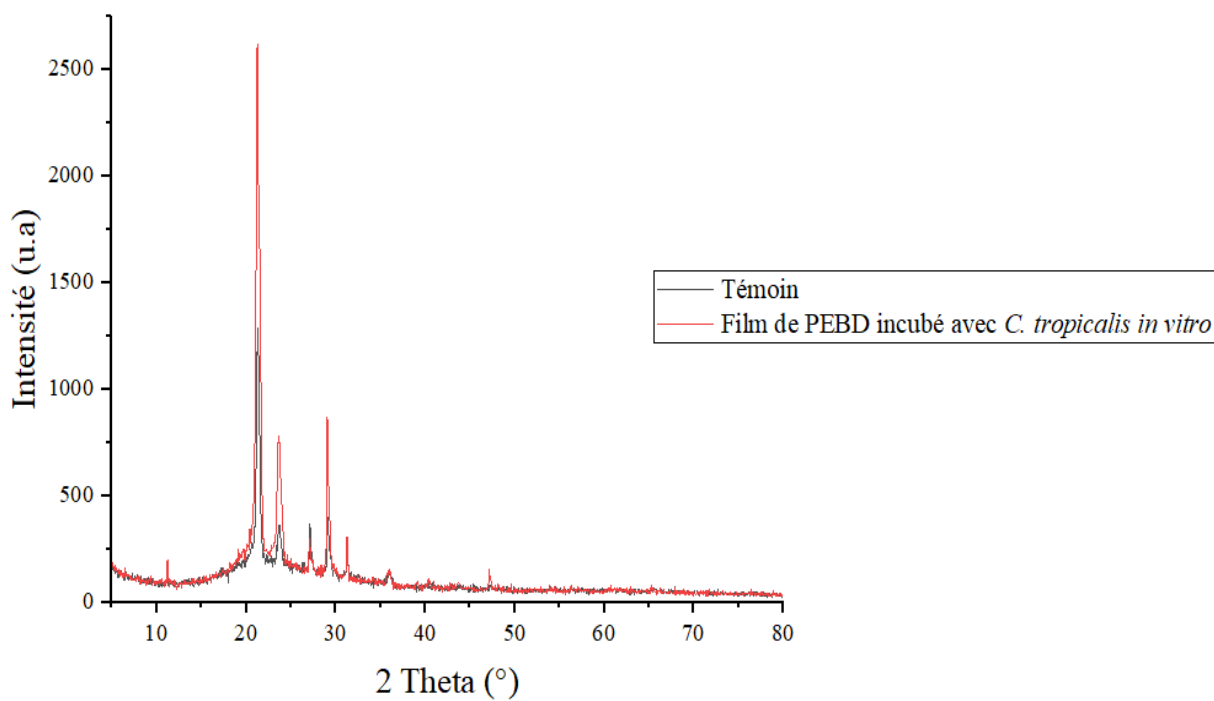
La **figure 70 (D)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *R. arrhizus in vitro* dans une culture discontinue, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20°, 21.26° et 31.26°. Cependant, les pics obtenus à 23.71°, 27.11°, 29.11°, 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à

23.61°, 27.16°, 29.06°, 35.76° et 47.22°. Par ailleurs, un nouveau pic est apparu à la position $2\theta = 40.27^\circ$.

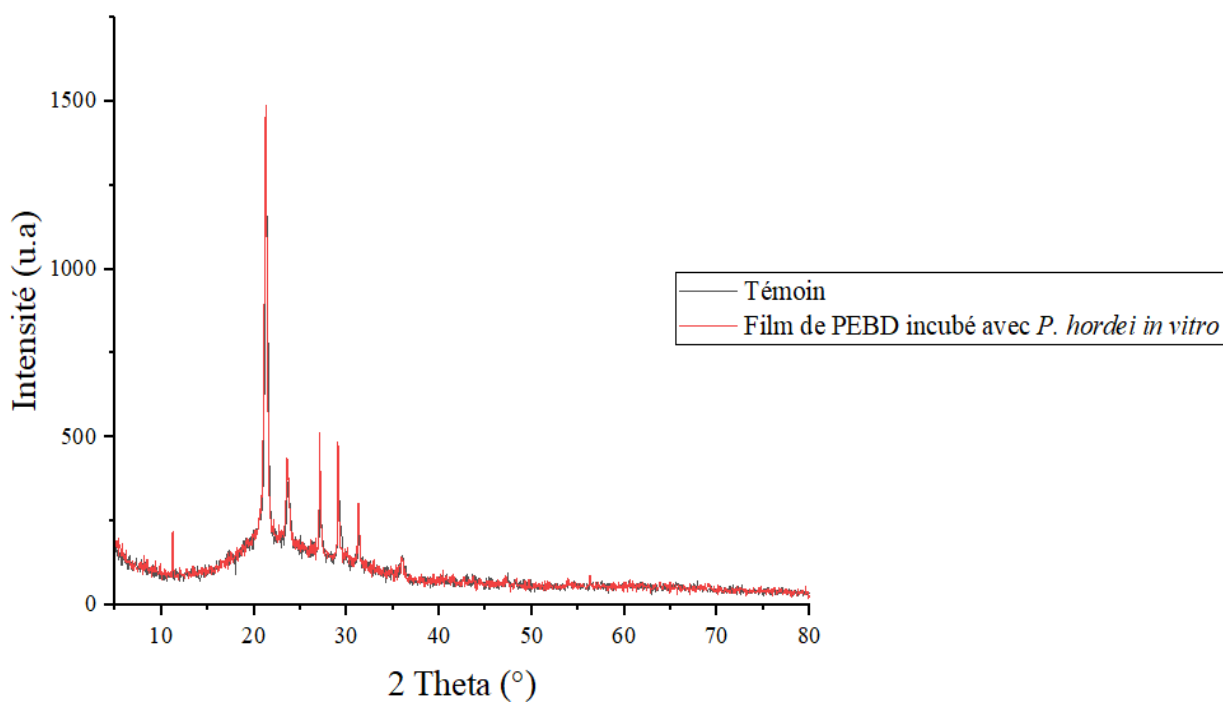
La **figure 70 (E)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *R. mucilaginosa in vitro* dans une culture discontinue, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20°, et une intensité plus faible à 31.26°. Cependant, les pics obtenus à 21.26°, 23.71°, 27.11°, 29.11°, 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.36°, 23.66°, 27.26°, 29.21°, 36.16° et 47.42°. Par ailleurs, deux nouveaux pics sont apparus aux positions $2\theta = 43.82^\circ$ et 56.38° .



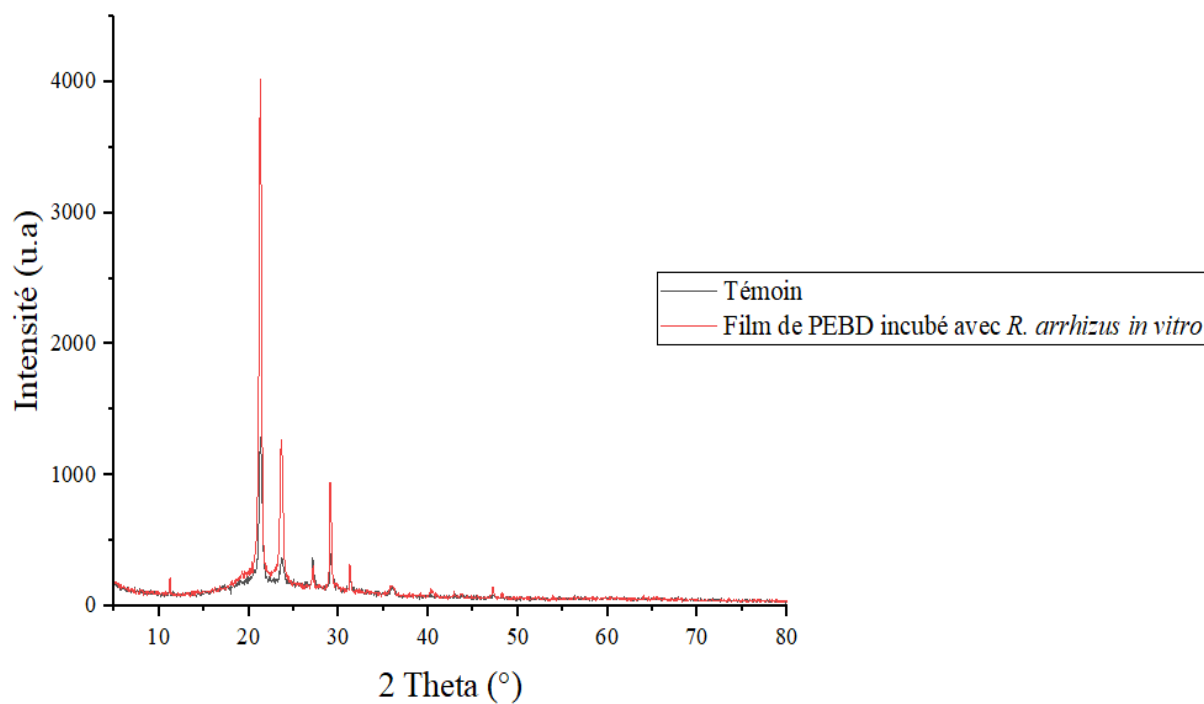
(A)



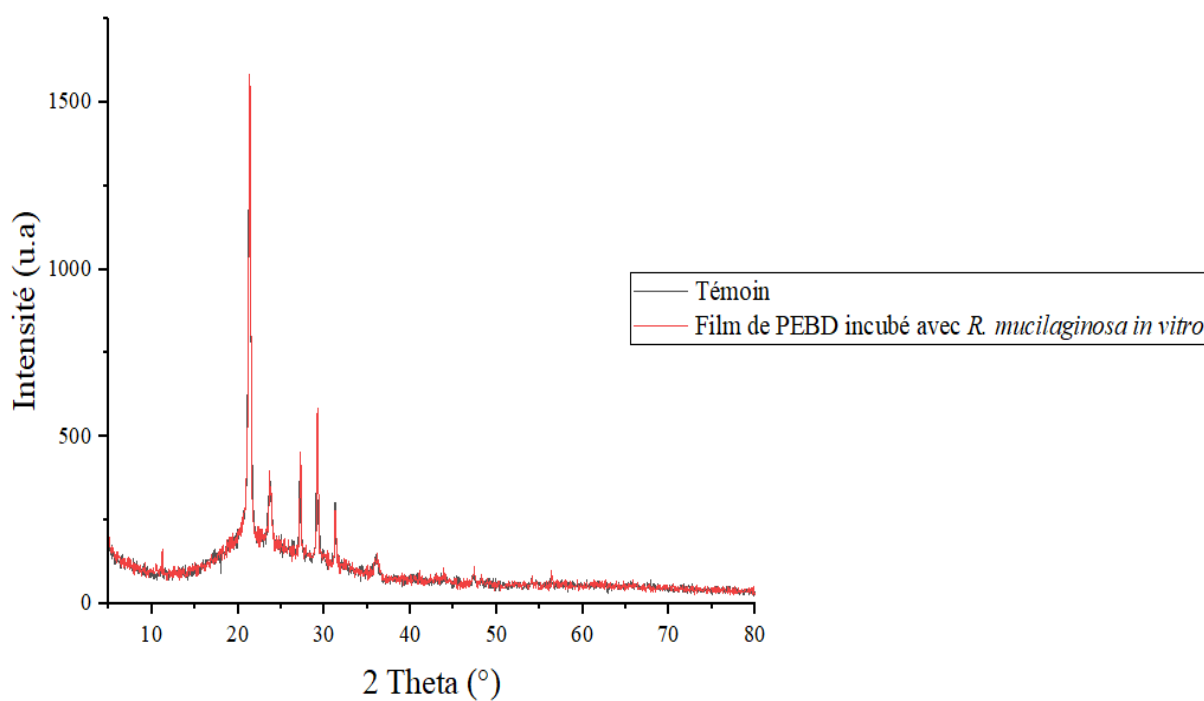
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 70. Diffractogrammes des films de PEBD incubés pendant un mois dans un MML en cultures discontinues avec: (A) *A. niger* ; (B) *C. tropicalis* ; (C) *P. hordei* ;(D) *R. arrhizus* et (E) *R. mucilaginosa*, comparés au témoin

La **figure 71** illustre le profil DRX du film de PEBD (F5) incubé avec *R. arrhizus in vitro* dans une culture continue, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus faible à 11.20° et 31.26° . Cependant, les pics obtenus à 21.26° , 23.71° , 27.11° , 29.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.31° , 23.66° , 27.21° , 29.16° , 36.06° et 47.27° . Par ailleurs, deux nouveaux pics sont apparus aux positions $2\theta = 42.92^\circ$ et 43.77° .

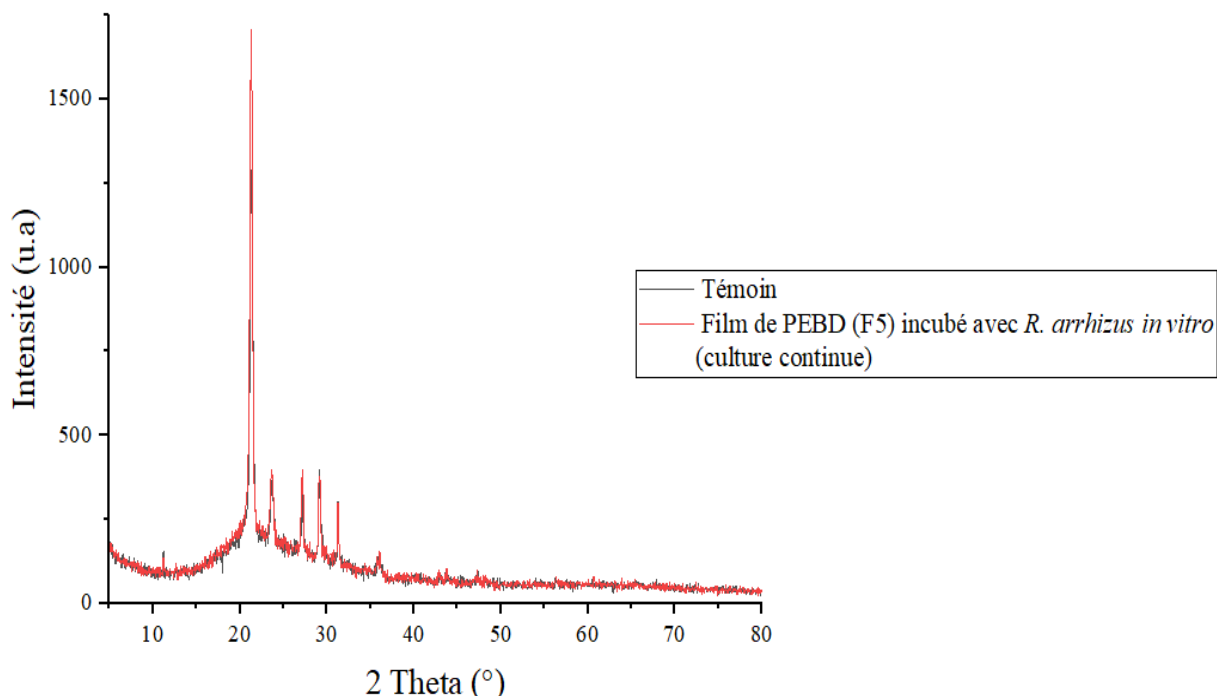


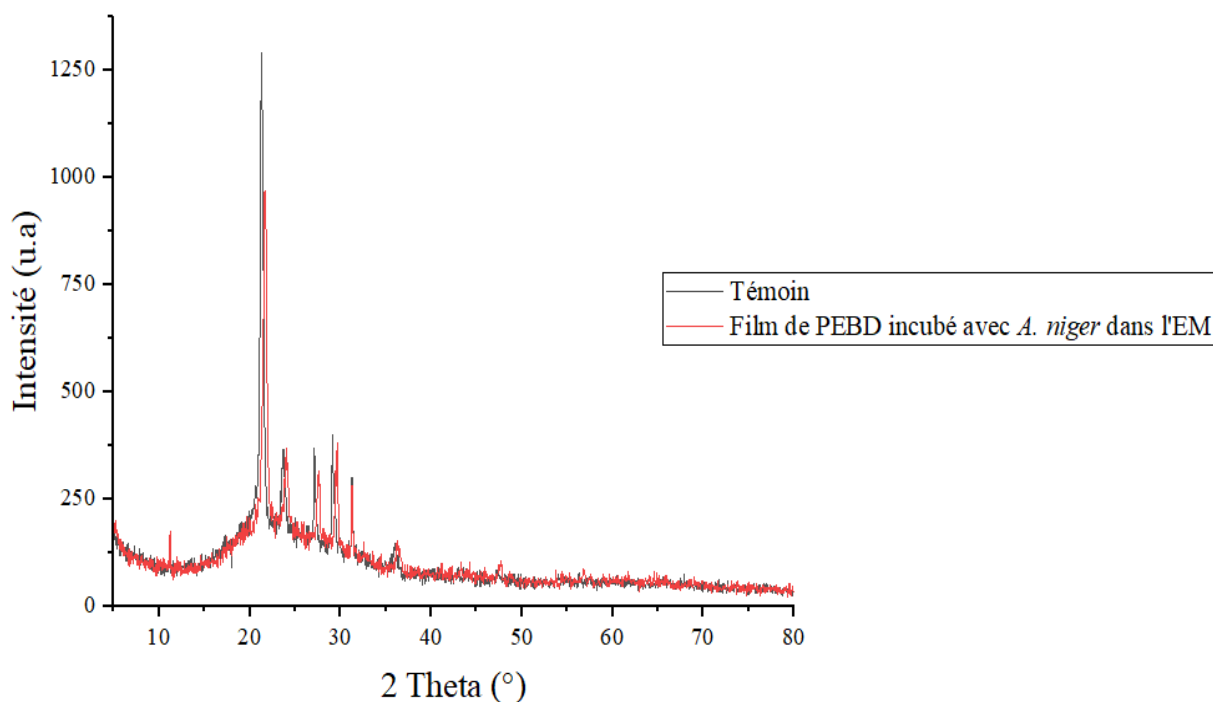
Figure 71. Diffractogramme du film de PEBD (F5) incubé pendant 90 jours dans un MML en culture continue avec *R. arrhizus*, comparé au témoin

La **figure 72 (A)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *A. niger ex situ* dans l'eau de mer, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20° , et une intensité plus faible à 31.26° . Cependant, les pics obtenus à 21.26° , 23.71° , 27.11° , 29.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.66° , 24.06° , 27.56° , 29.66° , 36.21° et 47.67° . Par ailleurs, deux nouveaux pics sont apparus aux positions $2\theta = 43.27^\circ$ et 56.78° .

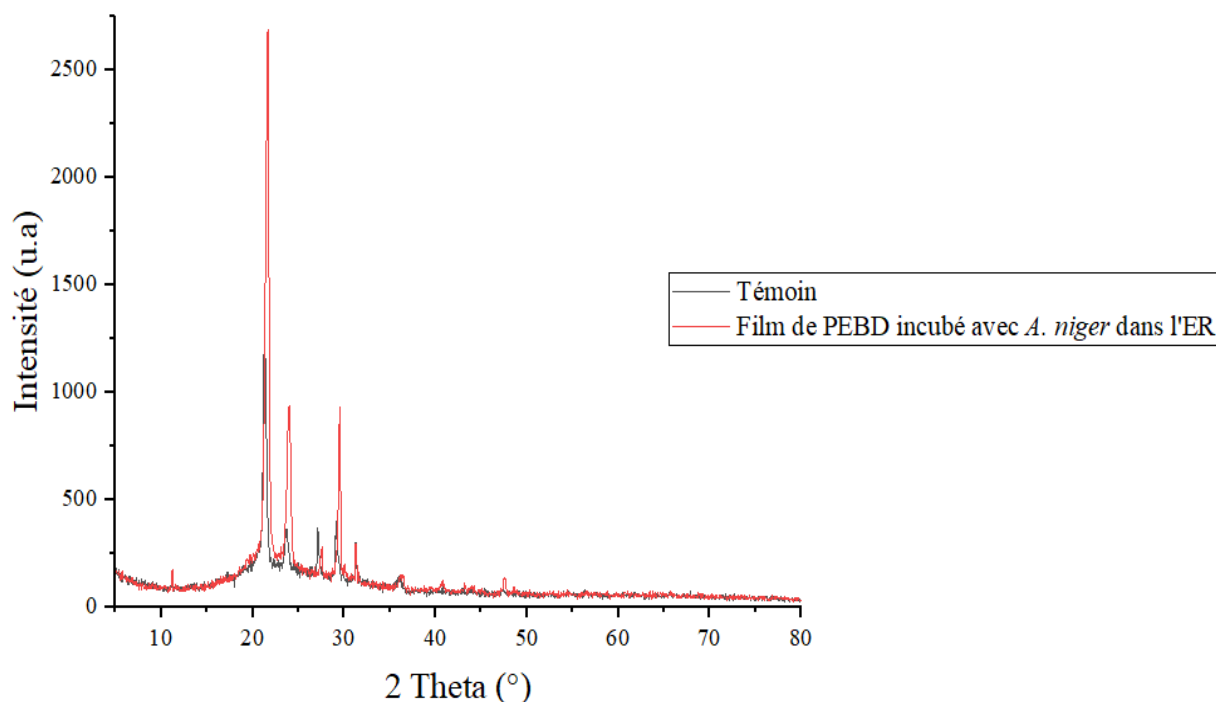
La **figure 72 (B)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *A. niger ex situ* dans l'eau du robinet, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20° , et une intensité plus faible à 31.26° .

Cependant, les pics obtenus à 21.26° , 23.71° , 27.11° , 29.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.66° , 24.01° , 27.56° , 29.51° , 36.36° et 47.57° . Par ailleurs, trois nouveaux pics sont apparus aux positions $2\theta = 40.77^\circ$, 43.17° et 48.57° .

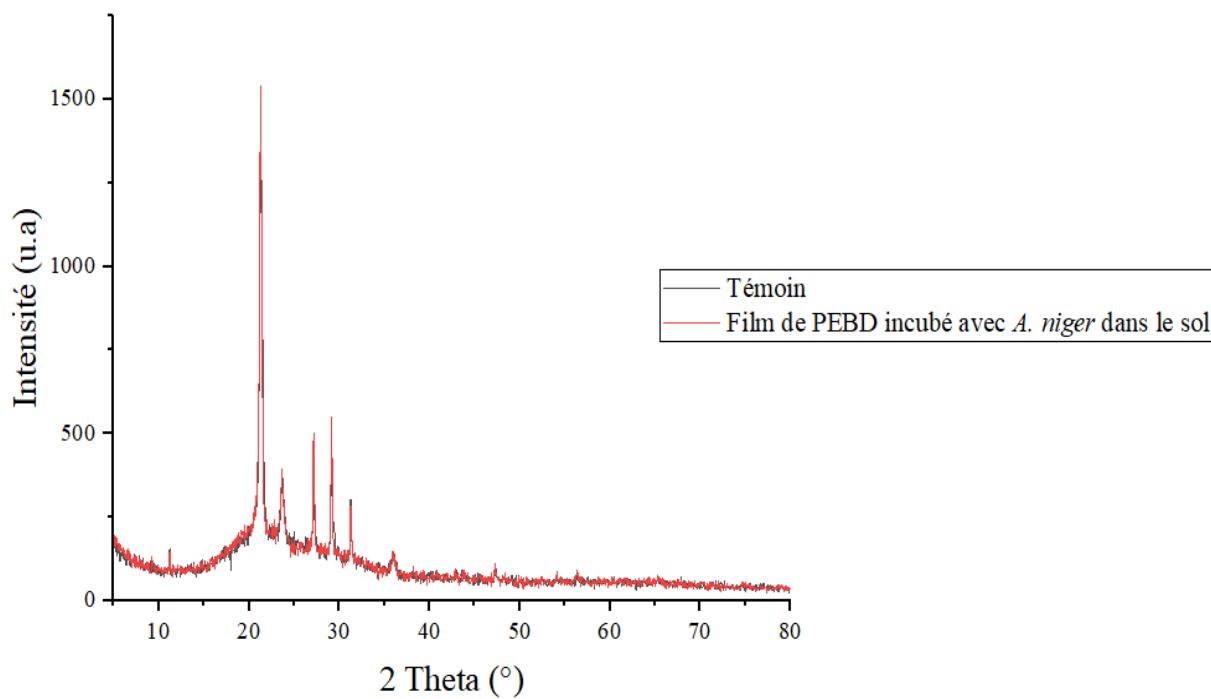
La **figure 72 (C)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *A. niger ex situ* dans un échantillon de sol, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus faible à 11.20° et 31.26° . Cependant, les pics obtenus à 21.26° , 23.71° , 27.11° , 29.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.31° , 23.61° , 27.16° , 29.16° , 35.96° et 47.27° . Par ailleurs, un nouveau pic est apparu à la position $2\theta = 56.33^\circ$.



(A)



(B)



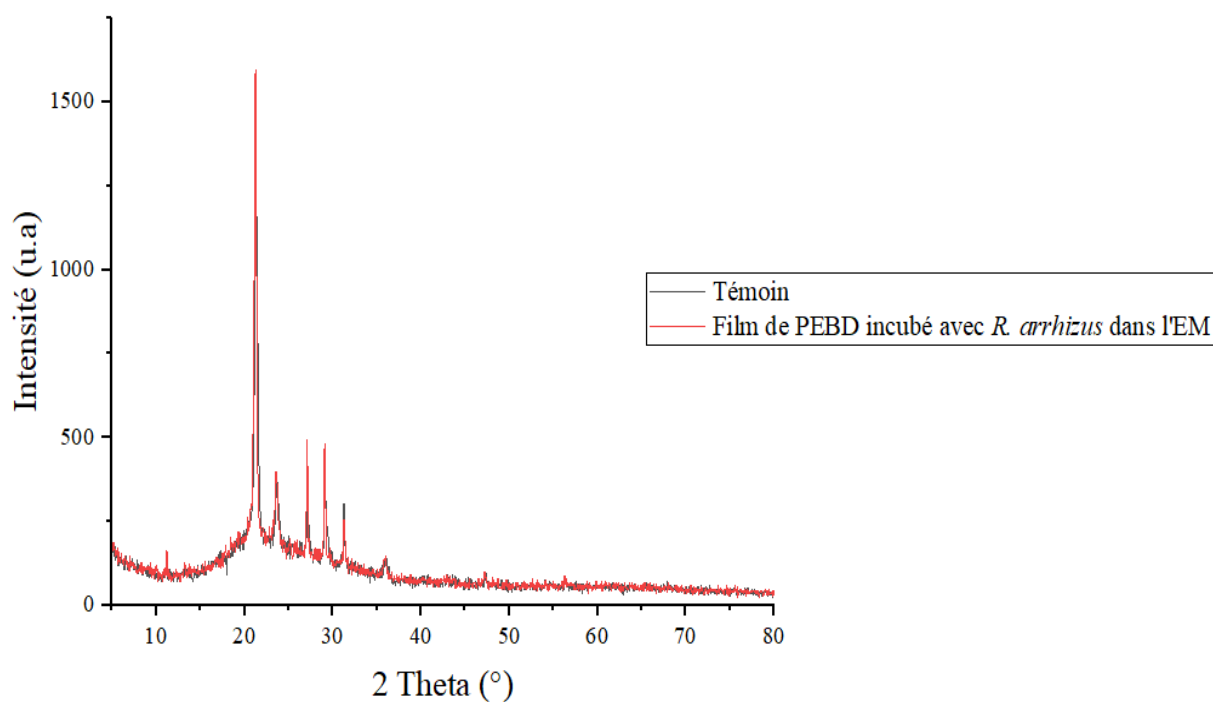
(C)

Figure 72. Diffractogrammes des films de PEBD incubés *ex situ* avec *A. niger* pendant 30 jours en cultures discontinues dans: (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin

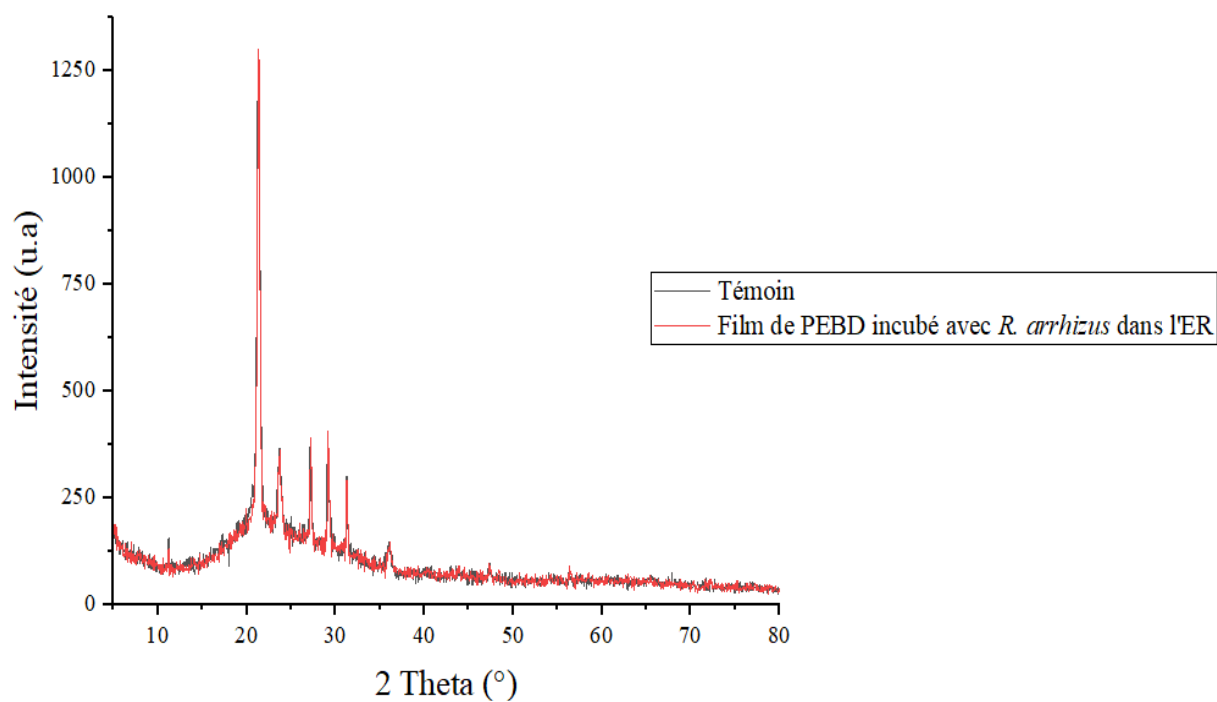
La **figure 73 (A)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *R. arrhizus ex situ* dans l'eau de mer, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20° , 21.26° et 29.11° , et une intensité plus faible à 31.26° . Cependant, les pics obtenus à 23.71° , 27.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 23.56° , 27.06° , 36.01° et 47.22° .

La **figure 73 (B)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *R. arrhizus ex situ* dans l'eau du robinet, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus faible à 11.20° et 31.26° . Cependant, les pics obtenus à 21.26° , 23.71° , 27.11° , 29.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.31° , 23.76° , 27.21° , 29.16° , 36.11° et 47.32° . Par ailleurs, un nouveau pic est apparu à la position $2\theta = 56.38^\circ$.

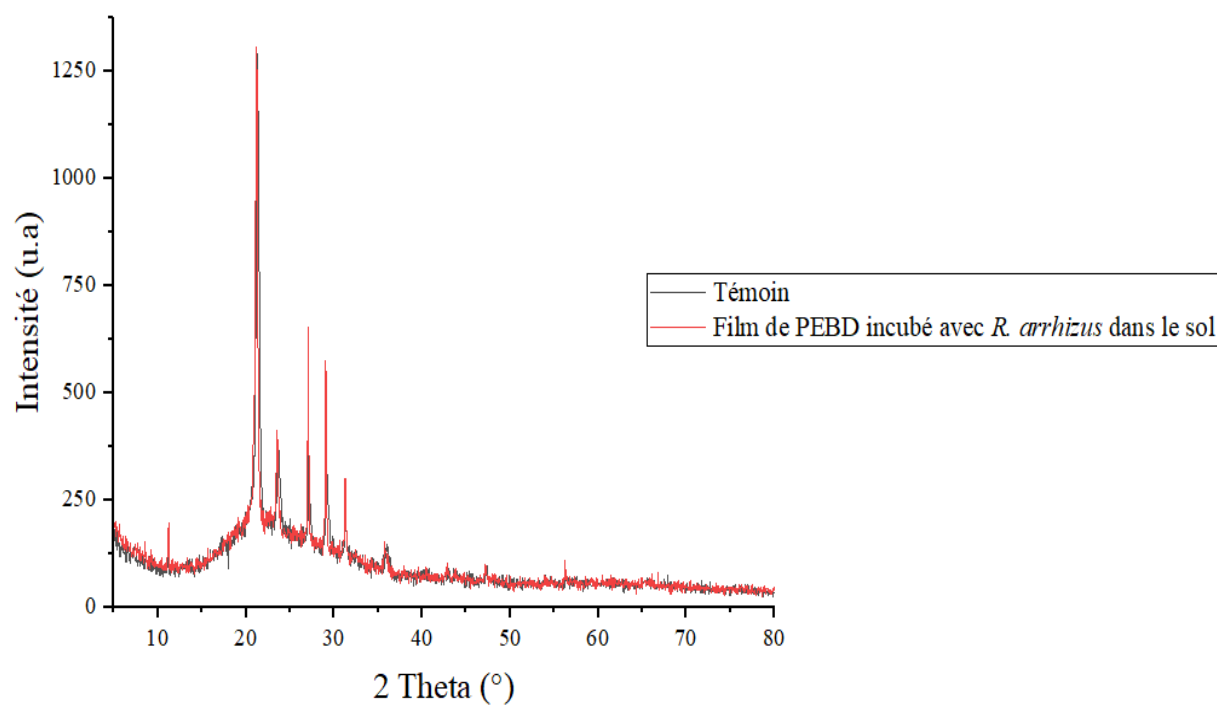
La **figure 73 (C)** illustre le profil DRX du film de PEBD incubé avec *R. arrhizus ex situ* dans un échantillon de sol, comparé au témoin. Cette analyse a révélé l'apparition des mêmes pics que ceux du film témoin, avec une intensité plus élevée à 11.20° , et une intensité plus faible à 31.26° . Cependant, les pics obtenus à 21.26° , 23.71° , 27.11° , 29.11° , 35.96° et 47.37° se sont déplacés, respectivement, à 21.21° , 23.56° , 27.06° , 29.06° , 35.71° et 47.17° . Par ailleurs, deux nouveaux pics sont apparus aux positions $2\theta = 42.82^\circ$ et 56.23° .



(A)



(B)



(C)

Figure 73. Diffractogrammes des films de PEBD incubés *ex situ* avec *R. arrhizus* pendant 30 jours en cultures discontinues dans : (A) l'eau de mer ; (B) l'eau du robinet et (C) un échantillon de sol, comparés au témoin

5. 3. 2. Taux de cristallinité

Le taux de cristallinité des films de PEBD a été calculé et est représenté dans le **tableau 19**. Le film témoin présente une cristallinité de 37.4 %. Par ailleurs, les films de PEBD incubés avec les espèces fongiques *in vitro* présentent des taux de cristallinité plus élevés, estimés à 79.99 %, 53.8 %, 39 %, 58.3 %, 41.7 % et 40.3 %, respectivement, pour *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* (en culture discontinue), *R. mucilaginosa* et *R. arrhizus* (en culture continue). Quant aux films incubés *ex situ* avec *A. niger*, le pourcentage de cristallinité est estimé, respectivement, à 35.9 %, 54.6 % et 40.3 % dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans l'échantillon de sol. Enfin, des taux de 38.6 %, 35.2 % et 36.3 % ont été, respectivement, attribués aux films incubés avec *R. arrhizus* dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans l'échantillon de sol.

Tableau 19. Taux de cristallinité des films de PEBD après incubation avec les isolats fongiques

Type de culture	Test	Isolat fongique	Taux de cristallinité
Discontinue	<i>In vitro</i>	<i>A. niger</i>	79.99 %
		<i>C. tropicalis</i>	53.8 %
		<i>P. hordei</i>	39 %
		<i>R. arrhizus</i>	58.3 %
		<i>R. mucilaginosa</i>	41.7 %
Continue	<i>In vitro</i>	<i>R. arrhizus</i> (90 jours)	40.3 %
Discontinue	<i>Ex situ</i> (eau de mer)	<i>A. niger</i>	35.9 %
		<i>R. arrhizus</i>	38.6 %
	<i>Ex situ</i> (eau du robinet)	<i>A. niger</i>	54.6 %
		<i>R. arrhizus</i>	35.2 %
	<i>Ex situ</i> (sol)	<i>A. niger</i>	40.3 %
		<i>R. arrhizus</i>	36.3 %
Témoin			37.4 %

L'augmentation de l'intensité des pics cristallins et des taux de cristallinité, ainsi que l'apparition de nouveaux pics, suggèrent la scission des chaînes du polymère suite à une attaque fongique des régions amorphes, qui sont moins résistantes aux micro-organismes. Ainsi, seule la région cristalline des films de PEBD est laissée derrière, ce qui conduit à une augmentation de la cristallinité. En revanche, la diminution de l'intensité de certains pics cristallins et du pourcentage de cristallinité peut être attribuée à la réticulation des chaînes et à l'altération de cristaux plus petits situés dans la phase amorphe-cristalline du polymère, ou produits par la consommation initiale de la phase amorphe.

DISCUSSION

1. Obtention d'isolats fongiques à partir du sol d'une décharge publique

L'accumulation de déchets plastiques dans l'environnement constitue une menace majeure pour tous les écosystèmes, avec des effets néfastes sur la santé humaine et animale, ainsi que des impacts environnementaux significatifs (Gao *et al.*, 2022), expliquant l'idée que les plastiques sont désormais considérés comme un marqueur de l'Anthropocène (Zalasiewicz *et al.* 2016). En 2021, 90.2 % des plastiques d'origine fossile ont été produits dans le monde. Le PP et le PE (PEBD, PEBDL) ont été les principaux polymères fabriqués, représentant, respectivement, 19.3 % et 14.4 % de la production globale (Plastics Europe, 2021). D'ailleurs, les décharges stockent jusqu'à 42 % des déchets plastiques dans le monde (Lin *et al.*, 2023). En Algérie, les déchets plastiques représentent 15.31 % des déchets ménagers et assimilés générés annuellement, soit environ 2.1 millions de tonnes. Le PEBD est majoritaire avec près de 8.14 % de la quantité globale des déchets plastiques produits. Ce polymère est principalement utilisé dans la fabrication des sacs, films, sachets poubelles, etc. De par leurs caractéristiques (faible densité, souplesse, légèreté, etc.), les produits en PEBD, et notamment les sacs plastiques, sont aisément dispersés dans l'environnement, notamment par le vent et le ruissellement, et persistent dans les environnements terrestre et marin, entraînant des impacts significatifs sur la faune et la flore (AND, 2020). Toutefois, les méthodes de traitement des déchets plastiques utilisées présentent des inconvénients considérables, c'est pourquoi les recherches portant sur la dégradation du PEBD par les micro-organismes, y compris les champignons et les bactéries, sont fortement encouragées pour aller vers un mode de dégradation durable de ces polymères. La biodégradation consiste en une conversion des atomes de carbone contenus dans les plastiques récalcitrants en composés biologiques inoffensifs pour l'environnement (Anderson *et al.*, 1995).

Dans plusieurs études, les champignons ont été considérés comme des microorganismes prometteurs pour la dégradation du PEBD en raison de leur capacité à former des protéines aux propriétés surfactantes telles que les hydrophobines, qui permettent l'adhésion des cellules fongiques aux surfaces des polymères (Seneviratne *et al.*, 2006; Kershaw *et al.*, 1998), de plus de leur capacité à générer des exo-enzymes capables de dégrader un grand nombre de polymères complexes (Shah *et al.*, 2008).

La présente étude consiste à identifier des isolats fongiques provenant d'une décharge située dans le nord-est de l'Algérie et à étudier leurs capacités à dégrader des films de PEBD *in vitro* dans des cultures discontinues (MML) en agissant sur différents paramètres (agitation, poids, pH, température, biomasse fongique et composition du milieu) dans le but d'optimiser la

biodégradation. Elle vise également à évaluer la dégradation *ex situ* et à aborder une nouvelle approche de dégradation *in vitro* (culture continue) afin de développer une méthode rentable de contrôle de la pollution plastique.

A cet égard, neuf espèces fongiques ont été isolées, dont sept champignons filamenteux identifiés comme *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium hordei*, *Rhizopus arrhizus* et *Trichoderma* sp. et deux levures: *Candida tropicalis* et *Rhodotorula mucilaginosa*. Le faible nombre de champignons isolés peut être attribué aux conditions extrêmes du lieu d'étude et à la présence de polluants et de contaminants, des facteurs limitant la croissance des champignons. Dineshraj et Ganesh (2016) ont identifié neuf champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* et *Fusarium* provenant de sites contaminés par le plastique à Cuddalore (Inde). De plus, Williams et Hakam (2016) ont isolé cinq espèces fongiques: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. et *Rhodotorula* sp. à partir de quatre sols de décharge publique au Nigeria. Une autre étude faite par Verma et Gupta (2019) révèle que 18 isolats fongiques ont été obtenus à partir de différents sites d'une décharge de déchets plastiques, notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terreus*. Des études récentes ont également rapporté la présence d'isolats fongiques dans les zones de décharges publiques: 16 isolats fongiques ont été obtenus de sols d'une décharge de déchets plastiques à Bhopal en Inde (Khan *et al.*, 2023). Puliga *et al.* (2023) ont isolé 47 espèces fongiques réparties en 10 genres appartenant aux phylums des *Ascomycota* et *Mucoromycota*, à partir des débris plastiques collectés dans deux champs agricoles différents.

Au cours des dernières années, de nombreuses espèces ayant un potentiel de dégradation du PE ont été découvertes à partir de différentes sources, notamment le sol d'un jardin (Albertsson, 1980), les rivières (El-Shafei *et al.*, 1998), le sol de mangrove (Kathiresan, 2003), le sol des déchets agricoles en polyéthylène (Gilan *et al.*, 2004 ;Santo *et al.*, 2013 ;Sivan *et al.*, 2006), les eaux peu profondes de l'océan (Sudhakar *et al.*, 2008), les eaux pélagiques (Harshvardhan et Jha, 2013), le sol forestier (Koutny *et al.*, 2009 ;Nowak *et al.*, 2011), un site d'élimination des déchets (Nanda et Sahu, 2010), des sols d'ordures (Usha et Palaniswamy, 2011), des sols d'enfouissement (Esmaeili *et al.*, 2013), des sols de plage contaminés par le pétrole (Jeon et Kim, 2015), ainsi que des intestins de vers de cire (Yang *et al.*, 2014) et de teigne de la cire (Ren *et al.*, 2019). Ces potentiels de dégradation dans cette diversité d'échantillons et d'habitats sont liés à la dispersion globale des déchets plastiques et à leur occurrence dans l'ensemble de la biosphère. Cela pourrait également indiquer que la dégradation du PE par des micro-organismes fongiques est effectuée par des processus non spécifiques impliquant la production

d'exo-enzymes multifonctionnelles capables de dégrader un grand nombre de polymères complexes.

En effet, les champignons du sol sont des acteurs cruciaux dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres (Janowski et Leski, 2022). Selon plusieurs études, ils peuvent constituer jusqu'à 30 % de la biomasse des micro-organismes du sol (Bar-on *et al.*, 2018) et présentent une grande diversité d'espèces fongiques, estimées à plus de six millions (Baldrian *et al.*, 2022). Cependant, leur croissance et leur répartition sont principalement influencées par des facteurs génétiques et environnementaux. De plus, l'adaptation de ces micro-organismes dans leur environnement naturel joue un rôle important dans la structuration des pools génétiques et affecte tous les niveaux de la diversité biologique, de la molécule aux individus, aux populations et aux communautés écologiques entières (Branco, 2019).

2. Sélection des isolats pour les tests de biodégradation

Bien qu'il existe plusieurs études sur la biodégradation du polyéthylène sous ses différentes formes (poudres, films), les rapports sur les micro-organismes capables de dégrader des granulés de polyéthylène ne sont pas beaucoup mis en évidence.

Dans cette étude, la sélection des espèces fongiques pour les tests de biodégradation a été basée sur l'évaluation de la capacité des isolats à dégrader des granulés de polyéthylène dans un MML. Après un mois d'incubation à 27°C, une véritable perte de poids des polymères incubés avec *Aspergillus niger* (6.12%), *Rhizopus arrhizus* (6.14%), *Penicillium hordei* (3.34%), *Candida tropicalis* (1.36%) et *Rhodotorula mucilaginosa* (1.39%) a été observée. Cette perte résulte de l'utilisation du polyéthylène comme seule source de carbone par ces espèces fongiques. Ces résultats indiquent que ces isolats sont capables de dégrader le polyéthylène, comparés au témoin où aucun changement de poids n'a été signalé.

En effet, le potentiel de dégradation des isolats fongiques testés s'explique par leur bonne adaptation dans le MML et leur capacité à produire les enzymes nécessaire au processus de dégradation, qui aboutissent à la conversion des polymères en oligomères, puis en monomères. Ces produits finaux solubles dans l'eau sont ensuite absorbés par les cellules fongiques en tant que source de carbone où ils sont métabolisés (Vasile, 1993).

Par ailleurs, une très faible perte de poids du polyéthylène incubé avec *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. et *Trichoderma* sp. a été observée, estimée, respectivement, à 0.15 %, 0.51 %, 0.56 % et 0.66 %. Cette faible perte de poids peut être attribuée à plusieurs facteurs tels que la nature du polymère, la température d'incubation, le pH du milieu, etc.

En effet, les premières études sur la biodégradation du PE remontent à 1980, lorsque des chercheurs ont isolé *Fusarium redolens* dans le sol d'un jardin en utilisant le PE marqué au ^{14}C (carbone 14) comme substrat et ont observé la libération du $^{14}\text{CO}_2$ (Albertsson, 1980). Cependant, les tests de biodégradation *in vitro* (sur MML) menés jusqu'à ce jour n'ont pas été réalisés sur les granulés de polyéthylène. Par ailleurs, plusieurs genres fongiques, dont *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, et *Phanerochaete*, ont été signalés pour leur capacité à dégrader le polyéthylène (Restrepo-Florez *et al.*, 2014; Sen et Raut, 2015; Danso *et al.*, 2019; Glaser, 2019). Singh et Gupta (2014) ont isolé diverses espèces fongiques à partir d'un site pollué par le polyéthylène et ont confirmé leurs capacités à dégrader ce polymère *in vitro*. Les isolats fongiques affiliés à *Aspergillus japonicus* (36 %), *Fusarium* sp. (32 %) et *Aspergillus flavus* (30 %) ont montré des résultats de dégradation plus efficaces en 4 semaines par rapport à *Penicillium* sp. (24 %), *Aspergillus niger* (20 %) et *Mucor* sp. (16 %). De plus, Saxena *et al.* (2022) ont obtenu dix isolats fongiques: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Chaetomium globosum*, *C. murorum*, *Fusarium oxysporum*, *Memnoniella echinata*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans* et *Stachybotrys chartarum*, pour lesquels, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *P. chrysogenum* et *R. nigricans*, ont montré les meilleurs résultats en termes de dégradation du polyéthylène basse densité et du bio-polyéthylène. Sangeetha Devi *et al.* (2015) ont signalé que l'espèce *Aspergillus flavus* a dégradé 8.5 % des films de PE après 30 jours d'incubation. Vinay *et al.* (2016) ont également isolé plusieurs genres fongiques capables de dégrader les films de polyethylene, notamment *Aspergillus niger* qui présente le pourcentage de perte de poids le plus élevé de 4.32 %. Das et Kumar (2014) ont rapporté la capacité de *Fusarium* sp. à dégrader des films de PEBD avec un pourcentage de perte de poids de 9 %. Douglas *et al.* (2020) ont confirmé que des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* et diverses levures, notamment *Candida* sp. et *Rhodotorula* sp., ont été associées à la biodégradation des déchets plastiques. Hegazy *et al.* (2024) ont rapporté le potentiel de *Candida tropicalis* dans la bioremédiation de l'huile de pétrole dans les environnements marins. Chandran et Das (2011) ont signalé la formation d'un biofilm de *Candida tropicalis* sur des graviers, aboutissant à une dégradation de 97 % du carburant diesel sur une période de 10 jours. Enfin, Wrobel *et al.* (2023) ont identifié sept champignons (quatre *Fusarium* spp., deux *Lecanicillium* spp. et *Trichoderma* sp.) ayant un potentiel de dégradation du PE. D'autre part, la faible perte de poids obtenue dans cette étude est confirmée par Sowmya *et al.* (2015), qui ont rapporté une réduction de 0.7 % de disque de PE après incubation avec *Fusarium* sp. Cependant, le potentiel de dégradation de chaque espèce fongique est attribué à sa disposition en gènes codant pour des enzymes intervenant dans le processus de la

biodégradation. [Muhonja et al. \(2018a\)](#) ont signalé que la capacité de production de laccases, estérases et alcane-hydroxylases est suggérée comme base moléculaire clé pour la dégradation du PEBD.

3. Biodégradation *in vitro*

3. 1. Biodégradation sur milieu minimum solide

La croissance des isolats fongiques sélectionnés, *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*, sur les films de PEBD additionnés au MMS affirme leur capacité à utiliser ce polymère comme source de carbone et, de fait, à le dégrader. Ces résultats sont en conformité avec ceux rapportés par [Khruengsai et al. \(2021\)](#), qui ont évalué la dégradation des films de PEBD par 30 espèces fongiques dans un MMS contenant un film de PEBD comme seule source de carbone, sur lequel les champignons se sont développés de manière significative.

[Khan et al. \(2023\)](#) ont montré la capacité du champignon filamenteux, *P. citrinum*, à croître rapidement dans un MMS amendé avec 3 % de poudre de PEBD comme seule source de carbone. La biodégradation du polyéthylène a également été étudiée par [Deepika et Jaya Madhuri \(2015\)](#) dans un MMS additionné de granulés de PE. La croissance fongique a été observée après une période d'incubation de 4 à 5 jours, en se fixant à la surface des granulés et s'étendant autour d'eux en 10 à 15 jours. Après 40 à 45 jours, un halo central distinct a été clairement observé, comparé à l'échantillon témoin non inoculé. [Augusta et al. \(1993\)](#) ont signalé que la zone de clairance autour des polymères est due à l'hydrolyse extracellulaire par des enzymes sécrétées par l'organisme cible dans le MMS. [Deepika et Jaya Madhuri \(2015\)](#) ont rajouté que la biodégradation des granulés de polyéthylène s'est produite en trois étapes: dans la première étape, les micro-organismes se sont attachés aux granulés de PE; dans la deuxième étape, ils se sont développés autour de ces derniers; et dans la dernière étape, ces micro-organismes ont dégradé le polymère et l'ont utilisé comme source de carbone. Enfin, [Nwogu et al. \(2012\)](#) ont rapporté la capacité de *Pleurotus tuber-regium* dan *Pleurotus pulmonarius* à croître dans un MMS contenant 3 g/l de poudre de PEBD.

3. 2. Biodégradation sur milieu minimum liquide: facteurs clés et optimisation

Les deux principaux facteurs ayant un impact sur la biodégradation sont les facteurs biotiques et les facteurs abiotiques. Ces deux groupes sont cruciaux car tout cycle naturel ou écosystème est composé à la fois d'éléments biotiques et abiotiques (Shahriar *et al.*, 2023). La biomasse microbienne et les enzymes microbiennes idoines sont des variables biotiques qui influencent la biodégradation (Hamamura *et al.*, 2006). Parallèlement, les conditions de culture et les facteurs naturels tels que la température, le pH, la salinité, l'humidité, l'oxygène et la lumière du soleil peuvent affecter la dégradation des polymères et présenter un effet important sur la population microbienne et l'activité des enzymes (Zekri et Chaalal, 2005). Mallisetty *et al.* (2023) ont signalé que le développement et le potentiel de dégradation de chaque micro-organisme sont régis par des facteurs physiques et chimiques tels que la durée d'incubation, le poids du PEBD, le volume de l'inoculum, la température d'incubation et le pH du milieu. Dans cette étude, on a évalué la biodégradation des films de PEBD par différentes espèces fongiques en agissant sur l'agitation du milieu (apport en oxygène), le poids des films, le pH du milieu, la température d'incubation et la biomasse fongique afin de déterminer les conditions optimales de dégradation par les espèces sélectionnées. Nos résultats ont montré que les taux de dégradation les plus élevés ont été obtenus dans les conditions suivantes:

- Une perte de poids de 17.21 % du film de 0.2g incubé pendant un mois avec 5 disques d' *A. niger* à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans un MML de pH 6, soumis à une agitation continue.
- Une perte de poids de 23.77 % du film de 0.2g incubé pendant un mois avec 5 disques de *R. arrhizus* à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans un MML de pH 6, soumis à une agitation continue.
- Une perte de poids de 7.77 % du film de 0.2g incubé pendant un mois avec 5 disques de *P. hordei* à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans un MML de pH 6, soumis à une agitation continue.
- Une perte de poids de 7.60 % du film de 0.2g incubé pendant un mois avec 5 disques de *C. tropicalis* à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans un MML de pH 6, soumis à une agitation continue.
- Une perte de poids de 5.53 % du film de 0.2g incubé pendant un mois avec 5 disques de *R. mucilaginosa* à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans un MML de pH 6, soumis à une agitation continue.

En effet, l'efficacité de la dégradation par ces champignons a été confirmée en utilisant le MML dans lequel la seule source de carbone nécessaire à la croissance des isolats fongiques a été limitée (films de PEBD). Par ailleurs, le taux de dégradation optimal de chaque espèce varie selon les conditions favorables à sa croissance. Leur potentiel de dégradation a été amélioré par

la production d'enzymes extracellulaires qui provoquent la dépolymérisation des polymères en oligomères puis dimères, formant un biofilm (Gu, 2003; Jumaah, 2017). Ces produits seront ensuite décomposés en fragments plus petits (monomères) qui sont facilement absorbés et métabolisés par des enzymes intracellulaires, utilisés comme sources de carbone pour la croissance des champignons et sont convertis en eau et en dioxyde de carbone (Ezziyyani *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008; Bahl *et al.*, 2021). Nos résultats sont en contraste avec ceux rapportés par Ali *et al.* (2022) qui ont signalé une perte de poids optimale des films de PEBD estimée à 45 % à l'état statique par rapport à ceux soumis à l'agitation, après 21 jours d'incubation sur MML avec *Fusarium equiseti*.

D'autre part, la température a été identifiée comme l'un des facteurs les plus critiques de la biodégradation. Les cellules microbiennes réagissent aux fluctuations de température par des voies biochimiques ou enzymatiques, la température ambiante et l'activité fongique sont directement liées (Mallisetty *et al.*, 2023). D'ailleurs, le taux de biodégradation est souvent faible à basse température, tandis qu'à des températures modérées, ce taux est élevé. En outre, la plupart des enzymes microbiennes peuvent être détruites ou endommagées à des températures extrêmement élevées (supérieures à 50°C) ou inactivées à des températures extrêmement basses. De même, la biomasse fongique peut subir une détérioration thermique à des températures aussi élevées. Cependant, jusqu'à ce jour, une température maximale de croissance de 62°C est attribuée à des espèces thermophiles, notamment *Thermomyces lanuginosus* (Maheshwari *et al.*, 2000). Tazkiaturrizki *et al.* (2023) ont signalé que la température ambiante a un impact sur le processus de biodégradation, et ont rapporté qu'à 30°C, ils ont observé le plus de changements dans la structure morphologique du PEBD. Fachrul *et al.* (2021) ont rapporté qu'une température de 30 °C est optimale pour la dégradation du PEBD par les champignons. De plus, la biodégradation est influencée par l'aération car l'activité microbienne nécessite de l'oxygène, ce qui implique souvent l'agitation du milieu qui favorise le transfert d'oxygène vers les micro-organismes aérobies (Pang *et al.*, 2020). Le pH a également un impact sur la biodégradation. La capacité des micro-organismes à survivre, à se développer, à se reproduire et à fonctionner diffère selon le pH du milieu, qui affecte également l'efficacité des enzymes. En général, la biodégradation est mieux adaptée aux niveaux de pH intermédiaires. Des niveaux de pH compris entre 6 et 7.5 sont idéaux pour la croissance fongique (Bahmani *et al.*, 2018). Il a été rapporté par Neina (2019) que les enzymes sont principalement plus actives entre un pH de 6.8 et 8. Une autre étude menée par Kwiatkowski *et al.* (2020) a démontré des niveaux plus élevés d'activité enzymatique à un pH de 6.5.

Les résultats obtenus dans cette étude se rapprochent de ceux fournis par [Saira et al. \(2022\)](#), qui ont obtenu un taux de dégradation estimé à 22.9 % après avoir incubé un film de PEBD (2 × 2 cm²) avec *A. niger* pendant un mois à 28°C avec agitation continue dans un MML. De plus, [Raaman et al. \(2012\)](#) ont rapporté un taux de dégradation de 5.8 % par *A. niger* après un mois d'incubation dans un shaker à 37°C. Bien que la capacité de *R. arrhizus* à dégrader le PEBD n'a pas été rapportée, certaines souches de *Rhizopus* sp. sont capables de dégrader les polymères complexes. Une étude faite par [Harrat et al. \(2022\)](#) sur la biodégradation des films de PEBD de 0.2, 0.4 et 0.6g par *Rhizopus* sp. a montré des taux de dégradation estimés, respectivement, à 5 %, 20 % et 20 %, après 30 jours d'incubation avec agitation continue dans un MML de pH 7 à 27±2°C. [Saxena et Pareek, \(2017\)](#) ont isolé 10 espèces fongiques à partir d'une décharge de la ville de Jhansi (Inde) et ont étudié leurs capacités à dégrader les films de PEBD (1× 1 cm) pendant 30 jours d'incubation à 27°C avec agitation continue dans un milieu de pH 5.6. Parmi les espèces isolées, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* ont présenté les pourcentages de dégradation les plus élevés, estimés, respectivement, à 8 %, 6 %, 7 %, 9 % et 7 %. *R. arrhizus* a été anciennement connu sous le nom de *R. oryzae* ([Davies et Thornton, 2022](#)). Une étude réalisée par [Awasthi et al. \(2017\)](#) en utilisant un isolat fongique de laboratoire *Rhizopus oryzae* NS5 a rapporté une diminution de 8.4 ± 3 % du poids du PEBD. D'autres résultats ont été obtenus par [Saxena et al. \(2022\)](#) et ont révélé que 6 % de perte de poids du PEBD a été notée après 30 jours d'incubation avec *Rhizopus nigricans*. Par ailleurs, l'implication de *P. hordei* dans la dégradation du plastique n'a jamais été relatée, cependant, plusieurs études ont rapporté la dégradation des polymères par des espèces du genre *Penicillium*. [Ojha et al. \(2017\)](#) ont signalé la capacité de *Penicillium oxalicum* à dégrader des films de PEBD après un mois d'incubation à température ambiante avec agitation continue dans un bouillon Czapek-Dox de pH 7.03±0.2. Néanmoins, une étude faite par [Saira et al. \(2022\)](#) sur la biodégradation du PEBD dans un MML avec agitation continue à 28°C a signalé qu'aucune perte de poids du polymère n'a été observée après 30 jours d'incubation avec *Penicillium*. Cependant, ils ont relaté la dégradation du PEBD par *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* avec, respectivement, 22.9 % et 16.1 % de perte de poids. En outre, les espèces du genre *Candida* sont riches en diverses enzymes extracellulaires capables de dégrader de grosses macromolécules en plus petites ([Neji et al., 2017](#)). [Hadibarata et al. \(2017\)](#) ont isolé une nouvelle souche *Candida* sp. S1 à partir de la forêt tropicale humide et ont signalé sa capacité à dégrader le pyrène à 35 % après 15 jours d'incubation. Ils ont ajouté que l'agitation du milieu a une très grande influence sur le processus de biodégradation. Une autre étude réalisée par [Frag et Soliman \(2011\)](#) a montré la capacité de l'espèce *Candida*

tropicalis à dégrader l'huile de pétrole ainsi que certains hydrocarbures. En outre, certaines espèces de la classe *Saccharomycètes* ont été largement utilisées dans les processus industriels et biotechnologiques, notamment les genres *Arxula*, *Candida* et *Debaryomyces*, qui ont été impliqués dans la dégradation du plastique (Bischoff *et al.*, 2015; Gonda *et al.*, 2000). D'ailleurs, Zahari *et al.* (2021) confirment la capacité de *C. tropicalis* à dégrader le PEBD avec 3.2 % de perte de poids. De plus, des espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae* sont des organismes modèles dans de nombreuses études (Suh *et al.*, 2006). Une recherche réalisée par Issa en 2021 a utilisé des techniques de génie génétique sur deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* pour produire l'enzyme hydrolase polyéthylène téréphtalate (PET) (protéine hétérologue), qui s'est avérée avoir la capacité de dégrader le PET en monomères. D'autre part, une étude réalisée par Vaksmaa *et al.* (2023b) a montré le potentiel de *R. mucilaginosa* isolée d'un environnement marin à minéraliser et à assimiler le carbone contenu dans le polyéthylène, en suivant la biodégradation par le traçage d'isotopes stables avec du polyéthylène marqué au ^{13}C , qui s'est trouvé incorporé dans la biomasse fongique.

Les facteurs environnementaux tels que l'exposition aux UV et la température peuvent diminuer l'hydrophobicité des plastiques ou introduire des groupes carbonyle, carboxyle ou hydroxyle, augmentant ainsi leur biodégradation (Taghavi *et al.*, 2021; Arutchelvi *et al.*, 2008). Ces facteurs environnementaux peuvent entraîner une altération de la surface, des fissures et des changements moléculaires dans les plastiques (Jacquin *et al.*, 2019). De même, la croissance des micro-organismes sur les surfaces de plastique peut modifier les propriétés physiques du polymère en créant des fissures et en agrandissant la taille des pores (Dussud et Ghiglione, 2014). Effectivement, ces altérations ont été observées dans cette étude par microscopie électronique à balayage (MEB) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Certainement, la perte de poids dans les échantillons de PEBD peut être attribuée à la dégradation du squelette carboné par les enzymes fongiques. En fait, les champignons produisent plusieurs enzymes qui peuvent rompre les liaisons chimiques des polymères plastiques pour les utiliser comme source de carbone. Après adhésion et colonisation à la surface des films de PEBD, notamment par la production de surfactants, les micro-organismes fongiques produisent des enzymes extracellulaires telles que des hydrolases (cutinases, carboxylestérases, protéases, amidases) et des oxydoréductases (laccases et peroxydases), qui entraînent la dépolymérisation des longues chaînes carbonées du polymère en oligomères, dimères et monomères plus simples et davantage dégradables. Ces fragments peuvent ensuite

être transportés à travers la membrane cellulaire, pénétrer à l'intérieur de la cellule fongique et être introduits dans la ou les voies métaboliques appropriées et assimilés (Srikanth *et al.*, 2022; Puliga *et al.*, 2023; Varshney *et al.*, 2023). Daccò *et al.* (2020) ont signalé que la croissance apicale des champignons filamenteux par un hyphes typique permet d'étendre leurs réseaux mycéliens dans différents polymères. Sánchez (2020) a indiqué que la capacité de pénétration des hyphes fongiques est associée à leur sécrétion d'exoenzymes et d'hydrophobines qui augmentent leur adhérence aux substrats hydrophobes. Les hydrophobines sont des protéines de surface cruciales pour le processus de bioremédiation en raison de leur rôle de biosurfactants, qui améliorent la biodisponibilité du substrat (Wu *et al.*, 2017). De plus, la non-spécificité des exoenzymes fongiques leur permet de décomposer différents polymères plastiques (Rodrigues da Luz *et al.*, 2019). Cette dépolymérisation augmentera ainsi leur assimilation cellulaire (Zhang *et al.*, 2020). D'ailleurs, les principales enzymes fongiques impliquées dans la biodégradation du polyéthylène sont les enzymes lignolytiques de type laccases (Lac, EC 1.10.3.2.) et peroxydases (EC 1.11.1.7) (Santacruz-Juárez *et al.*, 2021; Malachová *et al.*, 2020 ; Sowmya *et al.*, 2014 ; Shima, 2001). Santacruz-Juárez *et al.* (2021) ont proposé des voies hypothétiques pour la dégradation enzymatique du PE en conditions aérobies par des micro-organismes fongiques, dont une voie centrée sur les laccases, en combinaison avec l'action d'hydrophobines qui agissent comme biosurfactants permettant ainsi la catalyse enzymatique. Dans cette voie hypothétique, les laccases, possédant un haut potentiel rédox, entraînent l'oxydation des molécules avoisinantes et génèrent des radicaux libres du PE, qui seraient ensuite clivés pour générer des radicaux libres d'alcanes, eux-mêmes oxydés en alcools (e.g. éthanol) puis en aldéhydes (e.g. éthanal), qui sont ensuite transformés en acides carboxyliques (e.g. acide acétique) entrant dans le cycle de Krebs pour être minéralisés en CO₂ et H₂O. Ces auteurs ont également proposé une voie centrée sur les lignine-peroxydases et les peroxydases à manganèse. Ces enzymes ont été largement étudiées chez les *Basidiomycota*, mais elles sont également présentes chez les *Ascomycota*, dont *Trichoderma harzianum*, un ascomycète capable de produire à la fois de la laccase (Mw 88 kDa) et de la peroxydase (Mw 55 kDa) lors de la dégradation du PE (Sowmya *et al.*, 2014). En effet, le traitement du PE avec 0,01071 UI/ml de sa laccase a provoqué une réduction de masse de 0,5% après 10 jours d'incubation, tandis que le traitement du PE avec 0,01080 UI/ml de sa peroxydase a provoqué une perte de masse de 0,6%. Ce traitement a abouti à la formation de groupes d'acides carboxyliques, d'aldéhydes, d'aromatiques, d'alcools, d'esters, d'éthers et d'halogénures d'alkyle qui ont été détectés par FTIR. D'autre part, une espèce de basidiomycète, *Pleurotus ostreatus* a été impliquée dans la dégradation du PE. Cet isolat a été capable d'hydrolyser les liaisons C-C en

produisant des enzymes lignolytiques extracellulaires, notamment la lignine peroxydase (LiP), la peroxydase de manganèse (MnP) et les laccases (Lac). De plus, au cours de la croissance sur milieu semi-solide modifié en présence de film de PEBD, une production enzymatique élevée a été détectée. Plus précisément, les activités les plus élevées en Lac et en LiP ont été de 2.817 U/g et 70.755 U/g après 30 et 90 jours, respectivement, tandis que la production la plus élevée de MnP a été observée au 120ème jour (1.097 U/g) (Gómez-Méndez *et al.*, 2018).

Plusieurs autres études ont identifié des enzymes fongiques impliquées dans la dégradation des polymères plastiques telles que les peroxydases et les oxydases (Ojha *et al.*, 2017; Munir *et al.*, 2018; Muhonja *et al.*, 2018a; Sangale *et al.*, 2019; Sánchez, 2020). La dégradation du polyéthylène par l'enzyme laccase produite par *Pleurotus ostreatus* et *Aspergillus flavus* a été rapportée, respectivement, par Gomez-Mendez *et al.* (2018) et Zhang *et al.* (2020). Bholay *et al.* (2012) ont signalé la capacité des espèces fongiques, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Fusarium graminearum*, à produire l'enzyme peroxydase de manganèse, et la lignine peroxydase qui induisent la biodégradation des sacs de polyéthylène, avec une production maximale de peroxydes de lignine chez *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Les enzymes produites par le genre *Rhizopus* ont également été étudiées. De Souza *et al.* (2015) ont rapporté que les espèces du genre *Rhizopus* sont parmi les espèces fongiques importantes qui produisent des protéases pour dégrader les polymères plastiques. Une autre étude réalisée par Walter *et al.* (1995) a montré que l'excrétion de lipases a été impliquée dans la dégradation du plastique par la souche *Rhizopus delemar*. Ces enzymes fongiques créent des groupes fonctionnels qui augmentent l'hydrophilie du polymère et améliorent sa biodégradation (Shah *et al.*, 2008). De plus, Abraham *et al.* (2016) et Awasthi *et al.* (2017) ont observé une augmentation de la quantité des groupements carbonyles dans le PEBD en présence d'*Aspergillus nomius* et *Rhizopus oryzae*, respectivement, un signe directement associé à l'attaque de la peroxydase (Sudhakar *et al.*, 2008). Sowmya *et al.* (2015) ont révélé la sécrétion de la laccase et la manganèse peroxydase chez *Penicillium simplicissimum*. Manzur *et al.* (2004) ont évalué la production de l'enzyme dépolymérase, responsable de l'hydrolyse et de la rupture des polymères chez *Penicillium pinophyllum*.

Cependant, les enzymes sécrétées par les levures impliquées dans la dégradation du PE n'ont pas été identifiées. Or, les enzymes impliquées dans la dégradation d'autres polymères ont été signalées. Gautam *et al.* (2007) ont indiqué que les lipases impliquées dans la dégradation hydrolytique du polyester polyuréthane sont sécrétées principalement par des levures appartenant au genre *Candida*. Singh et Mukhopadhyay (2012) et Chandra *et al.* (2020) ont

rapporté les principaux genres de champignons producteurs de lipase, dont *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Candida*, *Eremothecium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Mucor*, *Ophiostoma*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* et *Trichoderma*. Cette enzyme a été impliquée dans la dégradation du polyéthylène téréphtalate (PET) (Carr *et al.*, 2020) par *Aspergillus oryzae* CCUG 33812 (Wang *et al.*, 2008) et *Candida antarctica* (CALB) (De Castro *et al.*, 2017; Carniel *et al.*, 2017). Issa (2021) a démontré la capacité de l'enzyme polyéthylène téréphtalate hydrolase (PETase) produite par *Saccharomyces cerevisiae* à dégrader et à provoquer des changements de surface sur des déchets de PET et a montré que cette levure a la capacité de former des amas cellulaires similaires à des biofilms sur la surface du PET.

Enfin, tous les facteurs biotiques et abiotiques doivent être pris en compte au cours du processus de la biodégradation. De même, les caractéristiques des polymères telles que la cristallinité, le poids moléculaire, les groupes fonctionnels, la flexibilité de la chaîne et la structure de réticulation contribuent à la dégradation enzymatique des plastiques (Artham et Doble, 2008). Ces critères peuvent être la cause des faibles pourcentages de perte de poids obtenus dans cette étude après avoir incubé les espèces fongiques sélectionnées avec des films de PEBD2. De plus, diverses forces physiques et biologiques sont aussi nécessaires pour décomposer la grande structure des polymères en fragments plus petits (Swift, 1997).

3. 3. Influence de la composition du milieu sur la biodégradation

Un autre facteur a été étudié pour évaluer son influence sur le processus de biodégradation: la composition du milieu de culture. C'est pourquoi le milieu Czapek contenant du saccharose a été utilisé. Cependant, les résultats obtenus ont montré qu'en présence d'une autre source de carbone, autre que le polymère plastique, l'affinité des espèces fongiques aux films de PEBD diminue, ce qui explique les faibles taux de dégradation obtenus dans cette étude. Nos résultats sont en conformité avec ceux rapportés par Ali *et al.* (2022) qui ont étudié l'influence du type de milieu sur la biodégradation des films de PEBD par *Fusarium equiseti* et ont signalé que le pourcentage de perte de poids a été plus élevé sur le MML. Ils ont ajouté que cela pourrait être dû à l'absence d'une source de carbone dans le MML et sa présence dans le milieu Czapek, ce qui favorise l'utilisation des films de PEBD comme source de carbone. De plus, Malachová *et al.* (2020) ont signalé un faible pourcentage de perte de poids (0.5 ± 0.4) des films de PEBD incubés avec *Trichoderma hamatum* pendant deux mois dans le milieu Czapek. En revanche, plusieurs études ont rapporté des taux de dégradation importants dans le milieu Czapek. Des

valeurs de 2.6 ± 1.51 %, 9.65 ± 1.52 % et 2.5 ± 1.51 ont été obtenues par [Perera et al. \(2021\)](#) après avoir incubé des films de PEBD de 20 microns, respectivement, avec *Phlebiopsis flavidoalba*, *Schizophyllum commune* et *Phanerodontia chrysosporium* dans le milieu Czapek pendant 60 jours à température ambiante. Par ailleurs, une étude réalisée par [Ojha et al. \(2017\)](#) a révélé qu'aucune perte de poids n'a été observée dans les films de PEBD après 30 jours d'incubation dans le milieu Czapek, ce qui est attribué au fait que les isolats fongiques ont utilisé le saccharose comme source de carbone, qui est plus facile à décomposer que le plastique.

4. Biodégradation *ex situ*

Le processus de bioremédiation peut être appliqué *in situ*, dans lequel le traitement est effectué directement dans la région contaminée, ou *ex situ*, dans lequel il est nécessaire d'excaver et de retirer la région contaminée de son lieu d'origine. Cette technique peut être utilisée pour éliminer différents polluants, y compris les plastiques ([Bardají et al., 2019](#)). Dans cette étude, la biodégradation des films de PEBD a été évaluée *ex situ*, dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans un échantillon de sol, pour étudier l'influence de la composition des milieux naturels sur l'activité fongique et donc sur le processus de biodégradation. Les résultats obtenus ont montré des valeurs non négligeables en termes de perte de poids pour *A. niger* et *R. arrhizus* dans les trois différents milieux utilisés, avec des pourcentages allant de 1.03 à 2.74 % après 30 jours d'incubation. Cependant, les films incubés avec *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa* ont présenté des pourcentages de perte de poids plus ou moins faibles (inférieurs à 1 %). En effet, très peu d'études ont rapporté la biodégradation des polymères plastiques *ex situ*. [Webb et al. \(2000\)](#) ont étudié la colonisation fongique et la biodétérioration du chlorure de polyvinyle plastifié *in situ* et *ex situ* et ont suggéré que la succession microbienne peut se produire pendant de longues périodes d'exposition *in situ*. Ils ont également identifié un champignon ressemblant à une levure (*yeast-like fungus*), *Aureobasidium pullulans*, comme principal colonisateur, et un groupe de levures, notamment *Rhodotorula aurantiaca* et *Kluyveromyces* spp. Une autre étude menée par [Harrat et al. \(2022\)](#) a signalé que les taux de dégradation les plus élevés obtenus dans l'eau du robinet (10%), dans le sol (8%) et dans l'eau de mer (5%) ont été attribués, respectivement, aux films de PEBD de 0.4 g, 0.4 g et 0.2 g. Cependant, aucune perte de poids n'a été observée dans cette étude au-delà du 30^{ème} jour d'incubation dans les trois milieux utilisés. Nos résultats sont en contraste avec ceux obtenus par [Verma et Gupta \(2019\)](#) qui ont signalé des pourcentages de perte de poids des films de PEBD estimés à 30.6 et 13.1 % après 9 mois d'incubation dans le sol avec *A. flavus* et *A. terreus*, respectivement.

Les micro-organismes présentant les potentiels de dégradation les plus importants doivent être testés au niveau *ex situ* avant de les utiliser sur le site de décharge pour se débarrasser des déchets plastiques (Shahnawaz *et al.*, 2019). Néanmoins, le taux de dégradation *ex situ* se produit généralement à un rythme plus lent par rapport à la dégradation *in vitro* ce qui explique les faibles pourcentages de dégradation obtenus dans cette étude. Ceci peut être attribué à la présence de sources de carbone autres que le polyéthylène dans les milieux naturels utilisés et/ou à des phénomènes de compétition avec les micro-organismes endémiques. De plus, les facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité et le pH des milieux ont une influence importante sur l'activité biologique des espèces fongiques et, par conséquent, sur la dégradation des polymères carbonés (Lefaux, 2005).

5. Suivi de la biodégradation des films de PEBD après trois mois d'incubation

Les films de PEBD, incubés avec *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa* dans des cultures discontinues, ont démontré des pourcentages de perte de poids augmentant avec le temps d'incubation jusqu'au 30^{ème} jour. Ces résultats suggèrent que la durée d'incubation, notamment le temps de contact des espèces fongiques avec les polymères, est également un élément important dans le processus de biodégradation. Cependant, le taux de dégradation reste inchangé après 30 jours. Des études ont été menées pour évaluer l'influence de la période d'incubation sur la dégradation du PEBD par des communautés microbiennes. Il est recommandé que les résultats de dégradation soient fiables et mesurables dans les 72 heures (Mallisetty *et al.*, 2023). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Tazkiaturrizki *et al.* (2023) qui ont trouvé des changements morphologiques plus importants à la surface du PEBD après 30 jours d'incubation. Les résultats obtenus par Khruengsai *et al.* (2021) confirment la capacité du champignon filamentueux *A. niger* à dégrader et à utiliser les films de PEBD comme seule source de carbone après 30 jours d'incubation, avec un pourcentage de perte de poids estimé à 8.85 %. D'autre part, Dsouza *et al.* (2021) ont étudié la dégradation du PEBD par un consortium fongique composé d'*Aspergillus niger*, *A. flavus* et *A. oryzae* où une perte de poids de 26.15 % a été observée après 55 jours d'incubation sous des conditions contrôlées. En effet, nos résultats sont en conformité avec ceux réalisés par Awasthi *et al.* (2017) et Harrat *et al.* (2022), qui ont rapporté la dégradation du PEBD par *Rhizopus oryzae* NS5 et *Rhizopus sp.*, respectivement, après un mois d'incubation. Cependant, plusieurs études ont relaté la biodégradation des films de PEBD avec une durée d'incubation prolongée *in vitro*, après l'application d'un prétraitement aux polymères testés ou l'enrichissement du milieu de culture. Vinay *et al.* (2016) ont étudié la dégradation du PEBD pré-exposé aux rayons UV par

Aspergillus niger (2.94, 4.32 et 5.11%) et *Penicillium* sp. (2.02, 3.11 et 3.87%) après 30, 60 et 90 jours d'incubation, respectivement. Verma et Gupta (2019) ont rapporté la dégradation des films de PEBD après 4 mois d'incubation avec *A. terreus* (11.4 %) et *A. flavus* (14.3 %). De même, Khruengsai *et al.* (2021) ont obtenu des pourcentages de perte de poids du PEBD estimés à 16.83 et 28.78 % après 60 et 90 jours d'incubation, respectivement, avec *A. niger*. Une autre étude réalisée par Muhonja *et al.* (2018a) a enregistré un taux élevé de dégradation du PEBD estimé à 36.4 ± 5.53 après incubation avec *A. oryzae* A5, 1 (MG779508) pendant 112 jours. Sáenz *et al.* (2019) ont obtenu des taux élevés de biodégradation des films de PEBD estimés à 35.3 % et 22.14% après incubation avec *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus*, respectivement, pendant 77 jours. Khan *et al.* (2023) ont également rapporté des pourcentages élevés de perte de poids des films de PEBD incubés pendant 90 jours avec *Penicillium citrinum*, estimés à 38.82 ± 1.08 % et 47.22 ± 2.04 % pour, respectivement, les polymères non traités et pré-traités à l'acide nitrique.

Par ailleurs, une perte de poids importante des films de PEBD a été observée après 90 jours d'incubation avec *R. arrhizus* dans la culture continue, atteignant 29.74 %. Cette perte est attribuée aux conditions du milieu, dans lequel il y a un apport continu en nutriments et en parallèle un soutirage de la biomasse produite, ce qui permettra à l'isolat fongique de croître et de sécréter les enzymes nécessaires à la biodégradation tout au long de la période d'incubation. Contrairement aux conditions des cultures discontinues, dans lesquelles la phase exponentielle est courte à cause de l'épuisement des éléments nutritifs dans le milieu et l'accumulation des produits de la dégradation. Ces derniers peuvent entraîner la mort cellulaire et, par conséquent, l'arrêt du processus de biodégradation au bout d'un mois. En effet, jusqu'à présent, la dégradation du PEBD dans une culture continue par des champignons n'a pas encore été étudiée. Cependant, Kumar *et al.* (2016) ont rapporté la dégradation des plastiques commerciaux dans le sol en utilisant un bioréacteur et ont constaté que le consortium bactérien, composé d'espèces de *Anabaena*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *Vibrio alginolyticus*, peut dégrader des films de PEBD avec 19,8% de perte de poids après 100 jours d'incubation.

6. Changements morphologiques sous MEB et altérations structurales sous FTIR

La biodégradation des films de PEBD a été confirmée par des analyses au MEB et FTIR. C'est pourquoi les films incubés avec *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*, présentant les pourcentages de perte de poids les plus élevés, ont été analysés par MEB et FTIR. Les résultats obtenus sous MEB ont montré des perturbations et des altérations morphologiques de la surface des films de PEBD incubés avec ces espèces fongiques, comparés au témoin. Des changements structuraux, notamment la formation de fissures et de pores, ont été mis en évidence sur les polymères plastiques incubés en cultures discontinues après 30 jours (*in vitro* et *ex situ*) et en culture continue après 30 et 90 jours. Ces résultats confirment que les cinq isolats fongiques sont capables de décomposer la structure complexe du PEBD. De même, les fissures formées ont confirmé la fragilité des films de PEBD cultivés avec les espèces fongiques qui ont colonisé ces polymères. D'ailleurs, les images obtenues suggèrent que les isolats ont utilisé le polyéthylène comme seule source de carbone en se développant sur sa surface et en fusionnant avec succès leurs hyphes fongiques sur les films de PEBD (Khruengsai *et al.*, 2021). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés précédemment montrant des changements structuraux et des érosions à la surface des films de PEBD en termes de porosité, de cavités et de trous engendrés par des isolats fongiques tels que *Aspergillus* et *Penicillium* (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2002; Das et Kumar, 2014), notamment *Aspergillus flavus* et *Mucor circinelloides* (Pramila et Ramesh, 2011). De plus, cette analyse a permis l'observation de la croissance superficielle du mycélium fongique et la biodégradation du polyéthylène clairement visible à travers la formation de pores et de fissures à la surface des films suite à la pénétration et la colonisation du mycélium fongique (Gong *et al.*, 2023). Bonhomme *et al.* (2003) ont confirmé que les champignons s'accumulent à la surface du polyéthylène et après leur élimination, cette dernière devient physiquement piquée et érodée. Khan *et al.* (2023) ont étudié la dégradation du PEBD par *Penicillium citricola* et ont observé la formation de cavités et de fissures à la surface du polymère sous MEB après 90 jours d'incubation. D'autres études ont rapporté des modifications à la surface des films de PEBD suite à leur dégradation par des espèces fongiques (Ameen *et al.*, 2015; Alshehrei, 2017; Verma et Gupta, 2019; Khruengsai *et al.*, 2021; Kučić Grgić *et al.*, 2023). La microscopie à balayage a fourni une observation détaillée des changements de surface dans les polymères de PEBD. Des hyphes fongiques, des cavités et des fosses ont été remarqués. La biodégradation des polymères est généralement un processus de corrosion de surface en raison de l'incapacité de pénétration des enzymes

extracellulaires dans le polymère (Gnanavel *et al.*, 2014). En outre, l'analyse EDS a fourni des preuves claires d'oxydation, confirmant l'altération et la décomposition des chaînes carbonées du polyéthylène par l'isolat fongique testé. Avant la dégradation, le taux de carbone dans le film témoin a été très élevé (94.83%). Cependant, après la dégradation par *R. arrhizus*, la teneur en carbone a diminué et est estimée à 69.26% et 56.84% pour, respectivement, le film de PEBD incubé dans une culture discontinue et une culture continue. En revanche, la teneur en oxygène a augmenté. En effet, lorsque le polyéthylène se dégrade suite à son utilisation par l'espèce fongique, la teneur en carbone diminue. De plus, les vides qui se forment dans la matrice du polymère augmentent sa surface de contact avec le milieu extérieur. Cela favorise l'adsorption de l'oxygène et l'oxydation des chaînes de PE, conduisant à la formation de groupes fonctionnels riches en oxygène tels que les groupes hydroxyles (-OH) et les groupes carbonyles (C=O). Ces composés sont plus oxygénés que les chaînes de polymères d'origine, ce qui explique l'augmentation observée de la teneur en oxygène.

D'autre part, les films de PEBD ont été soumis à une analyse FTIR pour évaluer toute transformation chimique ou modification des groupes fonctionnels de ces polymères (Montazer *et al.*, 2018; Ghatge *et al.*, 2020; El-Sayed *et al.*, 2021). Dans cette étude, l'augmentation de l'intensité des bandes d'absorption à 2912, 2845, 1463 et 718 cm^{-1} dans les films cultivés avec les isolats fongiques a été attribuée au clivage des liaisons C-H et la formation de nouveaux produits intermédiaires (Esmaeili *et al.*, 2013). L'apparition des pics à 3521-4912 cm^{-1} et 2088-2363 cm^{-1} dans tous les échantillons dégradés indique que les liaisons -OH (d'alcool) et $\text{C} \equiv \text{C}$ (d'alcyne) ont été altérées et que des composés carboxylés se sont formés. De plus, les bandes obtenues entre 1739 et 1841 cm^{-1} , dans les films incubés avec *R. arrhizus* dans la culture continue (F5) et la culture discontinue ainsi que les films incubés *ex situ*, résultent de l'élongation des groupements C=O des esters aliphatiques. La formation de ces groupements esters suggère une activité d'hydrolyse biologique par les dépolymérase. En outre, les bandes obtenues à 1695, 1697 et 1700 cm^{-1} sont attribuées, respectivement, à l'élongation des liaisons C=O des aldéhydes et des cétones aromatiques. Ces composés carbonyles résultent du phénomène d'oxydation par les oxydo-réductases. Das et Kumar (2015) ont mentionné que les groupes carbonyles, une fois formés, peuvent être attaqués par des micro-organismes. Hasan *et al.* (2007) ont attribué les changements au nombre d'onde 1812.8 cm^{-1} à l'utilisation du groupe carbonyle par les champignons au cours de la biodégradation du PEBD. D'autre part, les bandes apparues entre 1424 et 1435 cm^{-1} ont été attribuées aux déformations des liaisons C-H des groupements méthylènes (alcanes). De plus, l'apparition de nouveaux pics à 1107 et

1105 cm^{-1} dans le film de PEBD incubé avec *R. arrhizus* en culture continue pendant 30 et 90 jours, respectivement, confirme la biodégradation et la formation de nouveaux produits intermédiaires présentant des vibrations d'élongation C-O (alcools secondaires). L'introduction de ces bandes favorise l'oxydation du PEBD par les enzymes médiées par des champignons (Das *et al.*, 2018). L'analyse FTIR a montré que les films de PEBD ont été dégradés par *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*, et ce, via la réaction d'hydrolyse enzymatique favorisant l'action microbienne (Khruengsai *et al.*, 2021). En outre, la valeur de l'IC des films dégradés a été supérieure à celle du film témoin. L'augmentation de l'IC a confirmé que des changements oxydatifs se sont produits lors de la dégradation des films de PEBD par les isolats fongiques (Ratanakamnuan et Aht-Ong, 2006). D'autre part, l'exposition prolongée du film incubé dans une culture continue à l'isolat fongique pendant 90 jours a conduit à une faible diminution de l'indice carbonyle suite à la formation des groupements esters au cours du processus de dégradation (Sudhakar *et al.*, 2008). Lorsque le PEBD est oxydé, des groupements carbonyles sont introduits dans la chaîne du polymère conduisant à la formation d'acides carboxyliques et d'autres produits de faible poids moléculaire. Ces altérations rendent le matériau plus hydrophile, ce qui augmente et accélère le taux de dégradation. Enfin, les changements conformationnels des spectres d'absorption dans les films de PEBD dégradés ont confirmé la dépolymérisation de ces polymères et leur utilisation comme source de carbone (Nowak *et al.*, 2011).

7. Détermination des changements de cristallinité par DRX

La structure des films de PEBD a été étudiée par diffractométrie des rayons X afin d'examiner l'évolution du taux de cristallinité après la dégradation par les différents isolats fongiques. Les spectres obtenus ont montré des pics de diffraction d'intensité élevée dans la zone 2θ entre 20° et 30° , confirmant la structure semi-cristalline des polymères testés. Les pics observés entre 21° et 22° de l'angle 2θ , représentant les réflexions (110), et les pics formés à $2\theta = 23.5 - 24^\circ$, correspondant aux réflexions (200) (Musuc *et al.*, 2013), sont attribués à la structure cristalline orthorhombique du PEBD (Morancho *et al.*, 2006). Par ailleurs, des changements dans le profil DRX des films de PEBD ont été observés après la biodégradation, notamment une augmentation ou une diminution de l'intensité de certains pics, des variations dans les taux de cristallinité, des décalages de quelques pics et l'apparition de nouvelles bandes. Ces altérations sont conformes aux résultats obtenus par El Sayed *et al.* (2021), qui ont signalé des modifications de la structure cristalline des films de PEBD pré-traités thermiquement et exposés

à une culture mixte de deux isolats fongiques, *Aspergillus carbonarius* et *A. fumigatus*, pendant 16 semaines. Ils ont observé un déplacement de la position des pics à $2\theta = 21.6, 24.06$ et 36.39° , une disparition du pic à $2\theta = 69.558^\circ$, ainsi qu'une diminution de l'intensité des pics à $2\theta = 21.5$ et 36.12° , indiquant une réduction de la taille des cristaux et de la cristallinité au cours de la biodégradation (El Sayed *et al.*, 2021). Une autre étude menée par Manzur *et al.* (2004) a révélé une augmentation de la cristallinité relative du PEBD après 3 mois d'incubation avec un consortium de quatre champignons filamenteux : *Aspergillus niger*, *Gliocladium virens*, *Penicillium pinophilum* et *Phanerochaete chrysosporium*. En effet, les micro-organismes agissent sur les polymères semi-cristallins au niveau des phases amorphes, du fait que les régions cristallines sont plus résistantes aux attaques enzymatiques (Shogren *et al.*, 1992). La fraction amorphe entoure les particules cristallines et/ou délimite les blocs cristallins de la mosaïque cristalline (Manzur *et al.*, 1997). Nos résultats suggèrent que les isolats fongiques, *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosus*, agissent principalement sur la phase amorphe, provoquant une augmentation de la cristallinité et la séparation des blocs cristallins, formant ainsi des cristaux plus petits. Toutefois, ces composés situés dans l'interface amorphe-cristalline du polymère ou formés au cours de la première étape peuvent être assimilés par les espèces fongiques, conduisant à une augmentation de la fraction amorphe et une diminution de la fraction cristalline (Manzur *et al.*, 2004; Weiland *et al.*, 1995). Ces deux mécanismes expliquent les augmentations et les diminutions de cristallinité obtenues dans cette étude. Par ailleurs, les décalages dans la position des pics de diffraction résultent d'un faible changement dans les dimensions du réseau cristallin. Enfin, le type de traitements biologiques et physico-chimiques ainsi que la durée d'incubation peuvent être à l'origine des différences de cristallinité observées (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2002).

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

La pollution environnementale due à l'accumulation des polymères sous forme de déchets plastiques pose un énorme problème écologique. La biodégradation est considérée comme la méthode la plus efficace de contrôle de cette pollution et constitue le principal processus de décontamination des sédiments et des sols. En effet, les micro-organismes impliqués dans le processus de dégradation se distinguent par leurs caractéristiques uniques, ils présentent des exigences spécifiques en termes de conditions environnementales favorables à leur croissance. Cependant, il est crucial d'isoler des espèces capables de dégrader le plastique et de déterminer les conditions optimales pour leurs activités.

L'objectif de la présente étude est d'identifier des champignons isolés de la décharge publique de Boumehadjer située à l'est de Skikda (Algérie), et d'étudier leurs capacités à dégrader des films de polyéthylène basse densité (PEBD) *in vitro* dans des cultures discontinues (milieu minimum liquide, MML) en agissant sur quelques paramètres dans le but d'optimiser la biodégradation. De plus, cette étude vise à évaluer la biodégradation *ex situ* (dans l'eau de mer, l'eau du robinet et dans un échantillon de sol) et à aborder une nouvelle approche de dégradation *in vitro* (culture continue) afin de développer une méthode rentable de contrôle de la pollution plastique.

L'examen macroscopique et microscopique des isolats fongiques sélectionnés a permis leur identification. Ils appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Candida* et *Rhodotorula*. L'analyse phylogénétique des régions ITS, Actine; ITS, LSU; ITS, β -tubuline et ITS, D1D2 a révélé que ces isolats correspondent, respectivement, à *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium hordei*, *Candida tropicalis* et *Rhodotorula mucilaginosa*.

Notre étude a montré la capacité de ces espèces fongiques à dégrader des films de sacs plastiques de type PEBD *in vitro* et *ex situ*, en observant la perte de poids, les changements morphologiques par microscopie électronique à balayage (MEB), les altérations structurelles par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et les modifications de cristallinité par diffractométrie des rayons X (DRX) des polymères étudiés. Cependant, les taux de dégradation ont été plus élevés dans les tests réalisés sur MML que dans les tests menés dans des milieux naturels, car ces derniers contiennent des sources de carbone autres que le polyéthylène.

Notre étude a également mis en évidence la nécessité d'un apport en oxygène pour les cinq espèces identifiées lors du processus de dégradation. De plus, un pH de 6 a été trouvé comme optimal pour tous les isolats testés. En outre, une température optimale de 25°C a été attribuée à

toutes les espèces fongiques à l'exception d'*Aspergillus niger*, pour lequel la température optimale a été de 35°C. Quant aux poids des films, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les films de 0.2 g incubés avec une biomasse fongique estimée, respectivement, à 375×10^6 cellules/ml, 431.25×10^6 cellules/ml, 92.5×10^6 cellules/ml, 45×10^6 cellules/ml et 415×10^6 cellules/ml pour *A. niger*, *C. tropicalis*, *P. hordei*, *R. arrhizus* et *R. mucilaginosa*

L'optimisation de ces paramètres biotiques et abiotiques a permis d'améliorer l'activité fongique et d'obtenir des pourcentages de perte de poids prometteurs après 30 jours d'incubation, estimés à 17.21 %, 23.77 %, 7.77 %, 7.60 % et 5.53 % pour, respectivement, *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*. En outre, l'évaluation de la biodégradation dans une culture continue a permis d'obtenir des taux de dégradation plus élevés qu'en cultures discontinues, atteignant 29.74 % après 90 jours d'incubation avec *R. arrhizus*.

La microscopie électronique à balayage a révélé des changements structurels évidents, notamment des fissures et des rugosités à la surface des films de PEBD incubés avec les cinq isolats fongiques. De plus, l'analyse ATR-FTIR a montré que ces polymères ont été dégradés par *A. niger*, *R. arrhizus*, *P. hordei*, *C. tropicalis* et *R. mucilaginosa*, via des réactions enzymatiques favorisant l'action microbienne. En effet, l'apparition des groupements fonctionnels, notamment des esters, des aldéhydes et des cétones présentant des groupes carbonyles, suggère des activités d'hydrolyse par des dépolymérase et une oxydation par des oxydo-réductases. En outre, l'augmentation de l'indice carbonyle (IC) confirme que des changements oxydatifs se sont produits lors de la dégradation des films de PEBD. D'autre part, la diffractométrie des rayons X (DRX) a révélé des pics d'intensité élevée dans la position angulaire $2\theta = 20 - 30^\circ$, confirmant la structure semi-cristalline du polymère testé. Par ailleurs, plusieurs altérations ont été remarquées après la dégradation par les isolats fongiques, notamment des changements d'intensité des pics cristallins suite à l'attaque des régions amorphes et/ou des petits cristaux, ainsi que des décalages dans la position de certains pics qui résultent d'un faible changement dans les dimensions du réseau cristallin.

Enfin, l'utilisation des plastiques biodégradables est fortement encouragée; néanmoins, leur coût élevé rend leur adoption limitée, augmentant ainsi la demande pour les plastiques traditionnels, d'où la nécessité d'instaurer des systèmes de gestion des déchets, notamment la biodégradation. Ce processus biologique se distingue comme une solution idéale pour réduire les déchets plastiques et préserver les écosystèmes. Pour conclure, investir dans des méthodes de biodégradation efficaces et promouvoir la recherche dans ce domaine sont des initiatives essentielles pour faire face à cette problématique mondiale.

Perspectives

Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent des perspectives intéressantes et pourraient également servir de base pour des travaux ultérieurs:

- Des approches de génomique et de transcriptomique afin de mettre en évidence les gènes impliqués dans la dégradation des polymères
- Une caractérisation des enzymes impliquées dans le processus de la biodégradation
- Le suivi de la biodégradation par le marquage des molécules de carbone (^{13}C) contenues dans les polymères de PEBD par RMN
- L'étude *in situ* de la biodégradation du PEBD par les espèces fongiques identifiées
- Evaluation de la dégradation d'autres polymères par les espèces identifiées afin de déterminer leur spectre d'activité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

- Abraham, J., Ghosh, E., Mukherjee, P., & Gajendiran, A. (2016). Microbial Degradation of Low-Density Polyethylene. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(1), 147-154.
- Agence Nationale des Déchets (AND). (2020). Les Déchets Plastiques en Algérie: *Regard Croisé sur les Plastiques à Usage Unique. Le Bulletin de Veille Technologique N° 02-2021*.
- Aiswarya, S., Pratiksha, A., & Shib Shankar, B. (2022). Self-Healing Thermoplastic Elastomeric Materials: Challenges, Opportunities and New Approaches. *European Polymer Journal*, 181, 111658.
- Alabi, O.A., Ologbonjaye, K.I., Awosolu, O., & Alalade, O.E. (2019). Public and Environmental Health Effects of Plastic Wastes Disposal: A Review. *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, 5 (2), 13p.
- Alaswad, S.O., Mahmoud, A.S., & Arunachalam, P. (2022). Recent Advances in Biodegradable Polymers and Their Biological Applications: A Brief Review. *Polymers*, 14 (22), 4924.
- Albertsson, A.C. (1980). The Shape of the Biodegradation Curve for Low and High Density Polyethenes in Prolonged Series of Experiments. *European Polymer Journal*, 16(7), 623-630.
- Ali, M.I., Ahmed, S., Robson, G., Javed, I., Ali, N., Atiq, N., & Hameed, A. (2014). Isolation and Molecular Characterization of Polyvinyl Chloride (PVC) Plastic Degrading Fungal Isolates. *Journal of Basic Microbiology*, 54 (1), 18-27.
- Ali, S.S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E.A., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Degradation of Conventional Plastic Wastes in The Environment: A Review on Current Status of Knowledge and Future Perspectives of Disposal. *Science of the Total Environment*, 771, 144719.
- Ali, S.A., Zakarya, S., & Khaled, S. (2022). Screening and Optimisation of the Biodegradation Potential for Low Density Polyethylene (LDPE) Films by *Fusarium equiseti* and *Brevibacillus parabrevis*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 19(1), 215-229.
- Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M.N., Hill, G., & Wallis, C. (2020). Determination of the Carbonyl Index of Polyethylene and Polypropylene using Specified Area under Band Methodology With ATR-FTIR Spectroscopy. *E-polymers*. 20, 369-381.
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of Low-Density Polyethylene by Fungi Isolated from Red Sea Water. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 1703-1709.
- Alsohaili, S.A., & Bani-Hasan, B.M. (2018). Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(3), 329 – 337.
- Alves, R.F., Casalini, T., Storti, G., & McKenna, T. (2021). Gas-Phase Polyethylene Reactors—A Critical Review of Modeling Approaches. *Macromolecular Reaction Engineering*, 15(3), 79p.
- Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., & Al-Sabri, A.E. (2015). Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Mangrove Fungi from the Red Sea Coast. *Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology*, 31(2), 125-143.

- Amin, S., & Amin, M.N. (2011). Thermoplastic Elastomeric (TPE) Materials and their Use in Outdoor Electrical Insulation. *Reviews on Advanced Materials Science*, 29, 15–30.
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2020). Plastic Biodegradation: Frontline Microbes and Their Enzymes. *Science of The Total Environment*, 759, 143536.
- Anderson, T.A., Tsao, R., & Coats, J.R. (1995). Consumption and Degradation of 3H-Polyethylene/Starch Disks by Terrestrial Isopods. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 214-221.
- Artham, T., & Doble, M. (2008). Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. *Macromolecular Bioscience*, 8 (1), 14–24.
- Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S., & Uppara, P.V. (2008). Biodegradation of Polyethylene and Polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 9–22.
- Augusta, J., Müller, R.J., & Widdecke, H. (1993). A Rapid Evaluation Plate-Test for the Biodegradability of Plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 673-678.
- Avérous, L., & Fringant, C. (2001). Association Between Plasticized Starch and Polyesters: Processing and Performances of Injected Biodegradable Systems. *Polymer Engineering and Science*, 41 (5), 727-734.
- Avérous, L., & Pollet, E. (2012). Biodegradable Polymers. In: *Environmental Silicate Nano-Biocomposites [Green Energy and Technology]*. Avérous, L., Pollet, E., (eds). Springer, London, pp. 13-39.
- Awasthi, S., Srivastava, N., Singh, T., Tiwary, D., & Mishra, P.K. (2017). Biodegradation of Thermally Treated Low Density Polyethylene by Fungus *Rhizopus oryzae* NS 5. *3 Biotech*, 7(1), 73.
- Azizan, M.S., Zamani, A.I., Stahmann, K-P., & Ng, C.L. (2016). Fungal Metabolites and their Industrial Importance: A Brief Review. *Malaysian Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 2, 15-23.

- B -

- Bahl, S., Dolma, J., Singh, J.J., & Sehgal, S. (2021). Biodegradation of Plastics: A State of the Art Review. *Materials Today*, 39(1), 31-34.
- Bahmani, F., Ataei, S.A., Bahonar, S., & Mikaili, M.A. (2018). The Effect of Moisture Content Variation on the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils: Modeling and Experimental Investigation. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 5(2), 1000236.
- Baldauf, S., Romeralo, M., & Carr, M. (2013). The Evolutionary Origin of Animals and Fungi. In: *Evolution from the Galapagos: Two Centuries after Darwin*. Trueba, G., Montúfar, C., (eds), Springer, New York, pp. 73-106.
- Baldrian, P., Větrovský, T., Lepinay, C., & Kohout, P. (2022). High-Throughput Sequencing View on the Magnitude of Global Fungal Diversity. *Fungal Divers*, 114, 539–547.
- Banerjee, R., & Ray, S.S. (2022). Sustainability and Life Cycle Assessment of Thermoplastic Polymers for Packaging: A Review on Fundamental Principles and Applications. *Macromolecular Materials and Engineering*, 307(6), 2100794.
- Bardají, D.K.R., Furlan, J.P.R., & Stehling, E.G. (2019). Isolation of a Polyethylene Degrading *Paenibacillus* sp. from a Landfill in Brazil. *Archives of microbiology*, 201(5), 699-704.

- Bar-On, Y.M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The Biomass Distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 6506–6511.
- Battsetseg, B., Sukhbaatar, S., & Oyunchimeg, T. (2022). Current Status and Prospects of Plastic and Plastic Bag Waste Recycling. *International Journal of Social Science and Humanities Research-MIYR*, 2(2), 1-16.
- Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2015). *Marine Anthropogenic Litter*. First Edition, Springer Cham, 456.
- Bhogayata, A.C. (2024). *Sustainable Construction: Development of Eco-Efficient Concrete with Plastic and Industrial Wastes*. First Edition, CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, 209p.
- Bholay, A.D., Borkhataria, B.V., Jadhav, P.U., Palekar, K.S., Dhalkari, M.V., & Nalawade, P.M. (2012). Bacterial Lignin Peroxidase: A Tool for Biobleaching and Biodegradation of Industrial Effluents. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2(1), 58-64.
- Bilgen, S. (2014). Structure and Environmental Impact of Global Energy Consumption. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 890–902.
- Billmeyer, F.W. (1984). *Textbook of Polymer Science*. Third Edition, Fred W. Billmeyer, New York, 597p.
- Bischoff, F., Litwińska, K., Cordes, A., Baronian, K., Bode, R., Schauer, F., & Kunze, G. (2015). Three New Cutinases from the Yeast *Arxula adenivorans* that are Suitable for Biotechnological Applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5497-5510.
- Blackley, D.C. (1983). Plasticised Polyvinyl Chloride (PVC). In: *Synthetic Rubbers: their Chemistry and Technology*. Springer, Dordrecht, pp. 244–269.
- Bode, H.B., Kerkhoff, K., & Jendrossek, D. (2001). Bacterial Degradation of Natural and Synthetic Rubber. *Biomacromolecules*, 2 (1), 295-303.
- Bonanni, P.S., Schrott, G.D., Robuschi, L., & Busalmen, J.P. (2012). Charge Accumulation and Electron Transfer Kinetics in *Geobacter sulfurreducens* Biofilms. *Energy and Environmental Science*, 5(3), 6188-6195.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A-M., Lemaire, J., Sancelme, M., & Scott, G. (2003). Environmental Biodegradation of Polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81(3), 441-452.
- Boriskina, S.V. (2019). An Ode to Polyethylene. *MRS Energy & Sustainability*, 6, 23.
- Botton, B., Bretton, A., Fever, M., Gautier, S., Guy, Ph., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., & Veau, P. (1990). *Moisissures Utiles et Nuisibles, Importance Industrielle*, Masson, Paris, pp. 41-220.
- Bouadam, R. (2022). L'algerie Face à Ses Dechets: Outils et Entraves de Gestion vers Quelles Perspectives? Algeria Facing Its Waste: Management Tools and Barriers Towards What Perspectives?. *Architecture et Environnement de l'Enfant*, 7 (1), 65-79.
- Boughachiche, F., Reguioua, S., Zerizer, H., Oulmi, L., Boudemagh, A., Kitouni, M., & Boulahrouf, A. (2005). Production and Preliminary Characterization of Antibiotics Produced by an Actinomycetale Strain Isolated from Ain Mlila Saltpans (Algerie). *Antibiotiques*, 7(4), 234-8.

Bourzama, G., Iratni, N., Ennaghra, N., Ouled-Haddar, H., Soumati, B., Ameer Soualem, K., & Bechiri, K. (2021). *In vitro* Removal of Electronic and Electrical Wastes by Fungi Isolated from Soil at Annaba Area in Northeast of Algeria. *Environment and Natural Resources Journal*, 19(4), 302-9.

Brady, J., Dürig, T., Lee, P.I., & Li, J.-X. (2017). *Polymer Properties and Characterization*. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Yu, L., Mantri, R.V. (eds). Academic Press, Boston, pp. 181-223.

Branco, S. (2019). Fungal Diversity from Communities to Genes. *Fungal Biology Reviews*, 33(3-4), 225-237.

Bueno, D.J., & Silva, J.O. (2014). Fungi: The Fungal Hypha. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C.A., Tortorello, M.-L., (eds), Elsevier Ltd, Academic Press, Oxford, pp. 11-19.

Cagide, C., & Castro-Sowinski, S. (2020). Technological and Biochemical Features of Lignin-Degrading Enzymes: A Brief Review. *Environmental Sustainability*, 3, 371–389.

- C -

Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., & Yan, M. (2023). Biological Degradation of Plastics and Microplastics: A Recent Perspective on Associated Mechanisms and Influencing Factors. *Microorganisms*, 11(7), 1661.

Candlin, J.P. (2008). Chapter 3 Polymeric Materials: Composition, Uses and Applications. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 53, 65-119.

Carlile, M.J., & Watkinson, S.C. (1994). *The Fungi*. Second Edition, Academic Press, Michigan, 482p.

Carniel, A., Valoni, É., Junior, J.N., da Conceição Gomes, A., & de Castro, A.M. (2017). Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and Cutinase from *Humicola insolens* Act Synergistically for PET Hydrolysis to Terephthalic Acid. *Process Biochemistry*, 59, 84–90.

Carr, C.M., Clarke, D.J., & Dobson, A.D.W. (2020). Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 11, 571265.

Carrega, M. (2009). *Matières plastiques*. Deuxième Edition, Aide-mémoire, Dunod, 256p.

Carris, L. M., Little, C.R., & Stiles, C.M. (2012). *Introduction to Fungi*. Plant Health Instructor, 30p.

Chae, Y., & An, Y.J. (2018). Current Research Trends on Plastic Pollution and Ecological Impacts on the Soil Ecosystem: A Review. *Environmental Pollution*, 240, 387–395.

Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science*, 23(7), 1273–1335.

Chandra, P., Enespa., Singh, R., & Arora, P.K. (2020). Microbial Lipases and their Industrial Applications: A Comprehensive Review. *Microbial Cell Factories*, 19, 169.

Chandran, P., & Das, N. (2011). Degradation of Diesel Oil by Immobilized *Candida tropicalis* and Biofilm Formed on Gravels. *Biodegradation*, 22, 1181–1189.

- Charya, M.A.S. (2015). Fungi: An Overview. In: Plant Biology and Biotechnology. Bahadur, B., Rajam, M.V., Sahijram, L., Krishnamurthy, K.V., (eds), Springer, New Delhi, pp. 197–215.
- Chassanieux, C., Lefebvre, H., & Pascual, S. (2008). L'indispensable en polymères. L'indispensable, Bréal, 125p.
- Chiba, S., Saito, H., Fletcher, R., Yogi, T., Kayo, M., Miyagi, S., Ogido, M., & Fujikura, K. (2018). Human Footprint in the Abyss: 30 Year Records of Deep-Sea Plastic Debris. Marine Policy, 96, 204–12.
- Clapp, J., & Swanston, L. (2009). Doing Away with Plastic Shopping Bags: International Patterns of Norm Emergence and Policy Implementation. Environmental Politics, 18 (3), 315–332.
- Cleare, L.G., Zamith-Miranda, D., & Nosanchuk, J.D. (2017). Heat Shock Proteins in *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. Clinical and Vaccine Immunology, 24 (11), e00221-17.
- Crespy, D., Bozonnet, M., & Meier, M. (2008). 100 Years of Bakelite, the Material of a 1000 Uses. Angewandte Chemie, 47(18), 3322-3328.

- D -

- Daccò, C., Girometta, C., Asemoloye, M.D., Carpani, G., Picco, A.M., & Tosi, S. (2020). Key Fungal Degradation Patterns, Enzymes and their Applications for the Removal of Aliphatic Hydrocarbons in Polluted Soils: A Review. International Biodeterioration & Biodegradation, 147, 104866.
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W.R. (2019). Plastics: Microbial Degradation, Environmental and Biotechnological. Applied and Environmental Microbiology, 85, 19.
- Das, A., Chen, C-M., Mu, S-C., Yang, S-H., Ju, Y-M., & Li, S-C. (2022). Medicinal Components in Edible Mushrooms on Diabetes Mellitus Treatment. Pharmaceutics, 14 (2), 436.
- Das, M.P., & Kumar, S. (2014). Microbial Deterioration of Low-Density Polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. International Journal of ChemTech Research, 6(1), 299-305.
- Das, M.P., & Kumar, S. (2015). An Approach to Low-Density Polyethylene Biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. 3 Biotech, 5, 81–86.
- Das, M.P., Kumar, S., & Das, J. (2018). Fungal-Mediated Deterioration and Biodegradation Study of Low-Density Polyethylene (LDPE) Isolated from Municipal Dump Yard in Chennai, India. Energy, Ecology and Environment, 3, 229–236.
- Das, S., & Kumar, A. (2023). PP and LDPE Polymer Composite Materials Blend: A review. Materials Today: Proceedings, 81 (2), 511-514.
- Davet, P., & Rouxel, F. (1997). Détection et Isolement des Champignons du Sol. INRA. Paris, 203p.
- Davies, G.E., & Thornton, C.R. (2022). Development of A Monoclonal Antibody and A Serodiagnostic Lateral-Flow Device Specific to *Rhizopus arrhizus* (Syn. *R. oryzae*), the Principal Global Agent of Mucormycosis in Humans. Journal of Fungi, 8 (7), 756.
- De Castro, A.M., Carniel, A., Nicomedes Junior, J., da Conceição Gomes, A., & Valoni, É. (2017). Screening of Commercial Enzymes for Poly(ethylene Terephthalate) (PET) Hydrolysis and Synergy Studies on Different Substrate Sources. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 44(6), 835–844.

Deshkar, A., Kamle, S., Giri, J., & Korde, V. (2018). Design and Evaluation of A Lean Manufacturing Framework Using Value Stream Mapping (VSM) for A Plastic Bag Manufacturing Unit. *Materials Today: Proceedings*, 5, 7668–7677.

Deepika, S., & Jaya Madhuri, R. (2015). Biodegradation of Low-Density Polyethylene by Microorganisms From Garbage Soil. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(1), 1-7.

De Souza, P.M., Bittencourt, M.L.D.A., Caprara, C.C., de Freitas, M., de Almeida, R.P.C., Silveira, D., Fonseca, Y.M., Filho, E.X.F., Junior, A.P., & Magalhães, P.O. (2015). A Biotechnology Perspective of Fungal Proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346.

Dilkes-Hoffman, L.S., Pratt, S., Lant, P.A., & Laycock, B. (2019). 19 - The Role of Biodegradable Plastic in Solving Plastic Solid Waste Accumulation. *Plastics to Energy*, 469-505.

Dineshraj, D., & Ganesh, P. (2016). Screening and Characterization of Isolated Fungi from Plastic Waste Dump Yard Sites. *Microbiology*, 5(1), 2277 – 8179.

Dix, N.J., & Webster, J. (1995). Fungi of Extreme Environments. In: *Fungal Ecology*. Dix, N.J., Webster, J., (eds), Springer, Dordrecht, pp. 322-340.

Douglas, S.I., Williams, J.O., & Ekeke, J.I. (2020). Effect of Waste Separation on the Composting of Organic Waste Fraction from Domestic Solid Waste. *Microbiology Research Journal International*, 30(10), 1-17.

Dsouza, G.C., Sheriff, R.S., Ullanat, V., Shrikrishna, A., Joshi, A.V., Hiremath, L., & Entoori, K. (2021). Fungal Biodegradation of Low-Density Polyethylene Using Consortium of *Aspergillus* Species Under Controlled Conditions. *Heliyon*, 7, e07008.

Dunncliff, C. J. (1968). Instrumentation von the Plover Cove Main Dam. *Géotechnique*, 18(3), 283–300.

Dussud, C., & Ghiglione, J.F. (2014). Bacterial Degradation of Synthetic Plastics. In: *Marine Litter in the Mediterranean and Black Seas*, Briand, F., CIESM, Paris, pp. 49–54.

- E -

Ekanayaka, A.H., Tibpromma, S., Dai, D., Xu, R., Suwannarach, N., Stephenson, S.L., Dao, C., & Karunarathna, S.C. (2022). A Review of the Fungi That Degrade Plastic. *Journal of Fungi (Basel)*, 8(8), 772.

El Sayed, M.T., Rabie, G.H., & Hamed, E.A. (2021). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) Using the Mixed Culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigates*. *Environment, Development and Sustainability*, 23, 14556-14584.

El-Shafei, H.A., Abd El-Nasser, N.H., Kansoh, A.L., & Ali, A.M. (1998). Biodegradation of Disposable Polyethylene by Fungi and *Streptomyces* Species. *Polymer Degradation and Stability*, 62 (2), 361–365.

El-Wakil, A.E-A., Moustafa, H., & Youssef, A.M. (2020). Antimicrobial Low-Density Polyethylene/Low-Density Polyethylene-Grafted Acrylic Acid Biocomposites Based on Rice Bran with Tea Tree Oil for Food Packaging Applications. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 35, 938-956.

Enoki, M., Doi, Y., & Iwata, T. (2003). Oxidative Degradation of Cis- and Trans-1,4-Polyisoprenes and Vulcanized Natural Rubber with Enzyme-Mediator Systems. *Biomacromolecules*, 4 (2), 314-320.

Esmaeili, A., Pourbabae, A.A., Alikhani, H.A., Shabani, F., & Esmaeili, E. (2013). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *PLoS ONE*, 8, e71720.

Evode, N., Qamar, S.A., Bilal, M., Barceló, D., & Iqbal, H.M.N. (2021). Plastic Waste and Its Management Strategies for Environmental Sustainability. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 4, 100142.

Ezziyyani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C., & Candela, M.E. (2007). Biological Control of Phytophthora Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 342-349.

- F -

Fachrul, M.F., Rinanti, A., Tazkiaturrizki., Salmiati., & Sunaryo, T. (2021). Degradation of Polyethylene Plastic Waste by Indigenous Microbial Consortium and Fungi. *Indonesian Journal of Urban and Environmental Technology*, 5(1), 86-103.

Farag, S., & Soliman, N.A. (2011). Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida tropicalis* Strain. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 821-830.

Fare, S., Petrini, P., Motta, A., Cigada, A., & Tanzi, M.C. (1999). Synergistic Effects of Oxidative Environments and Mechanical Stress on *In Vitro* Stability of Polyetherurethanes and Polycarbonateurethanes. *Journal of biomedical materials research*, 45 (1), 62-74.

Feldman D. (2008). *Polymer History. Designed Monomers and Polymers*. 11(1), 1–15.

Fredriksson, H., Silverio, J., Andersson, R., Eliasson, A.C., & Aman, P. (1998). The Influence of Amylose and Amylopectin Characteristics on Gelatinization and Retrogradation Properties of Different Starches. *Carbohydrate Polymers*, 35, 119-134.

- G -

Gao, R., Liu, R., & Sun, C. (2022). A Marine Fungus *Alternaria alternata* FB1 Efficiently Degrades Polyethylene. *Journal of Hazardous Materials*, 431, 128617.

Gardes, M., & Bruns, T.D. (1993). ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes-Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-8.

Gaston, S. (2009). Les plastiques dans Tous Leurs Etats. In: *Technologie. Scérén-CNDP*, pp. 8-15.

Gautam, R., Bassi, A.S., & Yanful, E.K. (2007). *Candida rugosa* Lipase-Catalyzed Polyurethane Degradation in Aqueous Medium. *Biotechnology Letters*, 29, 1081–1086.

Gerigny, O., Brun, M., Fabri, M.C., Tomasino, C., Le Moigne, M., Jadaud, A., & Galgani, F. (2019). Seafloor Litter from the Continental Shelf and Canyons in French Mediterranean Water: Distribution, Typologies and Trends. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 653–666.

Geyer, R. (2020). Chapter 2 - Production, Use, and Fate of Synthetic Polymers. In: *Plastic Waste and Recycling*. Letcher, T.M, Academic Press, Cambridge, pp. 13-32.

- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J-H., & Hur, H-G. (2020). Biodegradation of Polyethylene: A Brief Review. *Applied Biological Chemistry*, 63, 27.
- Ghosh, S.K., Pal, S., & Ray, S. (2013). Study of Microbes Having Potentiality for Biodegradation of Plastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4339–4355.
- Gilbert, M. (2017). Chapter 1 - Plastics Materials: Introduction and Historical Development. In : *Brydson's Plastics Materials*. Eighth Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 1-18,
- Glaser, J.A. (2019). Biological Degradation of Polymers in the Environment. *Plastics in the Environment*. Gomiero, A., IntechOpen, pp. 1-22.
- Glass, N.L., & Donaldson, G.C. (1995). Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous *Ascomycetes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323–1330.
- Gilan, I., Hadar, Y., & Sivan, A. (2004). Colonization, Biofilm Formation and Biodegradation of Polyethylene by a Strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65 (1), 97–104.
- Gnanavel, G., Valli, V.P.M.J., Thirumarimurugan, M., & Kannadasan, T. (2014). Degradation of Plastics Waste Using Microbes. *Elixir Chemical Engineering*, 75, 27866-27868.
- Gomez-Mendez, L.D., Moreno-Bayona, D.A., Poutou-Piñales, R.A., Salcedo-Reyes, J.C., Pedroza-Rodriguez, A.M., Vargas, A., & Bogoya, J.M. (2018). Biodeterioration of Plasma Pretreated LDPE Sheets by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS ONE*, 13(9), e0203786.
- Gonda, K.E., Jendrossek, D., & Molitoris, HP. (2000). Fungal Degradation of the Thermoplastic Polymer Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) Under Simulated Deep Sea Pressure. *Hydrobiologia*, 426, 173–183.
- Gong, Z., Jin, L., Yu, X., Wang, B., Hu, S., Ruan, H., Sung, Y.-J., Lee, H.-G., & Jin, F. (2023). Biodegradation of Low-Density Polyethylene by the Fungus *Cladosporium* sp. Recovered from a Landfill Site. *Journal of Fungi*, 9, 605.
- Grigore, M.E. (2017). Methods of Recycling, Properties and Applications of Recycled Thermoplastic Polymers. *Recycling*, 2 (4), 24.
- Gu, J.D., Eberiel, D., McCarthy, S.P., & Gross, R.A. (1993a). Degradation and Mineralization of Cellulose Acetate in Simulated Thermophilic Compost Environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(4), 281-291.
- Gu, J.D., Eberiel, D.T., McCarthy, S.P., & Gross, R.A. (1993b). Cellulose Acetate Biodegradability Upon Exposure to Simulated Aerobic Composting and Anaerobic Bioreactor Environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(2), 143-153.
- Gu, J.D. (2003). Microbiological Deterioration and Degradation of Synthetic Polymeric Materials: Recent Research Advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 69-91.

- H -

- Hadibarata, T., Khudhair, A.B., Kristanti, R.A., & Kamyab, H. (2017). Biodegradation of Pyrene by *Candida* sp. S1 Under High Salinity Conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(9), 1411-1418.

- Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M., & Inskeep, W.P. (2006). Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Applied Environmental Microbiology*, 702, 6316-6324.
- Harrat, R., Bourzama, G., Ouled-Haddar, H., & Boudjema, S., (2022). *In Vitro* and *Ex Situ* Biodegradation of Low-Density Polyethylene by a *Rhizopus* sp. Strain Isolated from a Local Dumpsite in North-East Algeria. *Environment and Natural Resources Journal*, 20(5), 1-10.
- Harris, P.T. (2020). The Fate of Microplastic in Marine Sedimentary Environments: A review and Synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111398.
- Harshvardhan, K., & Jha, B. (2013). Biodegradation of Low-Density Polyethylene by Marine Bacteria from Pelagic Waters, Arabian Sea, India. *Marine Pollution Bulletin*, 77 (1–2), 100–106.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., & Ahmed, S. (2007). Synergistic Effect of Photo- and Chemical Treatment on the Rate of Biodegradation of Low-Density Polyethylene by *Fusarium* sp. AF4. *Journal of Applied Polymer Science*, 105(3), 1466-1470.
- Hegazy, G.E., Soliman, N.A., Farag, S., El-Helow, E.R., Hassan, H.Y., & Abdel-Fattah, Y.R. (2024). Isolation and Characterization of *Candida tropicalis* B: a Promising Yeast Strain for Biodegradation of Petroleum Oil in Marine Environments. *Microbial Cell Factories*, 23(20), 1-15.
- Hernandez, R.J. (1997). Food Packaging Materials, Barrier Properties, and Selection. In: *Handbook of Food Engineering Practice*. Valentas, K., Rotstein, E., Singh, R.P., CRC Press, Boca Raton, pp. 296- 365.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., *et al.* (2007). A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research*, 11(5), 509-547.
- Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E & Svendsen, C. (2017). Microplastics in Freshwater and Terrestrial Environments: Evaluating the Current Understanding to Identify the Knowledge Gaps and Future Research Priorities. *Science of the Total Environment*, 586, 127–141.
- Hossain, K.B., Chen,K., Chen,P., Wang,C., & Cai, M. (2021). Socioeconomic Relation with Plastic Consumption on 61 Countries Classified by Continent, Income Status and Coastal Regions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107, 786–792.
- Huang, D., Li, X., Ouyang, Z., Zhao, X., Wu, R., Zhang, C., Lin, C., Li, Y., & Guo, X. (2021). The Occurrence and Abundance of Microplastics in Surface Water and Sediment of the West River Downstream, in the South of China. *Science of the Total Environment*, 756, 143857.
- Hurdeal, V.G., Gentekaki, E., Hyde, K.D., Nguyen, T.T., & Lee, H.B. (2021). Novel *Mucor* species (*Mucoromycetes*, *Mucoraceae*) from northern Thailand. *Mycology*, 84, 57.
- Hussain, A., Javed, Z., Kishwa, F., Bangash, M.K., Raza, H.M.Z., & Farooq, M. (2020). Impact of Single Use Polyethylene Shopping Bags on Environmental Pollution, A Comprehensive Review. *Pure and Applied Biology*, 9(3), 1962-1975.

- I -

Issa, N. (2021). Towards the Biological Degradation of Plastics: Genetic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to Secrete Ideonella Sakaiensis Derived PETase. Thèse de doctorat, Université du Kent, Canterbury, 79p.

- J -

Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A-L., & Ghiglione, J-F. (2019). Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere”. *Frontiers in Microbiology*, 10, 865.

Jaiswal, S., Sharma, B., & Shukla, P. (2020). Integrated Approaches in Microbial Degradation of Plastics. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100567.

James, E.M. (2007). *Physical Properties of Polymers Handbook*. Second Edition, Springer Science & Business Media, New York, 1076p.

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K.L. (2015). Marine Pollution. Plastic Waste Inputs From Land Into the Ocean. *Science*, 347(6223), 768-71.

Jamieson, A.J., Brooks, L.S.R., Reid, W.D.K., Piertney, S.B., Narayanaswamy, B.E., & Linley, T.D. (2019). Microplastics and Synthetic Particles Ingested by Deep-Sea Amphipods in Six of the Deepest Marine Ecosystems on Earth. *Royal Society Open Science*, 6, 180667.

Janaki, T. (2022). Fungi. In: *Current Research and Innovations in Plant Pathology*. Singh, H.K., (ed), AkiNik Publications, New Delhi, pp. 83-106.

Janowski, D., & Leski, T. (2022). Factors in the Distribution of Mycorrhizal and Soil Fungi. *Diversity*, 14, 1122.

Jeon, H.J., & Kim, M.N. (2015). Functional Analysis of Alkane Hydroxylase System Derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for Low Molecular Weight Polyethylene Biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 141–146.

Jewett, M.C., Hofmann, G., & Nielsen, J. (2006). Fungal Metabolite Analysis in Genomics and Phenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 191–197.

Jeyakumar, D., Chirsteen, J., & Doble, M. (2013). Synergistic Effects of Pretreatment and Blending on Fungi Mediated Biodegradation of Polypropylenes. *Bioresource Technology*, 148, 78–85.

Jumaah, O.S. (2017). Screening of Plastic Degrading Bacteria from Dumped Soil Area. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 11(5), 93-98.

Jung, B., Kim, S., & Lee, J. (2014). Microcyle Conidiation in Filamentous Fungi. *Mycobiology*, 42 (1), 1-5.

- K -

Kaplan, D.L., Mayer, J.M., Ball, D., McCassie, J., Allen, A.L., & Stenhouse, P. (1993). *Fundamentals of Biodegradable Polymers*. In: *Biodegradable Polymers and Packaging*. Ching, C., Kaplan, D.L., Thomas, E.L., Technomic publishing, Inc., Lancaster, Pennsylvanie, pp.1-42.

- Kathiresan, K. (2003). Polythene and Plastic-Degrading Microbes in An Indian Mangrove Soil. *Revista de Biologia Tropical*, 51 (3–4), 629–633.
- Kavanagh, K. (2005). Fungal Fermentation Systems and Products. In: *Fungi: Biology and Applications*. Kavanagh, K., (ed), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 89-112.
- Kershaw, M.L., & Talbot, N.J. (1998). Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 23, 18–33.
- Khruengsai, S., Sripahco, T., & Pripdeevech, P. (2021). Low-Density Polyethylene Film Biodegradation Potential by Fungal Species from Thailand. *Journal of Fungi*, 7, 594.
- Khan, S., Ali, S. A., & Ali, A. S. (2023). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mesophilic Fungus '*Penicillium citrinum*' Isolated from Soils of Plastic Waste Dump Yard, Bhopal, India. *Environmental Technology*, 44 (15), 2300-2314.
- Kimmel, R.M. (2014). Life Cycle Assessment of Grocery Bags in Common Use in the United States. *Clemson University Press, Environmental Studies 6*, Clemson, 194p.
- Kirschner, R. (2018). Sex Does Not Sell: The Argument for Using the Terms “Anamorph” and “Teleomorph” for Fungi. *Mycological Progress*, 18, 305–312.
- Knight, G. (2013). Plastic pollution. *Raintree*, London, pp. 64.
- Knop, M. (2011). Yeast Cell Morphology and Sexual Reproduction – A Short Overview and Some Considerations. *Comptes Rendus Biologies*, 334 (8,9), 599-606.
- Koul, A.K., & Sumbali, G. (2001). Reproductive Biology of Fungi. In: *Reproductive Biology of Plants*. Johri, B.M., Srivastava, P.S., (eds), Springer Berlin, Heidelberg, pp. 96-126.
- Koutny, M., Amato, P., Muchova, M., Ruzicka, J., & Delort, A.-M. (2009). Soil Bacterial Strains Able to Grow on the Surface of Oxidized Polyethylene Film Containing Prooxidant Additives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63 (3), 354–357.
- Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Ocelić Bulatović, V., Ukić, Š., Slouf, M., & Gajdosova, V. (2023). Screening the Efficacy of a Microbial Consortium of Bacteria and Fungi Isolated from Different Environmental Samples for the Degradation of LDPE/TPS Films. *Separations*, 10, 79.
- Kumar, B.M., Noobia, S., & Mythri, S. (2016). Studies on Biodegradation of Plastic Packaging Materials in Soil Bioreactor. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, S1, 297-299.
- Kumar, C.S., & Tamang, A. (2022). Recent Trends in Food Packaging: A Review. *Plant Archives*, 22(2), 263-266.
- Kurtzman, C.P., & Robnett, C.J. (1997). Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 59 End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. *Journal Of Clinical Microbiology*, 35(5), 1216–1223.
- Kwiatkowski, C.A., Harasim, E., Feledyn-Szewczyk, B., & Antonkiewicz, J. (2020). Enzymatic Activity of Loess Soil in Organic and Conventional Farming Systems. *Agriculture*, 10, 135.
- Kyaw, B.M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M.K., Lim, C.S., & Sakharkar, K.R. (2012). Biodegradation of Low-Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 411-419.

- L -

- Lacoste, J., & Carlsson, D.J. (1992). Gamma-, Photo-, and Thermally Initiated Oxidation of Linear Low-Density Polyethylene: A Quantitative Comparison of Oxidation Products. *Journal of Polymer Science*, 30, 493–500.
- Lefaux, S. (2005). Biodégradation de Films Polymères à Usage Agricole: Caractérisation Physico-Chimique des Résidus et Identification Biomoléculaire des Bactéries Actives. Thèse de doctorat en Physiologie et Biochimie Végétales, Université du Maine, Le Mans, 266p.
- Leja, K., & Lewandowicz, G. (2010). Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – A Review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19 (2), 255-266.
- Lenz, R.W. (1993). *Biodegradable Polymers*. Advances in Polymer Science. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 40p.
- Lewis, H. (2012). Complying with Regulations. In: *Packaging for Sustainability*. Verghese, K., Lewis, H., Fitzpatrick, L., Springer, London, pp. 155-70.
- Lin, X., Zhang, S., Yang, S., Zhang, R., Shi, X., & Song, L. (2023). A Landfill Serves as A Critical Source of Microplastic Pollution and Harbors Diverse Plastic Biodegradation Microbial Species and Enzymes: Study in Large-Scale Landfills, China. *Journal of Hazardous Materials*, 457, 131676.
- Lu, S., Qu, R., & Forcada, J. (2009). Preparation of Magnetic Polymeric Composite Nanoparticles by Seeded Emulsion Polymerization. *Materials Letters*, 63, 770-772.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J-E. (2008). Polymer Biodegradation: Mechanisms and Estimation Techniques. *Chemosphere*, 73 (4), 429–442.
- Luckachan, G.E., & Pillai, C.K.S. (2011). Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 637–676.

- M -

- Madelin, T.M. (1994). Fungal Aerosols: A review. *Journal of Aerosol Science*, 25(8), 1405-1412.
- Mahalakshmi, V. (2014). Evaluation of Biodegradation of Plastics. *International Journal of Innovative Research & Development*, 3 (7), 185-190.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M.K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 461-488.
- Malachová, K., Novotný, Č., Adamus, G., Lotti, N., Rybková, Z., Soccio, M., Šlosarcíková, P., Verney, V., & Fava, F. (2020). Ability of *Trichoderma hamatum* Isolated from Plastics-Polluted Environments to Attack Petroleum-Based, Synthetic Polymer Films. *Processes*, 8, 467.
- Mallisetty, R., Veluru, S., Hamzah, H.T., Hamem, M.N.K., Tukarambai, M., Poiba, V.R., Srikanth, R., & Mahdi, H.S. (2023). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Paenibacillus* sp. and *Serratia* sp. Isolated from Marine Soil Sample. *Materials Today: Proceedings*, 2214-7853.
- Mankar, S.D., Vikhe, S., Pawar, T., & Bhawar, S.B. (2022). Current Perspective of Fungi- A Review. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 12 (3), 7p.

- Mannaa, M., & Kim, K.D. (2018). Effect of Temperature and Relative Humidity on Growth of *Aspergillus* and *Penicillium* spp. and Biocontrol Activity of *Pseudomonas protegens* AS15 against Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in Stored Rice Grains. *Mycobiology*, 46 (3), 287–295.
- Manzur, A., Cuamatzi, F., & Favela, E. (1997). Effect of the Growth of *Phanerochaete Chrysosporium* in a Blend of Low-Density Polyethylene and Sugar Cane Bagasse. *Journal of Applied Polymer Science*, 66 (1), 105-111.
- Manzur, A., Limón-González, M., & Favela-Torres, E. (2004). Biodegradation of Physicochemically Treated LDPE by A Consortium of Filamentous Fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, 92(1), 265-271.
- Mao, R., Song, J., Yan, P., Ouyang, Z., Wu, R., Liu, S., & Guo, X. (2021). Horizontal and Vertical Distribution of Microplastics in the Wuliangshuai Lake sediment, Northern China. *Science of the Total Environment*, 754, 142426.
- Martínez, A., & Maicas, S. (2021). Cutinases: Characteristics and Insights in Industrial Production. *Catalysts*, 11 (10), 1194.
- Martinez-Goss, M.R., & Arguelles, E.DLR. (2020). Classical Taxonomy. In: *Methods in Microalgal Studies*. Martinez-Goss, M.R., Rivera, W.R., Torreta, N.K., (eds), University of the Philippines Los Baños, Philippine Science Letters, Los Baños, 145-153.
- Matavuly, M., & Molitoris, H.P. (2015). *In vitro* Degradation of Poly[(r)-3-Hydroxybutyrate] and BIOPOL™ by Marine-Derived Fungi. *Biologia Serbica*, 37 (1-2), 49-63.
- Matsuguma, Y., Takada, H., Kumata, H., Kanke, H., Sakurai, S., Suzuki, T., Itoh, M., Okazaki, Y., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Weerts, S., & Newman, B. (2017). Microplastics in Sediment Cores from Asia and Africa as Indicators of Temporal Trends in Plastic Pollution. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(2), 230–239.
- Miri, S., Saini, R., Davoodi, S.M., Pulicharla, R., Brar, S.K., & Magdoui, S. (2022). Biodegradation of Microplastics: Better Late Than Never. *Chemosphere*, 286, 131670.
- Money, N.P. (2016). Chapter 3 - Spore Production, Discharge, and Dispersal. In: *The Fungi*. Watkinson, S.C., Boddy, L., Money, N.P., (eds), Academic Press, Boston, 67-97.
- Montazer, Z., Habibi-Najafi, M.B., Mohebbi, M., & Oromiehei, A. (2018). Microbial Degradation of UV-Pretreated Low-Density Polyethylene Films by Novel Polyethylene-Degrading Bacteria Isolated from Plastic-Dump Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 3613–3625.
- Montazer, Z., Habibi-Najafi, M.B., & Levin, D.B. (2020). Challenges with Verifying Microbial Degradation of Polyethylene. *Polymers*, 12(1), 123.
- Morancho, J.M., Ramis, X., Fernández, X., Cadenato, A., Salla, J.M., Vallés, A., Contat, L., & Ribes, A. (2006). Calorimetric and Thermogravimetric Studies of UV-Irradiated Polypropylene/Starch-Based Materials Aged in Soil. *Polymer Degradation and Stability*, 91 (1), 44–51.
- Morawetz, H. (1992). *Modern Methods of Polymer characterization*. In: *Polymer Science*. Barth, H.G., Mays, J.W., Wiley-Interscience, New York, pp. 561.
- Muhonja, C.N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018a). Biodegradability of Polyethylene by Bacteria and Fungi from Dandora Dumpsite Nairobi-Kenya. *PLOS ONE*, 13(7), e0198446.

Muhonja, C.N., Magoma, G., Imbuga, M., & Makonde, H.M. (2018b). Molecular Characterization of Low-Density Polyethylene (LDPE) Degrading Bacteria and Fungi from Dandora Dumpsite, Nairobi, Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2018, 4167845.

Müller, R.-J. (2005). Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing. In: *Biopolymers Online*. Steinbüchel, A., (ed), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 365-388.

Munir, E., Harefa, R.S.M., Priyani, N., & Suryanto, D. (2018). Plastic Degrading Fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* Isolated from Local Landfill Soil in Medan. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 126, 012145.

Murphy, C.A., Cameron, J.A., Huang, S.J., & Vinopal, R.T. (1996). *Fusarium* Polycaprolactone Depolymerase Is Cutinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2), 456–460.

Musuc, A.M., Badea-Doni, M., Jecu, L., Rusu, A., & Popa, V.T. (2013). FTIR, XRD, and DSC Analysis of the Rosemary Extract Effect on Polyethylene Structure and Biodegradability. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 114, 169–177.

- N -

Na, Y., Dai, S., & Chen, C. (2018). Direct Synthesis of Polar-Functionalized Linear Low-Density Polyethylene (LLDPE) and Low-Density Polyethylene (LDPE). *Macromolecules*, 51(11), 4040–4048.

Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F., & Nakahara, T. (1999). Microbial Degradation of Polyurethane, Polyester Polyurthanes and Polyether Polyurthanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 134-140.

Nanda, S., & Sahu, S.S. (2010). Biodegradability of Polyethylene by *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhodococcus* spp. *New York Science Journal*, 3(7), 95–98.

Neina, D. (2019). The Role of Soil pH in Plant Nutrition and Soil Remediation. *Applied and Environmental Soil Science*, 2019, 1–9.

Neji, S., Hadrich, I., Trabelsi, H., Abbes, S., Cheikhrouhou, F., Sellami, H., Makni, F., & Ayadi, A. (2017). Virulence Factors, Antifungal Susceptibility and Molecular Mechanisms of Azole Resistance Among *Candida parapsilosis* Complex Isolates Recovered from Clinical Specimens. *Journal of Biomedical Science*, 24, 67.

Nowak, B., Pająk, J., Drozd-Bratkowicz, M., & Rymarz, G. (2011). Microorganisms Participating in the Biodegradation of Modified Polyethylene Films in Different Soils Under Laboratory Conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), 757-767.

Nwogu, N.A., Atuanya, E.I., & Akpaja, E.O. (2012). Capability of Selected Mushrooms to Biodegrade Polyethylene. *Mycosphere*, 3(4), 455–462.

- O -

Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V., & Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE Degradation by Fungus, Implemented by Statistical Optimization. *Scientific Reports*, 7, 39515.

Olatunji, O. (2022). *Plastic and Polymer Industry by Region: Production, Consumption and Waste Management in the African Continent*. First Edition, Springer Singapore, 216p.

Ouartsi, N., Djeribi, R., Boukachabia, A., Mena, F., Gasmi, K., Akacem, D., & Rouabhia, M. (2019). *In Vitro* Biodegradation of Gliclazide by *Aeromonas hydrophila* and *Serratia odorifera* Bacteria. *Environmental engineering science*. 36(6), 643-649.

- P -

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J.P., Santos, P.S.M., Pereira, R., Pereira, M.E., Freitas, A.C., Duarte, A.C., & Rocha-Santos, T.A.P. (2017). Biodegradation of Polyethylene Microplastics by the Marine Fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10–15.

Pang, H., Xin, X., He, J., Cui, B., Guo, D., Liu, S., Yan, Z., Liu, C., Wang, X., & Nan, J. (2020). Effect of NaCl Concentration on Microbiological Properties in NaCl Assistant Anaerobic Fermentation: Hydrolase Activity and Microbial Community Distribution. *Frontiers in Microbiology*, 11, 589222.

Pardo-Rodríguez, M.L., & Zorro-Mateus, P.J.P. (2021). Biodegradation of Polyvinyl Chloride by *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. Isolated from Soil. *Revista de Investigación Desarrollo e Innovación*. 11(2), 387-400.

Peacock, A. (2000). *Handbook of Polyethylene: Structures, Properties, and Applications*. Marcel Dekker, New York.

Perera, P., Deraniyagala, A.S., Mahawaththage, M.P.S., Herath, H., Rajapakse, C.S.K., Wijesinghe, P., & Attanayake, R.N. (2021). Decaying Hardwood Associated Fungi Showing Signatures of Polyethylene Degradation. *BioResources*, 16(4), 7056-7070.

Piringer, O.G., & Baner, A.L. (2008). *Plastic Packaging: Interactions with Food and Pharmaceuticals*. Second Edition, Wiley, 632p.

Plast Alger. (2024). Maghreb's Major Plast Market. In: 8th International Plastics, Composites & Recycling Trade Show, Alger, 4-6 mars 2024, 14p.

Plastics Europe. (2022). *Plastics—the Facts 2022*. Brussels.

Plummer, C., Bourban, P., & Manson, J. (2001). *Polymer Matrix Composites: Matrices and Processing*. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, 7388-7396.

Portnoy, J.M., & Jara, D. (2015). Mold allergy revisited. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 114 (2), 83-89.

Pramila, R., & Ramesh, K.V. (2011). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Fungi Isolated from Marine Water- a SEM Analysis. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28), 5013–5018.

Premraj, R., & Doble, M. (2005). Biodegradation of Polymers. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 186-193.

Puliga, F., Zuf, V., Baldo, D., Cavatorta, D., Zambonelli, A., Francioso, O., & Sanchez-Cortes, S. (2023). *Cladosporium cladosporioides* (strain Clc/1): A Candidate for Low-density Polyethylene Degradation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10, 50.

- Q -

Qiang, L., Hu, H., Li, G., Xu, J., Cheng, J., Wang, J., & Zhang, R. (2023). Plastic Mulching, and Occurrence, Incorporation, Degradation, and Impacts of Polyethylene Microplastics in Agroecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 263, 115274.

- R -

Raaman, N., Rajitha, N., Jayshree, A., & Jegadeesh, R. (2012). Biodegradation of Plastic by *Aspergillus* spp. Isolated from Polythene Polluted Sites Around Chennai. *Journal of Academia and Industrial Research*, 1(6), 313-316.

Raghavan, D., & Torma, A.E. (1992). DSC and FTIR Characterization of Biodegradation of Polyethylene. *Polymer Engineering and Science*, 32 (6), 438-442.

Rahmani, M. (2023). Solution to Plastic Waste in Algeria. *Economic studies Journal*, 17 (2), 12-33.

Rai, M., & Agarkar, G. (2014). Plant–Fungal Interactions: What Triggers the Fungi to Switch Among Lifestyles?. *Critical Reviews in Microbiology*, 42 (3), 428-438.

Rai, P., Mehrotra, S., Priya, S., Gnansounou, E., & Sharma, S.K. (2021). Recent Advances in the Sustainable Design and Applications of Biodegradable Polymers. *Bioresource Technology*, 325, 124739.

Rajeswari, E., Rao, S.S., & Bhatt, S.G. (2021). Recent Trends in Classification of Fungi. In: *Research Trends and Innovations in Plant Pathology*. Chandrabhan, A.R., (ed), Integrated Publications, New Delhi, pp. 125-150.

Rajeswari, S., Prasanthi, T., Sudha, N., Swain, R.P., Panda, S., & Goka, V. (2017). Natural Polymers: A Recent Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (8), 472-494.

Rani, A., & Singh, P. (2015). Biodegradability of Polyethylene by *Aspergillus niger*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (3), 1621-1626.

Rani, A., Singh, P., & Kumar, R. (2020). Microbial Deterioration of High-Density Polyethylene by Selected Microorganisms. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 8 (6), 64-66.

Rao, J.P., & Geckeler, K.E. (2011). Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887–913.

Rasmussen, S.C. (2021). From Parkesine to Celluloid: The Birth of Organic Plastics. *Angewandte Chemie*, 133(15), 8090-8094.

Ratanakamnuan, U., & Aht-Ong, D. (2006). Photobiodegradation of Low-Density Polyethylene/banana Starch Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 2725–2736.

Ratnayake, W.S., Hoover, R., Shahidi, F., Perera, C., & Jane, J. (2001). Composition, Molecular Structure, and Physicochemical Properties of Starches from Four Field Pea (*pisum sativum L.*) Cultivars. *Food Chemistry*, 74, 189-202.

- Redecker, D. (2002). New Views on Fungal Evolution Based on DNA Markers and the Fossil Record. *Research in Microbiology*, 153, 125-130.
- Rehner, S.A., & Samuels, G. (1994). Taxonomy and Phylogeny of *Gliocladium* Analysed from Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. *Mycological Research*, 98(6), 625-634.
- Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., Wang, B., Wang, J., Zhang, Y., & Zhang, W. (2019). Biodegradation of Polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16 (11), 1941.
- Restrepo-Flórez, J.M., Bassi, A., & Thompson, M.R. (2014). Microbial Degradation and Deterioration of Polyethylene - A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83-90.
- Rochman, C.M., Hoh, E., Hentschel, B.T., & Kaye, S. (2013). Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology*, 47(3), 1646–1654.
- Rodrigues da Luz, J.M., Soares da Silva, M.C., Ferreira dos Santos, L., & Kasuya, M.C.M. (2019). Plastics Polymers Degradation by Fungi. In: *Microorganisms*. Intech Open, pp. 13.
- Rosato Dominick, V., Rosato Donald, V., & Rosato Matthew, V. (2004). *Plastic Product Material and Process Selection Handbook*, Elsevier Science, Oxford.

- S -

- Sadrati, N., Zerroug, A., Demirel, R., & Harzallah, D. (2023). Anti-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and anti-dermatophyte activities of secondary metabolites of the endophytic fungus *Penicillium brevicompactum* ANT13 associated with the Algerian endemic plant *Abies numidica*. *Archives of Microbiology*, 205(4), 110.
- Sáenz, M., Borodulina, T., Diaz, L., & Banchon, C. (2019). Minimal Conditions to Degrade Low Density Polyethylene by *Aspergillus terreus* and *niger*. *Journal of Ecological Engineering*, 20(6), 44–51.
- Saidi, A., Mebdoua, S., Mecerem, D., Al-Hoshani, N., Sadrati, N., Boufahja, F., & Bendif, H. (2023). Dual biocontrol potential of the entomopathogenic fungus *Akanthomyces muscarius* against *Thaumetopoea pityocampa* and plant pathogenic fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(8), 103719.
- Saira., Abdullah., Maroof, L., Iqbal, M., Farman, S., Lubna., & Faisal, S. (2022). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) Bags by Fungi Isolated from Waste Disposal Soil. *Applied and Environmental Soil Science*, pp. 7.
- Samanta, I. (2015). General Characteristics of Fungi. In: *Veterinary Mycology*. Samanta, I., (ed), Springer, New Delhi, 179p.
- Samir, A., Ashour, F.H., Hakim, A.A.A., & Bassyouni, M. (2022). Recent Advances in Biodegradable Polymers for Sustainable Applications. *npj Materials Degradation*, 6 (68), 28p.
- Sánchez, C. (2020). Fungal Potential for the Degradation of Petroleum-Based Polymers: An Overview of Macro- and Microplastics Biodegradation. *Biotechnology Advances*, 40, 107501.
- Sangale, M.K., Shahnawaz, M., & Ade, A.B. (2019). Potential of Fungi Isolated from the Dumping Sites Mangrove Rhizosphere Soil to Degrade Polythene. *Scientific Reports*, 9, 5390.

- Sangeetha Devi, R., Rajesh Kannan, V., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S., & Robert Antony, A. (2015). Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from Marine Ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Marine Pollution Bulletin*, 96, 32 -40.
- Santacruz-Juárez, E., Buendia-Corona, R.E., Ramírez, R.E., & Sánchez, C. (2021). Fungal Enzymes for the Degradation of Polyethylene: Molecular Docking Simulation and Biodegradation Pathway Proposal. *Journal of Hazardous Materials*, 411, 125118.
- Santo, M., Weitsman, R., & 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.
- Saxena, A., & Pareek, A. (2017). Possible Degradation of LDPE and Biodegradable Polythene by Natural Fungal Flora. *Journal of Phytological Research*, 30 (2), 77-81.
- Saxena, A., Jain, S., & Pareek, A. (2022). Estimation of Possible Biodegradation of Polythene by Fungal Isolates Growing on Polythene Debris. *Pollution*, 8(2), 567-577.
- Saxena, S.C., & Jotshi, C.K. (1994). Fluidized-Bed Incineration of Waste Materials. *Progress in Energy and Combustion Science*, 20 (4), 281-324.
- Schmit, J.P., & Mueller, G.M. (2007). An Estimate of the Lower Limit of Global Fungal Diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16, 99–111.
- Selke, S.E., & Hernandez, R.J. (2001). Packaging: Polymers in Flexible Packaging. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*.
- Semon, W.L., & Stahl, G.A. (1981). History of Vinyl Chloride Polymers. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry: Pure and Applied Chemistry*, 15(6), 1263-1278.
- Sen, S.K., & Raut, S. (2015). Microbial Degradation of Low-Density Polyethylene (LDPE): A Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 462-473.
- Seneviratne, G., Tennakoon, N.S., Weerasekara, M.L.M.A.W., & Nanadasena, K.A. (2006). LDPE Biodegradation by A Developed *Penicillium – Bacillus* Biofilm. *Current Science*, 90, 20–21.
- Shah, A.A, Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological Degradation of Plastics: A Comprehensive Review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-65.
- Shahnawaz, M., Sangale, M.K., & Ade, A.B. (2019). *Ex Situ* Bioremediation Technology for Plastic Degradation. In: *Bioremediation Technology for Plastic Waste*. Springer, Singapore, pp. 77-83.
- Shahriar, S.M.S., Dipti, S., Hossain, M.S., Das, N.C., & Zakir, H.M. (2023). Polyethylene Degradation by Microbes (Bacteria & Fungus): A Review. *Journal of Global Ecology and Environment*, 18(1), 32-51.
- Shamiri, A., Chakrabarti, M.H., Jahan, S., Hussain, M.A., Kaminsky, W., Aravind, P.V., & Yehye, W.A. (2014). The Influence of Ziegler-Natta and Metallocene Catalysts on Polyolefin Structure, Properties, and Processing Ability. *Materials*, 7(7), 5069-5108.
- Shang, J., Chai, M., & Zhu, Y. (2003). Photocatalytic Degradation of Polystyrene Plastic Under Fluorescent Light. *Environmental science and technology*, 37 (19), 4494-4499.
- Shaw, D.K., & Sahni, P. (2014). Plastic to Oil. *Journal of Mechanical and Civil Engineering*, 46-48.

- Sheik, S., Chandrashekar, K.R., Swaroop, K., & Somashekarappa, H.M. (2015). Biodegradation of Gamma Irradiated Low Density Polyethylene and Polypropylene by Endophytic Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105, 21-9.
- Shi, N.N., Du, Y.X., Chen, F.R., Ruan, H.C., & Yang, X.J. (2017). First Report of Leaf Spot Caused by *Colletotrichum fructicola* on Japanese Fatsia (*Fatsia japonica*) in Fujian Province in China. *Plant Disease*, 101(8), 1552-1552.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of Plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 242-7.
- Shogren, R.L., Thompson, A.R., Felker, F.C., Harry-O'Kuru, R.E., Gordon, S.H., Greene, R.V., & Gould, J.M. (1992). Polymer Compatibility and Biodegradation of Starch-Poly (Ethylene-Co-Acrylic Acid)-Polyethylene Blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 44 (11), 1971-1978.
- Shourie, A., & Vijayalakshmi, U. (2022). Fungal Diversity and Its Role in Mycoremediation. *Geomicrobiology Journal*, 39 (3-5), 426-444.
- Shumi, W., Towhid Hossain, Md., & Anwar, M.N. (2004). Isolation and Purification of Fungus *Aspergillus funiculosus* G. Smith and its Enzyme Protease. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (3), 312-317.
- Silva, R.R.A., Marques, C.S., Arruda, T.R., Teixeira, S.C., & de Oliveira, T.V. (2023). Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects. *Macromol*, 3(2), 371-399.
- Singh, A.K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 486–520.
- Singh, H. (2006). *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. John Wiley & Sons, New Jersey, 624p.
- Singh, J., & Gupta, K.C. (2014). Screening and Identification of Low-Density Polyethylene (LDPE) Degrading Soil Fungi Isolated from Polythene Polluted Sites around Gwalior City (M.P.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 443-448.
- Singh, N., Hui, D., Singh, R., Ahuja, I.P.S., Feo, L., & Fraternali, F. (2017). Recycling of Plastic Solid Waste: A State of Art Review and Future Applications. *Composites Part B: Engineering*, 115, 409-422.
- Sivan, A., Szanto, M., & Pavlov, V. (2006). Biofilm Development of the Polyethylene Degrading Bacterium *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (2), 346–352.
- Sowmya, H.V., Ramalingappa., Krishnappa, M., & Thippeswam, B. (2014). Degradation of Polyethylene by *Penicillium simplicissimum* Isolated from Local Dumpsite of Shivamogga District. *Environment, Development and Sustainability*, 17, 731-45.
- Sowmya, H.V., Ramalingappa, B., Nayanashree, G., Thippeswamy, B., & Krishnappa, M. (2015). Polyethylene Degradation by Fungal Consortium. *International Journal of Environmental Research*, 9(3), 823-830.
- Spontak, R.J., & Patel, N.P. (2000). Thermoplastic Elastomers: Fundamentals and Applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 334-341.
- Srikanth, M., Sandeep, T.S.R.S., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022). Biodegradation of Plastic Polymers by Fungi: A Brief Review. *Bioresources and Bioprocessing*, 9, 42.

Su, W-F. (2013). Radical Chain Polymerization. In: Principles of Polymer Design and Synthesis. Lecture Notes in Chemistry, vol 82. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 137–183.

Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, P.S., & Venkatesan, R. (2008). Marine Microbe-Mediated Biodegradation of Low- and High-Density Polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61 (3), 203–213.

Suh, S.O., Blackwell, M., Kurtzman, C.P., & Lachance, M.A. (2006). Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the Ascomycete Yeasts. *Mycologia*, 98(6), 1006-1017.

Swift, G. (1997). Non-Medical Biodegradable Polymers: Environmentally Degradable Polymers. In: Handbook of Biodegradable Polymers. Domb, A.J., Kost, J., Wiseman, D.M., Harwood Academic, Amsterdam, pp. 473–511.

- T -

Taghavi, N., Zhuang, W-Q., & Baroutian, S. (2021). Enhanced Biodegradation of Non-Biodegradable Plastics by UV Radiation: Part 1. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106464.

Taherzadeh, M.J., Ferreira, J.A., & Pandey, A. (2023). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Filamentous Fungi Biorefinery. First Edition, Elsevier, 616p.

Tazkiaturrizki., Fachrul, M.F., Rinanti, A., & Sunaryo, T. (2023). Incubation Period Effect on Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE). *Aip Conference Proceedings*, 2706, 020177.

Temporiti, M.E.E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms*, 10, 1180.

Tokiwa, Y., Calabria, B.P., Ugwu, C.U., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3722-3742.

Toledo, A.V., Franco, M.E.E., Lopez, S.M.Y., Troncozo, M.I., Saparrat, M.C.N., & Balatti, P.A. (2017). Melanins in Fungi: Types, Localization and Putative Biological Roles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 99, 2-6.

Trigo, A., Valencia, A., & Cases, I. (2009). Systemic Approaches to Biodegradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (1), 98–108.

Tyuftin, A.A., & Kerry, J.P. (2020). Review of Surface Treatment Methods for Polyamide Films for Potential Application as Smart Packaging Materials: Surface Structure, Antimicrobial and Spectral Properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100475.

- U -

Usha, R., Sangeetha, T., & Palaniswamy, M. (2011). Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Libyan Agriculture Research Center Journal International*, 2 (4), 200–204.

- V -

Vaksmaa, A., Guerrero-Cruz, S., Ghosh, P., Zeghal, E., Hernando-Morales, V., & Niemann, H. (2023a). Role of Fungi in Bioremediation of Emerging Pollutants. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1-21.

- Vaksmas, A., Polerecky, L., Dombrowski, N., Kienhuis, M.V.M., Posthuma, I., Gerritse, J., Boekhout, T., & Niemann, H. (2023b). Polyethylene Degradation and Assimilation by the Marine Yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. ISME Communications, 10,3(1),68.
- Van der Zee, M. (1997). Structure-Biodegradability Relationships of Polymeric Materials. Thèse de Doctorat. Université de Twente, Enschede, 213p.
- Varshney, S., Gupta, V., Yadav, A.N., Rahi, R.K., Devki., & Neelam, D.K. (2023). An Overview on Role of Fungi in Systematic Plastic Degradation. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 11(3), 61-69.
- Vasile, C. (1993). Degradation and Decomposition. In: Handbook of Polyolefins Synthesis and Properties. Vasile, C., Seymour, R.B., Marcel Dekker Inc, New York, pp 479-506.
- Vasile, C., & Pascu, M. (2005). Practical Guide to Polyethylene. iSmithers Rapra Publishing, Shawbury, 184p.
- Venkatesan, R., Santhamoorthy, M., Alagumalai, K., Haldhar, R., Raorane, C.J., Raj, V., & Kim, S.-C. (2022). Novel Approach in Biodegradation of Synthetic Thermoplastic Polymers: An Overview. Polymers, 14, 4271.
- Verma, N., & Gupta, S. (2019). Assessment of LDPE Degrading Potential *Aspergillus* Species Isolated from Municipal Landfill Sites of Agra. SN Applied Sciences, 1, 701.
- Verma, R., Vinoda, K.S., Papireddy, M., & Gowda, A.N.S. (2016). Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. Procedia Environmental Sciences, 35, 701 – 708.
- Vert M., Feijen J., Albertsson A., Scott G., & Chiellini E. (1992). Biodegradable Polymers and Plastics. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 512p.
- Vert, M., Li, S., Garreau, H., Mauduit, J., Boustta, M., Schwach, G., Engel, R., & Coudane, J. (1997). Complexity of the Hydrolytic Degradation of Aliphatic Polyesters. Angewandte Makromolekulare Chemie, 247, 239-253.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for Biorelated Polymers and Applications (IUPAC Recommendations 2012). Pure and Applied Chemistry, 84, 377- 410.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species. Journal of Bacteriology, 172(8), 4238-4246.
- Vinay, B.R., Uzma, M., Govindappa, M., Vasantha, R.A., & Lokesh, S. (2016). Screening and Identification of Polyurethane (PU) and Low-Density Poly-ethene (LDPE) Degrading Soil Fungi Isolated from Municipal Solid Waste. International Journal of Current Research, 8, 34752–34761.
- Volke-Sepúlveda, T., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Manzur, A., & Favela-Torres, E. (2002). Thermally Treated Low Density Polyethylene Biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. Journal of Applied Polymer Science, 83(2), 305–314.
- Vollmer, I., Jenks, M.J.F., Roelands, M.C.P., White, R.J., van Harmelen, T., de Wild, P., van der Laan, G.P., Meirer, F., Keurentjes, J.T.F., & Weckhuysen, B.M. (2020). Beyond Mechanical Recycling: Giving New Life to Plastic Waste. Angewandte Chemie International Edition, 59 (36), 15402-15423.

Vrijheid, M. (2000). Health Effects of Residence Near Hazardous Waste Landfill Sites: A Review of Epidemiologic Literature. *Environmental Health Perspectives*, 108 (1), 101 – 112.

- W -

Walker, G.M., & White, N.A. (2005). Introduction to Fungal Physiology. In: *Fungi: Biology and Applications*. Kavanagh, K., (ed), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1-34.

Walker, G.M., & White, N.A. (2018). Introduction to Fungal Physiology. In: *Fungi: Biology and Applications (Third Edition)*. Kavanagh, K., (ed), John Wiley & Sons, pp. 1-35.

Walter, T., Augusta, J., Muller, R.J., Widdecke, H., & Klein, J. (1995). Enzymatic Degradation of a Model Polyester by Lipase from *Rhizopus delemar*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 218-224.

Wang, X., Lu, D., Jönsson, L.J., & Hong, F. (2008). Preparation of a PET-Hydrolyzing Lipase from *Aspergillus oryzae* by the Addition of Bis(2-Hydroxyethyl) Terephthalate to the Culture Medium and Enzymatic Modification of PET Fabrics. *Engineering in Life Sciences*, 8(3), 268-276.

Webb, J.S., Nixon, M., Eastwood, I.M., Greenhalgh, M., Robson, G.D., & Handley, P.S. (2000). Fungal Colonization and Biodeterioration of Plasticized Polyvinyl Chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3194-200.

Weiland, M., Daro, A., & David, C. (1995). Biodegradation of Thermally Oxidized Polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 48 (2), 275-289.

William, A.T. (2003). *Electrical Power Cable Engineering*. Second Edition, William A. Thue, Washington, D. C, 432p.

Williams, J. O., & Hakam, K. (2016). Microorganisms Associated with Dump Sites in Port Harcourt Metropolis, Nigeria. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 8(2), 9-12.

Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., & Hryniewicz, K. (2023). Selection of Microorganisms Capable of Polyethylene (PE) and Polypropylene (PP) Degradation. *Microbiological Research*, 267, 127251.

Wu, Y., Li J., Yang, H., & Shin, H. J. (2017). Fungal and Mushroom Hydrophobins: A review. *Journal of Mushrooms*, 15, 1–7.

- Y -

Yang, J., Yang, Y., Wu, W.M., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environmental Science & Technology*, 48 (23), 13776–13784.

Yukata, T., Akira, I., & Masatoshi, K. (1990). Development of Biodegradable Plastics Containing Polycaprolactone and/or Starch. *Polymeric Materials Science and Engineering*, 63, 742-749.

- Z -

Zahari, N.Z., Abdullah, S.N., Tuah, P.M., & Cleophas, F.N. (2021). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) and Starch – Based Plastic (SBP) by Thermophiles *Bacillus subtilis* and *Candida tropicalis*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1173, 012035.

- Zahra, S., Abbas, S.S., Mahsa, M-T., & Mohsen, N. (2010). Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Isolated Fungi in Solid Waste Medium. *Waste Management*, 30 (3), 396–401.
- Zalasiewicz, J., Waters, C.N., Ivar do Sul, J.A., Corcoran, P.L., Barnosky, A.D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J.R., Steffen, W., Summerhayes, C., Wapre, M., Williams, M., Wolfe, A.P., & Yonan, Y. (2016). The Geological Cycle of Plastics and their Use as a Stratigraphic Indicator of the Anthropocene. *Anthropocene*, 13, 4–17.
- Zare, M., Ghomi, E.R., Venkatraman, P.D., & Ramakrishna, S. (2021). Silicone-Based Biomaterials for Biomedical Applications: Antimicrobial Strategies and 3D Printing Technologies. *Journal of Applied Polymer Science*, 138, e50969.
- Zeenat., Elahi, A., Bukhari, D.A., Shamim, S., & Rehman, A. (2021). Plastics Degradation by Microbes: A Sustainable Approach. *Journal of King Saud University-Science*, 33 (6), 101538.
- Zeghal, E., Vaksmaa, A., Vielfaure, H., Boekhout, T., & Niemann, H. (2021). The Potential Role of Marine Fungi in Plastic Degradation – A Review. *Frontiers in Marine Science*, 8, 738877.
- Zekri, A.Y., & Chaalal, O. (2005). Effect of Temperature on Biodegradation of Crude Oil. *Energy Sources*, 27(1-2), 233-244.
- Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., Bi, Q., & Zhao, Y. (2020). Biodegradation of Polyethylene Microplastic Particles by the Fungus *Aspergillus flavus* from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment*, 704, 135931.
- Zhong, X., Zhao, X., Qian, Y., & Zou, Y. (2018). Polyethylene plastic production process. *Insight - Material Science*, 1(1), 8p.

ANNEXES

Annexe I. Composition des milieux de culture

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH du milieu	5.6 ± 0.2

Milieu Sabouraud Dextrose Agar

Peptone	10 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH du milieu	5.6 ± 0.2

Annexe II. Caractérisation moléculaire des isolats fongiques

II.1. Extraction de l'ADN fongique

L'extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique) a été effectuée en utilisant un kit commercial FastDNA Spin (MP Biomedicals). Le protocole consiste à déposer 1ml de solution de lyse cellulaire (CLS-Y) dans des tubes de Lysing Matrix A, puis à ajouter l'équivalent de 200 mg de structures fongiques (spores et mycélium pour les champignons filamenteux), prélevées à partir de cultures sur boîtes PDA à l'aide d'un scalpel stérile ou d'une anse à usage unique. Cette préparation a été homogénéisée dans un vibro-broyeur (Retsch MM400) pendant 40s à une fréquence de 60 Hz, puis centrifugée à $14000 \times g$ pendant 10 min. Un volume de 800 μ l de surnageant a été transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml, et 800 μ l de la solution Binding Matrix (suspension de silice, agissant comme matrice de liaison) y ont été ajoutés. La préparation a été incubée pendant 5 min à température ambiante, avec une agitation douce sur un support rotatif (RotoFlex, R2001). La moitié de cette préparation a été transférée dans des tubes SPIN Filter, puis centrifugée à $14000 \times g$ pendant une minute. Le tube de récupération a été vidé et le reste de la préparation a été ajouté dans le tube SPIN Filter et centrifugé une seconde fois (**Figure I**).

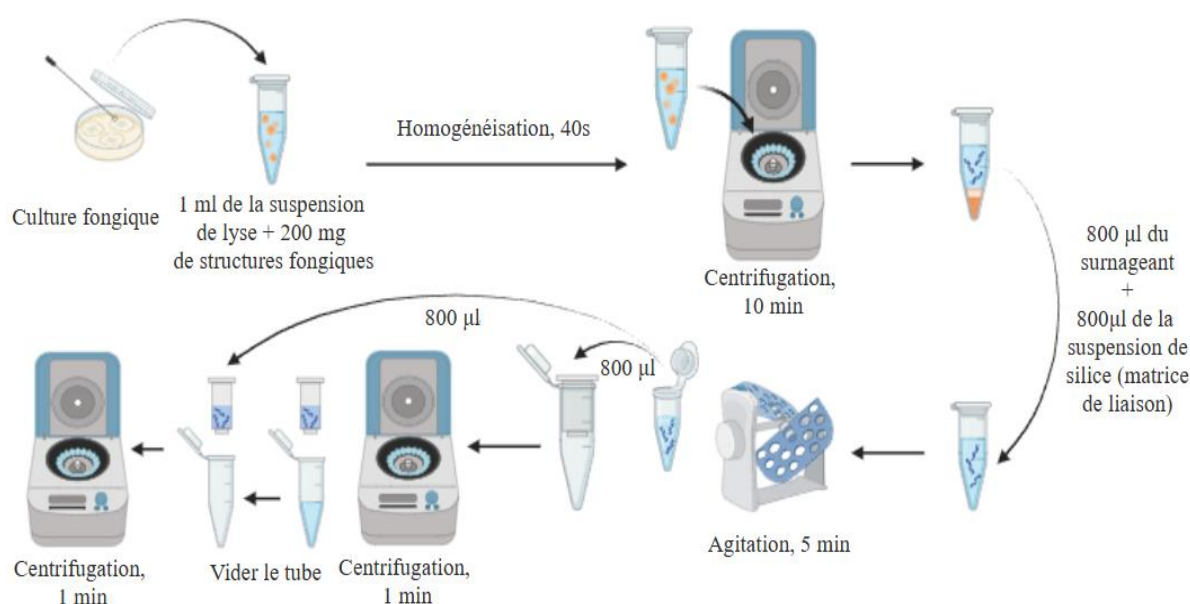


Figure I. Protocole expérimental de la lyse cellulaire et la fixation de l'ADN à la matrice de silice

Le tube de récupération a été vidé à nouveau, et 500 μ l de la solution de lavage SEWS-M additionnée de l'éthanol à 100 % ont été ajoutés, tout en remettant le culot en suspension à l'aide de la pointe d'une pipette. Le mélange a été centrifugé à 14000 \times g pendant une minute. Le tube de récupération a été vidé et remplacé par un autre. Le mélange a été centrifugé une nouvelle fois à 14000 \times g pendant 2 minutes afin d'assurer l'élimination complète de l'éthanol. Enfin, le tube de récupération a été remplacé par un nouveau tube propre et l'ADN a été élué en remettant doucement en suspension la matrice de liaison contenue dans le tube SPIN Filter avec 100 μ l de DES. Cette suspension a été incubée pendant 5 minutes à 55°C dans un Eppendorf ThermoStat Plus, puis centrifugée à 14000 \times g pendant une minute afin de récupérer l'ADN élué dans le tube de récupération. Le tube SPIN Filter a ensuite été jeté et l'ADN fongique est prêt. La conservation de l'ADN se fait à -20°C (à long terme) ou à 4°C (à court terme) (**Figure II**).

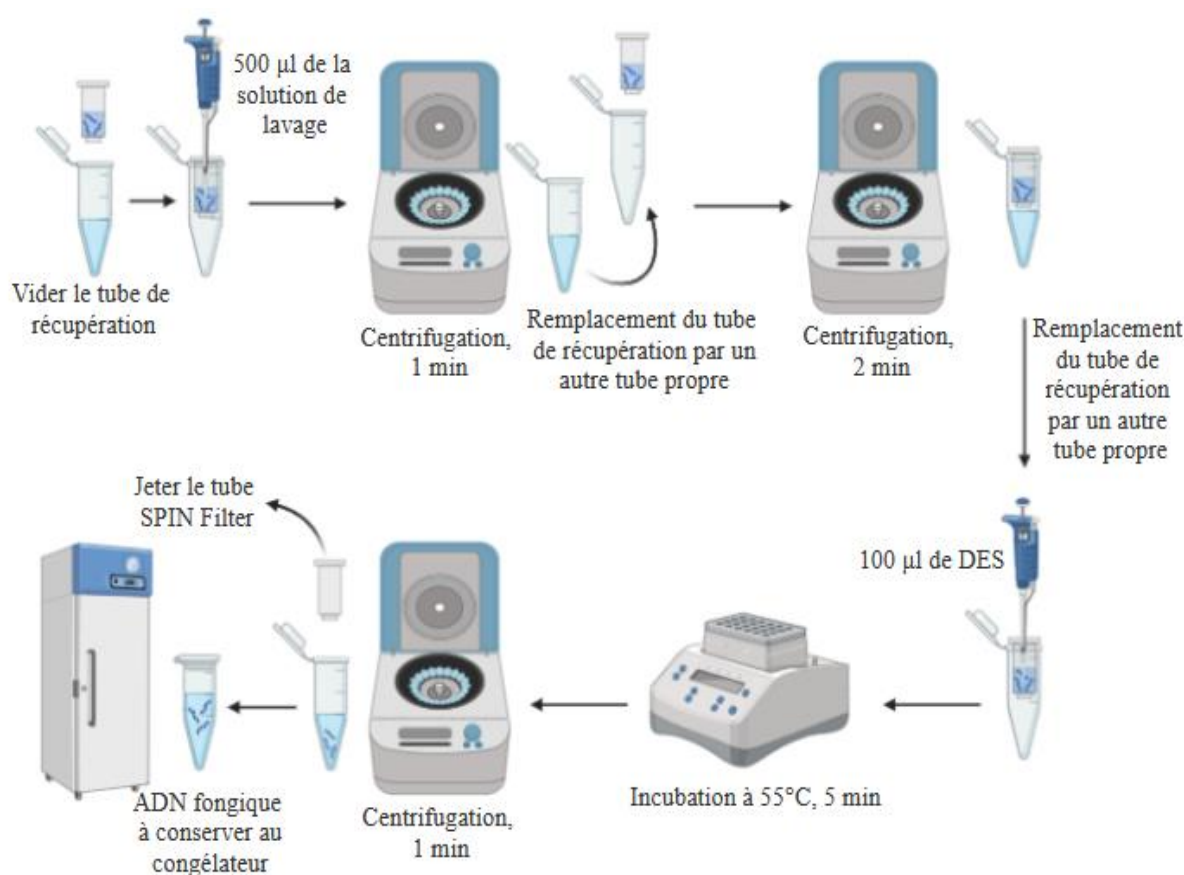


Figure II. Protocole expérimental de l'élution et la récupération de l'ADN fongique

II.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

1. Préparation du gel d'agarose à 2 %

- Verser 2 g d'agarose dans un Erlenmeyer et ajouter 100 ml de tampon TAE (Tris-acétate EDTA) à 1x;
- Dissoudre l'agarose en chauffant la solution dans un micro-ondes jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissoute, obtenant ainsi une solution claire et homogène;
- Refroidir la solution en la plaçant sous une eau froide, en tournant délicatement l'Erlenmeyer pour permettre une dissipation régulière de la chaleur;
- Ajouter 5 µl de l'intercalant Midori Green dans le gel et mélanger délicatement.

2. Préparation de la cuve de migration

- Installer les parois amovibles du support de coulage et insérer le peigne;
- Verser la solution d'agarose préparée dans le support et laisser refroidir pendant 20 minutes;
- Retirer les parois amovibles et le peigne en veillant à ne pas endommager les puits;
- Placer le support dans la cassette d'électrophorèse et recouvrir le gel avec le tampon TAE à 1x, en veillant à ce que le gel soit complètement submergé;
- Ajouter 5 µl du marqueur de taille BenchTop DNA Ladder (100 pb) dans le premier et le dernier puits, et 5 µl de chaque échantillon (amplicons, témoin positif, témoin négatif) dans les autres puits;
- Fermer le couvercle de sécurité et vérifier le positionnement correct du gel.

3. Migration et observation

- Effectuer l'électrophorèse à 100 V pendant 30 minutes;
- Après la migration, retirer le gel de la cuve et l'observer sous lumière UV avec un Quantum ST4 équipé du logiciel Quantum-Capt.

Annexe II.3. Séquences nucléotidiques des gènes d'intérêt (3'-5')

>A2_ITS: *Aspergillus niger*

TGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGA
 TCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACAC
 ACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCG
 CAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTGC
 GTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAACT
 CAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAA
 GCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGAT
 GGGAGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTT

>A2_Actine: *Aspergillus niger*

TGTGCAAGGCCGGTTTCGCCGGTGACGATGCTCCCCGTGCCGTCTTCCGTAAGTCAACCTCCTCCTTG
 TCCACTGTGCTGGACGTTCTACCTACTGGCTTGATGGATTCTTCCGCTCTTTCATGGCAATTGCCACC
 CATTGCGTCTTCGCGCCGGGCTGCTAGCTCATGTGGGGCGGTGAATTACCCGCCATGTCAGCACCA
 GTTCGAATAGTGAACAACTTGCAGTACAGCCTCCATTGTCGGTTCGTCACCATGGGTAAAG
 CTCCCTTTGTTCTCTCCTAATTGGCCTGCCAGGCTGGTTGATCAGTTTTGTCTAATGCCGCCACAGT
 ATCATGATTGGTATGGGCCAGAAGGACTCG

>R1_ITS: *Rhizopus arrhizus*

AGAAAGTAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGGTAGTGATTGCTTCTACAC
 TGTGAAAATTTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTT
 GATCGATGCCACTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGT
 ATTATAAAGTTTAATAAAAAACAACCTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG
 ATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCAT
 CGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACCTATGGTTTTTCTATAGAGTACGCCTGCTTCA
 GTATCATCACAAACCCACACATAACATTTGTTTATGTGGTGATGGGTTCGCATCGCTG
 TTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGTGATTTTCTGTCTGGCTTGCTAGGCAG
 GAATATTACGCTGGTCTCAGGATCTTTTTTTTTGGTTCGCCAGGAAGTAAAGTACA
 AGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACCTATGATCTGAAGTCAGGTGGGATTACCCGC
 TGAACCTAAGCATATCATAAGC

>R1_LSU: *Rhizopus arrhizus*

AGGCCACACCTAAGCGAATAGAAGTATAACCAAAAAGACAACCTTGATACCGTAG
 TACCTCAGAAAACCTTCCCTGGAAAACCTCGCCAATAAGCATTTCGCTGCGTTCCTCAA
 TCCAACCAAGGTATTTTCTAAGGGACTATAACACCCACAAGTGGGCCACATTTCC
 CTAGTTTTTCCCTCAAGTCAAATTGTCGTTGGCAGGCATAGCCTGCAAGTGCAT
 CCAGGCCGAAGCCTAGATTGATTACAGACAAGCCAGTCTGGCTCCAACGGTTCC
 CTTTTAACAATTTACATACTGTTTAACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCC
 TCACGGTACTTGTTTCGCTATCGGTTTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGGTGAGATTTAC
 CACCAATTTAGGCTGCATTCCCAAACAACCTGACTCTTTGAAAGCGTATCACAAA
 AGGCAAATGCTCAAGCCAAAGACGGGATTCTCACCTCTATGATGCCCTGTTCCAA
 AGGACTTATTTACTCGGCTTGCCCTGGAAAACACTTCTACAGTCTACAATCCGGTTTA
 GCTAGGCCAAACAGGTTCCAACCTTGAGCTCTTCCCTCTTCACTCGCCGTTACTAG
 GGAAATCATTGTTATTTTCTTTTCCCTCGTA

>P1_ITS: *Penicillium hordei*

ATAAAATTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGC
 TCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAAATCGGAGGACGGGGC
 CCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCG
 GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATT
 CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTC
 ACTCAGACTTCAATCTTCAGACAGAGTTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGTGA
 GCCCCCCGGCGGCCAGTAAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTAAAATAAACACGGGTGGGAG
 GTTGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCTACGGAA

>P1_bétatubuline: *Penicillium hordei*

AGCTTGCCGAAGGGACCGGAGCGGACAGCGTCCATGGTACCGGGCTCCAAATCGACGAGAACGGC
 ACGGGGAACGTACTTGTACCCGCTGGCCTAGATTATGAGAAGCATCCGATCAGATGATGCACGATTA
 TTCGGTTTCCAGTCGTTGGACTCACATGGTTGAAGTAGACGTTACATCGCTCGAGCTGGAGGTCGGA
 GGTACCATTGTACCTAGCAAGATATCAGACGTGTGATCCACCGGAAACCCCATCACAGTTAAAACCT
 ACTGTCCATCGCCATCGAGACCGTGTCTGCCAGAGATGGTTTGCCTGTAATCCAGTTAGCAACCTGTC
 AATTGATACCCAACGCGGGAAAAAAAAA

>C1_ITS: *Candida tropicalis*

AAGTTATGAAATAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAATAAGCGTTTTTGGATAAACCTAAGTCGCTTA
 AAATAAGTTTCCACGTTAAATTCTTTCAAACAACCTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGGGGGTT
 TGAGGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAA
 AGATTCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG
 CGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGACTGTAAT
 AAAAAGTTTGGTTTAGTTATAACCTCTGGCGGTGGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAAT
 AAAAAACACATGTGGTGAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCTACGG

>C1_D1D2: *Candida tropicalis*

TCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATAAACCGCAGTCCTCAG
 TCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACACAACCAAAGTCGTGCCACATTCCAACGCAATT
 CTCCTACCGCCAAACTGATGCTGGCCGATAAACTGTAGAGGCCACCCCGAAGAAGTAACATACA
 AAATACCAAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTTTTTCAAAG
 TTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAA
 TTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGCCTGG
 ATCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAG
 ACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTT
 GCCGC

>R2_ITS: *Rhodotorula mucilaginosa*

AGAAGCTTCCTTTAACCCAACCCGGCTCTAATCCGAAGACTAGAATTCCTCAGCGAATAGTCTATTAC
GCCAAGTCAATCCGAAGTTCGATTGCGGATGCTAATGCATTACGAACGAGCTAGACCGTAAAGGCCA
GCAGCGCTCAGAAACCAAACACCTCTTCAATCATTAAAGAAAGAGGAGGGTTGAAGTATTCATGACAC
TCAAACAGGCATGCTCCACGGAATACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG
AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCC
GTTGTTGAAAGTTTTATTTGTTATAAAAATTTAATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAGTGAATAGG
AGTTCGCTCTCTTGCGAGAGTTACTATCCCAAACAAGTGCACAGGGTTAGAAAGTGAGAGTTCGGAC
TCCAAGTTAAGTTGGACGTCCTATATTCATAATGATCCTTCCGCA

>R2_D1D2: *Rhodotorula mucilaginosa*

TCCTAAGTGTGAAGAGGTGCAAACCCCGCCAAAGGCACACTGCGTTCCTCAGTCCCCCAAGATGTA
TCCAGCAGAGAGCTATAACACAGCCGAAACTGCTACCTTCTCTCTACCATTATCCATCCCGGAAAAC
GATGCTGGCCTGCAAACCGATTGCTCGGCAAGCAAGTCTGACTTCAAGCGTTTCCCTTCCAACAATTT
CACGTAAGTGTAACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCT
CTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCAATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTC
TTCGAAAATGTATCACAAAGCGCTGGGCGTCCGCACCATATACGGGGGTCTCACCCTATGCCGCTG
TATTCACAGACTTGTGTGCGGTCCAACGCGGAAAACATTTCTAGAGATTACAACCTCGGACACCGA
AGGTGCCAGATTATAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGCTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTT
TCTTTTCCT

Annexe III. Dénombrement par la cellule de Malassez

1. Préparation de la solution mère

- Verser 9 ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai
- Ajouter un disque de l'isolat fongique (culture jeune de 7 jours)
- Homogénéiser la solution à l'aide d'un vortex

2. Préparation d'une série de dilutions (10^{-1} et 10^{-2})

3. Préparation de la cellule de comptage

- Placer la cellule de Malassez sur une surface plane
- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle
- Placer la lamelle (adhérence par un effet ventouse)
- Déposer, à l'aide d'une micropipette, la suspension à dénombrer dans la chambre de comptage en évitant tout débordement vers les rigoles (la capillarité permettra l'entrée du liquide dans l'espace entre la lamelle et la cellule)
- Attendre 5 à 10 minutes pour que les cellules sédimentent avant de réaliser le comptage

4. Comptage des cellules

- Observer au microscope optique avec un objectif x10 pour visualiser le quadrillage de la cellule de Malassez
- Observer au microscope optique avec un objectif x40 pour compter toutes les cellules présentes dans un rectangle (unité de comptage), ainsi que celles qui chevauchent le bord haut et droit. Chaque rectangle correspond à un volume de 0.01mm^3 .

5. Calcul du nombre de cellules par ml

- Utiliser la formule: $N = \frac{n}{axv} \times Fd$, où:

N: nombre de cellules par unité de volume

n: nombre de cellules comptées

a: nombre d'unités de comptage dénombrées

v: volume d'une unité de comptage

Fd: facteur de dilution