



**HAL**  
open science

## Matériaux biodégradables et environnement

P. Feuilleley, Véronique Bellon Maurel

► **To cite this version:**

P. Feuilleley, Véronique Bellon Maurel. Matériaux biodégradables et environnement. Cemagref Editions, pp.274, 2000, Coll. Actes de colloque, 2-85362-546-X. hal-02579164

**HAL Id: hal-02579164**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02579164v1>**

Submitted on 6 Jul 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

PU300008239

ACTES DE  
COLLOQUE

Paris  
5-6 mai 1999  
France

Matériaux biodégradables  
et environnement

*Coordination  
Pierre Feuilloley et Véronique Bellon-Maurel*

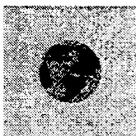
**Cemagref**  
EDITIONS

# Matériaux biodégradables et environnement

Actes du colloque

Paris, 5-6 mai 1999

ADEME



## Organisation

Comité scientifique :

Bellon-Maurel Véronique (Cemagref Montpellier, COBIO)  
Bewa Hilaire (ADEME)  
Fabrèga Benoît (ARD de Haute-Normandie)  
Feuilloley Pierre (Cemagref Montpellier)  
Rols Jean-Luc (INSA Toulouse)  
Silvestre Françoise (ENSC Toulouse)  
Vert Michel (CNRS Montpellier)

Gestion administrative et comptable : Aline Merlot

Coordination de l'édition : Pierre Feuilloley, Véronique Bellon-Maurel

**Matériaux biodégradables et environnement** – Actes du colloque international organisé par l'Ademe, le Cemagref et le Cobio. Paris 5-6 mai 1999.

Coordination de l'édition : Pierre Feuilloley et Véronique Bellon-Maurel.

Impression et façonnage : Ateliers Cemagref. Vente par correspondance : Publi-Trans, BP 22, 91167 Longjumeau Cedex 9, Tél. 01 69 10 85 85. Diffusion aux libraires : Tec et doc Lavoisier, 14 rue de Provigny – 94236 Cachan Cedex.

ISBN 2-85362-546-X. Dépôt légal : 2<sup>e</sup> trimestre 2000 – Prix : 215 F – 32,78 €

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b>	5
<b>AVANT PROPOS</b>	7
<b>INTERETS, ENJEUX ET RISQUES DES MATERIAUX BIODEGRADABLES</b>	
Intérêt et enjeux de matériaux biodégradable (M. Vert)	11
Evaluation des risques écotoxicologiques des produits de dégradation (G. Soulas)	20
<b>OUTILS DE MESURE A BASE NORMATIVE</b>	
Les systèmes de mesure en bouteilles closes (Wolf Müller)	35
La respirométrie séquencée appliquée à la mesure de la biodégradabilité (E. Paul)	51
Un système automatisé de mesure de la biodégradabilité des matériaux (P. Feuilloy)	60
Mesure de la biodégradabilité en condition anaérobie (M. Itävaara)	69
<b>QUELQUES TENDANCES DE LA RECHERCHE</b>	
Vers une standardisation de l'inoculum microbien (JL. Rols)	79
Matériaux biodégradables et compostage (C. Belloy)	88
Modèle de prédiction de la dégradation en milieu naturel (F. Silvestre)	95
Biodégradabilité et lombriculture (N. Alauzet)	105
Test et biodégradabilité sur lit de vermiculite (F. degli Innocenti)	116
<b>LE MARCHÉ DES PRODUITS BIODEGRADABLES</b>	
Le marché des produits biodégradables : enjeux, utilisation, élimination, avantages et inconvénients (H. Bewa)	129
Les plastiques biodégradables au Japon (S. Guilbert)	143
Labellisation des matériaux biodégradables (G. Jacques)	150

<b>TABLE RONDE :</b>	161
Production, fabrication, utilisation, consommation de produits biodégradables	163
<b>SESSION POSTERS</b>	179
Préparation de Mélanges PHBV/Amidon par Mélange Réactif et leur Caractérisation ( <b>M. Avella, M. Errico</b> )	181
Formulation, Fabrication et Propriétés fonctionnelles de bioemballages à base de protéines myofibrillaires ( <b>Bernard Cuq, Stéphane Guilbert</b> )	189
Les Protéines Sources d'Agro-Polymères pour la Production d'Emballages ( <b>Bernard Cuq, Nathalie Gontard, Stéphane Guilbert</b> )	197
Ecotoxicité de matériaux biodégradables après compostage ( <b>J. Fritz, U. Link, R. Braun</b> )	208
Evaluation de la biodégradabilité primaire d'huiles de base utilisées dans la fabrication des lubrifiants ( <b>F. Haus, G.-A. Junter, J. German, E. Poitrat</b> )	217
Utilisation de la biodiversité des Pseudomonas pour la synthèse de polyesters à architecture contrôlée ( <b>Delphine Mallarde, Valérie Langlois, Odile Bouvet, Philippe Guerin</b> )	227
La biodégradation du polybuthylène succinate (pbs) et du polybuthylène succinate/adipate (pbsa) dans différents environnements ( <b>Yoshihisa Yokota, Hélène Maréchal</b> )	235
Conteneur bio-dégradable ( <b>Maurice Rabouin</b> )	244
Hydrophobation de films protéiques obtenus par filmage en milieu humide ( <b>Vincent Rampon, Noël Nicolas</b> )	248
Les poly(glyoxylate de méthyle - co - glyoxylate de potassium) : nouveaux copolymères bio-dégradables à hydrophilie variable ( <b>C. Vaugelade, C.-H. Brachais, K. Glínel, J. Belleney, C. Bunel</b> )	254
<b>DOSSIER DE PRESSE</b>	263

# Remerciements

Le comité d'organisation remercie chaleureusement :

## **Pour leur soutien financier**

- ◆ L'ADEME
- ◆ Le Cemagref
- ◆ Le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
- ◆ Le Ministère de la Culture et de la Communication

## **Pour leur soutien logistique et technique**

- ◆ Le service de la communication de l'ADEME
- ◆ Le service de la communication du Cemagref
- ◆ Le service de l'information scientifique et technique du Cemagref
- ◆ Le service de comptabilité du Cemagref de Montpellier



# Avant-propos

Le colloque « Matériaux biodégradables et Environnement » a pour objectif de présenter à la communauté industrielle, agricole, scientifique et aux pouvoirs publics l'état du marché et de la réglementation et les évolutions possibles concernant les matériaux biodégradables.

Ce colloque est organisé conjointement par l'ADEME, le Cemagref et le COBIO. Les deux premiers organismes sont des établissements publics bien connus qui traduisent l'intérêt porté aux matériaux biodégradables en environnement et en agriculture, dans le cadre de la réduction des déchets. Le troisième organisme, le COBIO ou Comité Français pour la Biodégradabilité, est une émanation beaucoup plus récente d'un groupe de chercheurs réunis dans le cadre du programme Agrice et qui ont, sous l'impulsion du Cemagref et de l'ENSCT, décidé de mettre en place un réseau multidisciplinaire d'échange d'informations sur la biodégradabilité. Après 3 ans de vie, le COBIO compte une quarantaine de membres issus des métiers les plus variés (agriculteurs, producteurs de films agricoles, producteurs de matériaux plastiques, producteurs d'emballages, chercheurs, industriels des déchets...). Ceux-ci sont régulièrement informés des avancées dans le domaine des matériaux ou de la réglementation au travers de la « Lettre d'information » du COBIO. Ce colloque est un autre exemple de cette politique de transparence et d'information de cette association.

## **Pourquoi un colloque de cette forme ?**

Les matériaux biodégradables, encore trop peu développés dans les applications commerciales restent majoritairement une préoccupation des laboratoires de recherche -publics ou privés- travaillant sur les polymères. Ils font l'objet de congrès scientifiques réunissant les chercheurs dont l'objectif est de mettre au point des produits ayant les meilleures propriétés et ce, au moindre coût. Si l'intérêt de telles rencontres est indéniable, il apparaît que d'autres types d'échanges sont nécessaires pour fédérer également les autres acteurs du marché des matériaux biodégradables, à savoir les industriels producteurs, les utilisateurs et les services publics.

C'est en caractérisant plus finement les attentes qualitatives et quantitatives des utilisateurs que les producteurs pourront orienter leurs recherches. C'est par une clarification sur l'évolution de la réglementation que les utilisateurs identifieront l'intérêt d'utiliser des matériaux biodégradables. Enfin, c'est en connaissant les propriétés de ces matériaux que les pouvoirs publics pourront arrêter des décisions argumentées quant à leur utilisation en relation avec l'environnement.

Proposition nous est donc faite dans ce colloque de travailler ensemble pour une meilleure connaissance des contraintes et des offres respectives, afin de promouvoir intelligemment l'utilisation des matériaux biodégradables.

Pour le Comité,

Véronique BELLON MAUREL  
COBIO

Pierre FEUILLOLEY  
Cemagref

Hilaire BEWA  
ADEME



# **INTERETS, ENJEUX ET RISQUES**

## **DES MATERIAUX BIODEGRADABLES**

- Intérêt et enjeux des matériaux biodégradables  
Michel Vert, CNRS Montpellier
- Risques liés à l'écotoxicité des produits de dégradation  
Guy Soulas, INRA Dijon



# Intérêts et enjeux des matériaux biodégradables

## *Challenges of biodegradable materials*

Michel Vert

Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels, ESA CNRS 5473 –  
Université Montpellier 1, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault,  
34060 Montpellier, France

**Résumé :** Les composés macromoléculaires, improprement appelés « matières plastiques », constituent l'une des dernières générations de matériaux artificiels que l'homme tente de maîtriser. Ces composés biorésistants révolutionnent notre quotidien depuis plus d'un demi-siècle et ont envahi quasiment tous les domaines de l'activité humaine. Leur recyclage est problématique pour des raisons thermodynamiques extrêmement contraignantes. Quel que soit leur domaine d'utilisation (chirurgie, pharmacologie, emballage, agriculture, etc.), les polymères de synthèse génèrent des déchets qu'il faut de nos jours éliminer. Inventer et qualifier de nouveaux polymères concurrentiels des premiers sur le plan fonctionnel et en plus bioassimilables est l'une des solutions. La machine est en route dans le monde. Plusieurs solutions sont à l'étude. L'avenir proche nous dira si la technologie est possible et surtout si le jeu en vaut la chandelle. Il ne faut pas oublier qu'un composé dégradé ou biodégradable doit d'abord être un matériau sous peine d'un avenir économique compromis. La pression sociale sera probablement déterminante pour passer outre.

**Abstract :** *Macromolecular compounds, also incorrectly referred to as «plastics», are one of the last generations of artificial materials man tries to control. These bioresistant compounds have totally changed our everyday life for the last fifty years and invaded almost any domain of the human activities. Their recycling is problematic for drastic thermodynamic reasons. Regardless of the domain of applications (surgery, pharmacology, packagings, agriculture, etc.), synthetic polymers generate wastes that must be eliminated. Inventing and qualifying new polymers that can compete with previous ones from a functional viewpoint and that can be assimilated by biosystems is one of the potential solutions. The process is engaged in the world. Several solutions are being investigated. The close future will tell us whether the technology is feasible and if it is worth doing it. One must keep in mind that a degradable or biodegradable compound has first to be a material otherwise its economical future can be questioned. The social pressure will be probably critical to overcome the problem.*

**Mots clés :** Matériaux organiques, Polymères, Dégradation, Biodégradation, Devenir, Bioassimilation, Enjeux économiques, Enjeux technologiques

**Keywords :** *Organic materials, Polymers, Degradation, Biodegradation, Biossimation, Technical issues*

# 1. Introduction

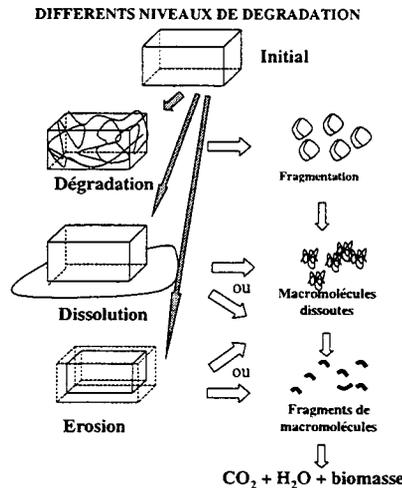
La notion de matériau, c'est à dire de matière exploitée par l'homme à des fins utiles, est intimement liée à l'évolution de l'humanité. Les progrès réalisés par l'homme au fil des siècles suivent parfaitement les progrès des matériaux. La diversité et la qualité des matériaux atteintes de nos jours modifient quelque peu cette tendance. Le recyclage des matériaux à usage temporaire devient une nécessité économique autant qu'écologique. Les composés macromoléculaires, improprement appelés « matières plastiques », constituent la dernière génération de matériaux artificiels que l'homme tente de maîtriser. Ces composés révolutionnent notre quotidien depuis plus d'un demi-siècle et ont envahi quasiment tous les domaines de l'activité humaine. La production mondiale annuelle de matériaux polymères frise les 100 millions de tonnes et contrairement aux autres types de matériaux, leur recyclage est problématique pour des raisons thermodynamiques extrêmement contraignantes.

Quel que soit leur domaine d'utilisation (chirurgie, pharmacologie, emballage, agriculture, etc.), les polymères de synthèse génèrent des déchets qu'il faut traiter. Pour la plupart des autres matériaux de grande diffusion (verre, métaux) le traitement moderne des déchets est fondé sur le recyclage qui fournit une matière équivalente. Le recyclage des matériaux dits plastiques, en particulier celui des polymères de commodité, n'est pas réalisable actuellement, principalement pour des raisons thermodynamiques. A de rares exceptions près, deux polymères, même de nature voisines, ne se mélangent pas ; on dit qu'ils sont non-miscibles. Même intimement travaillés, leurs mélanges conduisent en général à des composés aux propriétés insuffisantes. Il est théoriquement possible de trier les déchets ménagers ou industriels pour en extraire des populations unipolymères. Pour certains, tels que les bouteilles en PET par exemple, il faut que le tri soit très rigoureux car une proportion infime de PVC suffit à rendre le produit final inexploitable. Le fait que le recyclage ne puisse pas conduire à un matériau équivalent est un obstacle majeur. Pour le polyéthylène, on contourne partiellement le problème en mélangeant la matière à recycler avec de la résine vierge. Il n'en demeure pas moins qu'après quelques cycles, les déchets deviennent irrécupérables et doivent être éliminés. Dans ce cas, le recyclage de la matière plastique ne fait que repousser l'échéance de l'inévitable élimination. Des solutions concurrentes telles que les recyclages par dégradation chimique ou par pyrolyse sont envisagées dans certains cas pour régénérer les monomères d'origines ou d'autres composés polymérisables, mais ces solutions sont encore chères et très spécifiques. Dans ces conditions, la biodégradation apparaît donc comme particulièrement intéressante puisque fondée sur des phénomènes d'élimination naturelle. Théoriquement elle ouvre la porte au biorecyclage. Toutefois, la notion de biodégradabilité, fortement portée par l'impact médiatique du terme, est séduisante mais beaucoup moins accessible et, peut être, moins performante que beaucoup le croient. En effet, les phénomènes à maîtriser et les critères à respecter sont plus nombreux et plus complexes qu'il n'y paraît au premier abord. De plus, c'est la nature qui en est maîtresse.

La vie est largement fondée sur la notion de macromolécule. Fondamentalement, il n'y a pas de différences entre les systèmes macromoléculaires naturels ou biopolymères et les polymères artificiels inventés par l'homme, excepté le fait que ces derniers sont extrêmement simples et qu'ils ont été sélectionnés, jusqu'à présent, sur la base de leurs performances et notamment pour leur durabilité y compris face aux agressions biologiques et environnementales. Au contraire, les biopolymères vierges sont tous qualifiables de biorecyclables par minéralisation et bioassimilation.

## 2. Dégradation – Biodégradation - Bioassimilation

Examinons tout d'abord la notion de dégradation. La Figure 1 montre différents niveaux d'altération d'un objet en matière macromoléculaire, plus communément connue sous le nom impropre de matière plastique.



*Figure 1 : Différents niveaux de dégradation d'un matériau polymère à distinguer d'un point de vue fondamental*

D'après ce schéma, un objet peut être dégradé au niveau macroscopique pour former des fragments solides ou particules dispersables sans altération des macromolécules le constituant. Un objet polymère peut aussi être dégradé par dispersion des macromolécules après dissolution dans un fluide environnant, notamment l'eau. A un niveau de dégradation plus avancé, les macromolécules peuvent être fragmentées en objets moléculaires plus petits. Enfin, ces objets issus de la dégradation des grandes molécules peuvent être minéralisés ou transformés en matière organique. Il est bien évident que ces différents niveaux ne sont pas équivalents. La fragmentation en particules, dont un exemple typique est

constitué par les mélanges polyéthylène-amidon dans lesquels seul l'amidon est dégradé par voie biologique, n'est pas à proprement parler une biodégradation. Dans l'environnement, on pourra parler de « sable organique » à propos des particules formées qui seront tout aussi résistantes que la matière constituant l'objet d'origine. L'impact d'un tel sable organique sur les écosystèmes est encore inconnu. Dans le cas de la dissolution sans altération des macromolécules, il peut y avoir, à la longue, une source de problème si ces macromolécules atteignent les nappes phréatiques ou perturbent les bilans des stations d'épuration. Une telle situation est rencontrée avec les additifs macromoléculaires présents dans les produits lessiviels par exemple. Il est évident que seule la solution conduisant à la minéralisation et/ou à la formation de biomasse après bioassimilation est satisfaisante, au premier abord.

D'un point de vue fondamental, la minéralisation et/ou la bioassimilation d'un matériau macromoléculaire peut être obtenue par deux voies différentes (Figure 2).

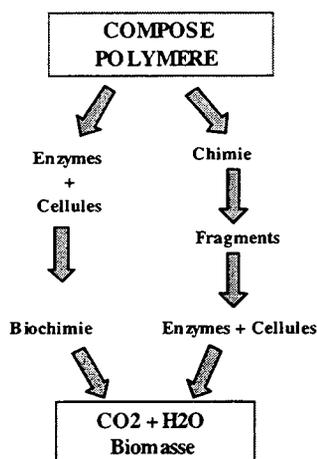


Figure 2 : Les deux voies pour minéraliser et/ou bioassimiler un composé polymère

La première voie consiste en une attaque des macromolécules par des éléments biologiques, en l'occurrence des enzymes inévitablement associés à des cellules individuelles ou associées au sein d'un tissu vivant. La biochimie mène alors à la minéralisation et/ou à la bioassimilation. Dans ce cas, c'est la nature qui commande l'évolution de la dégradation. Si l'environnement est impropre au bon fonctionnement des systèmes vivants, la dégradation est inhibée. La seconde voie est fondée sur une attaque chimique des macromolécules (hydrolyse, oxydation, photodégradation, etc.) avec génération de fragments moléculaires suffisamment petits pour être bioassimilés par voie biologique mobilisant des enzymes et des cellules. Ces deux voies aboutissent au même résultat. Toutefois, il y a une différence fondamentale. La première voie dépend entièrement du bon fonctionnement du milieu biologique tandis que la seconde dépend de la chimie. Elle est donc mieux maîtrisable par l'homme. Il est maintenant convenu de

dénommer « biodégradation » la dégradation des macromolécules par attaque enzymatique, le terme « dégradation » étant réservé à la seconde voie. Afin d'éviter toute confusion, la dégradation conduisant à la seule fragmentation de la matière sans altération des molécules sera dénommée « fragmentation » ou « biofragmentation » si des enzymes sont impliquées, comme dans le cas des mélanges polyéthylène-amidon. La dissolution d'un objet macromoléculaire ne peut donc pas être considérée comme une biodégradation si il n'est pas prouvé que les macromolécules sont dégradées. Enfin, l'érosion, qui correspond à une dégradation par la surface, n'est qu'un cas particulier rencontré généralement, mais pas uniquement, dans le cas de la biodégradation. En effet, les enzymes ne peuvent pas pénétrer une matrice polymère constituée de chaînes enchevêtrées. Une dégradation de surface n'est donc pas suffisante pour conclure à une biodégradation car elle peut être observée sans intervention d'enzyme, dans le cas où la réaction chimique est rapide par rapport à la vitesse de pénétration de l'agent dégradant.

Ces conditions étant précisées, il est évident que l'enjeu principal n'est pas la biodégradation des matériaux polymères comme on le croît souvent, notamment au niveau des media et des non-spécialistes. Les vrais problèmes sont sur un plan philosophique la maîtrise du devenir des produits de dégradation et sur les plans industriel et économique la compétitivité des produits de remplacement des polymères actuels.

Une idée commune est que les biopolymères, c'est à dire les polymères naturels, sont intrinsèquement biodégradables. C'est une réalité mais d'une part leur bioassimilation peut être longue et, d'autre part, ils sont généralement difficiles à mettre en œuvre sans transformation. Enfin et contrairement aux polymères de synthèse, ils n'offrent généralement que peu de possibilités d'adaptation ce qui limite considérablement la gamme de propriétés accessibles à partir d'un composé de base. C'est d'ailleurs l'une des raisons pour lesquelles les polymères de synthèse ont supplantés les matériaux polymères naturels dans de nombreuses applications courantes (huisseries plastiques, tissus synthétiques, etc.). Il est bien sûr possible de modifier chimiquement un polymère naturel pour générer une plus grande variété de propriétés. Malheureusement, leur biodégradabilité est rarement préservée. C'est le cas pour l'acétate de cellulose. Au delà d'un degré de substitution DS ~ 2,5, la chaîne cellulosique n'est plus biodégradable. En deçà, les propriétés bénéfiques du triacétate de cellulose ne sont pas atteintes. On peut citer également le cas du poly(hydroxy butyrate) bactérien ou PHB. Le PHB naturel est composé d'unité de configuration R. L'introduction d'unités de configuration opposée S dans les chaînes bloque l'activité enzymatique et donc la biodégradation.

De ces réflexions, il ressort que la dégradabilité et la biodégradabilité sont des propriétés intéressantes mais qu'elles ne sont pas suffisantes. Qu'il soit dégradable ou biodégradable, un déchet polymère doit surtout être bioassimilable et biocompatible, c'est à dire qu'il doit respecter les milieux vivants où ils se dégradent et les systèmes vivants qui les dégradent.

Pour pouvoir remplacer un matériau polymère biostable, un matériau dégradable ou biodégradable bioassimilable doit d'abord être un matériau équivalent. En d'autres termes, il doit répondre au cahier des charges de l'application visée qui comprend les critères liés à la fonctionnalité complétée par la biocompatibilité et la bioassimilation (Fig. 3)

## CAHIER DES CHARGES

=

### FONCTIONNALITE

Propriétés principales :

- Chimiques
- Physico-chimiques
- Thermiques
- Mécaniques, etc.

Autres propriétés

- Stockable
- Facile à manipuler
- Adjustable

+

### BIOCOMPATIBILITE

+

### BIOASSIMILATION

*Figure 3 : Critères du cahier des charges idéal d'un candidat polymère bioassimilable*

Nous avons maintenant tous les éléments logiques pour discuter les avantages et les enjeux des matériaux polymères dits « biodégradables ».

### 3. Les avantages

La biodégradabilité n'est pas en soit un avantage décisif si le matériau polymère candidat n'est pas compétitif sur les plans fonctionnel et économique par rapport au composé biostable à remplacer. Par contre, en cas de compétitivité, la dégradabilité et la biodégradabilité présente deux avantages majeurs : après usage, le déchet résiduel est éliminé naturellement. Encore faut-il que le matériau conserve sa fonctionnalité pendant toute la durée d'utilisation, ce qui n'est pas un critère simple à satisfaire ? La dégradabilité et la biodégradabilité peuvent aussi être la source d'innovations spécifiques liés à l'ingéniosité humaine, comme cela a été le cas de tout nouveau matériau jusqu'à présent.

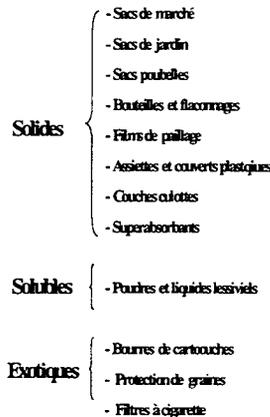
## 4. Les enjeux

Nous ne considérerons ici que les enjeux techniques. L'enjeu principal est le remplacement des polymères de commodité biostables ce qui implique de satisfaire aux conditions d'équivalence de comportement, de propriétés, et de compétitivité de coût. Il est alors impératif de prendre en compte l'ensemble des paramètres au sein d'un écobilan toujours difficile à établir.

Plus spécifiquement, les enjeux pratiques visent le remplacement de matériaux, d'objets, de systèmes et de dispositifs dont quelques exemples sont présentés

### ENJEUX

#### Exemples de systèmes à remplacer



*Figure 4 : Quelques exemples de systèmes actuellement exploités à l'aide de polymères biostables et susceptibles de constituer des débouchés pour les polymères dégradables et bioassimilables*

Le nombre de familles de polymères susceptibles de satisfaire aux conditions de biocompatibilité et de bioassimilation sera inévitablement restreint. C'est d'ailleurs un constat que l'on peut faire pour les biopolymères, la nature n'ayant retenu que trois grandes familles de polymères (protéines, polysaccharides et polynucléotides) à partir desquels elle a diversifié les propriétés quasi à l'infini en exploitant les immenses possibilités offertes par le jeu de construction moléculaire qu'est la synthèse des macromolécules à partir de petites molécules bi ou multifonctionnelles. Dans le domaine des polymères de synthèse bioassimilables, le problème sera le même. Il faudra donc trouver des moyens pour diversifier les

propriétés liées au squelette en jouant sur tous les paramètres structuraux des macromolécules et surtout élaborer ces dernières à partir de composés normalement présents dans les circuits biochimiques pour assurer au mieux la condition de bioassimilation.

## 5. Conclusion

Bien que de nombreux auteurs jouent sur les mots et tentent de démontrer que la dégradation par vieillissement physique ou par d'autres voies telles que la dégradation photochimique oxydante puissent conduire à la bioassimilation de polymères comme le polyéthylène, rendre les polymères de commodité actuels bioassimilables relève encore du rêve à quelques exceptions près. Inventer et qualifier de nouveaux polymères concurrentiels des premiers sur le plan fonctionnel et en plus bioassimilables quel que soit le mécanisme de dégradation, est donc nécessaire et n'est plus une utopie. La machine est en route dans le monde mais les obstacles sont nombreux. Plusieurs solutions sont à l'étude sur la base d'investissements relativement importants. Elles concernent les pays en voie de développement autant sinon plus que les pays développés. En effet les pays en voie de développement disposent de ressources naturelles renouvelables à valoriser et souvent peu chères. L'avenir proche nous dira si la technologie est possible et surtout si le jeu en vaut la chandelle, c'est à dire si le marché réel dépasse les quelques niches qui justifient les efforts actuels. Il ne faut pas oublier qu'un composé biodégradable doit d'abord être un matériau sinon son avenir économique est compromis. L'idéal est le biorecyclage. Les biopolymères se prêtant mal aux méthodes de mise en œuvre et à la formulation qui ont fait le succès des polymères de synthèse, il faudra trouver soit des voies de synthèse de polymères dégradables et bioassimilables à partir du pétrole à l'aide d'une pétrochimie spéciale, ou des voies d'accès à des matériaux polymères bioassimilables à partir de la biomasse, peut être les deux. Le poly(acide lactique), devenu depuis peu un des meilleurs candidats, est à ces égards exemplaire. Il n'est pas biodégradable mais seulement hydrolytiquement dégradable. Par contre, il est bioassimilable et peut être obtenu à partir du pétrole ou de la biomasse. Actuellement il dérive principalement de la biomasse par l'intermédiaire des biotechnologies avec l'aide de la chimie. Enfin, la bioassimilation, voire le biorecyclage, étant finalement l'objectif à satisfaire, il faudra ne pas oublier d'inclure les additifs et autres produits de formulation indispensables à l'adaptation des propriétés aux cahiers des charges dans les protocoles d'évaluation et de normalisation

## 6. Références bibliographiques

« Degradable Materials : Perspectives, Issues and Opportunities », S.A. Barenberg et al. eds., CRC Press, Boca Raton, 1989

« Biodegradable Polymers and Plastics », M. Vert et al. Eds., Royal Society of Chemistry, London, 1992

« Degradable Plastics and Polymers », Y. Doi and K. Fukuda eds., Studies in Polymer Science 12, Elsevier, Amsterdam, 1994

« Biodegradable Polymers and Macromolecules », dans « Biomaterials and Biodegradable Polymers and Macromolecules: Current Research and Applications », F. Burny et al. Eds., Elsevier, Amsterdam 1998

# Évaluation des risques écotoxicologiques des produits de dégradation

Application à la microflore des sols

*Assessment of ecotoxicological hazards*

*The example of the soil microflora*

Guy Soulas

INRA-CMSE, Microbiologie des Sols - 17 rue Sully, 21034 Dijon Cedex, France

Tel : 33 03 80 69 30 98 - Fax : 33 03 80 69 32 24 – E-mail : [soulas@dijon.inra.fr](mailto:soulas@dijon.inra.fr)

**Résumé** : Les micro-organismes du sol sont les principaux agents du recyclage des éléments dans le sol et, plus généralement, de la fertilité des sols agricoles. Ces derniers sont aussi la voie de passage obligée de nombreuses molécules xénobiotiques dont certaines représentent une menace en raison de leur impact écotoxicologique. Les micro-organismes du sol sont donc parmi les premiers organismes exposés. Deux voies sont actuellement possibles pour évaluer les effets secondaires des substances xénobiotiques sur la microflore des sols. Pendant longtemps, ce sont les caractéristiques de taille et d'activité de la microflore, les plus en rapport avec le fonctionnement biologique des sols, qui ont été considérées comme les meilleurs indices des impacts écotoxicologiques. Elles sont actuellement critiquées car les adaptations physiologiques et structurales qui accompagnent la réponse microbienne à la présence de polluants tendent à minimiser les variations de niveaux de biomasse et d'activité qui de ce fait apparaissent comme des descripteurs d'effets peu sensibles. Les descripteurs de diversité considérés à différents niveaux (spécifique, métabolique et génétique) ont la propriété de restituer les modifications structurales qui affectent les communautés microbiennes naturelles soumises à des stress chimiques. Elles restent soumises à des limitations méthodologiques et techniques qui en limitent encore l'intérêt.

**Abstract** : *Because soil micro-organisms are mainly responsible for nutrient cycling they play a major role in plant nutrition and soil fertility. Soil is also the ultimate receptacle of a number of xenobiotic compounds and their degradation products which represent a potential threat due to their ecotoxicological impact. Soil micro-organisms are directly exposed. A desirable evolution towards sustainable agriculture requires taking into account these potentially damaging consequences. There are currently two main ways of monitoring side-effects of xenobiotic compounds on the soil microflora. For decades, size and activity descriptors of soil microbial communities were used. They have been criticised on the ground that they are the net outcome of complex physiological and structural rearrangements of the soil microflora and, for that reason, lack the necessary sensitivity. Recent progress in analysis of microbial diversity at the species, metabolic, physiological, and genetic levels offer new promising alternatives. Yet, some limitations in acquisition and interpretation of data are presented and discussed.*

**Mots-clés** : bioindicateurs, dénombrements, biomasse, activité respiratoire, minéralisation, diversité spécifique, génétique, métabolique

**Keywords** : *bioindicator, counting, microbial biomass, respiratory activity, specific, -genetic-, metabolic diversity*

# 1. Introduction

Les micro-organismes du sol et du sous sol sont les principaux agents du recyclage des éléments nutritifs des végétaux cultivés et l'une de leurs caractéristiques principales est sans aucun doute la très grande variété des espèces microbiennes qui coexistent dans un milieu aussi complexe que le sol. Ceci permet à la microflore du sol considérée dans son ensemble d'exploiter à des fins nutritives et énergétiques tous les gisements carbonés présents sous des formes chimiques variées, sous différents états d'accessibilité biologique et dans des niches écologiques qui représentent des conditions environnementales très changeantes. A l'adaptation pour ces différents milieux, parfois extrêmes, correspond une diversité physiologique et métabolique dont l'expression repose sur l'acquisition d'une information génétique d'une très grande richesse. Le sol représente par ailleurs le passage obligé dans l'acheminement de nombreuses molécules xénobiotiques dont certaines présentent une activité biologique. Il s'agit donc de polluants potentiels qui représentent une menace pour les micro-organismes dont le sol est l'habitat naturel. Il est important de se préoccuper de la protection d'un patrimoine biologique dont la diversité permet non seulement d'assurer une certaine permanence fonctionnelle dans un environnement changeant mais aussi de sauvegarder une capacité évolutive susceptible de minimiser les conséquences négatives liées à l'apparition de nouveaux stress d'origine anthropique. La gestion des ressources biologiques des sols doit être considérée comme un élément essentiel de la durabilité des écosystèmes agricoles. Elle ne pourra être parfaitement maîtrisée que dans la mesure où l'on disposera à la fois d'indices biologiques pertinents et fiables et de référentiels d'interprétation garantissant une bonne sécurité de diagnostic. En retour, l'ubiquité de présence des micro-organismes dans les sols, en fait aussi des indicateurs biologiques potentiels de la pollution des sols.

On dispose actuellement de deux façons d'apprécier la réponse des micro-organismes du sol à la présence de composés xénobiotiques toxiques. Jusqu'à un passé relativement récent, les essais visaient à satisfaire des exigences de pertinence par rapport à un critère de fertilité, de fiabilité des mesures et de possibilité de réalisation en routine. Cette approche pragmatique a eu pour conséquence la sélection de tests ayant une grande signification pratique ainsi qu'une forte représentativité mais aussi une faible sensibilité en raison d'une forte redondance fonctionnelle microbienne. Les changements observés traduisent la résultante nette d'un ensemble de changements physiologiques et de réarrangements structuraux modifiant la composition spécifique des communautés microbiennes naturelles lors de leur adaptation aux nouvelles contraintes écologiques. Il s'ensuit une sous-évaluation du risque à laquelle on a tenté de porter remède en recherchant des indices en relation avec la structure spécifique ou fonctionnelle des communautés microbiennes naturelles qui soient des enregistrements plus sensibles de l'impact écotoxicologique des substances xénobiotiques.

## **2. Techniques d'évaluation de l'écotoxicité des substances xénobiotiques vis à vis de la microflore des sols.**

### **2.1 Mesures globales**

#### **2.1.1 Taille des communautés microbiennes**

Les techniques de dénombrement des communautés microbiennes des sols ont été pendant longtemps les seules pratiquement utilisées. Elles tendent à être abandonnées pour des raisons de précision de mesure et de trop grande sélectivité, les espèces cultivables recensées ne représentant qu'une très faible fraction de la communauté microbienne du sol. Dans le cadre qui nous intéresse, la dernière critique reste cependant toute relative car, à défaut de réelle représentativité, l'échantillon des bactéries cultivables pourraient donner une idée du type de réponse étendue à l'ensemble de la microflore du sol. Par ailleurs, la possibilité d'une identification individuelle par des tests phénotypiques ou génétiques des espèces isolées permet l'établissement de diagrammes de type "rang-fréquence" décrivant la structure des communautés concernées.

Les techniques de dénombrement ont été relayées par des techniques de mesure de la biomasse des sols telles que les méthodes biocidales (CFI et CFE) (Jenkinson & Powlson, 1976; Vance *et al.*, 1987) et les méthodes physiologiques (Anderson & Domsch, 1978). Ces approches se caractérisent par une grande simplicité de mise en œuvre et une relative fiabilité des mesures. Il s'agit d'outils appropriés à des analyses de routine. La représentativité des données tient au fait qu'elles concernent l'ensemble de la microflore. Il s'agit cependant de mesures nettes traduisant le résultat global d'un ensemble de processus de réajustement et de compensation liés à la redondance fonctionnelle de la microflore du sol. Il en résulte un certain manque de sensibilité qui constitue le point faible de ces approches.

#### **2.1.2 Activité respiratoire des communautés microbiennes**

Sans aucun doute, les mesures d'activité respiratoire ont été et restent la référence en matière d'estimation des impacts écotoxicologiques de substances xénobiotiques sur la microflore des sols. Il y a à cela des raisons théoriques, leur liaison directe avec la taille des communautés microbiennes et avec la dégradation de la matière organique des sols, et pratiques, la diversité et la simplicité des dispositifs expérimentaux disponibles. Il en existe différentes variantes allant des tests respiratoires à court ou moyen terme effectués à l'aide d'échantillons de sol non perturbés ou après stimulation nutritive de la microflore à des techniques, telle la mesure de l'activité hétérotrophe (Wright & Hobbie, 1965), combinant mesures de respiration en temps court après des stimulations nutritives croissantes. L'établissement d'une relation entre la vitesse de minéralisation d'un substrat et sa

concentration permet d'atteindre des paramètres biocinétiques caractéristiques du fonctionnement physiologique des micro-organismes et susceptibles de variation en réponse à un stress chimique.

Les mesures d'activité respiratoire ont la faveur des instances réglementaires, notamment européennes, compte tenu de leur signification pratique en liaison avec la gestion du stock de la matière organique des sols. Elles allient simplicité technique, fiabilité et représentativité mais également, et pour des raisons identiques à celles que nous avons évoquées pour les mesures de biomasse, faible sensibilité. Il faut également savoir qu'elles peuvent conduire à des résultats controversés et la plus grande précaution doit être prise dans leur interprétation. Il y a à cela plusieurs raisons. D'abord, il s'agit d'un indicateur non spécifique de la microflore puisque la macrofaune ainsi que les racines des plantes contribuent à la respiration globale. Surtout, l'absence d'effet visible voire même la stimulation de l'activité respiratoire peuvent être les manifestations secondaires liées à la disparition d'espèces sensibles dont le carbone peut être utilisé par des souches résistantes qui réoccupent la niche écologique abandonnée.

### 2.1.3 Autres fonctions microbiennes et activités enzymatiques

Le choix de groupes microbiens fonctionnels comme indicateurs se justifie plus par leur importance agronomique que par leur représentativité. Les exemples les plus couramment rencontrés concernent des groupes microbiens qui interviennent dans les différentes étapes du cycle de l'azote, notamment la nitrification. Les transformations microbiennes de l'azote combiné sont probablement l'un des indicateurs parmi les plus couramment utilisés pour aborder l'étude des effets de substances à activité biologique sur la microflore des sols. Ce choix est dicté d'abord par la sensibilité intrinsèque particulière des micro-organismes autotrophes impliqués dans ces transformations, ensuite par la nécessité de préserver l'une des fonctions du sol dont l'importance agronomique est vitale et, enfin, en raison de la facilité qu'il y a à quantifier de façon simple, sensible, précise, reproductible et automatisable les différentes formes de l'azote dans le sol. Une analyse de détail des différentes étapes semblerait montrer qu'en raison d'une relative tolérance probablement liée à diversité des espèces microbiennes impliquées (Edwards, 1989) l'étape d'ammonification serait moins sensible aux substances biocides que l'étape de nitrification dont Grossbard (1976) rapporte de nombreux exemples d'inhibition par les herbicides.

Les transformations biologiques se déroulant dans le sol étant sous le contrôle d'enzymes, il était naturel de rechercher dans l'activité de différents types d'enzymes des indicateurs d'impact qui soient en même temps corrélés avec des processus microbiens. Compte tenu de leur rapidité, de leur simplicité et de leur reproductibilité, les tests enzymatiques ont connu un très large succès. Effectivement, certaines enzymes du sol, telles les phosphatases et les uréases ont un lien apparent avec les cycles du phosphore et de l'azote. D'autres, telles les déshydrogénases qui interviennent dans les oxydations biologiques, devraient être corrélées avec l'activité respiratoire globale de la microflore des sols. En fait, ces

corrélations n'apparaissent pas toujours de façon évidente, laissant quelques doutes sur la valeur des activités enzymatiques en tant que bioindicateurs du fonctionnement biologique des sols. Il y a à cela plusieurs raisons. Les enzymes du sol peuvent avoir des origines diverses qui ne se limitent pas à la seule microflore : la macrofaune et la flore du sol en produisent également. Par ailleurs, certaines activités sont sous le contrôle de différentes enzymes dont les optima de fonctionnement ne se superposent pas. Enfin, ces enzymes existent souvent dans le sol à l'état adsorbé qui leur confère une relative protection vis à vis de stress chimiques. La tendance actuelle est de se concentrer sur quelques enzymes telles les déshydrogénases, intracellulaires et caractéristiques des cellules vivantes, ou encore un ensemble d'enzymes hydrolytiques globalement caractérisées par une activité hydrolytique de l'acétate de fluoresceïne (Dick, 1994).

#### 2.1.4 Exemples d'application

Plusieurs exemples d'application ont montré l'intérêt potentiel de ces différentes approches. Ils concernent pour l'essentiel l'étude de l'impact des produits phytosanitaires et des éléments traces métalliques sur la microflore des sols. C'est le cas des techniques biocidales et physiologiques de mesure de la biomasse (Duah-Yentumi & Johnson, 1986; Biederbeck et al., 1987), les premières, notamment dans la version CFE, semblant contribuer à une plus grande sensibilité de détection (Harden et al., 1993; Fournier et al., 1992), des techniques respirométriques (Wainwright, 1978; Edwards, 1989), éventuellement rapportée à l'unité de biomasse ( $qCO_2$  de Anderson & Domsch, 1993), enfin, des mesures d'activité hétérotrophe (Rouard et al., 1996) permettant d'accéder aux paramètres de la loi michaélienne de réponse entre la vitesse de minéralisation et la concentration en substrat. Pour ce qui concerne la nitrification, Edwards (1989) en a précisé les limites et montré que la sensibilité aux stress chimiques pouvait dépendre des étapes considérées.

## 2.2 Mesure de la diversité microbienne

Les diversités fonctionnelle et physiologique qui, à différents niveaux, contribuent à une meilleure exploitation des ressources nutritives présentes dans l'environnement sont essentielles à la stabilité et à la résilience des écosystèmes terrestres et, pour les agrosystèmes, au maintien de leur fertilité. Leur mesure peut donc contribuer à la définition d'indices dont la variation peut traduire des dysfonctionnements biologiques provoqués par des contraintes externes. Plus que par leur capacité à réduire globalement la taille des communautés microbiennes, les biocides sont susceptibles d'altérer leur organisation naturelle et de nuire à la fois à leur fonctionnement et leur faculté d'adaptation.

Les différentes techniques destinées à caractériser la diversité microbienne des sols peuvent être regroupées selon 3 techniques de profilage se situant aux niveaux spécifique, génétique, moléculaire et métabolique.

### 2.2.1 Diversité par profilage spécifique

Basée sur la reconnaissance directe des espèces microbiennes, elle suppose un isolement préalable à partir du sol. Cette approche ne concerne donc que les espèces microbiennes cultivables. C'est une approche qui connaît un regain d'intérêt compte tenu des nouvelles possibilités d'identification des unités taxonomiques basée sur des critères phylogénétiques plus discriminants que les critères morphologiques et phénotypiques traditionnels. En dépit de la sélectivité des étapes de culture et d'une définition parfois imprécise des espèces procaryotes, c'est, comme indiqué précédemment, la seule approche qui permette de construire des diagrammes de type "rang-fréquence" et de calculer des indices synthétiques de diversité. Quelques études concernant les effets des pesticides sont rapportés dans la littérature. Ils vont d'une simple étude de relation de dominance entre microflore bactérienne et fongique (Jones et al., 1992) à celle de la distribution de groupes bactériens cultivables sur des milieux plus ou moins sélectifs (Duah-Yentumi & Johnson, 1986 ; Atlas et al., 1991). La littérature reste malgré tout relativement pauvre, ce qui s'explique aisément si l'on considère la charge expérimentale que représente une telle approche.

### 2.2.2 Diversité par profilage génétique

Elles ont toutes pour base méthodologique un traçage des différents individus par le biais des gènes codant pour les ARNr 16S dont la collecte est réalisée par extraction de l'ADN du milieu et amplification par PCR avec des amorces universelles. Le problème technique consiste à analyser un polymorphisme de séquence, et non de taille, des fragments amplifiés. Plusieurs stratégies sont possibles. La technique du clonage-séquençage des amplifiats (Weller & Ward, 1989 ; Stackebrandt et al., 1993 ; Schmidt et al., 1991) reste relativement longue et complexe. Plus récemment, Muyzer et al. (1993) ont proposé une technique d'électrophorèse en gel avec gradient de dénaturant (DGGE), basée sur une séparation des différentes séquences en fonction de leur propriété de dénaturation lorsqu'elles migrent dans un gradient de dénaturant. La dénaturation fait apparaître des structures branchées dont la migration dans le gel est stoppée. Cette technique a été appliquée avec succès à l'analyse directe de communautés naturelles de sols (Führ et Kubiak, 1995). Plus récemment, Avanis-Aghajani et al. (1994) ont mis au point une autre approche, la T-RFLP, consistant à amplifier par PCR les gènes codant pour les ARNr 16S avec des amorces dont une porte un groupement fluorescent. La digestion des amplifiats avec une endonucléase de restriction produit à partir de chacun d'entre eux un fragment terminal marqué de taille différente permettant, en théorie, d'identifier chaque bactérie d'un mélange.

Plus généralement, la diversité des séquences codante d'une communauté microbienne est probablement en relation avec sa capacité de réponse vis à vis des perturbations du milieu extérieur et représente un facteur essentiel de stabilité et de résilience. Il est donc normal qu'on ait cherché à caractériser les communautés microbiennes par la richesse ou, ce qui revient au même, par l'hétérogénéité de leur contenu génomique. C'est Torsvik et al. (1990) qui, les premiers, ont proposé de prendre le nombre de génomes bactériens

différents comme définition théorique de la diversité génétique d'une population ou communauté microbienne. Elle peut se déduire de la complexité de l'ADN extrait du mélange bactérien, cette propriété étant définie par le nombre total de paires nucléotidiques dans des séquences non répétées. Ainsi, l'étude des cinétiques de réassociation de fragments d'ADN homologue simple brin issu d'un mélange bactérien permet d'accéder à un paramètre cinétique, le  $C_0t_{1/2}$ , en relation avec la complexité génétique du mélange considéré. Estimant la diversité génétique à partir de l'ADN extrait d'un mélange de 206 bactéries cultivables choisies au hasard, ces auteurs ont montré que la valeur du  $C_0t_{1/2}$  correspondait à 20 génotypes entièrement hétérologues. Par comparaison, la valeur calculée à partir de l'ADN total extrait du sol représentatif de l'ensemble de la communauté bactérienne était de 4000 génotypes hétérologues soit une diversité 200 fois supérieure, apportant au passage un support chiffré à la sélectivité reconnue des techniques culturales.

La littérature donne d'autres exemples de techniques de caractérisation de l'ADN extrait de sols et dont l'usage peut être envisagé pour détecter des changements structuraux affectant la composition génétique des communautés naturelles. Parmi ces différentes techniques, citons une technique d'amplification avec amorces aléatoires (RAPD) dont l'usage en écologie moléculaire avait été recommandé par Hadrys et al. (1992). Récemment, Holben & Harris (1995) ont proposé une technique de fractionnement de l'ADN après liaison avec du bisbenzimidazole qui se fixe préférentiellement dans les régions riches en liaisons A-T. Cette fixation modifie la densité du complexe ADN-bisbenzimidazole permettant ainsi la séparation de l'ADN suivant le pourcentage G+C dans un gradient de CsCl. On obtient un profil d'abondance relative de l'ADN dans différentes fractions de %G+C différents. En fait, il est difficile de juger de l'apport réel de ces différentes techniques au travers des exemples trop peu nombreux qui sont donnés dans la littérature.

Les techniques de biologie moléculaire ont sans aucun doute apporté des instruments d'analyse extrêmement puissants permettant notamment d'avoir accès à des micro-organismes impossibles à atteindre par les techniques culturales classiques. Par ailleurs, excepté peut être pour les approches basées sur une caractérisation par séquençage, la charge expérimentale est relativement réduite et permet un plus grand nombre d'analyses. Enfin, l'utilisation de gènes autres que ceux codant pour les ARNr 16S permet d'envisager des études portant sur des groupes fonctionnels. Cependant, ces techniques ont aussi leurs limites, la plus sérieuse étant l'extraction de l'ADN du sol qui doit satisfaire deux exigences contradictoires, être suffisamment douce pour éviter une fragmentation excessive du produit mais avec le risque d'une extraction incomplète et peu productive, ou privilégier le rendement au détriment de la qualité physique. Compte tenu de ces contradictions on est actuellement dans l'ignorance à peu près complète de l'origine et de la représentativité du matériel extrait. L'étape de PCR n'est pas non plus exempte de reproches. Elle se caractérise souvent par une sélectivité d'amplification qui privilégie certaines séquences d'un mélange (Reysenbach et al., 1992) et introduit un biais dans l'image que l'on restitue de la structure d'une communauté microbienne. En outre, Silva & Batt (1995) ont montré que l'efficacité

de l'amplification dépendait aussi de l'état physiologique des micro-organismes. Pour ces différentes raisons, les techniques de biologie moléculaire ne peuvent être envisagées comme substituts aux techniques conventionnelles. Elles permettent seulement d'aborder autrement et avec des groupes microbiens différemment structurés l'analyse des communautés microbiennes naturelles et de leur évolution en présence de stress notamment d'origine chimique.

### 2.2.3 Diversité par profilage moléculaire

Parmi les autres molécules "signature" qui peuvent être utilisées pour déterminer la composition d'une communauté microbienne, les acides gras des phospholipides (PLFA) offrent certains d'avantages : on les trouve dans les membranes de toutes les cellules vivantes. Ils ont un taux de turnover relativement rapide dans les cellules mortes et chaque espèce microbienne en possède un ensemble de composition caractéristique. Plus de 8000 souches bactériennes peuvent ainsi être différenciées par leur profils PLFA (Tunlid & White, 1990). L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides est donc un instrument important de classification taxonomique et phylogénétique des micro-organismes. Les bactéries à Gram+ et les actinomycètes contiennent typiquement des acides gras à chaîne méthylée tandis que les eucaryotes, notamment les champignons, synthétisent plus spécifiquement des acides gras saturés à nombre pair d'atomes de C et des acides gras polyinsaturés (Zelles et al., 1992). La composition en acides gras des communautés microbiennes est donc liée à leur structure. Haack et al., (1994) ont confirmé la validité de cette approche en montrant que différents mélanges de bactéries du sol pouvaient être distingués sur la base de leurs profils en acides gras. Enfin, Frostegård et al. (1992) en ont donné des exemples d'application destinés à étudier les changements qui affectent la structure de communautés microbiennes du sol contaminés avec des métaux lourds. La principale faiblesse de cette approche technique est l'impossibilité de relier les modifications de profils observées à des changements dans la répartition fréquentielle de groupes microbiens concernés.

### 2.2.4 Diversité par profilage métabolique

L'empreinte métabolique d'une communauté microbienne déterminée au travers d'un profil d'utilisation de différents substrats carbonés et énergétiques offre une base de classification des communautés microbiennes du sol. Wünsche et al. (1995) y voient également la possibilité de déceler des dérives environnementales liées à des pollutions. Les plaques de microtitration Biolog (Garland & Mills, 1991) qui permettent de réaliser simultanément 95 tests biochimiques pour une même suspension bactérienne sont un support technique idéal. Les applications concernant l'étude de communautés naturelles sont assez représentatives de la diversité des situations qui peuvent être abordées et de la pertinence de la technique notamment lorsqu'elle est relayée par une évaluation du signal multivariable généré par des analyses statistiques appropriées monovariées ou multivariées. Dans le domaine écotoxicologique, Wunsche et al. (1995) ont mis en évidence des modifications importantes dans les profils métaboliques de communautés microbiennes de sol contaminés avec des hydrocarbures. Malgré

tout, un certain nombre de critiques peuvent être formulées. La première concerne le caractère sélectif de la procédure lié à un mode de détection qui dépend d'une étape culturale. Une détection préférentielle de bactéries à stratégie de croissance de type r est donc probable. Par ailleurs, les espèces rares dont certaines peuvent être des acteurs importants dans le fonctionnement général des écosystèmes sont probablement sous estimées.

Par ailleurs, quelle que soit la technique adoptée, la pertinence de l'interprétation des résultats sera fonction de l'amplitude des fluctuations auxquelles les différents indices d'impact écotoxicologique sont naturellement soumis. De ce point de vue, la sensibilité des indices plus analytiques pourrait apparaître illusoire dans un contexte de variabilité spatio-temporelle importante. Ce sera l'un des objectifs de ce travail que de montrer que les choix techniques visant à étudier l'impact écotoxicologique des polluants du sol doivent être raisonnés en fonction des échelles d'espace considérées.

### **3. Conclusion**

Leur immersion dans le sol expose directement les micro-organismes aux pollutions d'origine agricole et industrielle dont le sol est souvent la cible ultime. Ces organismes constituent donc à la fois des sondes potentielles utilisables dans le cadre d'une surveillance de la qualité chimique des sols mais également des indicateurs d'une dérive biologique qui pourrait, à terme, nuire au fonctionnement des agrosystèmes. La littérature existante montre que le problème de l'impact d'un polluant peut être abordé à différents niveaux d'investigation allant de la souche isolée à la communauté microbienne, à l'aide d'indicateurs biologiques de natures différentes, de type populationnel ou fonctionnel, et conduire à des observations interprétables en termes qualitatifs ou quantitatifs. Aucune des différentes techniques rapportées ne peut prétendre, à elle seule, fournir une réponse globale permettant de juger de la signification écologique réelle des effets observés. C'est, au contraire, de la multiplicité des cibles et des approches que l'on peut espérer en avoir une vision plus réaliste. Il est par ailleurs évident que la seule mise en évidence d'effets ne peut suffire à conclure à une nocivité particulière d'un produit tant que ceux-ci n'ont pas été confrontés à ceux qui résultent des fluctuations spatio-temporelles normales qui affectent les populations et le fonctionnement des écosystèmes naturels. De ce point de vue, la sensibilité des tests peut quelquefois être une qualité illusoire et sans pertinence écologique, notamment lorsque ceux-ci reposent sur le choix d'indicateurs non spécifiques dont les variations dépendent souvent au moins autant de l'évolution normale des conditions du milieu que de la perturbation additionnelle liée à la présence d'un polluant.

## 4. Références bibliographiques

Anderson J. P. E. & Domsch K. H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221.

Anderson T. H. & Domsch K. H., 1985. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 197-203.

Anderson T. H. & Domsch K. H., 1993. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 393-395.

Atlas R.M., Horowitz A., Krichevsky M. & Bej A.K., 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.*, 22, 249-256.

Avaniss-Aghajani E., Jones K., Chapman D. and Brunk C., 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques*, 17, 144-149.

Bååth E., Frostegård A. & Fritze H., 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4026-4031.

Biederbeck V. O., Campbell C. A. & Smith A. E., 1987. Effects of long-term 2,4-D field applications on soil biochemical processes. *J. Environ. Qual.*, 16, 257-262.

Dick R. P., 1994. Soil Enzyme activities as indicators of soil quality. In « *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* », Chap. 7, pp 107-124, Doran J. W., Coleman D. C., Bezdicek D. F. & Stewart B. A. eds, SSSA special publication n° 35, American Society of Agronomy, Inc., Madison, USA

Duah-Yentumi S. & Johnson D. B., 1986. Changes in soil microflora in response to repeated applications of some pesticides. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 629-635.

Edwards C. A., 1989. Impact of herbicides on soil ecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 8, 221-248.

Fournier J. C., Froncek B., Gamouh A. & Collu T., 1992. Comparison of three methods to test the side-effects of pesticides on soil microbial biomass. In "*Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*", pp 18-23, Anderson J. P. E., Arnold D. J., Lewis F., Torstensson L. eds, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Frostegård Å., Tunlid A. & Bååth E., 1992. Changes in soil phospholipid fatty acid patterns due to different environmental disturbance. In "*Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*", pp 24-29, Anderson J. P. E., Arnold D. J., Lewis F., Torstensson L. eds, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Führ A. & Kubiak R., 1995. Darstellung der Mikrobiellen im Boden mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA PCR-Produkten. *Mitteilungen der Dt. Bodenkdl. Gesellschaft*, 75, 83-86.

- Garland J. L. & Mills A. L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2351-2359.
- Grosbard E., 1976. Effects on the soil microflora. In « *Herbicides, Physiology, Biochemistry, Ecology* », Vol. 2, Chap. 4, pp 99-147, Audud L. J. ed, Academic press, London
- Haack S. K., Garchow H., Klug M.J. & Forney L. J., 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproductibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1458-1468.
- Hadrys H., Balick M. & Schierwater B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1, 55-63.
- Harden T. Joergensen R. G., Meyer B. & Wolters V., 1993. Soil biomass estimated by fumigation-extraction and substrate-induced respiration in two pesticide-treated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 679-683.
- Holben W. E. & Harris D., 1995. DNA-based monitoring of total bacterial community structure in environmental samples. *Mol. Ecol.*, 4, 627-631.
- Jenkinson D.S. & Powlson D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8, 209-213.
- Muyzer G., Waal E. C., & Uitterlinden A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- Reysenbach A. L., Giver L. J., Wickman G. S. & Pace N. R., Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3417-3418.
- Rouard N., Dictor M. C., Chaussod R. & Soulas G., 1996. Side-effects of herbicides on the size and activity of the soil microflora : DNOC as a test case. *Eur. J Soil Sci.*, 47, 557-566.
- Schmidt T. M., Delong E. F. & Pace N. R., 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173, 4371-4378.
- Silva M. C. & Batt C. A., 1995. Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency. *Mol. Ecol.*, 4, 11-16.
- Stackebrandt E. Liesack W. & Goebel B. M., 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. Genetic diversity of natural microbial community, 7, 232-236.
- Torsvik V., Goksøyr J. & Daae F. L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 782-787.
- Tunlid A. & White D., 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In "Soil Biochemistry", Vol. 7, pp 229-262, Stotzky G. and Bollag J. M. Edts, Marcel Dekker, N. Y..

- Vance E.D., Brookes P.C. & Jenkinson D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 703-707.
- Wainwright M., 1978. A review of the effects of pesticides on microbial activity in soils. *J. Soil Sci.* 29, 287-298.
- Weller R. & Ward D. M., 1989. Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1818-1822.
- Wright R.T. & Hobbie J.E., 1965. The uptake of organic solutes in lake water. *Limn. Oceanogr.*, 10, 22-28.
- Wünsche L., L. Brüggeman & W. Babel, 1995. Determination of substrate utilization pattern of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 295-306.
- Xueqing Xia, Bollinger J. & Ogram A, 1995. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol. Ecol.*, 4, 17-28.
- Zelles L., Bai Q. Y., Beck T. & Beese F., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 24, 317-323.



## **OUTILS DE MESURE A BASE NORMATIVE,**

### **NOUVEAUX OUTILS DE MESURE**

- Les systèmes de mesure en bouteilles closes  
Wolf Müller, Université de Stuttgart, Allemagne,
- La respirométrie séquencée appliquée à la mesure de la biodégradabilité  
Etienne Paul, INSA Toulouse
- Un système automatisé de mesure de la biodégradabilité des matériaux  
Pierre Feuilloley, Cemagref Montpellier
- Mesure de la biodégradabilité en conditions anaérobies  
Merja Itävaara, VTT Finlande



# Systèmes de mesure de biodégradabilité en milieu aqueux de l'Université de Stuttgart

## *Systems for the determination of biodegradability in water used in Stuttgart University*

Wolf-Rüdiger Müller, Anja Schäfer, Ralf Jörg, Angela Boley, Julia Nguyen  
Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft,  
Universität Stuttgart, Bandtäle 1, D-70569 Stuttgart

**Résumé :** Les normes de la CE en vigueur ne préconisent pour le milieu aqueux que des tests de biodégradabilité aérobies, basés sur les standards de l'OCDE (301, 302, 1992). C'est le groupement de l'industrie chimique (ECETOC) qui proposa des tests de biodégradation anaérobies. Les tests en conditions d'anoxie ne sont pas standardisés. Dans un milieu aqueux, toutes les conditions écologiques -aérobie, anoxie et anaérobie-, sont possibles. Une comparaison de ces trois conditions avec les polymères PHB, PCL et Avicel amène à justifier cette extension des méthodes aux tests en conditions anoxiques. Les systèmes développés à Stuttgart pour déterminer la biodégradabilité sont présentés. Le respiromètre conventionnel permet de mesurer la consommation d'O<sub>2</sub>. Le respiromètre "BSB-CO<sub>2</sub>" permet d'obtenir la consommation en O<sub>2</sub> et la production de CO<sub>2</sub>. Le "METHANOMAT" permet de suivre la production de biogaz ainsi que sa composition (CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>), à pH fixé. Avec le "DENIMAT" la production de N<sub>2</sub> sous condition d'anoxie peut être suivie.

**Abstract :** Actual standards of the EU for testing biodegradability in an aqueous environment confine to aerobic conditions. Procedures are given in the OECD-Guidelines. It was the European Chemical Industry (ECETOC) which first proposed methods for anaerobic testing. Testing under anoxic conditions is not standardized. However all ecological conditions as aerobic, anoxic, anaerobic may occur in an aqueous environment. A comparison of biodegradation with PHB, PCL and Avicel as test polymers under these conditions justifies the additional anoxic testing. The technical systems for testing biodegradability in water, used in our Institute are presented. The conventional respirometer allows to follow-up the consumption of O<sub>2</sub>. With "BSB-CO<sub>2</sub>" beyond O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub>-production measurement is possible. The "METHANOMAT" is an automated equipment to determine continuously the biogas production and its composition (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) at constant pH-conditions. The "DENIMAT" was conceived for following N<sub>2</sub> production under constant conditions thus for measuring anoxic biodegradation activity.

**Mots-clés:** Biodégradabilité en conditions aérobie, anoxie et anaérobie; outils de mesure à base normatifs en milieu aqueux; nouveaux outils de mesure.

**Keywords :** Aqueous biodegradability under aerobic, anoxic and anaerobic conditions; equipment used in standard testing; new testing equipment.

# 1. Introduction

Whenever environmentally hazardous material is put into circulation with the risk of release into the environment, appropriate tests according to standards of e.g. OECD-Guidelines for Testing of Chemicals, 1992, have to be carried out. The testing scheme may contain among others screening procedures for detecting acute toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, toxicity with respect to aquatic organisms, inhibition of bacterial and algae growth and abiotic and biological degradability and others.

Testing biodegradability is the scope of this contribution and as a basis we refer to the OECD-Guidelines, which practically can be found unchanged in the EU-Guidelines (84/449/CEE).

OECD-Guidelines distinguishes between tests for "Ready and Inherent Biodegradability". For "Ready Biodegradability" in an aqueous aerobic medium the following methods are applied (adopted 17.07.1992):

- 301 A: DOC Die-Away
- 301 B: CO<sub>2</sub> Evolution (see also Modified Sturm Test, 84/449/CEE: C5)
- 301 C: MITI Test (I), (see modified MITI-Test: 84/449/CEE: C7)
- 301 D: Closed Bottle (see 84/449/CEE: C6)
- 301 E: Modified OECD Screening (see 84/449/CEE: C3)
- 301 F: Manometric Respirometry, differs from 301 C mainly in inoculum.

"Readily biodegradable" is an arbitrary classification of chemicals which have passed certain specified screening tests for ultimate biodegradability; these tests are so stringent that it is assumed such compounds to biodegrade rapidly and completely in an aquatic environment under aerobic conditions.

Pass levels for "Ready Biodegradability" are 70 % removal of DOC and 60 % of ThOD or ThCO<sub>2</sub> production for respirometric methods. They are lower in the respirometric methods since, as some of the carbon from the test chemical is incorporated into new cells, the percentage of CO<sub>2</sub> produced is lower than the percentage of carbon being used. These pass levels have to be reached in a 10 d window within the 28 d period of the test duration, with some exceptions. The 10 d window begins when the degree of biodegradation has reached 10 % DOC, ThOD or ThCO<sub>2</sub> and must end before day 28 of the test. Chemicals which reach the pass level after the 28 d period are not deemed to be really biodegradable. The 10 d window concept does not apply to the MITI method (OECD, 17.07.1992, 301, p.3/62).

Screening of chemicals which may be classified as "Inherent Biodegradable", are chemicals for which there is unequivocal evidence of biodegradation in any test of biodegradability which can be carried out with:

- 302 A Modified SCAS Test, 12.05.1981; See EN ISO 9887: 1994-12.
- 302 B Zahn-Wellens/EMPA Test, 17.07.1992; See EN 29888: 1993
- 302 C Modified MITI Test (II), 12.05.1981, all OECD-Guidelines.

All this multitude of tests takes place under aerobic conditions. Anaerobiosis which contributes globally up to 30 % of the biotic degradation (Schink, B., 1994) is not considered as an essential testing in legally relevant documents.

With respect to an adaptation of test procedures to the "real world" conditions test for anaerobic and anoxic biodegradability must be included in test schemes.

A simple example for a system where beyond aerobic conditions anoxic and anaerobic processes play a major role is a waste water treatment plant, see Fig. 1.

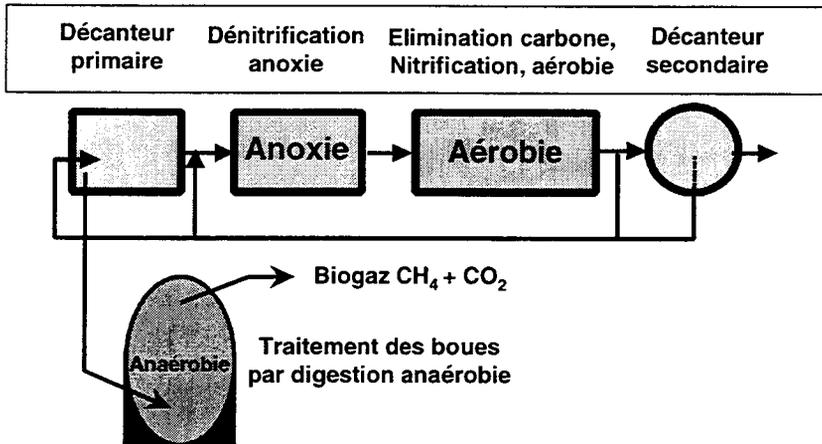


Figure 1: Scheme of a wastewater treatment plant, aerobic, anoxic and anaerobic conditions

Aerobic processes take place in the activated sludge tank, anoxic condition - i.e. absence of  $O_2$  with  $NO_3^-/NO_2^-$  present - is essential for the denitrification unit. Finally sludge digestion takes place in an anaerobic digester, where the microbial degradation of organic compounds takes place in the absence of  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ . Bacterial consortia degrade organic compounds in a stepwise process yielding organic acids, carbon dioxide and hydrogen and, ultimately, methane and carbon dioxide.

Anaerobic testing procedures have been launched by the "Ecology and Toxicology Center of ECETOC" (Stringer, D.A. 1988). The rationale was: "...anaerobic biodegradation is considered to be an important process especially for those chemicals which are not aerobically biodegradable or whose physico-chemical properties are such that their occurrence in an aerobic environment is restricted (e.g. chemicals which are strongly adsorbed or insoluble). For these chemicals it is possible that anaerobic degradation is the major process responsible for their breakdown in the environment".

Painter (1992) proposed to add to OECD-Guidelines methods for determining the "Potential for biodegradation - methane production", the "Simulation of anaerobic digestion" and the "Inhibition of methane production". He referred to a testing scheme of EC from 1986 where the adoption of anaerobic biodegradability was suggested, without any consequences in legally relevant texts until today.

In 1985 a German standard DIN 38414, Tl. 8 for the examination of anaerobic digestion was published. First applications of bioplastics in the US rapidly induced

ASTM to submit two standards in 1992 and 1994. In 1995 ISO and CEN started to publish standards for organic compounds and plastic material in aqueous systems. For testing anoxic biodegradability actually no standards are available.

The situation with respect to testing devices is characterized on one hand to improve simple methods towards an automatization. On the other hand existing complex testing systems are upgraded to extend their measuring capacity. Recent developments in our Institute are presented. Advanced systems for anoxic and anaerobic testing are not yet common.

## 2. Aerobic Biodegradation

### 2.1 Basic considerations

The simplified basic equation for aerobic degradation is given in Tab. 1. A substance or a polymer  $P_i$  is transformed at constant conditions with  $O_2$  present and inoculum into additional biomass  $X$ , eventually intermediate products  $P$ ,  $CO_2$  and  $H_2O$  with heat production.

<p><b>Equation simplifiée:</b></p> $P_i + O_2 + X_o \rightarrow X + P + CO_2 + H_2O + \Delta H$ <p>(Température T, pH, <math>O_2</math> ajusté)</p> <p><b>DTO Demande théorique d'<math>O_2</math> polymère <math>C_cH_hO_o</math></b></p> $C_cH_hO_o + 0,5(2c + 0,5h - o) O_2 \rightarrow c CO_2 + 0,5h H_2O$ <p>Avec nombre d'atomes et masse molaire <math>M_r</math>:</p> $DTO = \frac{15,99 \cdot (2c + 0,5h - o)}{M_r} \text{ in mg } O_2 / \text{ mg Polymère}$
--

Table 1: Simplified equation for aerobic degradation, definition of ThOD (DTO)

The Theoretical Oxygen Demand (ThOD, DTO) can be calculated according to the incineration equation. It is defined as the total amount of  $O_2$  required to oxidize completely a compound and expressed as mg oxygen required per mg test compound. Also a theoretical carbon dioxide (Th $CO_2$ ) can be defined. This is the quantity of carbon dioxide to be produced stoichiometrically from the carbon content of the test compound when fully mineralized; expressed as mg  $CO_2$  evolved per mg compound.

The degree of biodegradation of a substance without taking into account biomass formation is defined as:

$$D_{(\text{ThOD})t} = D_{(\text{DTO})t} = \frac{(\text{BOD}_{\text{Pi}} - \text{BOD}_{\text{Blank}}) * 100}{\text{ThOD} * C_{\text{Pi}}} = \frac{(\text{DBO}_{\text{Pi}} - \text{DBO}_{\text{Blank}}) * 100}{\text{DTO} * C_{\text{Pi}}} \text{ in \%}$$

$\text{BOD}_{\text{Pi}}$ ,  $\text{BOD}_{\text{Blank}}$  respectively  $\text{DBO}_{\text{Pi}}$ ,  $\text{DBO}_{\text{Blank}}$  is the Biochemical Oxygen Demand of the test bottle with polymer and inoculum respectively only with inoculum.

A carbon-balancing allows a "proof" of biodegradability when following up the fate of carbon out of a polymer. The following equations hold for a closed system where no carbon is lost:

$$\begin{aligned} C_{\text{start}} &= C_{\text{P start}} + C_{\text{Bio start}} + \text{DOC}_{\text{start}} + \text{DIC}_{\text{start}} \\ C_{\text{end}} &= C_{\text{P end}} + C_{\text{CO}_2} + C_{\text{Bio end}} + \text{DOC}_{\text{end}} + \text{DIC}_{\end{aligned}$$

A recovery rate can be calculated as  $R = C_{\text{end}} / C_{\text{start}} * 100 \text{ in \%}$

## 2.2 Equipment

The first equipment developed in Stuttgart was a respirometer "SAPROMAT", Steinecke, 1968, see Fig. 2. It is a closed system operating on the principle of constant pressure in a reaction chamber.  $\text{O}_2$  is continuously restored by producing it in an electrolytic cell ( $\text{Cu}/\text{CuSO}_4$ ). The  $\text{CO}_2$  evolved is absorbed with soda lime pellets.

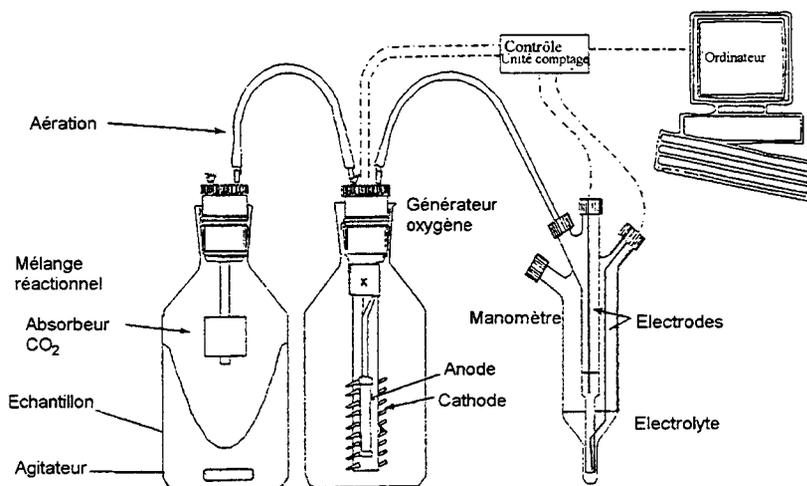


Figure 2: Respirometer, called "SAPROMAT", Steinecke (1968)

As shown in the previous equations one major compound necessary to prove complete mineralization is  $\text{CO}_2$ . Originally  $\text{CO}_2$  was not a parameter to be considered. We equipped the conventional respirometer with a "simple" system for determining the  $\text{CO}_2$  generated by microorganisms (Schäfer *et al.*, 1997). It is estimated via absorption in  $\text{KOH}$  solution by measuring its change in conductivity. With this method  $\text{O}_2$ -consumption is now connected to  $\text{CO}_2$ -production during biological degradation

in a closed system. It allows an unambiguous judgment about biodegradation and makes C-balancing more secure, see Fig. 3.

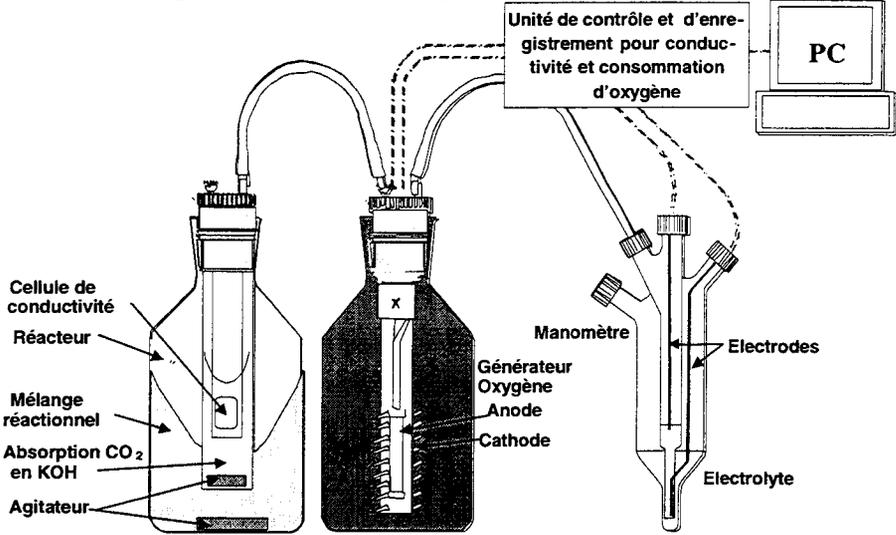


Figure 3: Respirometer, called "BSB-digi-LF1" or "BSB-CO<sub>2</sub>" (Selutec, 1999)

### 2.3 Results

Results of aerobic biodegradation of a PHB-Powder with respect to O<sub>2</sub>-consumption and CO<sub>2</sub>-production with normalized values referred to the ThOD (DTO) ThCO<sub>2</sub>P (PTCO<sub>2</sub>) are given in Fig. 4. The overlapping of the two curves is nearly perfect. This means, with the degree of exactitude possible in the "BSB-CO<sub>2</sub>" device we may not be able to detect accumulation of intermediate products in low concentrations (≈< 1 mg/L).

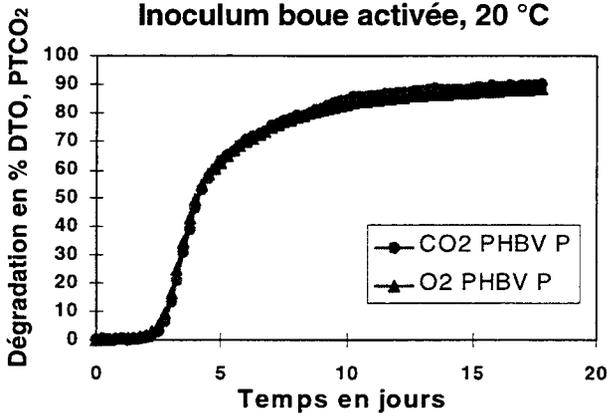


Figure 4: Aerobic biodegradation of PHBV powder, D300, 563 mg/L, Mineral salt medium, PHB exclusive carbon source

In Tab. 2 an example for a carbon-balance with PHBV-powder is shown. Two items have to be discussed: First the C-content of biomass is determined indirectly by a protein determination, Sperandio and Püchner, 1993. Further discussions with this respect can be found in Urstadt et al., 1995, Spitzer et al., 1996. Second, to pretend that the polymer is completely degraded has not been proved analytically. A major problem here is the difficulty to separate all the biomass from polymer powder.

$C_{\text{start}}$	$C_{\text{Polymère}}$	$+ C_{\text{Biomasse Start}}$	$+ COD_{\text{Start}}$	
	368	+ 27	+ 5	= 400 mg/l C
$C_{\text{end}}$	$C_{\text{CO}_2}$	$+ C_{\text{Polymère non dégradé}}$	$+ C_{\text{Biomasse end}}$	$+ COD_{\text{End}}$
	341	+ 0	+ 49	+ 16
				= 406 mg/l C
<b>Degré de recouvrement: 102 %</b>				

Table 2: Aerobic biodegradation of PHBV powder, C-balancing/recovery

### 3. Anaerobic Biodegradation

#### 3.1 Basic considerations

Anaerobic biodegradation is simplified in Tab. 3. The polymer  $P_i$  is transformed in a complex fermentative, anaerobic respiration process into additional biomass  $X$ , eventually intermediate or endproducts  $P_e$ , and biogas in form of  $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$  with minor heat production. With the Buswell equation the expected composition of the biogas can be described. Biomass formation with carbon originating from the polymer is low, all indicates that it can be neglected. The theoretical amount of carbon which can be transformed into biogas can be calculated as  $PT_{\text{Biogaz}}$ .

**Equation simplifiée:**

$$P_i + X_o \rightarrow X + P_o + CO_2 + CH_4 + \Delta H$$

(Température T, pH, milieu réductif)

Equation Buswell  $C_c H_h O_o + \left( c - \frac{h}{4} - \frac{o}{2} \right) H_2O \rightarrow \left( \frac{c}{2} + \frac{h}{8} - \frac{o}{4} \right) CH_4 + \left( \frac{c}{2} - \frac{h}{8} + \frac{o}{4} \right) CO_2$

**PTC** Production théorique de carbone, polymère en mol/L  
**Xc** Fraction de masse pour carbone, polymère C<sub>c</sub>H<sub>h</sub>O<sub>o</sub>

$$PTC = c_{P_i} * X_c \frac{1}{12,011 \text{ (g/mol)}} \text{ en mol/L}$$

$$X_c = \frac{c \cdot 12,011}{c \cdot 12,011 + h \cdot 1,008 + o \cdot 15,999}$$

**PTB<sub>logaz</sub>** Production théorique de biogaz en cm<sup>3</sup>/L, c<sub>Pi</sub> en mg/L  
**PTB<sub>logaz</sub>** = PTC \* 22 414 en cm<sup>3</sup>/L

Table 3: Simplified equation for anaerobic degradation, Buswell equation, definition of theoretical biogas production ThC (PTBiogaz)

The degree of biodegradation of a substance, without considering biomass formation can be calculated according to ISO/DIS 14853: 1998 as:

$$D(\text{PTBiogaz})_t = \left( \sum_{i=1}^n \left( \frac{(\text{CO}_2 + \text{TIC} + \text{CH}_4)_{T_i} - \sum_{j=1}^k (\text{CO}_2 + \text{TIC} + \text{CH}_4)_{B_j}}{(\text{PTBiogaz})_i} \right) \right) / n * 100 \text{ in \%}$$

Also C-balances for the carbon introduced including the polymer to be tested can be calculated similar to aerobic conditions. The same problems as mentioned above occur and the determination of C in the biomass formed is not solved in a satisfactory way until now.

### 3.2 Equipment

The standard equipment used for determining anaerobic biodegradability is an Eudiometer, see Fig. 5. The pressure in the system equals atmospheric conditions. If gas is produced the barrier fluid is pressed into the equilibrium vessel. Reading the gas volume produced is carried out after balancing both levels of the manometer fluid. The values are transformed to standard temperature and pressure (S.T.P). An other equipment measures the increase of pressure in a closed system, see ISO 11 734: 1995. Both methods are very labor intensive.

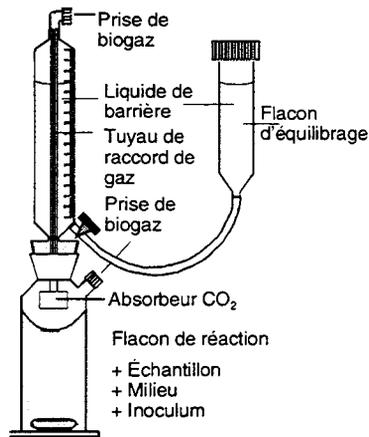


Figure 5: Eudiometer test system for anaerobic biodegradation, CO<sub>2</sub> absorption for anoxic biodegradation (ISO/DIS 14853: 1998)

Our unit "METHANOMAT", Fig. 6, allows an automated anaerobic testing, with manostatic, volumetric measuring the biogas produced in the closed system (Jörg *et al.*, 1995). This is combined with a continuous, automatic registration of the gas composition. CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> contents are continuously determined by sensors. pH is measured and controlled by acid/base addition which gives a deepened understanding of the biodegradation process, as we will demonstrate.

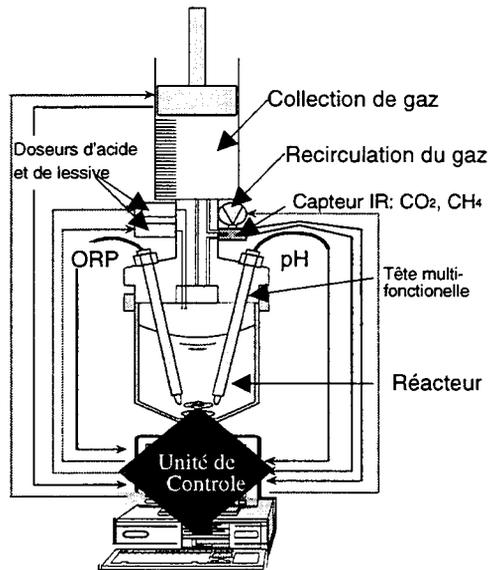


Figure 6: "METHANOMAT", automated test system for anaerobic biodegradation

### 3.3 Results

With eudiometer-units the reproducibility of biogas production with PHB-powder started in parallel, with seven replicates was tested, see Fig. 7.

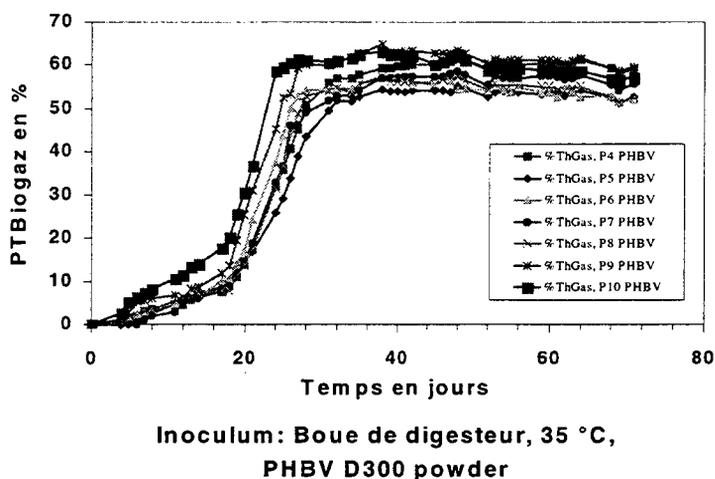


Figure 7: Eudiometer, anaerobic biodegradation: PHBV D300 powder. Y-axis: biogas development in % ThC, initial conc. 600 mg/L, Digester sludge ca. 3 g/L, mineral medium, pH 7.

The result with these carefully supervised experiments is somewhat deceiving. It demonstrates the difficulties to be faced with anaerobic polymer degradation experiments. The lag-phase - defined as period from inoculation until the degradation percentage has reached 10%. - is here in a time window from 10,2 up to 18,7 d. The degradation in % referred to the gas production fluctuated from 54 % up to 64 %. The recovery was between 61 % up to 123 % with an average of 96 %. Gas production in the blank vessels has been subtracted.

In Fig. 8 we present results obtained with the "METHANOMAT". Anaerobic biodegradability of PHB and PCL powder is compared. The medium was weakly buffered. PHB acidification started after 50 h and was rapidly completed which is shown by the attainment of a stable plateau. The formation of biogas could be observed with considerable delay. The production reached a stable value after 550 h. At this temperature no anaerobic biodegradation of PCL could be detected. The use of the "METHANOMAT" allows a deepened insight in the process kinetics of a substance. The initial step of anaerobic biodegradation: hydrolysis respectively depolymerisation with subsequent formation of organic acids as e.g. acetate, propionate can be detected by the pH-stat-modus. Already at an early stage, based on the acidification phase an evaluation of the bioavailability is possible.

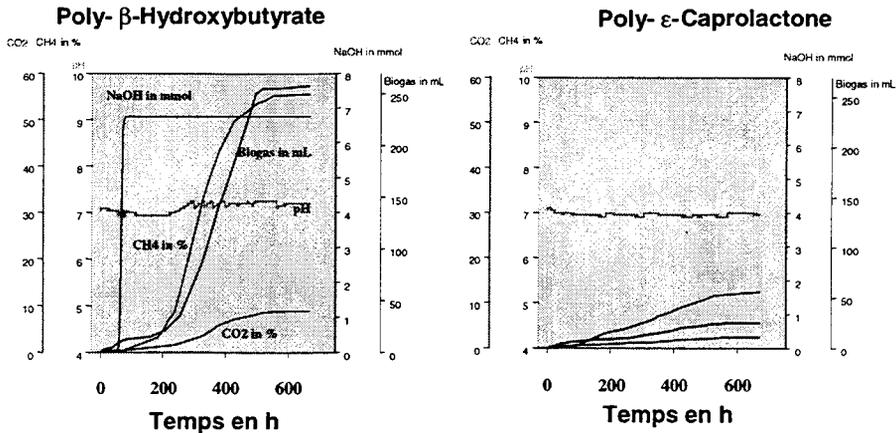


Figure 8: "METHANOMAT", anaerobic biodegradation: PHB G08, PCL P767 powders, initial conc. 1333 mg/L, inoculum: digester sludge 3 g/L, mineral medium, pH 7, 30 °C

## 4. Anoxic Biodegradation

### 4.1 Basic considerations

The anoxic biodegradation is simplified in Tab. 4. The polymer  $P_i$  is transformed during denitrification into additional biomass  $X$ , eventually intermediate or endproducts  $P_e$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$  and  $H_2O$  with heat production.

The theoretical nitrate demand respectively  $N_2$  gas production can be defined on the stoichiometric basis given, no biomass formation considered.

Denitrification is a process with several intermediate steps. A definition of a biochemical nitrate demand, BND, must take this into account, Tab. 5.

**Equation simplifiée:**

$$P_i + NO_3^- + X_o \rightarrow X + P_e + CO_2 + N_2 + H_2O + \Delta H$$

(Température T, pH,  $O_2$  ajusté  $\rightarrow 0$ )

**DTNO<sub>3</sub>** Demande théorique d' $NO_3^-$  polymère  $C_cH_hO_o$   
**PTN<sub>2</sub>** Production théorique de  $N_2$

$$C_cH_hO_o + a NO_3^- \rightarrow c CO_2 + w H_2O + a OH^- + 0,5 a N_2$$

$$a = 4/5 c + 1/5 h - 2/5 o = 2/5 * (2c + 0,5h - o), \quad w = -2/5 c + 2/5 h + 1/5 o$$

Avec nombre d'atomes et masse molaire  $M_r$  :

$$DTNO_3 = PTN_2 = \frac{14,007 * (0,8c + 0,2h - 0,4o)}{M_r} \text{ en mg N-NO}_3^-/\text{mg Polymère}$$

Table 4: Simplified equation for anoxic degradation, definition of a DTNO<sub>3</sub> and PTN<sub>2</sub>

Half-reactions	Consumed reduction-Equivalents / mol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fraction referred to overall reaction: NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 e <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2	2/5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3 e <sup>-</sup> + 4 H <sup>+</sup> → NO + 2 H <sub>2</sub> O	3	3/5
2 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 8 e <sup>-</sup> + 10 H <sup>+</sup> → N <sub>2</sub> O + 5 H <sub>2</sub> O	4	4/5
2 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 10 e <sup>-</sup> + 12 H <sup>+</sup> → N <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	5	1

$$\text{BND} = (\Delta\text{N-N}_2 + 2/5 \Delta\text{N-NO}_2^- + 3/5 \Delta\text{N-NO} + 4/5 \Delta\text{N-N}_2\text{O}) / V_p;$$
 BND in mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; ΔN-N<sub>2</sub>, ΔN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, ΔN-NO, ΔN-N<sub>2</sub>O fractions of intermediate products in mg N determined in experiment; V<sub>p</sub> watervolume of reaction vessel in L

Table 5: Definition of a BND (Biochemical Nitrate Demand, Schäfer, C., 1994).

## 4.2 Equipment

We used the Eudiometer presented in Fig. 5. Also an automated system has been developed, called "DENIMAT", precursor of the "METHANOMAT". It would exceed the scope here to present also this system in detail, see Schäfer (1994).

## 4.3 Results

Fig. 9 gives a comparison of anoxic degradation of PHB D300, PCL Tone 757, Avicel 2330 all as powder, in relation to aerobic and anaerobic conditions (Jörg et al., 1996). From these results it becomes obvious that testing anoxic biodegradation has its justification. One can not assume that biodegradation behavior of polymeric substances under aerobic and anoxic, or anoxic and anaerobic conditions equate. Anoxic testing has its own justification as demonstrated. PHB is well biodegradable under all three conditions. PCL however has a distinct, gradual degradation behavior. Well degradable under aerobic conditions, slow degradation under anoxic conditions and finally no degradation under anaerobic conditions. The testing of Avicel led to a surprising effect. In comparison to aerobic and anaerobic conditions, under anoxia the material remains nearly inert.

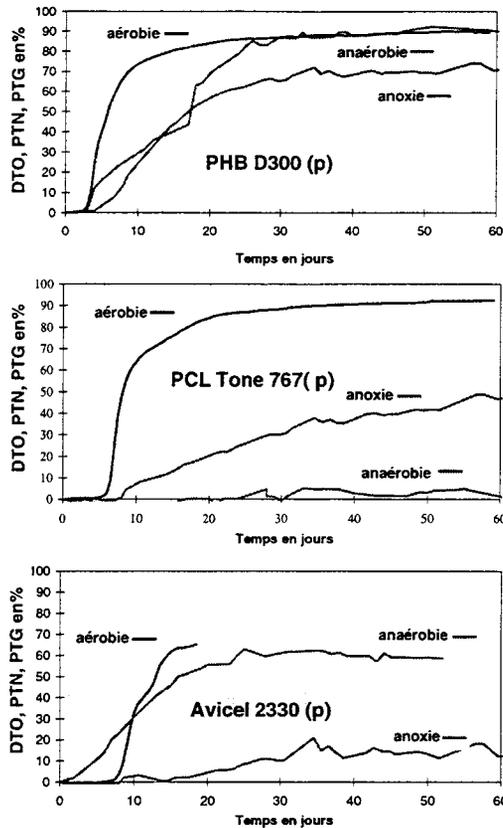


Figure 9: Comparison of anoxic biodegradation of PHB D300, PCL Tone 757 and Avicel 2330, powders, 30 °C, with aerobic, anaerobic conditions at 35 °C

## 5. Abbreviations, list of symbols

ASTM	American Society for Testing Materials
Avicel	Microcristalline cellulose
CEN	Comité Européen de Normalisation
ECETOC	European Chemical Industry, Ecology & Toxicology Center
ISO	International Organization for Standardization
MITI	Ministry of International Trade and Industry, Japan
PCL	Poly-ε-Caprolactone
PHB	Poly(3-hydroxybutyrate)
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
SCAS	Semi-continuous activated sludge, OECD-Guidelines, Method 302 A, Adopted 2.05.1981, "Inherent Biodegradability: Modified SCAS Test"
Selutec	Small company producing respirometer BSB-digi-LF1, later METHANOMAT, Roßbergstrasse, D- 72116 Mössingen-Öschingen, E-Mail: selutec@t-online.de

S.T.P.	Standard conditions: standard temperature and pressure for calculation of gas production. $T_0 = 273,15 \text{ K}$ (or $0^\circ\text{C}$ ); $p_0 = 1,01325 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ (or $1013,25 \text{ mbar}$ ). Molar volume of ideal gas at S.T.P. $V_{\text{molar}} = 0,022414 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} = 22414 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ .
BND	Biochemical Nitrate Demand, Biochemical $\text{N}_2$ -Production in $\text{mg/L N-NO}_3^-$ ; in $\text{mg/L N}_2$
BOD	Biochemical oxygen demand in $\text{mg/L O}_2$
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
$\text{BOD}_{\text{Pi}}$ , $\text{BOD}_{\text{Blank}}$	Biochemical oxygen demand in $\text{mg/L O}_2$ ; with Polymer $\text{P}_i$ ; without Polymer: only activity of inoculum = Blank
$\text{C}_{\text{Bio start}}$ , $\text{C}_{\text{Bio end}}$	C-content of biomass, at start, at end of the experiment, estimated via protein-analysis in $\text{mg/L C}$
$\text{C}_{\text{CO}_2}$	$\text{CO}_2$ produced in $\text{mg/L C-CO}_2$
$\text{CO}_2$ , $\text{H}_2\text{O}$	Endproducts
$\text{COD}_{\text{Start}}$ , $\text{COD}_{\text{End}}$	Carbone organique dissous in $\text{mg/L C} \equiv \text{DOC}_{\text{start}}$ , $\text{DOC}_{\text{end}}$
$\text{C}_{\text{Polymère}}$	Concentration of polymer in $\text{mg/L C}$
$\text{C}_{\text{Polymère non dégradé}}$	Concentration of polymer in $\text{mg/L C}$ at end of testing
$\text{C}_{\text{Pi}}$	Concentration of test substance $\text{P}_i$ ; at start in $\text{mg/L}$
$\text{C}_{\text{start}}$ , $\text{C}_{\text{end}}$	Total carbon content in a closed system in $\text{mg/L C}$
$\text{C}$	
$\text{DBO}_{\text{Pi}}$ , $\text{DBO}_{\text{Blank}}$	see. $\text{BOD}_{\text{Pi}}$ , $\text{BOD}_{\text{Blank}}$
$\text{D}_{(\text{DTo})t}$	see $\text{D}_{(\text{ThOD})t}$
$\text{DiC}_{\text{start}}$ , $\text{DiC}_{\text{end}}$	Dissolved inorganic carbon; start; end, in $\text{mg/L C}$
$\text{DOC}_{\text{start}}$ , $\text{DOC}_{\text{end}}$	Dissolved organic carbon; start; end, in $\text{mg/L C}$
$\text{D}_{(\text{PTBiogaz})t}$	Degree of degradation of test substance $\text{P}_i$ after time $t$ in % $\text{PTB}_{\text{Biogaz}}$
$\text{D}_{(\text{ThOD})t}$	Degree of degradation of test substance $\text{P}_i$ after time $t$ in % ThOD
$\text{DTNO}_3$	Demande théorique de nitrate en $\text{mg N-NO}_3^- / \text{mg}$
$\text{P}_i$ see ThND	
DTO	Demande théorique d'oxygène, voire ThOD
$\text{M}_r$	Molar mass of compound e.g. $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_6$
in $\text{g/mol}$	
$n$ , $k$	Number of replicates $n$ : with test substance, $k$ : with blank
$\text{P}$ , $\text{P}_e$	Sum of intermediate products, complete biodegradation
$\text{P} \equiv 0!$	
$\text{P}_i$	Test substance
$\text{PTB}_{\text{Biogaz}}$	Production théorique de biogaz en $\text{cm}^3/\text{L}$
PTC, PTG	Production théorique de carbone in $\text{mol/L}$ , en forme $\Sigma \text{CH}_4 + \text{CO}_2$
$\text{PTN}$ , $\text{PTN}_2$	Production théorique d'azote en $\text{mg N-N}_2 / \text{mg P}_i$ , see
ThNP	
R	Recovery rate in %
ThC	Theoretical amount of carbon transformed in gaseous products in $\text{mol/L}$
Th $\text{CH}_4$	Theoretical amount of methane, standard conditions (S.T.P.) in $\text{cm}^3/\text{L}$
Th $\text{CO}_2$	Theoretical amount of carbon, in $\text{mg CO}_2/\text{mg P}_i$ resp. standard conditions (S.T.P.) in $\text{cm}^3/\text{L}$
ThND, ThNP	Theoretical Nitrate Demand in $\text{g N-NO}_3^-/\text{g P}_i$ resp. Theoretical Nitrogen Production in $\text{mg N-N}_2 / \text{mg P}_i$
ThOD	Theoretical oxygen demand in $\text{mg O}_2 / \text{mg P}_i$

TIC	Total inorganic carbon
$V_P$	Water volume, reaction vessel in L
$V_t$	Volumen Gasphase, Zeit $t$ , in $\text{cm}^3$
$X_c$	Fraction de masse de C dans un polymère de composition $C_cH_hO_o$
$X_o, X$	Biomass, start, end of experiment
$(CO_2+TIC+CH_4)_{T_i/B_j}$	Amount of $CO_2$ and $CH_4$ in gasphase and $CO_2$ in water produced in reaction vessel $F_{T_i}$ with testsubstance and in blank reaction vessel $F_{B_j}$ without testsubstance during experiment, ISO/DIS 14853: 1998
$\Delta H$	Volume related heat

## 6. Expression of thanks

The developments presented here have been financially supported by the following organizations:

- Federal Office of Environment (UBA, Berlin): Wasser 102 06122: "Untersuchungen zur Optimierung der Denitrifikation hinsichtlich der Entwicklung von elementarem Stickstoff und Distickstoffoxid (Lachgas)"
- European Commission: EG-Air 2/ CT 93-1099: "Biodegradability of Bioplastics: Prenormative Research, biorecycling, and ecological impacts"
- German Foundation Environment, (DBU): 02612 : "Bestimmung und Optimierung der anaeroben Abbaubarkeit in Screening-Tests mit einem automatisierten Meßgerät (METHANOMAT)",
- German Research Foundation, DFG, Mu 577/1-1: "Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit unter aeroben Bedingungen über Sauerstoffverbrauch, Kohlenstoffdioxidproduktion und Kohlenstoffbilanz".

## 7. References

ASTM D 5210, 1992, Determining the anaerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge.

ASTM D 5511, 1994, Determining anaerobic biodegradation of plastic materials under high-solids anaerobic-digestion conditions.

CEN/Draft, 1995, Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradability and disintegration of packaging materials under high-solids anaerobic digestion conditions - method by analysis of released biogas. (equivalent to ASTM Standard D 5511-94).

DIN 38414, Tl. 8, 1985-06, Bestimmung des Faulverhaltens, DEV S 8.

DIN EN 29888, 1993-04. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wäßrigen Medium, Statischer Test (Zahn-Wellens-Verfahren) (ISO 9888: 1991; Dt. Fass. EN 29888: 1993; DEV L 25).

DIN EN ISO 9887, 1994-12. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wäßrigen Medium, Halbkontinuierlicher Belebtschlammtest (SCAS) (ISO 9887: 1992; Dt. Fass. EN ISO 9887:1994; DEV L 28).

EC-Guideline 84/449/EC, 25.04.1984.

EEC (European Economic Community), 1986. Guiding principles for a strategy for biodegradability testing, XI/841/86 final, 9 pp.

ISO 11734, 1995. Water quality - Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge - Method by measurement of the biogas production.

ISO/DIS 14853, 1998. Plastics - Evaluation of ultimate anaerobic biodegradation of plastic materials in an aqueous system - Method by measurement of the biogas production.

Jörg, R., A. Schäfer, A.-B. Fink, A. Boley, W.-R. Müller, 1996. Weiterentwicklung von Testverfahren zur Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit im wäßrigen Milieu unter aeroben, anoxischen und anaeroben Bedingungen; Fachgespräch: "Beitrag der Biotechnologie zu einer nachhaltigen, umweltgerechten Entwicklung", 17.12.1996, Wissenschaftszentrum, Bonn, Verant.: BMU.

Jörg, R., W.-R. Müller, 1995. Bestimmung und Optimierung der anaeroben Abbaubarkeit in Screening Tests mit einem automatisierten Meßgerät (Methanomat), Poster, Dechema-Jahrestag., Wiesbaden, 30.5.-1.6.1995.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Paris, ISBN 92-64-12221-4, 1981, 1992.

Painter, H. A., 1992. Detailed Review Paper on Biodegradability Testing, OECD Test Guidelines Programme, Periodical Review, July.

Schäfer, C., 1994. *Untersuchungen zur Optimierung der Denitrifikation hinsichtlich der Entwicklung von molekularem Stickstoff und Distickstoffoxid (Lachgas)*, Stuttg. Ber. Siedl. Wass. Wirtsch., Bd. 131, München: R. Oldenbourg.

Schäfer, A., W.-R. Müller, C. Engel, 1997. Kontinuierliche CO<sub>2</sub>-Messung im Respirometer als zusätzliches Abbaukriterium, *gwf Wass. Abwass.* (138), 570-576.

Schink, B., 1994. Bedeutung und Mechanismen des anaeroben Abbaus, *Bioengineering*, 10, 56-57 (BASF-Workshop, 22. bis 23.3.1994).

Sperandio, A., Püchner, P., 1993. Bestimmung der Gesamtproteine als Biomasse-Parameter in wäßrigen Kulturen, *gwf Wass. Abwass.*, 134, 482-495.

Spitzer, B., Mende, C., Menner, M., Luck, T., 1996. Determination of the Carbon Content of Biomass - A Prerequisite to estimate the complete Biodegradation of Polymers, *J. Environm. Polym. Degrad.*, 4, 157-171.

Steinecke, H., 1968. *Automatische BSB-Messung und Registrierung unterschiedlich vorbehandelter Abwasserproben*, Stutt. Ber. Siedl. Wasserw., Bd. 34, München: R. Oldenbourg.

Stringer, D. A., (Edit.), 1988. Evaluation of Anaerobic Biodegradation. *ECETOC Techn. Rep.* 28, 42 p.

Urstadt, S., Augusta, J., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., 1995. Calculation of Carbon Balances for Evaluation of the Biodegradability of Polymers, *J. Environm. Polym. Degrad.*, 3, 121-131.

# La respirométrie séquencée appliquée à la caractérisation de la biodégradation

## *Sequenced respirometry applied to characterisation of biodegradation*

Etienne Paul, Mathieu Spérandio, Michel Mauret, Xavier Lefebvre et Jean Cantet  
INSA, Laboratoire d'Ingénierie des Procédés de l'Environnement, Département  
GPI, 135 Avenue de Rangueil 31077 Toulouse France  
Tel. : 33 (0)5 61 55 97 72 ; fax : 33 (0)5 61 55 97 90 ; E-mail : Paul@insa-tlse.fr

**Résumé :** La dégradation de substrats par des micro-organismes peut être suivie et caractérisée par respirométrie, c'est à dire par la mesure et l'interprétation des cinétiques de consommation d'oxygène par les cellules. Le choix de la technique respirométrique est importante et détermine l'applicabilité de la respirométrie et sa précision. Un appareillage, le **BIOS-R** a été développé par l'INSA de manière à réaliser une mesure de la vitesse de consommation d'oxygène tout en s'affranchissant des phénomènes de transfert. La description des potentialités de cet appareillage montre, entre autre, que la fréquence d'acquisition est proportionnelle à l'activité des micro-organismes. L'appareil est simple d'utilisation et facilement transportable.

Ce système peut être utilisé pour analyser finement les cinétiques de consommation de substrat complexe. L'application à la dégradation de deux agro-matériaux, le Novon et le Biopol montre qu'il est possible non seulement d'évaluer leur biodégradabilité mais également de proposer une mécanisme de dégradation. En particulier, les micro-organismes présents initialement sur le matériau colonisent rapidement l'ensemble de la surface disponible et le matériaux se desquame. La cinétique de réaction devient alors limitée par le substrat.

**Summary :** *Substrate biodegradation kinetic can be followed and characterised by respirometry, that is measuring and interpreting oxygen uptake rate (OUR) kinetics. The choice of the respirometry principle is determinant for its feasibility and accuracy. A new apparatus, the BIOS-R has been developed. It is based on sequenced measurements of oxygen uptake rate in a closed cell whereas the reaction takes place in a reactor open for gas in order to avoid oxygen limitation for long term measurement. Therefore, OUR outputs become independent of the oxygen transfer. The measurement frequency can be high and is proportional to the micro-organism activity. The BIOS-R is easy to use and to carry. It can be used for kinetic analysis of complex substrate degradation. The biodegradation of two Agro-materials, the Novon and the Biopol, were assessed. The Novon material was found to be not biodegradable. Degradation mechanism was proposed for the Biopol. The microorganisms initially stick on the material, rapidly invade the whole available surface and then the reaction kinetic becomes limited by the substrate.*

**Mots clés :** respirométrie, biodégradation de substrats, agro-matériaux

**Key words :** respirometry, kinetics of biodegradation, agro materials

# 1. INTRODUCTION

La respirométrie est la mesure et l'interprétation de la vitesse de consommation de l'oxygène par voie biologique dans des conditions contrôlées. La vitesse de consommation d'oxygène étant directement reliée à la croissance des cellules et à l'élimination de la pollution, la respirométrie constitue une technique très utile pour caractériser les activités microbiennes de dégradation. Elle permet de caractériser aussi bien la biodégradation que l'état de l'inoculum et l'inhibition pour des micro-organismes autotrophes et hétérotrophes (Block, 1976, Grady et Coll., 1989, Ros et Dular 1992, Vanrolleghem et Verstraete, 1993, Spanjers and Vanrolleghem, 1995).

Les relations globales entre la croissance, la consommation de substrat et la consommation d'oxygène s'écrivent :

$$\frac{dX}{dt} = Y \frac{dS}{dt} \quad \text{De plus,} \quad \frac{dO_2}{dt} = \frac{1-Y}{Y} \frac{dX}{dt}$$

$$\text{d'ou} \quad \frac{dO_2}{dt} = (1-Y) \frac{dS}{dt}$$

Y représente le rendement de conversion du substrat S en biomasse X

Une partie du substrat est oxydé pour fournir l'énergie, alors que le substrat restant sert à former de la biomasse.

Pour étudier la consommation en oxygène des micro-organismes, la mesure de l'oxygène dissous peut être réalisée dans un réacteur ouvert ou fermé sur les gaz et sur le liquide. Spanjer H. et Coll. (1998) ont donné une classification des systèmes respirométriques et définis les bilans matière sur l'oxygène permettant de calculer la vitesse de consommation d'oxygène par les micro-organismes.

La mesure de la vitesse de consommation de l'oxygène en réacteur ouvert présente l'inconvénient de dépendre de la qualité de la phase liquide. En effet, le bilan oxygène conduit à l'expression :

$$\frac{dO_2}{dt} = K_l a (O_2^* - O_2) - r_{O_2}$$

variation interne de l'oxygène	vitesse d'apport de l'oxygène	vitesse de consommation de l'oxygène
-----------------------------------	----------------------------------	---

avec :

- $r_{O_2}$  : vitesse de consommation d'oxygène ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- $O_2$  : concentration en oxygène ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ )
- $O_2^*$  : concentration en oxygène à saturation ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ )
- $K_l a$  : coefficient de transfert d'oxygène ( $\text{temps}^{-1}$ )

L'hypothèse souvent considérée lors de l'utilisation de cette relation est que le  $k_l a$  est constant. Cette hypothèse n'est malheureusement que rarement vérifiée du faite de la présence de molécules biodégradables interférant sur le transfert. Cette constatation nous a conduit à développer un nouvel appareil.

## 2. Un outil spécifique et complet : le *BIOS-R*

### 2.1 Description de l'appareillage

Le respiromètre *BIOS-R*, présenté sur la figure 1, permet l'acquisition automatique de la concentration en oxygène dissous d'un milieu liquide. Le *BIOS-R* utilise un principe mixte : la réaction a lieu dans un réacteur fermé sur le liquide et ouvert sur les gaz mais la mesure est effectuée dans une cellule séquencée sur le liquide et fermée sur les gaz. Cette configuration présente l'avantage de rendre la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène indépendante des phénomènes de transfert tout en évitant une limitation de la réaction par l'oxygène. Ces deux aspects de l'analyse respirométrique sont déterminants pour la précision de la mesure.

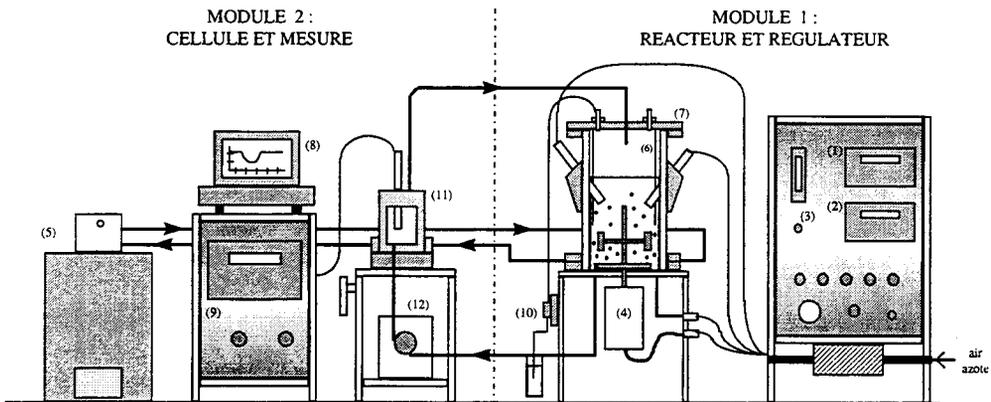


Figure 1 : schéma du respiromètre séquencée

La réaction et la mesure de l'oxygène dissous sont séparées. Le liquide du réacteur est pompé régulièrement vers la cellule. La mesure de l'oxygène dissous est réalisée dans une cellule équipée d'une sonde à oxygène. Lorsque la circulation de liquide est arrêtée, aucun transfert d'oxygène (pas de phase gaz) n'est présent (configuration spéciale de la cellule pour éviter tout transfert d'O<sub>2</sub> par la surface). La décroissance de O<sub>2</sub> en fonction du temps représente directement la vitesse de consommation des micro-organismes  $r_{O_2}$  (lorsqu'on s'affranchit du temps de réponse de la sonde et si une concentration en oxygène dissous non limitante est présente).

$$r_{O_2} = - dO_2/dt$$

Lorsque la concentration en oxygène atteint un seuil bas (par exemple), la recirculation de liquide du réacteur reprend afin de renouveler le milieu et l'oxygène dissous.

Les hypothèses considérées sont les suivantes :

- les réactions sont identiques dans la cellule de mesure et le réacteur,

- absence de limitation de la réaction par l'oxygène ou les substrats dans la cellule : le recyclage assure le renouvellement du liquide et surtout la réoxygénation de la cellule

## 2.2 Mode de gestion du séquençage

La fin de la mesure peut être déterminée soit par atteinte d'une concentration en  $O_2$  minimale (seuil bas), soit par rapport à un temps maximum, soit par un gradient de concentration en  $O_2$  consommé.

La fin de la recirculation est définie soit par rapport à un seuil haut de concentration en  $O_2$ , soit par rapport à un temps maximum.

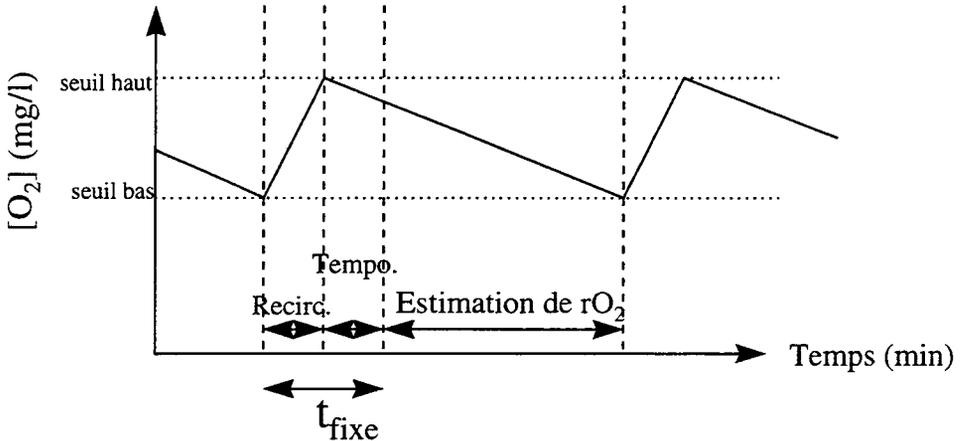


Figure 2 : évolution de la concentration en oxygène dissous dans la cellule de mesure

La figure 2 présente l'évolution de la concentration en oxygène dissous lors d'un cycle de mesure : recirculation, temporisation puis mesure.

Des précautions sont nécessaires pour assurer une mesure correcte : le  $k_L a$  doit être élevé dans le réacteur aéré. De plus, étant donné qu'il peut y avoir une variation importante de  $rO_2$  au cours d'une expérience, une régulation de concentration en  $O_2$  dans le réacteur est nécessaire pour que la réaction ne soit pas limitée.

La figure 3 permet de visualiser l'évolution de la concentration en oxygène dissous et la valeur du  $rO_2$  au cours d'un enchaînement de cycles.

## 2.3 La fréquence d'acquisition

Ce paramètre est important puisqu'il détermine la précision de l'interprétation cinétique. La fréquence ( $F$ ) sera d'autant plus élevée que la vitesse de consommation d'oxygène est grande, donc que l'activité globale des micro-organismes est grande. Le système est auto-adaptatif .  $F = t_{fixe} + \Delta O_2 / rO_2$

Le  $t_{fixe}$  correspond à la somme entre le temps de remplissage et la temporisation (temps de réponse de la sonde + dégazage). Le  $\Delta O_2$  minimum est de 1 mg/l afin d'obtenir une bonne précision de la mesure.

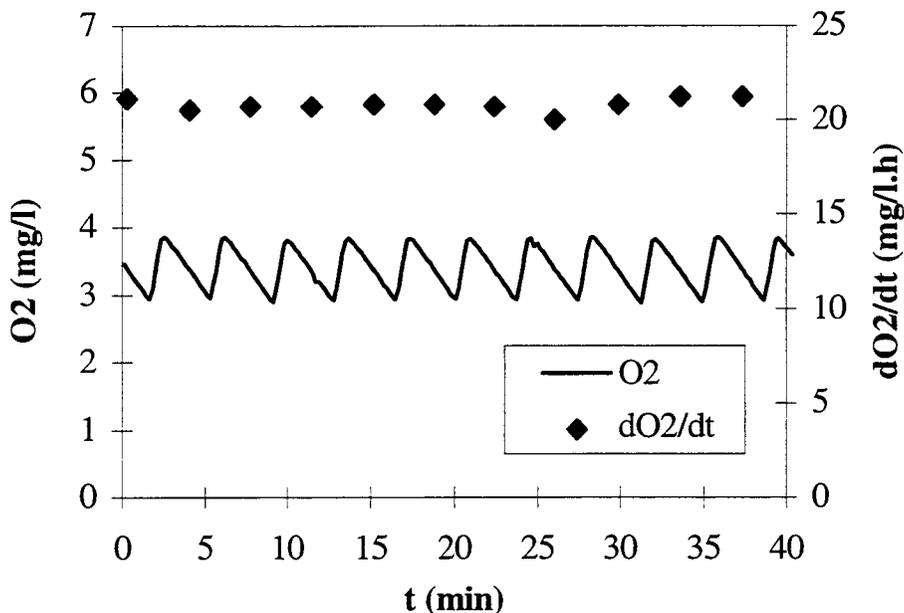


Figure 3 : visualisation de l'enchaînement des cycles et du profil de rO2 calculé.

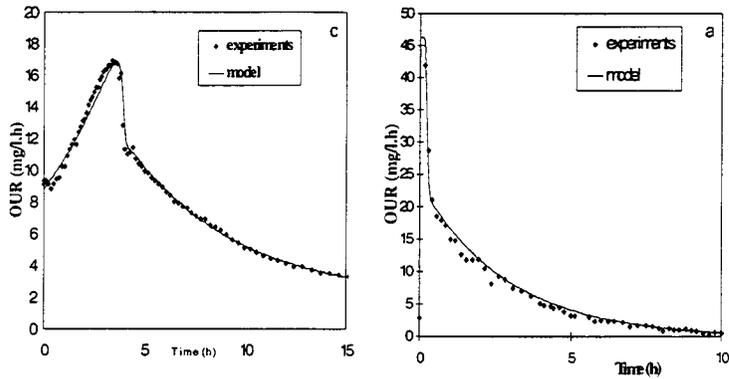
Ainsi, les avantages du BIOS'R sont multiples : la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène est directe et simple. Le transfert gaz/liquide n'intervient pas dans ce calcul de vitesse. Le milieu réactionnel est accessible pour des prélèvements. Une régulation de la concentration en oxygène dissous est possible et enfin la fréquence de mesure s'adapte à la rO<sub>2</sub>. Un syncopage de l'aération peut permettre d'envisager des suivis cinétiques même pour de faibles taux de consommation d'oxygène. Une procédure d'ajout automatisé de substrat permet de réaliser une acclimatation des populations aux conditions de charge polluante et de qualité de pollution. Cette procédure améliore fortement la représentativité de la caractérisation de la biodégradabilité et permet aussi d'évaluer l'inhibition par l'utilisation d'un substrat de normalisation.

### 3. Application à la caractérisation des mécanismes de biodégradation

#### 3.1 Cas d'un effluent urbain

Ce système peut être utilisé pour analyser finement les cinétiques de consommation d'oxygène. L'association d'une cinétique respirométrique et d'un modèle de dégradation permet d'identifier les paramètres d'activité des populations et la qualité du substrat (compartimentation, caractère inhibiteur...).

*Cette approche ouvre des potentialités considérables à l'utilisation de la respirométrie. Un exemple d'identification de paramètres cinétiques de dégradation de la DCO d'une eau résiduaire urbaine est donné sur la figure 4.*



Estimates			
		Mean	$\sigma$
$\mu_m$	(d <sup>-1</sup> )	3.5	1.35
$K_s$	(mgCOD/l)	0.22	0.26
$k_H$	(d <sup>-1</sup> )	3.2	0.9
$f_{ma}$	-	1.06	0.17
$b_H$	(d <sup>-1</sup> )	0.26	0.04
Default values			
$f_i = 0.1$ gCOD/gCOD			
$Y_H = 0.66$ gCOD/gCOD			
$K_a = 1$ l/mgCOD.d			

Figure 4 : Utilisation de la dynamique d'évolution de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub> pour l'estimation des paramètres d'un modèle de dégradation de pollution par des micro-organismes (d'après Spérandio M., 1998).

Sur la figure 4 sont représentés deux cinétiques de respiration pour deux rapports Substrat/Micro-organismes (S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>) différents. La première cinétique à fort S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> permet de distinguer la croissance exponentielle sur la fraction facilement assimilable d'une eau résiduaire urbaine. Elle permet d'identifier le taux de croissance et la concentration initiale en biomasse active. La deuxième cinétique à faible rapport S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> permet, elle, de caractériser la dégradation de la fraction lentement biodégradable et la respiration endogène.

### 3.2 Cas de la biodégradation d'agro-matériaux

Différents agro-matériaux ont été utilisés, le Novon et le Biopol dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau 1.

Le réacteur contenant les agro-matériaux estensemencé par un surnageant de boues activées préalablement lavées. Environ 6 10<sup>6</sup> cellules revivifiables par ml ont été ajoutées. L'activité respirométrique étant très faible et pour ne pas entraîner d'interférence liée à l'altération du matériau lors du passage dans les pompes, la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène a été gérée en mode manuel. La figure 5 présente l'évolution de la vitesse de consommation en oxygène au cours de la dégradation des deux agro-matériaux.

	Novon	Biopol
Aspect visuel Macroscopique microscopique	film plastique	film plastique
	irrégulier (trous, bosses)	irrégulier (trous, bosses)
Composition chimique (C/H/N/O)	80/13/0/5	55/7/1/35
origine	amidon+proteines	fermentation du glucose
% de minéralisation attendu	3%	65%

Tableau 1 : caractéristiques du Biopol et du Novon.

Le taux de consommation d'oxygène est très faible dans le cas du Novon. La valeur de  $r_{O_2}$  est proche de celle correspondant à la respiration endogène des micro-organismes de l'inoculum. Une observation au microscope démontre l'absence de colonisation croissante et massive de la surface du matériau qui conserve sa structure. Ce résultat confirme la faible biodégradabilité de ce matériau.

En revanche, le taux de consommation d'oxygène est important dans le cas du Biopol. On distingue deux phases dans la dégradation de ce matériau. La première phase correspond à une phase où le taux de consommation d'oxygène augmente fortement de manière quasi exponentielle. Lors de la deuxième phase, le taux de consommation d'oxygène diminue progressivement jusqu'à épuisement du substrat.

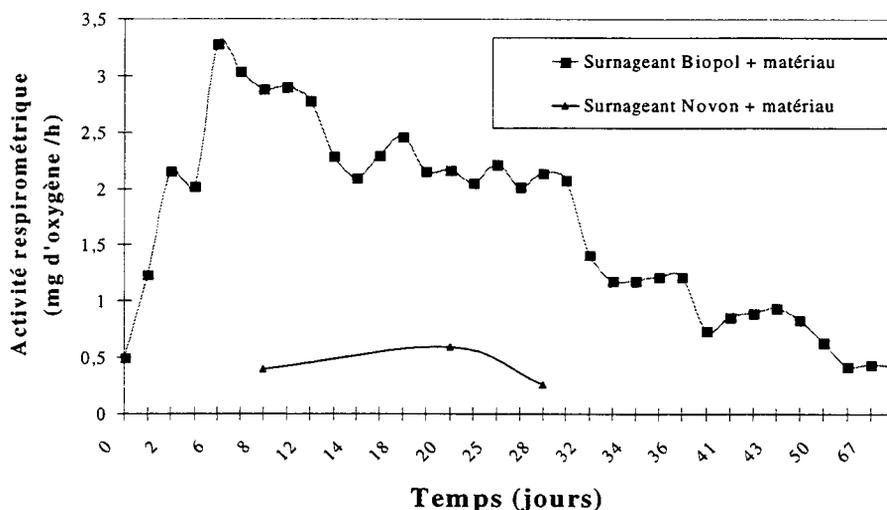


Figure 5 : évolution de la vitesse de consommation d'oxygène au cours du temps liée à la dégradation des agro-matériaux Novon et Biopol.

La première phase correspond à une phase de croissance entraînant simultanément une colonisation de la surface. La réaction est d'ordre 0 par rapport au substrat ce qui justifie l'allure exponentielle de la  $rO_2$ . Une desquamation du matériau débute. Lorsque la colonisation du matériau est maximale (toute la surface disponible est recouverte par les micro-organismes), la réaction devient limitée par la disponibilité du substrat : la réaction est d'ordre 1 par rapport au substrat. Ces résultats ont été confirmés par des observations au microscope, montrant clairement la colonisation progressive du matériau et sa desquamation. En début de seconde phase, le matériau apparaît totalement colonisé. La surface de matériau colonisée va décroître avec l'avancement de la réaction. Les paramètres cinétiques caractérisant la colonisation et la dégradation du Biopol ont pu être calculés.

Par ailleurs, la biomasse préalablement fixée sur le matériau joue un rôle prépondérant sur la cinétique de dégradation par rapport à une biomasse rajoutée (inoculum). La contamination initiale du matériau détermine donc la vitesse de dégradation (Pujol C., 1997).

Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus lors de la dégradation d'une fraction particulière contenant majoritairement de la cellulose (Spérandio et Paul, 1999).

## **4. Conclusion**

La respirométrie basée sur la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène permet la caractérisation des mécanismes de dégradation de substrats non seulement solubles mais aussi particuliers. Parmi les différentes techniques respirométriques développées, la respirométrie séquencée, basée sur un découplage spatial entre le lieu de fourniture de l'oxygène et le lieu de mesure de la vitesse de consommation d'oxygène, présente l'avantage d'être insensible aux modifications du transfert d'oxygène.

L'application à la caractérisation d'agro-matériaux permet non seulement d'estimer le caractère biodégradable du matériau mais également de visualiser la cinétique de sa dégradation. L'analyse de cette cinétique permet de proposer un mécanisme de dégradation des matériaux tels que le Biopol. Une étape de colonisation du matériaux par les bactéries préalablement fixées est suivie par une étape de dégradation limitée par la disponibilité du substrat.

## **5. Références bibliographiques**

Block J. (1976) Measurements of the viable biomass concentration in activated sludge by respirometric techniques. *Water Research*, **10**, pp. 919-925

Grady C.P.L. , Dang J.S. , Harvey D.M. , Jobbagy A. & Wang X.L. (1989) Determination of biodegradation kinetics through use of electrolytic respirometry. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, pp. 957-968

Pujol C. (1997) Etude des mécanismes de biodégradation des agro-matériaux. DESU, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Ros M. et Dular M. (1992) Determination of some kinetic parameters by respirometry. *Wat. Sci. Tech.*, **26**, pp. 2535-2538

Spanjers H. and Vanrolleghem P. A. (1995) Respirometry as a tool for rapid characterisation of wastewater and activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, **31,2**, pp. 105 - 114

*Sperandio M. (1998) Développement d'une procédure de compartimentation d'une eau résiduaire urbaine et application à la modélisation dynamique de procédés à boues activées. Thèse, INSA, Toulouse, France, n° 488.*

Spérandio, M., Paul, E., 1999. Experimental basis for the prediction of Particulate Settleable Solids hydrolysis in activated sludge processes. Soumise à *Water Research*.

# Un système automatisé de mesure de la biodégradabilité des matériaux

P. Feuilloley<sup>1</sup>, J.L. Lablée<sup>1</sup>, L. Dusserre-Bresson<sup>1</sup>, S. Christol<sup>1</sup>, A. Calmon<sup>1,2</sup>, V. Bellon-Maurel<sup>1</sup>, F. Silvestre<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cemagref, GIQUAL, 361 rue J.F.Breton, BP 5095, 34033 Montpellier, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, UA INRA n°31A1010, ENSCT / INP, 118 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France.

**Résumé :** Les méthodes de mesure de la biodégradabilité des matériaux sont toutes très complexes et difficiles à mettre en oeuvre. Elles demandent un travail important, délicat et fastidieux pour le personnel, et donc coûteux. L'objectif de travail est la mise au point d'un banc de mesure de la biodégradabilité des matériaux entièrement automatisé, basé sur la méthode de Sturm et conforme à la norme européenne en cours d'élaboration. La pièce centrale de ce système est un analyseur infrarouge de CO<sub>2</sub> d'une gamme de 0 à 1000 ppm. Il reçoit successivement et périodiquement le CO<sub>2</sub> de 9 réacteurs où se déroulent les biodégradations, grâce à un système d'électrovannes commandées par un micro-ordinateur. Ce même ordinateur supervise le fonctionnement de l'analyseur, contrôle le bon déroulement des tests et réalise l'acquisition et le stockage des données. Un dernier objectif de cette étude est de mettre ce banc à la disposition du public (industriels, utilisateurs, chercheurs) pour la mesure de la biodégradabilité de matériaux à des coûts acceptables.

**Abstract :** *The objectives of this work is the setting up of an automatic device for the biodegradability assessment of natural or synthetic biopolymers. This system will comply to the future CEN standard of CEN/TC 261 « requirement for packaging recoverable through composting and biodegradation, test scheme and evaluation criteria for the final acceptance of packaging ». Our device is based on the Sturm method. This system deals with a set of 9 glass reactors (3 liters) where materials are immersed in a mineral medium in the presence of bacteria. The result of the biodegradation is the production of CO<sub>2</sub> rate of which is periodically analysed by an IR gas analyser. The automation concerns the logging and the analysis of the CO<sub>2</sub> in each reactor, the calibration, the data storage and its processing. In order to make this system automatic, the amount of CO<sub>2</sub> produced during the biodegradation is periodically analyzed by a gas analyzer piloted by a computer. The computer also acquires and processes the data. The work described below consists mainly in the establishment of the device specification booklet, and a comparison between manual and automatic measurement methods.*

**Mots Clés :** Agromatériaux, biodégradation, automatisation, Test de Sturm

**Keywords :** Agromaterials, biodegradation, automation, Sturm test

# 1. Introduction.

Les méthodes de mesure de la biodégradabilité des matériaux sont complexes et difficiles à mettre en oeuvre. Elles sont basées sur une mesure indirecte de la dégradation telles que la consommation d'oxygène, la quantité de CO<sub>2</sub> produit ou l'augmentation de biomasse. Parmi ces méthodes, il ressort que c'est la méthode du test modifié de Sturm, en cours de normalisation, qui semble la plus appropriée à une automatisation. Ainsi, le suivi de la production de dioxyde de carbone permet d'estimer la biodégradabilité ultime du matériau.

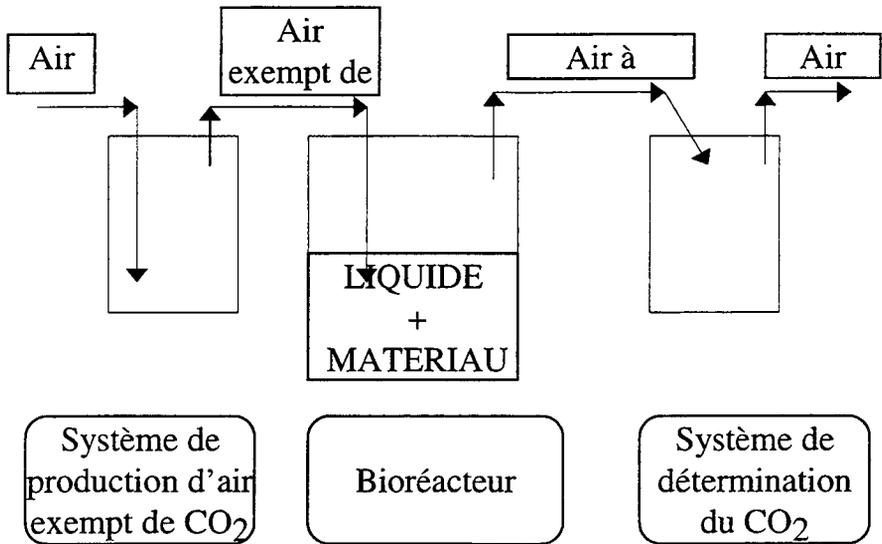
L'objectif de ce travail est la mise au point d'une chaîne automatisée de mesure de la biodégradabilité des matériaux, basée sur le test de Sturm et conforme au projet de norme européenne. Après un rapide examen des avantages et inconvénients des méthodes manuelles et automatiques, la chaîne automatisée de mesure mise en place au *Cemagref* de Montpellier sera décrite et comparée au banc manuel.

## 2. Méthode de Sturm

Le test de biodégradabilité des matériaux est réalisé suivant le projet Gen (CEN, 1995). Il est basé sur le test modifié de Sturm (Sturm, 1973). Le matériau est exposé à une source de micro-organismes (surnageant de boues activées de station d'épuration) pour produire du dioxyde de carbone, une nouvelle biomasse et de l'eau (biodégradabilité ultime). Cependant, si la biodégradation n'est pas totale, il est nécessaire d'établir un bilan du carbone pour quantifier la part de matériau résiduel ainsi que la formation des oligomères.

Le descriptif d'ensemble de la chaîne de mesure se présente en trois parties (Figure 1). Il comprend :

- **Un prétraitement de l'air:** L'air introduit est filtré et régulé. Des pièges à CO<sub>2</sub> (KOH et Ba(OH)<sub>2</sub>) éliminent le dioxyde de carbone présent dans l'air. L'air exempt de CO<sub>2</sub> condensé est distribué dans chaque réacteur.
- **Des bioréacteurs :** Le matériau à tester et/ou la référence sont introduits dans le milieu minéral et inoculés avec un surnageant de boues activées de station d'épuration. Pour tester un matériau, six réacteurs sont nécessaires : deux réacteurs contenant le matériau à tester (FT), deux réacteurs « blancs » caractérisant la respiration endogène des micro-organismes (FB), un réacteur de « référence positive » (FC) contenant la cellulose et permettant de vérifier la bonne activité des micro-organismes et un réacteur de « contrôle d'inhibition » des micro-organismes contenant le matériau à tester et la cellulose. Ainsi, la chaîne de mesure inclue neuf réacteurs pour tester deux matériaux en parallèle. Chaque réacteur est alimenté en entrée avec de l'air exempt de CO<sub>2</sub> et les gaz d'événements sont analysés en sortie pour déterminer la production en dioxyde de carbone.



**Figure 1:** Descriptif d'ensemble de la méthode.

- **Un système de piégeage du CO<sub>2</sub>**: Le gaz sortant de chaque réacteur est en continu piégé dans une solution d'hydroxyde de baryum (Ba(OH)<sub>2</sub>). La quantité de CO<sub>2</sub> produit est déterminée par titration de l'excès de Ba(OH)<sub>2</sub> par une solution normée d'acide chlorhydrique (HCl) en présence de phénophtaléine.

La teneur théorique en dioxyde de carbone (mg ThCO<sub>2</sub>) qui peut être produit par une oxydation totale du matériau est calculée. Alors, le taux de minéralisation est exprimé par :

$$\text{Taux de minéralisation} = \frac{(CO_2)_{\text{(matériau)}} - (CO_2)_{\text{(blanc)}}}{m \text{ ThCO}_2}$$

Avec :

(CO<sub>2</sub>)<sub>matériau</sub> est la quantité de CO<sub>2</sub> mesuré dans le réacteur contenant le matériau à tester (FT)  
 et (CO<sub>2</sub>)<sub>blanc</sub> dans le réacteur « Blanc » (FB).

### 3. Avantages et inconvénients d'une méthode manuelle de mesure.

Cette méthode est basée sur la titration manuelle et journalière des solutions d'hydroxyde de baryum ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ). Le  $\text{CO}_2$  produit est en continu piégé dans des flacons laveurs contenant une solution d'hydroxyde de baryum ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ). La quantité de  $\text{CO}_2$  est déterminée par titration de l'excès de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  par une solution normée d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) en présence de phénophtaléine. (Calmon *et al.*, 1999).

Si le test de Sturm semble la méthode la plus appropriée pour évaluer la biodégradabilité, certains problèmes sont encore mal appréhendés dans la mesure manuelle. Tout d'abord *le risque de fuite*, du fait du montage complexe et de la manipulation, impliquant une sous estimation du  $\text{CO}_2$  produit. Déconnecter les flacons-laveurs du système entraîne des fuites et par conséquence des erreurs de mesure qui vont entacher la courbe de cumul du dioxyde de carbone. Les titrations étant étroitement liées à l'opérateur, elles nécessiteront que ce soit la même personne qui procède aux dosages.

De plus, le *travail est laborieux* car le  $\text{CO}_2$  est piégé par une solution puis titré à intervalles réguliers pour chacune des lignes. Par exemple, pour un test d'une durée de 45 jours, la seule mesure du  $\text{CO}_2$  par la titrimétrie manuelle requiert un temps de main d'œuvre estimé à 100 heures.

Il convient également d'ajouter l'*engorgement de la chaîne*, car pour chaque ligne il faut placer en série 3 flacons laveurs en amont des réacteurs pour piéger le  $\text{CO}_2$ . Dans notre cas, pour tester 2 matériaux, 27 flacons laveurs sont utilisés.

Il est aussi nécessaire d'y adjoindre deux autres contraintes: de *larges volumes* de milieu minéral et une *faible quantité d'échantillon* introduite.

Enfin, se pose le problème des mesures en fin de semaines et les jours fériés. Dans ces cas là, l'hypothèse d'une autonomie suffisante des flacons laveurs est émise.

Il ressort que ce système est coûteux en personnel pour le laboratoire mais cette méthode reste la méthode de référence, car fiable et pratiquée depuis longtemps.

### 4. Avantages et inconvénients d'une méthode de mesure automatisée.

En vue de répondre aux problèmes cités précédemment, la conception d'une chaîne de mesure automatisée a été émise. La mesure repose sur la scrutation et l'analyse en discontinu du  $\text{CO}_2$  dans chaque réacteur à l'aide d'un analyseur infrarouge de gaz. L'ensemble est piloté par un ordinateur et permet le stockage de l'information.

Par rapport à la chaîne manuelle, les 2 dernières parties ont été modifiées :

- **Bioréacteurs** : Chaque réacteur est alimenté au départ en air exempt de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures (purge du milieu aqueux et de tous les volumes gazeux). Suite à cette étape, le volume gazeux en tête de réacteur est recyclé dans chaque réacteur pendant plusieurs heures grâce à des pompes.

- **Analyse**: Périodiquement, l'air en tête de chaque réacteur est entraîné par l'air exempt de CO<sub>2</sub> vers l'analyseur de gaz. Lorsque le temps d'analyse est terminé (balayage à blanc dû au renouvellement du gaz) le réacteur est isolé et fonctionne à nouveau en boucle fermée.

Cette chaîne de mesure présente néanmoins des inconvénients et des difficultés de mise en œuvre. Tout d'abord, un appareillage de mesure performant et fiable (soit de coût élevé) a été mis en place. Puis, des séquences de démarrage (balayage de tous les réacteurs avec air sans CO<sub>2</sub>), d'étalonnage et de mesure ont été réalisées. Un système complexe d'électrovannes permet de réaliser l'ensemble de ces séquences. La commande, la visualisation et l'acquisition des données est réalisée par un ordinateur compatible PC. La chaîne a été fiabilisée et protégée des pannes par un onduleur et une réserve d'air comprimé pour terminer les mesures en cours et attendre le retour à une situation normale.

En outre, des logiciels spécifiques ont été conçus pour gérer l'ensemble de la chaîne de mesure, acquérir, sauvegarder et traiter les données. Une vue plus détaillée de ce montage est donné sur la figure 3.

Cette chaîne de mesure comprend trois parties :

- un *système de prétraitement de l'air* avec un distributeur d'air (1 entrée et 10 sorties)
- les *9 réacteurs* (volume: 3 litres) équipés avec 9 pompes, 9 agitateurs magnétiques, 18 électrovannes 2/2 NF
- le *système d'analyse du gaz*: un débitmètre massique avec régulation, un analyseur de gaz CO<sub>2</sub> Binos 1004 (Gamme : 0 - 1000 ppm), un ordinateur PC industriel Arcom 104, un ordinateur PC en superviseur, trois électrovannes 2/2NF (2 étalons et une circulation d'air exempt en dioxyde de carbone), 2 Bouteilles de gaz étalon et 3 filtres coalesceurs.

Le logiciel de pilotage a été conçu et peut être utilisé sous deux versions soit en commande manuelle ou bien en commande automatique avec recyclage.

Les paramètres de réglage (fréquences des scrutations, des étalonnages) sont sauvegardés sur un fichier afin de les recharger dans le cas d'une défaillance. Sur l'écran, on visualise à tout instant le synoptique de l'état du système.

Schématiquement, l'organigramme du logiciel de commande est donné par la figure 4.

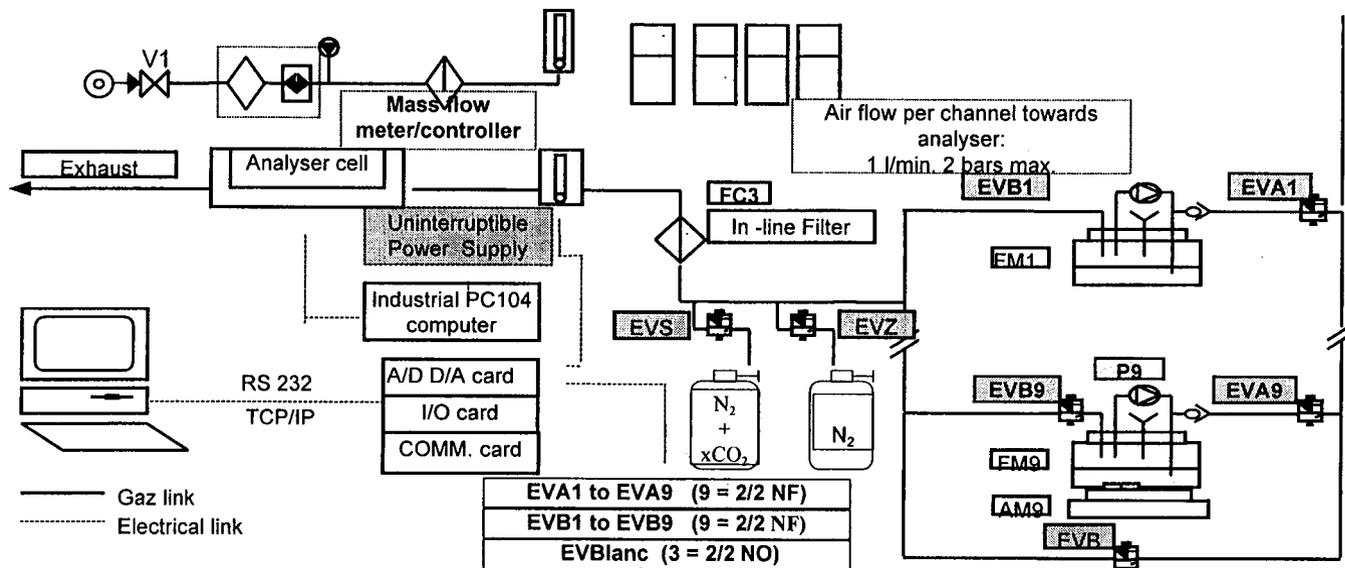


Figure 3 : Schéma général du banc automatique.

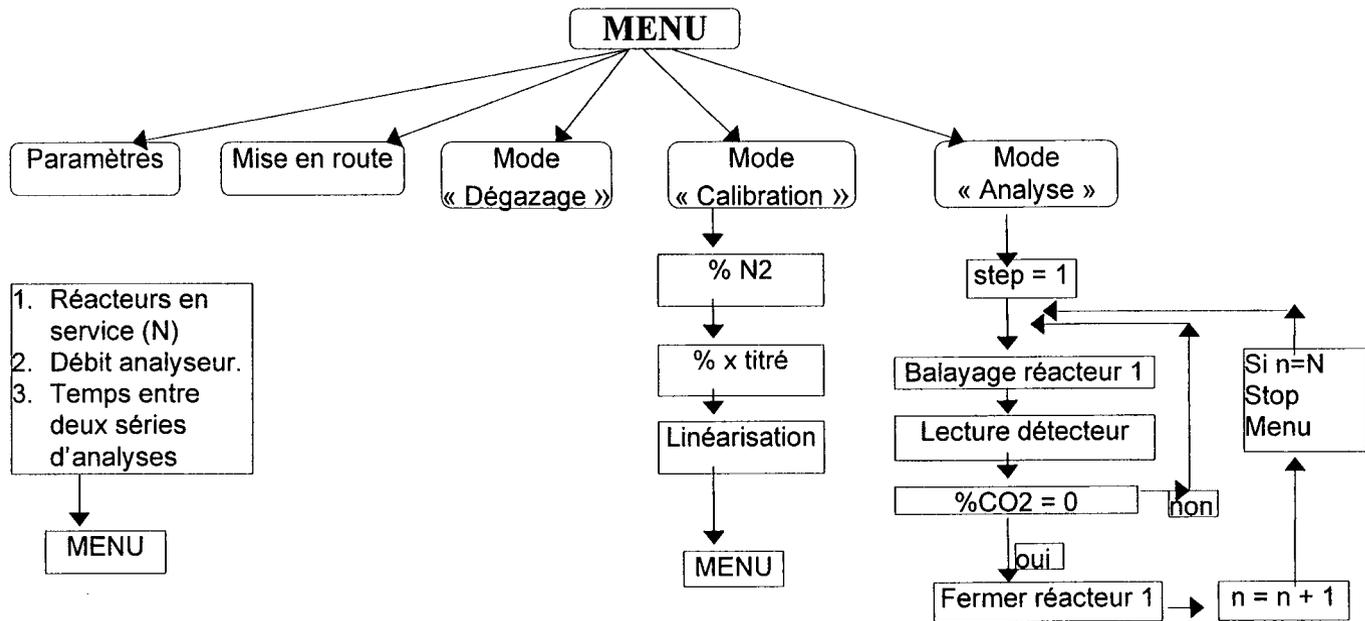


Figure 4. Organigramme de commande

## Résultats

La chaîne de mesure automatisée a été validée en comparant les résultats obtenus à ceux de la chaîne de mesure manuelle mise en place au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle – ENSC Toulouse (Calmon *et al.*, 1999).

Les premiers essais ont montré un gain de 30% sur la reproductibilité des mesures par rapport à la méthode manuelle (amélioration de l'écart type). En outre, comme les flacons laveurs en sortie des réacteurs sont remplacés par un analyseur de gaz, il en résulte un gain de place considérable dans l'encombrement du système.

En revanche, ce système est très complexe et la conception du logiciel de gestion est toujours dans sa phase d'élaboration.

## 5. Conclusions.

Les premiers essais en 1997-98 ont montré que, par rapport à la méthode manuelle de titration du CO<sub>2</sub>, l'automatisation des mesures permettait une meilleure reproductibilité des résultats, un plus faible coût d'utilisation et un encombrement réduit.

Par contre, les phases de mise au point sont longues et toujours en cours, vu la complexité du système.

Un autre objectif de cette étude, non abordé dans cet article, est la mise à disposition de cette chaîne de mesure de la biodégradabilité au public (industriels, utilisateurs, chercheurs) pour la mesure de la biodégradabilité de matériaux mais également des huiles et détergents avec un coût acceptable.

Enfin, grâce à cette chaîne de mesure automatisée, des études sont menées en vue de réduire les durées des analyses sans affecter leur fiabilité.

## 6. Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'ADEME, la DRRT (Délégation Régionale de la Recherche et de la Technologie) et la Communauté Européenne (SMT 4CT97-2167) pour l'aide financière. Ils remercient également JF. Mirabella pour sa participation technique au projet.

## 7. Références Bibliographiques

Calmon A., F. Silvestre, V. Belon-Maurel, J.M. Roger, P. Feuilloley 1999, Modelling easily biodegradability of materials in liquid medium – Relationship between structure and biodegradability. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, In press

Calmon A. L. Dusserre-Bresson, V. Bellon-Maurel, P. Feuilleley, F. Silvestre, 1999, An automated line for measuring polymer biodegradation, Submitted to *Chemosphere*.

Projet CEN, 1995, Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and desintegration of packaging materials under aqueous medium. Doc. 15/02/95. CEN/TC 261/SC4/N42.

Sturm R.N., 1973, Biodegradability of noionic surfactants : screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J. Oil Chem. Soc.* 50, 159-167.

# Tests de biodégradation anaérobie

## *Anaerobic Biodegradation Tests*

Merja Itävaara,

VTT Biotechnology and Food Research, PL 1500, 02044 VTT, Finland

Email:merja.itavaara@vtt.fi

**Résumé :** Après deux décennies de maturation, la technologie de traitement anaérobie des déchets est devenue une alternative viable au traitement aérobie des eaux usées concentrées ou des déchets solides. Elle possède 2 avantages intrinsèques. Non seulement, elle économise l'énergie nécessaire à l'aération, mais elle convertit également les déchets en combustible utile, le méthane (Jia *et al.*, 1996). Cependant, elle présente un désavantage : la nécessité d'un procédé aérobie en aval du procédé anaérobie pour dégrader les produits métaboliques nuisibles aux plantes si ceux-ci sont utilisés en culture. La digestion anaérobie de composés organiques complexes a été décrite par 3 étapes : 1) l'hydrolyse, la liquéfaction, et la fermentation, 2) la formation d'hydrogène et d'acide acétique et 3) la formation de méthane. Cinq groupes de bactéries seraient impliqués, chacun puisant leur énergie dans un nombre limité de réactions biochimiques (Gene *et al.*, 1987).

D'après le CEN, la biodégradabilité des polymères peut être évaluée par des tests soit aérobie, soit anaérobie. Les tests anaérobie standardisés peuvent être classés en 2 catégories : tests aquatiques ou les tests en milieu solide, selon qu'ils simulent le traitement des eaux usées ou le procédé de traitement des déchets solides. Les tests sont basés sur la mesure de la minéralisation des polymères (biodégradabilité ultime). En biodégradation anaérobie, les produits finaux sont le méthane et le CO<sub>2</sub> qui peuvent être mesurés de manière volumétrique ou par le suivi de pression. Nous présentons les résultats de nos études, les équipements pour la mesure en ligne de variation de pression et les systèmes de digestion anaérobie à l'état solide.

**Abstract :** *Anaerobic technology has matured during the past two decades to become a viable alternative to the aerobic treatment of concentrated industrial wastewaters, as well as solid waste. Anaerobic processes have two intrinsic advantages. They not only save the energy required for aeration but also convert waste into useful fuel, methane (Jia et al., 1996). However, they have the disadvantage of requiring an aerobic process after the anaerobic process in order to degrade the metabolic products that are harmful to plants if used in crop cultivation. Anaerobic digestion of complex organic compounds has been described as a three-stage process involving 1) hydrolysis, liquefaction and fermentation, 2) hydrogen and acetic acid formation, and 3) methane formation. Five groups of bacteria are thought to be involved, each deriving energy from a limited number of biochemical reactions (Gene et al., 1987).*

*According to CEN (European standardization committee), the biodegradability of polymers can be verified using either aerobic or anaerobic biodegradability tests. The standardized tests available for studying the anaerobic biodegradability of «biodegradable plastics» can be divided into aquatic and solid state tests that simulate waste water treatment and a solid state plant process respectively. The tests are based on the ultimate biodegradability measurement of polymer mineralization. In anaerobic biodegradation the final end products are methane and carbon dioxide which can be measured volumetrically or on the basis of the pressure change. Some of the results of our studies, the test equipment used for online pressure measurement, and the solid state anaerobic digestion systems will be demonstrated.*

**Mots clés :** Anaérobie, compostage

**Keywords :** Anaerobic process, compost

# 1. Introduction

The background to this presentation is the Biodegradable Polymers Technology Programme which was launched during 1992-1997 in Finland (Technology Programme Report 13/97). Several industrial companies, universities and research institutes were involved in this major undertaking aimed at developing biodegradable polymers for several purposes. The work is currently continuing in a number of smaller separate projects in different fields. The role of VTT Biotechnology and Food Research has been to support other ongoing projects by providing biodegradability testing and the development of suitable methods. In addition, standardization in CEN (European standardization committee) has been an important part of the work in verifying the testing methods.

At present there is a large range of tests in CEN for studying the aerobic or anaerobic biodegradability of packaging materials and biodegradable plastics. The origin of the microbial inoculum used in the test systems is important because the microbial communities vary considerably depending on the conditions and available nutrients.

## 2. The conditions and microbes involved in anaerobic biodegradation

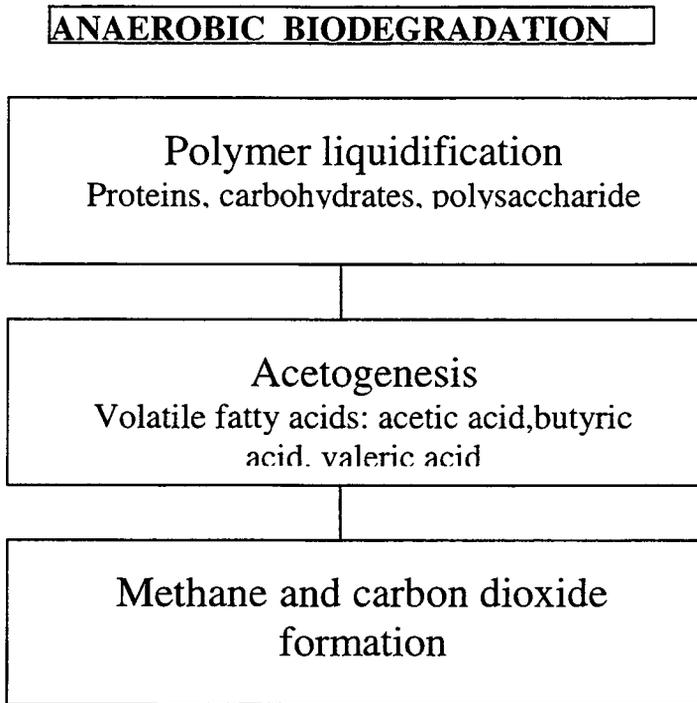
The prerequisite for anaerobic biodegradability is that no oxygen is present in the test system. The optimum pH of the medium is about 6.5-7.0 and the medium is kept in reduced conditions. The inoculum is derived from either an ongoing anaerobic reactor in a sewage treatment facility or from an anaerobic solid state plant. Incubation is performed in completely anoxic conditions, and a redox indicator is added to indicate any leaks in the system.

Two main types of microbial groups are involved in biodegradation under anaerobic conditions : **facultative microorganisms** which are capable to live in both aerobic and anaerobic conditions and **strictly anaerobic microorganisms** which fail to grow if oxygen is present.

Some of the techniques and requirements for isolating strictly anaerobic microorganisms acetogens:

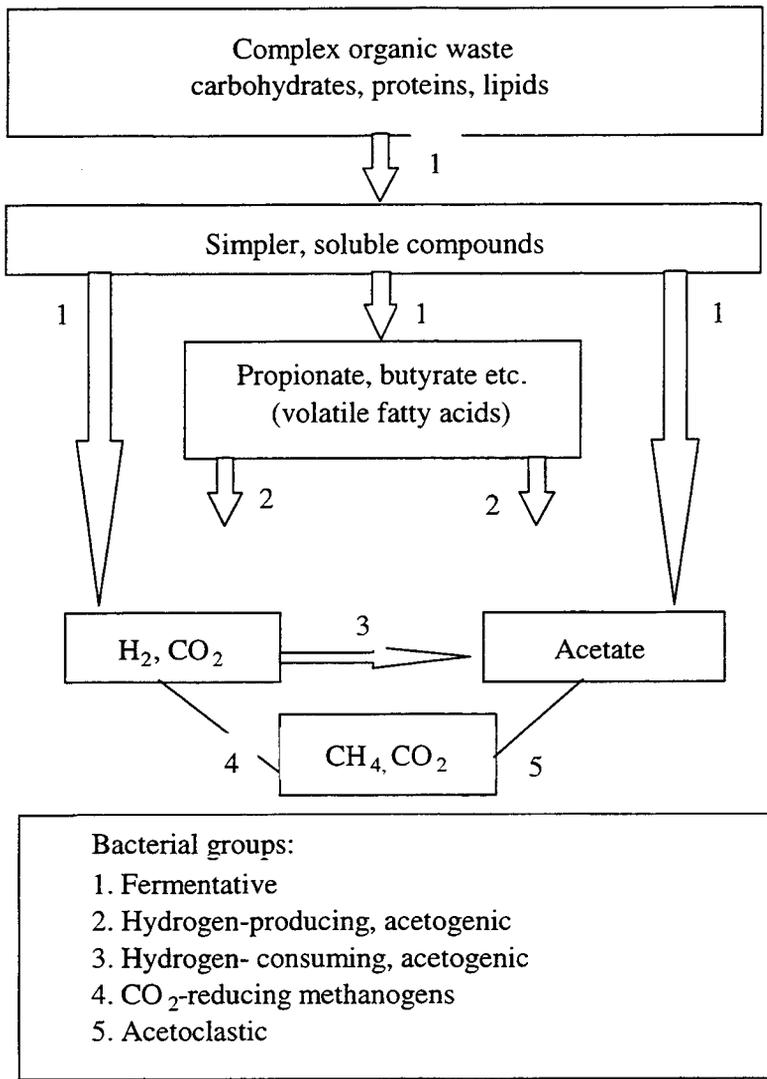
- Strict anaerobes (Hungate technique) : **référence ?**
- growth medium redox potential less than -200 mV (sodium sulphide, cysteine, dithionite, dithiothreitol)
- growth pH optimum 6.5-7.7 (some pH 8-9)
- CO<sub>2</sub> required (terminal electron acceptor)
- trace metals (metalloenzymes)

The anaerobic digestion of complex organic compounds can be described as a three-stage process shown below (Figure 1).



*Figure 1. 1) Hydrolysis, liquefaction and fermentation, 2) hydrogen and acetic formation and 3) biogaz formation*

In Figure 2 are described the phenomena involved in the anaerobic process. The anaerobic biodegradation of complex polymers starts with hydrolysis of the polymers to soluble compounds that can be absorbed by microbial cells. After the complex polymers have been fermented to smaller oligomers, smaller organic compounds are formed such as propionic-, butyric-, and valeric acid. This phase is commonly called the acid-forming phase. The bacterial population responsible for acid production may be facultative anaerobes, strict or obligate anaerobes (to which oxygen is toxic) or a combination of both. Acetic acid, hydrogen and carbon dioxide are also formed during the production of organic acids. Hydrogen is inhibitory to many of the acid-forming bacteria and must be removed from the system if acid production is to continue. Fortunately, hydrogen is an energy source for some methanogenic bacteria and is rapidly consumed in the reduction of carbon dioxide to methane.



*Figure 2. Process of the anaerobic digestion  
Five bacteria groups are considered to be responsible for the complete mineralization of complex polymers in anaerobic conditions.*

The final end product of the mineralization of complex polymers is in the formation of biogas comprising a mixture of carbon dioxide and methane. Standardized anaerobic biodegradability tests are based on measurement of the mineralization degree of the organic compounds. The amount of biogas formed during mineralization can be determined by gas chromatography, volumetrically or by pressure measurement inside the vessels.

### **3. Standard anaerobic biodegradation tests**

Several standardization bodies such as CEN, ISO (International standardization organization) and ASTM (American Society for Testing and Materials) are developing biodegradability tests for biodegradable plastics and polymers. The anaerobic tests can be roughly divided into aquatic and solid state condition tests.

#### **1. Aquatic anaerobic test (ASTM D 5210)**

- inoculum from an anaerobic waste water treatment facility
- 35-37°C testing temperature

#### **2. Anaerobic digestion in solid state conditions (ASTM D5511-94, CEN Draft)**

- inoculum from an anaerobic plant treating solid waste
- > 52°C testing temperature

### **4. Equipment and some results from VTT's studies**

#### **4.1 Online aquatic anaerobic biodegradability test**

The aquatic anaerobic test includes the preparation of a mineral nutrient medium which is made anoxic by liquid nitrogen gasification through the medium. A redox indicator resazurin is added to indicate any leaks in the flasks. The redox indicator will turn red in the presence of oxygen and is colourless in anoxic conditions.

The amount of sample (biodegradable plastics) is very small, only 10-30 mg/flask, and the amount of mineral nutrient per flask is 50 ml/120 ml head-space flasks. The inoculum for this test is derived from an anaerobic waste water digestion facility. The concentration of the inoculum is 10% of the volume.

According to the standard, the generated biogas is measured by releasing the pressure by means of a syringe and needle weekly. If, however, the biodegradability is very slow, piercing the rubber cap may cause a leak and errors in the result. We therefore constructed an automated measuring system based on the online determination of the pressure increase inside the head-space flasks. The system comprise 40 head-space flasks (vol. 120 ml), each with a pressure transducer connected by means of a sealed needle into the flasks. The online measurement system makes it possible to monitor the length of the lag phase and to determine the right time for releasing the biogas. If, however, a very small amount of sample is studied, the test can be continued without releasing the biogas.

## 4.2 Anaerobic digestion in solid state conditions (ASTM D 4411-94, CEN Draft) Evaluation of the Ultimate Anaerobic Biodegradability and Disintegration of Packaging Materials under High-solids Anaerobic Digestion Conditions (CEN Draft)

This method is simple and is based on the volumetric measurement of biogas after it is released into a water column. The amount of sample is larger, and the test is performed by adding the sample to an inoculum, taken from a solid state plant, with a dry weight content of about 20-30%. In Finland there is only one solid state anaerobic digestion plant.

### 4.2.1 Calculation of the biodegradability in anaerobic conditions

1 mmol (=12 mg) of inorganic carbon as either CH<sub>4</sub> or CO<sub>2</sub> in the biogas occupies a volume of 22,4 ml at NTP according to the ideal gas law. At 35°C, which is the incubation temperature in the anaerobic test, the volume is 26,7 ml. The amount of organic carbon is first determined on a carbon analyzer and the theoretical amount of biogas is calculated on the basis of the amount of organic carbon in the sample.

Theoretical gas volume  $V_{\text{theor}}$

$$V_{\text{theor}} = \frac{m(\text{mg}) * x * 26,71 \text{ ml}}{100 * 12 \text{ mg}}$$

$V_{\text{theor}}$  = theoretical amount (ml) generated from the samples

m = sample weight

x = carbon content (%)

$V_{\text{cumulative}}$  = the cumulative amount of biogas generated during the test

**Anaerobic biodegradability degree is calculated as follows:**

$$\frac{V_{\text{cumulative}}}{V_{\text{theoretical}}} * 100 = \text{biodegradability-\%}$$

## 5. Are polymers which are biodegradable in anaerobic condition also biodegradable in aerobic conditions?

The biodegradability of polymers is affected, in addition to the chemical structure and macro morphology, also by the environmental conditions. Questions that are often raised are: Are polymers which are biodegradable in aerobic conditions also biodegradable in anaerobic conditions? When should anaerobic biodegradability be tested?

Up until now very little data have been published on the comparison of aerobic and anaerobic biodegradability of the same polymers.

## 6. Aerobic and anaerobic biodegradation of polylactide

We compared the biodegradability of polylactide in aerobic and anaerobic conditions at several elevated temperatures in aquatic and solid state conditions, e.g. composting and anaerobic digestion. Polylactide was chosen for the studies because it is one of the most promising polymers that can be manufactured for several medical and environmental applications.

Aerobic biodegradability in the aquatic head-space test has been shown to increase at elevated temperatures (Hiltunen *et al.*, 1997). The same increase occurs also in anaerobic conditions at elevated temperatures. Temperature enhances hydrolysis of the polymer, thus making it more susceptible to microorganisms. Near the glass transition stage at around 60°C, the biodegradability was faster than that in aerobic conditions. Polylactide biodegraded by 60% in about 40 days at +52°C in anaerobic conditions, while in aerobic conditions the biodegradability was 60% during 100 days.

## 7. Conclusions

The industry designing polymers should keep the applications of biodegradable polymers in mind in the early phase of the development work. This is because, in addition to aerobic or anaerobic biodegradation, different environmental conditions have different physicochemical conditions (e.g. temperature, humidity, pH) that affect the biodegradation. It is also recommendable to test the biodegradability in conditions that are as close as possible to the final fate of the polymer in the environment.

## 8. References

- Jia, X., S., Furumai, H., Fang, H., H.P. 1996. Extracellular polymers of hydrogen-utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludges. – *Wat. Res.* **30**, 6, 1439-1444.
- Gene, F., P. and Owen, W.F. 1987. Fundamentals of Anaerobic digestion of wastewater sludges. – *J. Environ. Engin.* **112**, 5, 867-920.
- Hiltunen, K., Seppälä, J.V., Itävaara, M. and Härkönen, M. 1996. Biodegradation of lactic acid based poly(ester-urethanes). - *Journal of Environmental Polymer Degradation* **5**, 3, 167-173.



## **QUELQUES TENDANCES DE LA RECHERCHE**

- Vers une standardisation de l'inoculum microbien  
Jean-Luc ROLS, INSA Toulouse
- Matériaux biodégradables et compostage  
Christian Belloy, ARD Reims
- Modèle de prédiction de la dégradation en milieu naturel  
Françoise Silvestre, ENSC Toulouse
- Biodégradabilité et lombriculture  
Nathalie Alauzet, CNRS Montpellier
- Test et biodégradabilité sur lit de vermiculite  
Francesco Degli Innocenti, NOVAMONT Italie



# Vers une standardisation de l'inoculum microbien des tests de biodégradabilité facile

## *Towards a standardization of the microbial inoculum for ready biodegradability tests*

Gabriela Vazquez-Rodriguez, Alain Lançon, Gérard Goma et Jean-Luc Rols  
Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, UMR-CNRS 5504, UR-INRA 792  
Institut National des Sciences Appliquées,  
Complexe Scientifique de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France  
Tél (33) 5 61 55 94 47 ; Fax (33) 5 61 55 94 00 ; e-mail : [rols@insa-tlse.fr](mailto:rols@insa-tlse.fr)

**Résumé :** Les tests de biodégradabilité facile sont souvent limités par manque de précision sur certaines conditions opératoires (principalement la source et la qualité de l'inoculum), ce qui engendre un manque de reproductibilité. Dans cet article, il est évalué l'effet de procédures de préparation (décantation, aération prolongée, acclimatation) de l'inoculum (provenant de procédés à boues activées traitant des eaux usées urbaines) visant à harmoniser les densités cellulaires. Le protocole de préparation de l'inoculum proposé comprend des étapes successives d'aération (4 h), de centrifugation (500 g, 4 mn) et de culture en mode discontinu du surnageant dans un milieu nutritif.

**Abstract :** Ready biodegradability tests are often limited because of a lack of definition in some operating conditions (mainly inoculum source and quality), which can be critical for reproducibility and efficiency. In this paper, the effects of some preparation procedures (decantation, extended aeration, acclimation) of the inoculum (collected in municipal wastewater treatment plants operating with activated sludge processes) are evaluated related to the harmonization of the cellular densities. The protocol suggested for inoculum preparation includes an aeration step (4 hrs), a centrifugation (500 g for 4 min) and a discontinuous culture of supernatant in nutritif liquid medium.

**Mots-clés :** Biodégradabilité facile, tests normalisés, inoculum, boues activées

**Keywords :** Ready biodegradability, standard tests, inoculum, activated sludge

## 2. Introduction

Les tests normalisés de biodégradabilité facile constituent un ensemble de tests de triage basés sur la mesure de la biodégradabilité ultime d'une molécule. Leur caractéristique principale réside dans les conditions opératoires limitant les possibilités de biodégradation de la substance et d'acclimatation des micro-organismes au cours du test. Ces conditions de réalisation permettent d'obtenir une information générale sur la biodégradabilité des produits chimiques dans la plupart des conditions environnementales. Cependant, et pour une même substance, la comparaison entre les différents tests proposés est difficile à réaliser car leur degré de stringence est très variable. Celui-ci décroît généralement dans l'ordre suivant : bouteille close, MITI, OCDE modifié, Sturm (Blok *et al.*, 1985). Le choix des inocula microbiens s'avère être la cause de variabilité, de par leur origine et pré-traitement dissemblables selon les tests. Les boues activées et les effluents secondaires constituent les sources de biomasse les plus courantes, mais pour certains tests, il est possible d'utiliser des eaux de surface, des extraits de sol ou de compost ou même un mélange de ceux-ci. Dans la plupart des cas, et même si le choix de la source de l'inoculum détermine la densité cellulaire initiale du test, aucune restriction n'est faite à ce sujet (Thouand, 1993). De même, l'inoculum peut subir des traitements physiques préalables selon les protocoles, ce qui représente une source de variabilité supplémentaire et limite la reproductibilité du test (Gerike et Fischer, 1979 ; van Ginkel *et al.*, 1994 ; Vazquez-Rodriguez *et al.*, 1999).

Les boues activées secondaires provenant de stations d'épuration d'effluents urbains sont considérées comme une source convenable d'inocula actifs et ayant une diversité microbienne importante. Bien que ces dispositifs d'épuration soient différents par plusieurs aspects, ils présentent certaines caractéristiques communes (i.e., temps de séjour hydraulique, caractère aérobie, biocénose de floccs) qui rendent les boues activées plus comparables que d'autres sources (Blok *et al.*, 1985). Compte tenu de tels avantages, notre contribution a pour objectif de mettre en évidence les variations en qualité et quantité associées aux boues activées et la conséquence pour un test de biodégradabilité, ainsi qu'à évaluer la possibilité d'obtenir d'une façon reproductible un inoculum microbien standard à partir de boues activées issues de stations d'épuration différentes.

## 3. Matériels et méthodes

### 3.1 Caractéristiques des boues activées

Trois échantillons de boues activées secondaires issues de stations d'épuration municipales différentes ont été utilisées. Les paramètres de fonctionnement de ces stations sont présentés dans le Tableau 1.

Paramètre	Procédé		
	Forte charge	Moyenne charge	Faible charge
Lieu de prélèvement	Toulouse	Toulouse	Flourens (31)
Charge volumique [kgDBO <sub>5</sub> m <sup>-3</sup> j <sup>-1</sup> ]	2-6	0,6 - 1,6	0,125 - 0,5
Age des boues [j]	4	10	30
Matières en suspension [gMES l <sup>-1</sup> ]	5,0	3,1	5,9
Indice de Mohlmann [ml gMES <sup>-1</sup> ]	52	131	169

Tableau n° 1 : Caractéristiques des boues activées utilisées

### 3.2 Préparation de l'inoculum

Les inocula sont préparés à partir des boues activées décrites dans le Tableau 1. Ces boues sont aérées pendant 4 heures sous agitation en accord avec le protocole normalisé de Sturm (OCDE 301B), de façon à éliminer le carbone organique dissous (COD) endogène à la boue. Cette opération peut être supprimée dans le cas d'une boue à faible charge, mais peut *a contrario* s'avérer insuffisante pour une boue à forte charge. Après aération, les boues sont traitées soit par décantation pendant 30 minutes (protocole standard), soit par centrifugation à 500 g pendant 4 minutes dans des pots stériles. Ces traitements sont censés aboutir à une densité cellulaire minimale dans le surnageant de 10<sup>5</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, celle-ci étant le seuil exigé par le Projet CEN (1995) d'évaluation de la biodégradabilité ultime de matériaux polymères.

### 3.3 Aération prolongée de l'inoculum

100 ml de surnageant de boues activées obtenu par décantation sont transférés stérilement dans des fioles d'erlenmeyer bafflées d'un litre, et maintenus sous agitation constante à 22 °C.

### 3.4 Pré-culture discontinue de l'inoculum

Des pré-cultures en mode discontinu des surnageants de boues activées sont réalisées dans un milieu nutritif de composition : extrait de levure (0,1 g l<sup>-1</sup>) ; peptone (1 g l<sup>-1</sup>) ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,0123 g l<sup>-1</sup>) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,117 g l<sup>-1</sup>) et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,15 g l<sup>-1</sup>). Ces concentrations ont été calculées en fonction du carbone total amené par la peptone et l'extrait de levure (environ 450 mgCOD l<sup>-1</sup>). Un fermenteur de marque SGI (volume utile de 1,3 l) a été utilisé. Le taux d'inoculation du milieu est de 10 % v/v. L'agitation est contrôlée afin de maintenir la teneur en oxygène dissous à 50 % de la saturation à l'air, la température est maintenue à 23 °C, tandis que le pH, non régulé, varie entre 6,5 et 7,2.

### 3.5 Tests de biodégradabilité de l'acétate de sodium

Une adaptation du test OCDE modifié (OCDE 301 E) a été utilisée. Elle est basée sur le suivi de la disparition du COD provenant de l'acétate de sodium. Le milieu minéral utilisé est celui décrit par Strotmann *et al.* (1995). Les essais sont menés en fioles d'erlenmeyer bafflées d'un litre, maintenues sous agitation constante à 22°C. La concentration initiale en substrat est de 50 mgCOD l<sup>-1</sup>. Dans tous les cas, un taux d'ensemencement de 1 % v/v a été utilisé.

### 3.6 Techniques analytiques

Les profils d'activités enzymatiques des surnageants des boues activées ont été détectés par le système API-ZYM (bioMérieux). Cette microméthode permet une étude semi-quantitative de 19 enzymes hydrolytiques spécifiques, parmi lesquelles des phosphatases, estérases, lipases, protéases et glucosyl hydrolases. La durée d'incubation des galeries est de 4 heures à 37 °C. La densité des cellules viables (unités formant colonies ou UFC) a été mesurée par la culture sur microgouttes (incubation pendant 24 heures à 30 °C) sur milieu solide (Biokar Diagnostics), décrite par Fung *et al.* (1976). Les activités déshydrogénasiques exogène et endogène ont été dosées par la méthode de Thouand et Block (1993). La mesure du COD est faite par un analyseur de carbone Dohrmann DC 180.

## 4. Résultats

Dans un premier temps, les facteurs majeurs pouvant influencer la qualité d'une boue activée issue d'une station de traitement d'eaux urbaines (l'âge des boues et le pré-traitement) ont été étudiés. Ensuite, l'efficacité de deux méthodes de conditionnement de l'inoculum (aération prolongée, pré-culture) ont été évaluées par le biais de tests de biodégradabilité de l'acétate de sodium.

### 4.1 Incidence de l'âge des boues sur la qualité des inocula

Les boues activées (voir Tableau 1) ont été traitées après aération (4 h) par décantation (30 mn) ou centrifugation (500 g, 4 mn) de façon à obtenir des surnageants ayant une teneur en COD et une densité cellulaire inférieures aux boues originales. Ces surnageants ont été caractérisés par leur viabilité (voir Tableau 2) et leur profil d'activités enzymatiques (voir Figure 1).

Station d'épuration	Viabilité des boues entières (UFC ml <sup>-1</sup> )	Viabilité du surnageant de décantation (UFC ml <sup>-1</sup> )	Viabilité du surnageant de centrifugation (UFC ml <sup>-1</sup> )
Forte charge	2 x 10 <sup>8</sup>	5,8 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>
Moyenne charge	1,5 x 10 <sup>7</sup>	9 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>
Faible charge	5,5 x 10 <sup>6</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>

Tableau n° 2 : Viabilité des boues et surnageants pour les trois stations d'épuration

Les boues activées à forte charge présentent une densité cellulaire supérieure, du fait du faible âge de boues et de l'absence de prédateurs dans un tel système d'épuration. L'étape de décantation permet d'abaisser significativement la teneur en UFC dans les surnageants, tout en réduisant partiellement l'écart entre les trois boues. Par contre, l'étape de centrifugation dans des conditions douces apporte un gain en terme d'harmonisation des teneurs en UFC, celles-ci restant supérieures au seuil de 10<sup>5</sup> UFC ml<sup>-1</sup> recommandé par le Projet CEN (1995). Un traitement des boues activées pré-aérées par centrifugation est donc préférable à la décantation et constitue une première étape de standardisation de l'inoculum.

Les enzymes hydrolytiques testées, qui hydrolysent des lipides (lipases,

estérases), protéines (protéases, estérases, aminopeptidases), acides nucléiques (phosphatases) ou liaisons de carbohydrates (glucosyl hydrolases), sont ubiquitaires dans l'environnement et peuvent agir sur une grande variété de substances. Les profils d'activités enzymatiques des surnageants de décantation obtenus sont très différents (voir Figure 1).

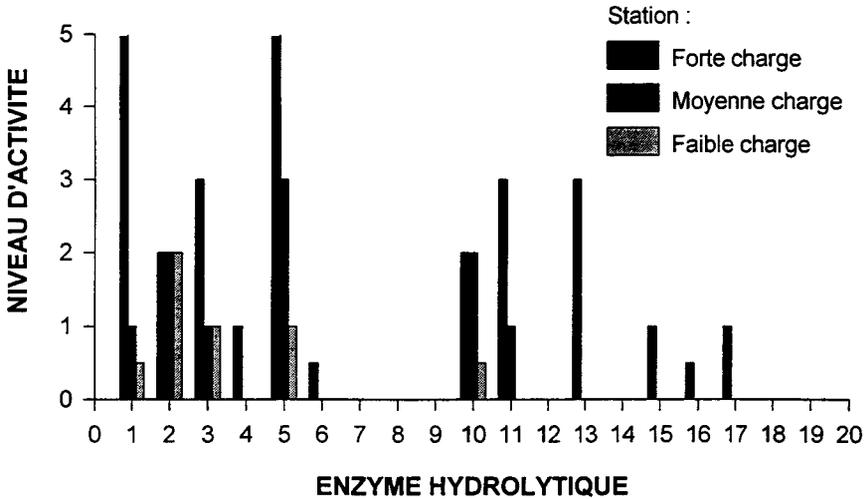


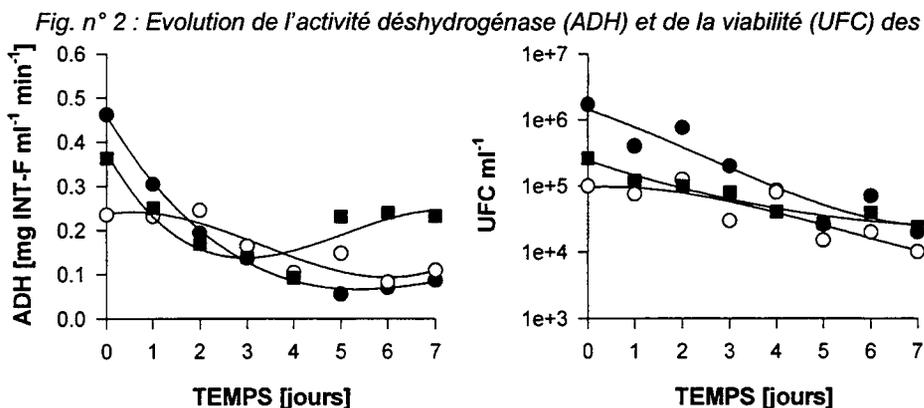
Fig. n° 1 : Profils enzymatiques des surnageants de boues activées obtenus par décantation  
 1, 10-11 : phosphatases et phosphohydrolases, 2-4 : estérases et lipases,  
 5-7 : aminopeptidases, 8-9 : protéases, 12-19 : glycosyl hydrolases

Les enzymes communes aux trois boues sont les phosphatases alcaline et acide (1 et 10), les estérases (2 et 3) et la leucine arylamidase (5). Pour toutes les enzymes testées, l'activité maximale est obtenue avec la boue à forte charge, laquelle a aussi présenté le spectre le plus varié (12 enzymes sur 19 contre 6 et 5 pour les boues à moyenne et faible charges, respectivement). Ces profils d'activités enzymatiques résultent à la fois du niveau de réactivité des micro-organismes et de leur diversité. L'effet induit par la limitation nutritionnelle dans un système de traitement à faible charge est en particulier de limiter les niveaux d'activités enzymatiques et les densités cellulaires, ce qui laisse présager d'un potentiel de dégradation restreint. Le seul fait de choisir parmi les différents systèmes à boues activées peut donc être à l'origine de grands écarts dans la qualité des inocula utilisés.

## 4.2 Incidence de l'aération prolongée des inocula

Les tests normalisés basés sur des méthodes respirométriques préconisent une période d'aération des boues en absence de substrat pour réduire l'activité de l'essai témoin (mesure de la respiration endogène de l'inoculum). La durée de cette période n'est pas définie (jusqu'à 7 jours). Pour connaître l'effet de ce conditionnement sur les caractéristiques des populations, trois inocula (surnageants de décantation) issus de boues activées différentes ont été soumis à une période d'aération de 7 jours en absence de substrat. La viabilité (teneur en

UFC) et l'activité respiratoire (activité déshydrogénasique) ont été suivies tout au long de la période d'aération (voir Figure 2).



surnageants de décantation de boues activées soumis à une aération prolongée.  
 ● : forte charge ; ○ : moyenne charge et ■ : faible charge.

L'activité respiratoire (ADH) constitue un indice important du potentiel oxydatif de la biomasse. Elle est exprimée par la différence entre les activités déshydrogénases exogène et endogène. Pour les surnageants à forte et faible charges, une diminution de l'activité respiratoire est initialement observée, avant l'obtention d'une valeur palier. Pour le surnageant à moyenne charge, l'activité respiratoire n'a commencé à décroître qu'à partir du troisième jour. Au terme de la période d'aération, les activités respiratoires sont inférieures aux valeurs initiales. Quant à la viabilité, la période d'aération en carence de substrat a eu également pour effet de réduire la teneur en UFC, mais également d'harmoniser les niveaux résiduels. Cependant, ceux-ci passent en dessous du seuil de  $10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> après 4 jours d'incubation.

Deux séries d'essais de biodégradabilité d'acétate de sodium (unique source de carbone) ont été réalisées, la première avec les trois inocula avant la période d'aération et la seconde au terme de celle-ci (voir Tableau 3). Afin de comparer les cinétiques de dégradation obtenues, les temps de latence (temps au bout duquel 10 % du COD initial est dégradé) et de demi-vie (temps au bout duquel 50 % du COD initial est dégradé) ont été estimés. Pour tous les essais, le taux de dégradation final du COD est de l'ordre de 85 %.

	0 jours d'aération			7 jours d'aération		
	FC	MC	fC	FC	MC	fC
Temps de latence (h)	6,2	11,8	13	11,9	11,7	12
Temps de demi-vie (h)	9,5	13,5	15,1	14,1	12,6	14,2

Tableau n° 3 : Résultats des tests de biodégradabilité de l'acétate avec des surnageants de décantation de boues activées ayant subi ou pas une aération prolongée. FC : forte charge ; MC : moyenne charge et fC : faible charge.

Les temps de latence obtenus avec les inocula non-aérés illustrent l'hétérogénéité existant entre les surnageants de boues activées suivant leur origine. Cette phase est nécessaire pour réactiver le potentiel enzymatique des micro-organismes. La période d'aération de 7 jours permet d'harmoniser les profils cinétiques (temps de latence et de demi-vie quasi identiques), cette harmonisation se faisant toutefois par rapport aux caractéristiques les plus défavorables (temps de latence élevé). Ce protocole de préparation de l'inoculum peut ne pas être adapté dans le cas de molécules plus difficilement biodégradables : celui-ci engendrerait des durées d'essai de biodégradabilité trop importantes. Il a cependant le mérite de standardiser l'inoculum issu de stations d'épuration par boues activées différentes.

### 4.3 Incidence de la pré-culture des inocula

Le processus d'acclimatation d'un inoculum consiste à pré-cultiver celui-ci dans un milieu contenant une source de carbone facilement assimilable autre que la substance testée. Ceci permet de réactiver la flore microbienne et de disposer du potentiel de dégradation de la population. De manière à éviter tout phénomène de sélection qui réduirait la diversité microbienne de l'inoculum, la pré-culture est réalisée en mode discontinu sur une courte période et avec un milieu nutritif à base d'extrait de levure et de peptone. Deux inocula (surnageants de décantation) issus de boues activées différentes ont été pré-cultivés (voir Figure 3).

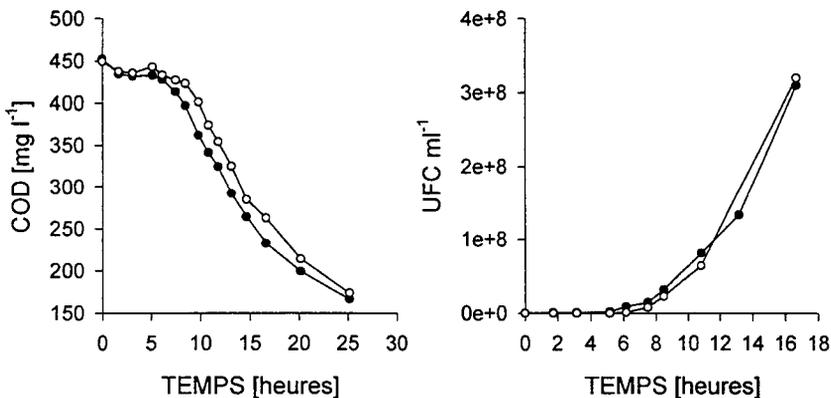


Fig. n° 3 : Evolution du carbone organique dissous (COD) et de la viabilité (UFC) des surnageants de décantation de boues activées soumis à une pré-culture.

● : forte charge ; ○ : moyenne charge.

Les profils cinétiques de consommation du COD et d'accumulation d'UFC sont similaires. Ceci est dû aux conditions initiales qui sont favorables à la croissance microbienne : emploi d'un milieu nutritif et niveau d'inoculation faible par rapport à la quantité de biomasse produite. Il en résulte une excellente harmonisation de la viabilité. Une seconde conséquence est liée à la possibilité de doser correctement les UFC moyennant une corrélation avec l'Absorbance de la culture à 600 nm (cette mesure n'est pas possible sur les surnageants de boues activées trop dilués). On dispose ainsi d'un paramètre permettant d'apprécier le niveau d'UFC et d'inoculer le test de biodégradabilité de la substance avec un rapport volumique adapté au niveau initial d'UFC recherché (par exemple  $10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ).

Deux séries d'essais de biodégradabilité d'acétate de sodium (inoculation à 1 % v/v) ont été réalisées, la première avec les deux inocula avant la pré-culture et la seconde au terme de celle-ci (voir Tableau 4). Alors que les temps de latence et de demi-vie sont bien différents pour les tests réalisés avec les inocula non pré-cultivés, une excellente harmonisation de ces paramètres cinétiques est obtenue avec les inocula pré-cultivés. Remarquons que les cinétiques sont beaucoup plus rapides, cela provenant d'un taux d'UFC initial important du fait du critère d'inoculation volumique choisi (1 % v/v). Le contrôle des conditions d'inoculation par la mesure d'Absorbance de la pré-culture doit permettre de se placer à un taux initial d'UFC indépendant des caractéristiques de la pré-culture. Avec le choix du niveau d'inoculation en UFC, il est possible de contrôler la durée de la phase de latence du test de biodégradabilité, de manière à réduire la durée du test et à mieux reproduire les conditions de réalisation.

	Avant pré-culture		Après pré-culture	
	FC	MC	FC	MC
Temps de latence (h)	5,5	9,4	2,2	2,2
Temps de demi-vie (h)	8,5	12,3	5,2	5

*Tableau n° 4 : Résultats des tests de biodégradabilité de l'acétate avec des surnageants de décantation de boues activées ayant subi ou pas une pré-culture. FC : forte charge ; MC : moyenne charge.*

## 5. Conclusions

De manière à harmoniser les caractéristiques microbiologiques d'échantillons de boues activées, il est recommandé par certaines normes des étapes de pré-conditionnement (décantation, aération prolongée ou pré-culture). Une étude, visant à évaluer l'incidence de ces étapes sur des boues activées issues de stations d'épuration urbaines fonctionnant à forte, moyenne et faible charges massiques, a été réalisée. Les techniques analytiques utilisées reposent sur la viabilité cellulaire, l'activité respiratoire, le potentiel d'activités enzymatiques hydrolytiques et l'analyse cinétique de tests de dégradation d'acétate de sodium. L'étape de décantation des boues activées est très dépendante de la nature des floccs ; il est préféré une étape de centrifugation (4 minutes à 500 g) qui permet d'atteindre un premier degré d'harmonisation des densités cellulaires. L'étape d'aération prolongée (en absence de substrat) permet une excellente

harmonisation de tous les paramètres testés, qui tendent cependant vers des seuils (niveau d'UFC) défavorables pour la mise en oeuvre du test. Inversement, une étape de pré-culture (de courte durée), dans un milieu nutritif, permet de réactiver la flore microbienne et d'harmoniser les paramètres à des seuils plus favorables. Sur la base des résultats de cette étude, il est actuellement possible de proposer un protocole de préparation de l'inoculum adapté aux caractéristiques initiales de la boue activée utilisée.

## 6. Bibliographie

Blok J., de Morsier A., Gerike P., Reynolds L. et Wellens H., 1985, Harmonisation of ready biodegradability tests, *Chemosphere* 14 (11-12), p. 1805-1820.

CEN, 1995, Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and desintegration of packaging materials under aqueous medium: Part 1: method by analysis of released carbon dioxide, *Draft method*, Doc. 15/02/95, CEN/TC261/SC4/N42.

Fung D.Y.C., Donahue R., Jensen J.P., Ullmann W.W., Hausler W.J. et Lagrange W.S., 1976, A collaborative study of the microtiter count method and standard plate count method for viable cell count of raw milk, *J. Milk Food Technology*, 39, p. 24-26.

Gerike P. et Fischer W.K., 1979, A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 3, p. 159-173.

OCDE, 1992, Ready biodegradability, n° 301 B : modified Sturm test. In : Guidelines for testing of chemicals, Paris, France.

OCDE, 1992, Essai de « screening » modifié, n° 301 E. In : Guidelines for testing of chemicals, Paris, France.

Strotmann U.J., Schwarz H. et Pagga U., 1995, The combined CO<sub>2</sub> / DOC test – a new method to determine the biodegradability of organic compounds, *Chemosphere*, 30, p. 525-538.

Thouand G., 1993, Maîtrise des inocula bactériens utilisés dans les essais de biodégradabilité aérobie. *Thèse de Doctorat*, Université Nancy I.

Thouand G. et Block J.C., 1993, Utilisation d'inocula pré-cultivés dans les essais de biodégradabilité aérobie, *Environ. Technol.*, 14, p. 601-614.

Van Ginkel C.G., Haan A., Luijten M.L.G.C. et Stroo C.A., 1995, Influence of the size and source of the inoculum on biodegradation curves in closed-bottle tests, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 31, p. 218-223.

Vazquez-Rodriguez G., Palluy F., Goma G. et Rols J.L., 1999, Procedures in ready biodegradability testing : effects of the inoculation and the monitored parameter, *Environ. Technol.*, 20, p. 301-308.

# Matériaux biodégradables et compostage

## *Tendances de la recherche sur la biodégradabilité des matériaux en conditions de compostage*

Christian Belloy

ARD - Route de Bazancourt - 51110 POMACLE - FRANCE

Tél. 03 26 05 42 80 – Fax. 03 26 05 42 89

**Résumé :** Les contraintes économiques induites par les nouvelles résolutions environnementales en matière d'élimination des déchets non ultimes accroissent l'intérêt pour réduire les fractions fermentescibles des déchets ménagers et agro-industriels en compost. Ce contexte accentue le développement de nouveaux biomatériaux prédestinés au compostage pour l'achèvement de leur cycle de vie. Ce traitement biologique en phase solide se caractérise par une bio-oxydation accélérée des matières biodégradables réduites en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et substances humiques grâce à un biotope diversifié où interviennent successivement ou conjointement de nombreuses populations de micro-organismes.

Différents procédés de compostage existent avec des technologies de niveaux faibles (andains aérés mécaniquement en plein air) à plus élevés (sites couverts à aération mixte contrôlée).

Ainsi, les plate-formes de compostage s'adaptent aux différentes considérations géographiques, climatiques, techniques, agronomiques et économiques. Cette filière permet d'envisager une véritable approche territoriale sur la question des déchets carbonés (déchets ménagers et assimilés, boues d'épuration, résidus agricoles solides ou agroalimentaires) conjointement et/ou en complément avec d'autres technologies de traitements en fonction des contextes particuliers.

Les méthodes d'estimation de la biodégradabilité des biomatériaux rapportées dans cette présentation ne sont pas exhaustives car volontairement simplifiées pour une relative facilité de mise en œuvre. La principale règle pour apprécier et juger de la biodégradation de xénobiotique en situation réelle de compostage reste de bien connaître les conditions de la mise en place des matériaux (configuration géométrique des éprouvettes avec leur mode de conditionnement et de mise en situation, suivi physico-chimique et de maturité des masses d'accueils, durée d'exposition,...). Des tests *in vitro* plus élaborés pour valider la bioassimilation avec absence de persistance chimique et toxique peuvent être élaborés. Le transfert de ce type de test sur le terrain nécessite des moyens importants à développer (traçage des biomatériaux, mise en situation de compostage et test sur parcelle cultivée). D'autres impacts sur l'environnement peuvent être soulevés comme par exemple le développement favorisé d'une souche potentiellement pathogène (*Aspergillus fumigatus*) par des composts enrichis et modifiés avec des biomatériaux favorables à certains micro-organismes. Cette gestion de la matière organique modifiée implique une approche maîtrisée pour respecter les grands principes du développement durable. Si l'évaluation du devenir des matériaux biodégradables dans l'environnement et les risques d'accumulation liée à leur épandage par le compost est à prédire, la recherche de synergie technologique ou de complémentarité entre matériaux biodégradables reste à développer. La réussite de cette filière passe par l'existence de solidarités professionnelles et sociales des fabricants

aux consommateurs sans oublier les opérateurs du recyclage (agriculteurs...). De même, la prise en compte des exigences agricoles et agro-industrielles avec l'amélioration des contraintes normatives et méthodologiques pour un label de qualité des composts, ne peut que favoriser la transparence et la confiance dans cette voie aérobie du recyclage du carbone dans la biosphère. Le compostage réhabilite la trilogie producteurs, consommateurs et décomposeurs en apportant une des réponses industrielles à une problématique du développement industriel.

**Abstract :** Environment-driven regulation aiming at reducing non-ultimate waste have increased the involvement in composting the fermentable part of domestic and industrial wastes. Thus new biomaterials that could end up into compost are on the stage. In the solid state biologic process occurs an accelerated bio oxydation : biodegradable materials are reduced into CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, and humic substances thanks to a diversified biotope.

Various composting technologies exist : either out-door mechanically aerated heap or an in-door heap with forced aeration.

The methods for estimating material biodegradability presented in this paper are not exhaustive. Only simplified and easy-to-carry-on procedures are introduced. The main rule is to exactly know the conditions in which the samples have been buried (geometrical shape of the sample, physico-chemistry monitoring, compost maturity, exposure time).

In vitro tests can be set up to validate the xenobiotic assimilation and consequently, the absence of toxic metabolic substances. Transferring these type of experiments in the field is not an easy task : biomaterials must be labelled, buried in compost heap and then displayed on the ground. Other environmental impacts have to be outlined as the development of potentially of pathogen strains (*Aspergillus fumigatus*) on composts enriched with biomaterials that are favourable to this strain.

It is necessary to look for complementarity between biomaterials in order to avoid the spreading of biomaterials in the fields and the risks linked to a possible accumulation. This channel will be useful provided that social and professional synergies exist all along, from the producer to the consumer. More, developing a quality label for the compost will encourage the transparency and the confidence in the whole channel of aerobic waste treatment.

**Mots-clés :** compost, filière, test industriels

**Keywords :** *compost, industrial tests*

# 1. Introduction

Cette fin de millénaire a vu exploser dans nos sociétés modernes l'utilisation hégémonique des matériaux polymères d'origine pétrochimique.

L'élimination sauvage et non rationnelle des xénobiotiques ménagers, voire industriels a constitué malheureusement une pratique facile car quasi gratuite en attendant les dommages ultérieurs dans notre environnement.

Aujourd'hui, le constat du déséquilibre provoqué dans la biosphère par l'exploitation désordonnée et abusive des réserves physiques de la planète induit une prise de conscience croissante de la nécessité d'une planification pérenne des développements industriels.

Ces nouvelles préoccupations environnementales se traduisent de nos jours par des contraintes réglementaires et économiques de mieux en mieux acceptées par les consommateurs. Dans ce contexte, les enjeux industriels et commerciaux ne manquent pas.

A titre d'exemple, les conditionnements en plastique occupent à eux seuls plus d'un quart des volumes des collectes ménagères, pour une masse d'environ 10 % seulement sur les 24 millions de tonnes de déchets ménagers mis en décharge ou incinérés annuellement en France. Or, les dernières données réglementaires applicables en 2002 programment la résorption progressive des décharges brutes vis-à-vis des déchets non ultimes.

Un autre exemple est l'utilisation de 170 000 tonnes de plastiques par l'agriculture française qui rend un tonnage de déchets après usage encore plus important compte tenu de la souillure des matériaux au contact du sol.

Ces données montrent l'importance de prospecter de nouveaux produits de conditionnement en intégrant leur mode d'élimination ou de recyclage en fin de cycle de vie.

L'implication de la société ARD dans des programmes sur le compostage s'inscrit dans une logique conductrice de ses thèmes de prédilection de recherches appliquées sur la valorisation alimentaire et surtout non alimentaire de la biomasse renouvelable où agriculture rentable et développement durable sont réconciliés.

En effet, depuis plus de dix ans, A.R.D contribue à poser les bases d'une agro-industrie source de matière première d'éco-produit (macromolécules glucidiques et protéiques, lipides, tensio-actifs, émulsifiants, biosurfactants, enzymes immobilisées, biomatériaux,...).

## **2. Végétaux hier, matériaux aujourd'hui, amendements DEMAIN...**

Tout procédé de fabrication met en œuvre des matières premières en vue d'obtenir un produit fini pour un usage donné.

Toutes les matières premières non transformées ou partiellement converties conduisent à défaut d'utilisation réalisable techniquement et économiquement à un résidu qu'il convient de traiter de façon adéquate comme tout produit ne trouvant plus d'usage.

A l'instar de la situation qui prévaut pour les traitements d'effluents fermentescibles, les filières biologiques sont particulièrement adaptées pour épurer les déchets organiques solides d'origine agricole.

Les grands concepts environnementaux plaident en faveur du recyclage agronomique maîtrisé des matières organiques. La bio-oxydation contrôlée de multisubstrats organiques frais par une succession de nombreuses populations variées de micro-organismes aérobies offre une des techniques en harmonie avec le monde agricole par le biais du compostage.

Cette technologie strictement aérobie a trois effets principaux :

- une réduction de la masse suite à la minéralisation des fractions organiques simples en dioxyde de carbone et vapeur d'eau ,
- une hygiénisation due aux réactions exothermiques responsables de l'élévation des températures à plus de 65° C,
- une stabilisation des fractions organiques complexes en substance préhumique ou humique particulièrement recherchée pour la fertilité de certains sols.

## **3. Comment apprécier les biodégradations des biomatériaux en situation de compostage ?**

Devant les impératifs environnementaux et face aux enjeux commerciaux, les matériaux plus « dégradables » et plus « naturels » appelés à finir leur cycle de vie dans un compost se développent.

Si beaucoup de ces matériaux sont d'origine naturelle, ils ne se dégradent pas nécessairement selon une cinétique rapide. En effet, pour répondre aux applications diverses comme l'emballage, les films de paillage, les couverts jetables..., ils subissent des traitements physiques ou chimiques qui diminuent leur biodégradabilité. L'adjonction d'additifs aux cours de modifications chimiques peut même les rendre peu bioassimilables voire toxiques.

Dans le cadre d'un programme AGRICE en cours sur la « Mise au point d'une méthode d'évaluation de la biodégradabilité d'agro-matériaux en milieu de compostage » des outils et des méthodes sont proposés afin de mieux répondre aux questions légitimes sur l'appréciation de la biodégradabilité.

Différentes méthodes (qualitatives ou quantitatives) **d'étude de la biodégradabilité** existent et s'adaptent de façon plus ou moins pertinentes à la réalité complexe des milieux compostés.

\* **En laboratoire**, les tests consistent à placer le matériau dans un milieu qui simule l'environnement naturel. Ce milieu est préparé à l'aide d'un inoculum issu d'un système naturel ou par reconstitution artificielle. Le contrôle des conditions de culture permet d'optimiser et d'accélérer la dégradation plus facilement suivie et mesurée.

\* **En milieu naturel**, les matériaux sont insérés par exemple dans un milieu liquide ou solide (eau de mer, effluent de station, sol, compost...). L'appréciation de la dégradation dans des conditions « réelles » est plus difficile de par la non maîtrise absolue de l'environnement naturel complexe.

Dans ce contexte, A.R.D. a développé des outils et des méthodes simples pour évaluer les biodégradations des matériaux en situation de compostage.

#### **- matières organiques utilisées**

Afin de valider un procédé pilote de compostage dans des conditions réelles en toutes saisons et lieux, un mélange de matières organiques relativement ubiquistes à base de fumier de bovin complétement d'écorces de résineux est constitué. L'objectif visé en C/N est de l'ordre de 30 pour une humidité de l'ordre de 65 %.

#### **- élaboration des mélanges**

L'homogénéisation des mélanges de matière organique reste une opération fondamentale à maîtriser pour la représentativité des analyses d'échantillons. Un essai représentatif de compostage nécessite environ dix tonnes de matières organiques.

#### **- prélèvements représentatifs des échantillons et conservations**

Pour le suivi du compostage, des échantillons de 0,5 à 1 kg sont pris en plusieurs points du mélange final après mélange dans un godet à vis afin d'obtenir une collecte de 10 kg environ. Après un nouveau mélange manuel, 1 kg de matière est prélevé et conditionné dans des sacs plastiques fermés à + 4°C à l'abri de la lumière. Les analyses sont généralement effectuées le jour même.

#### **- compostage en andain ou en bioréacteur**

Afin d'améliorer le contrôle du compostage, un double bioréacteur de 30 m<sup>3</sup> à aération forcée a été conçu dans le cadre d'AGRICE. Ce système assure des conditions aérobies en tout point de la masse à composter et permet de mieux

contrôler les températures maximums observées au cours du compostage tout en limitant les gradients de température observés dans toute masse organique compostée.

#### **- mise en place des biomatériaux en situation réelle de compostage**

Les tests en condition réelle sont inspirés de l'exposition des matériaux dans des sols. Des éprouvettes sont pesées après étuvage pendant 24 h à 50°C puis conditionnées dans des doubles filets à maille fine de 750 µm. Après incubation des éprouvettes à environ 0,5 m de profondeur dans les andains ou dans les bioréacteurs, les éprouvettes sont nettoyées, étuvées et pesées pour évaluer leur perte de masse. L'appréciation visuelle ou par analyse d'images permet une évaluation de la biodégradabilité. Ce type d'analyses nécessite systématiquement la présence de témoins d'épaisseur et de forme donnée, positifs et négatifs pour valider ce dispositif aux conditions connues mais non maîtrisées.

### **4. Comment vérifier la qualité des composts ?**

Au-delà de cette analyse d'évaluation de la dégradation de matériaux sur le terrain, l'appréciation de l'impact sur la qualité du compost reste posée.

L'utilisation des composts comme amendement ou support de culture oblige à vérifier l'innocuité théorique et pratique des biomatériaux sur le développement des végétaux dans un premier temps. Si certains professionnels du compostage évaluent la maturité d'un compost plus ou moins empiriquement par l'aspect du produit ou la non remontée en température après retournement, d'autres tests ou analyses existent et peuvent être repris dans un cadre normatif avec des variantes selon les pays. Longtemps, la stabilisation de la décroissance du rapport carbone sur azote ou de la consommation d'oxygène en deçà de valeur maximum a été retenue. Beaucoup d'utilisateurs des composts préfèrent aujourd'hui la caractérisation biochimique de la matière organique (CBM) mieux corrélée aux réalités agronomiques. Hormis les analyses physico-chimiques d'usages (humidité, pH, matière organique, azote,...) avec les teneurs d'éléments en traces, **l'écotoxicologie** offre une gamme de tests plus ou moins adaptés à des biotopes donnés. Les tests de phytotoxicité sur la germination du cresson par exemple conviennent bien au compost. Une procédure plus spécifique et plus sensible pour les composts mélangés à des quantités plus ou moins importantes de biomatériaux reste à valider. Les quantités de biomatériaux à tester vont de 1 à 5 % minimum pour une approche directe sur phase solide. En approche indirecte sur lixiviat, la procédure d'extraction du liquide reste à ajuster pour permettre un test d'inhibition de la croissance d'algues d'eau douce. Comme pour toutes les techniques d'évaluation, des témoins positifs voire négatifs sont à prévoir.

### **5. Conclusion**

Différents procédés de compostage existent avec des technologies de niveaux faibles (andains aérés mécaniquement en plein air) à niveaux plus élevés (sites couverts à aération mixte contrôlée).

Ainsi, les plate-formes de compostage s'adaptent aux différentes considérations géographiques, climatiques, techniques, agronomiques et économiques. Cette filière permet d'envisager une véritable approche territoriale sur la question des déchets carbonés (déchets ménagers et assimilés, boues d'épuration, résidus agricoles solides ou agroalimentaires) conjointement et/ou en synergie avec d'autres technologies de traitements en fonction des contextes particuliers.

Les méthodes d'estimation de la biodégradabilité des biomatériaux rapportées dans cette présentation ne sont pas exhaustives car volontairement simplifiées pour une relative facilité de mise en œuvre. La principale règle pour apprécier et juger de la biodégradation de xénobiotiques en situation réelle de compostage reste de bien connaître les conditions de la mise en place des matériaux (configuration géométrique des éprouvettes avec leur mode de conditionnement et de mise en situation, suivi physico-chimique et de maturité des masses d'accueils). Des tests *in vitro* plus élaborés pour valider la bioassimilation avec absence de persistance chimique et toxique peuvent être élaborés. Le transfert de ce type de test sur le terrain nécessite des moyens importants à développer (traçage des biomatériaux, mise en situation de compostage et test sur parcelle cultivée). D'autres impacts sur l'environnement peuvent être soulevés comme par exemple le développement favorisé d'une souche potentiellement pathogène (*Aspergillus fumigatus*) par des composts enrichis et modifiés avec des biomatériaux favorables à certains micro-organismes. Cette gestion de la matière organique modifiée implique une approche maîtrisée pour respecter les grands principes du développement durable. Si l'évaluation du devenir des matériaux biodégradables dans l'environnement et les risques d'accumulation liée à leur épandage par le compost est à prédire, la recherche de synergie technologique ou de complémentarité entre matériaux biodégradables reste à développer. La réussite de cette filière passe par l'existence de solidarités professionnelles et sociales des fabricants aux consommateurs sans oublier les opérateurs du recyclage (agriculteurs...). De même, la prise en compte des exigences agricoles et agro-industrielles avec l'amélioration des contraintes normatives et méthodologiques pour un label de qualité des composts, ne peut que favoriser la transparence et la confiance dans cette voie aérobie du recyclage du carbone dans la biosphère. Le compostage réhabilite la trilogie producteurs, consommateurs et décomposeurs en apportant une des réponses industrielles à une problématique du développement industriel.

# Modèle de prédiction de la dégradation en milieu réel

## *Prediction model of the degradation in natural environment*

F. Silvestre<sup>1</sup> ; A. Calmon<sup>1</sup> ; V. Bellon-Maurel<sup>2</sup> ; P. Feuilloley<sup>2</sup>

<sup>1</sup> - Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - Unité Associée INRA 31A1010

ENSCT - 118, route de Narbonne - 31077 Toulouse CEDEX 4 (France)

Tél : 05.62.88.57.44 – Fax : 05.62.88.56.50– E-mail : lcatar@cict.fr

<sup>2</sup> - Cemagref - Division GIQUAL

361, rue J.F. Breton - BP 5095 - 34033 Montpellier CEDEX 1 (France)

Tél : 04.67.04.63.19 – Fax : 04.67.04.63.06 –

E-mail : veronique.bellon@cemagref.fr

**Résumé :** L'objectif de ce travail est de prédire la biodégradabilité de matériaux polymères en milieu naturel à partir de la connaissance de la biodégradabilité de laboratoire et des données sur les matériaux et l'environnement. Pour cela, nous avons réalisé une base de données, issue d'une part des tests *in vitro* et d'autre part des tests *in situ*.

D'abord, nous avons montré par une analyse en composantes principales qu'il existait une relation entre la dégradation *in vitro* et la dégradation *in situ*. Les coefficients de corrélation entre l'indice de biodégradabilité *in vitro* ( $y_{max}$ ) et la surface dégradée ou la perte de poids augmentent au fur et à mesure de l'exposition. Le taux de dégradation est fortement dépendant du site d'enfouissement.

Ensuite, grâce à un réseau de neurones, le taux de dégradation d'un matériau dans un biotope donné a été modélisé à partir d'une mesure de laboratoire et des paramètres caractérisant le site.

Il ressort que les *index in vitro* et les caractères physico-chimiques des matériaux sont significatifs pour prédire le devenir d'un matériau dans un environnement, mais ils ne sont pas suffisants. Il est nécessaire d'y ajouter au moins une des caractéristiques du climat (profil des températures en fonction de la durée), du sol (granulométrie) et la durée de l'exposition.

Nous proposons donc deux modèles qui permettent de prévoir à partir des paramètres précédents, le taux de dégradation d'un matériau dans un environnement donné et ceci avec 86 % de succès pour moins de 15 point d'écart. Ce résultat nous autorise à corroborer la validité de la norme en milieu liquide (Projet CEN) par rapport au milieu réel.

**Abstract :** The aim of this work is to predict the biodegradability of polymer materials in natural environment using laboratory biodegradability measurements, material and environment data. Therefore, a model has been established to process data of *in vitro* tests and of *in situ* tests.

We have shown, using Principal Component Analysis, that there was a relationship between the *in vitro* degradation and the *in situ* degradation. Correlation factors between the biodegradability index ( $y_{max}$ ), degraded surface and/or the weight losses increased with the exposure time. The degradation rate is strongly dependent with the burial site.

Furthermore, the degradation level of a material in a given biotope has been modelled by means of laboratory measurements and site parameters using neural network, physico and chemical indexes are significant to predict the material fate in an environment but this is not

enough. It is necessary to add climate characteristics (temperature profiles versus dates), soil analysis and exposure duration.

Consequently, using the above parameters, two models are proposed to predict the degradation rate of a material in a given environment, with 86 % of suitable prediction and with an error less than 15 %. This result authorises us to corroborate the validity of the norm for liquid medium (CEN Project) regarding the real conditions.

**Mots Clés :** Agromatériaux, dégradation, prédiction, tests *in vitro*, tests *in situ*

**Keywords :** *Agromaterial, degradation, prediction, in vitro tests, in situ tests*

Ce travail sur la mise au point d'un modèle de prédiction de la biodégradabilité de matériaux solides en milieu naturel a été réalisé en étroite collaboration entre d'une part, le laboratoire de Chimie Agro-industrielle de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse qui met au point et développe de nouveaux agromatériaux avec le souci de leur devenir dans l'environnement et d'autre part, le Cemagref de Montpellier qui est spécialisé dans l'instrumentation rapide, la modélisation et les capteurs.

# 1. Introduction

L'objectif de ce travail est donc de proposer un modèle pour prédire la biodégradabilité des matériaux dans des conditions réelles à partir de la connaissance de la biodégradabilité de laboratoire et des données sur les caractéristiques des matériaux et celles de l'environnement avec le sol et le climat. Pour réaliser notre objectif, nous avons du acquérir et traiter de nombreuses données issues d'une part des tests *in vitro*, d'autre part des tests *in situ*, et enfin des données sur les matériaux et les sites d'enfouissement.

## 2. Acquisition des données

### 2.1. Caractérisation des matériaux

Nous avons sélectionné, pour l'étude, 20 matériaux ayant une large gamme de biodégradabilité.

Nous les avons caractérisés d'une part, d'un point de vue chimique, avec l'analyse élémentaire qui permet de déterminer les teneurs en carbone, hydrogène, azote et oxygène. La teneur en carbone est indispensable pour déterminer la quantité théorique de CO<sub>2</sub> produit lors de la dégradation du matériau en milieu liquide. D'autre part, d'un point de vue physique, par la mesure de l'épaisseur et des mesures d'état de surface des matériaux telles que l'hydrophobicité et la tension critique de surface.

### 2.2. Tests en laboratoire (*in vitro*)

Les tests ont été réalisés selon le projet de norme CEN<sup>1</sup> basé sur le suivi de la production de dioxyde de carbone au cours du temps lorsqu'un matériau est exposé à une source de micro-organismes. Une banque de données de courbes de dégradation a été constituée. Mais pour mieux caractériser la dégradation en milieu liquide nous avons proposé une modélisation de ces courbes fondée sur la sigmoïde de Hill. A partir de ce modèle, nous avons extrait, à partir des courbes de minéralisation et pour chaque matériau, des indices de biodégradabilité *in vitro* définis comme:  $y_{\max}$  : taux maximal de conversion,  $k$  : temps de demi-vie et  $n$  : rayon de courbure.

### 2.3. Tests en conditions réelles (*in situ*)

Nous avons également mis en place un protocole de tests *in situ* dans divers biotopes (Toulouse, Clermont-Ferrand, Montpellier, Rennes). Nous avons réalisé sur les 20 matériaux et pour les 4 sites, six prélèvements sur deux ans avec une

---

<sup>1</sup> Projet CEN. 1995. Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and desintegration of packaging materials under aqueous medium : Part1 method by analysis of released carbon dioxide.

mesure de biodégradabilité *in situ* mesurée par le taux de surface dégradée (SD) et le taux de perte de poids (PP).

Par ailleurs, les sols et les climats ont été caractérisés. Pour le sol, la granulométrie avec les teneurs en argile, limon et sable et les caractéristiques chimiques avec la teneur en matières organiques, le pH et le rapport C/N ont été mesurés. Pour le climat, la température moyenne de l'air et la pluviométrie et l'histogramme des températures en fonction de la durée de l'exposition ont été enregistrés.

D'après la littérature, les méthodes de laboratoire présentent l'avantage d'être plus rapides mais elles n'ont jamais été montrées comme représentatives de ce qui se passait dans l'environnement. Nous avons cherché, à l'aide de l'analyse descriptive, à étudier cette relation.

### 3. Relation Biodégradabilité *in vitro* et *in situ*

L'Analyse en Composante Principale (ACP) réalisée à partir des index *in vitro* et *in situ* (pour le sixième et dernier prélèvement) montre que les paramètres  $y_{max}$ , SD et PP sont fortement corrélés (Figure 1).

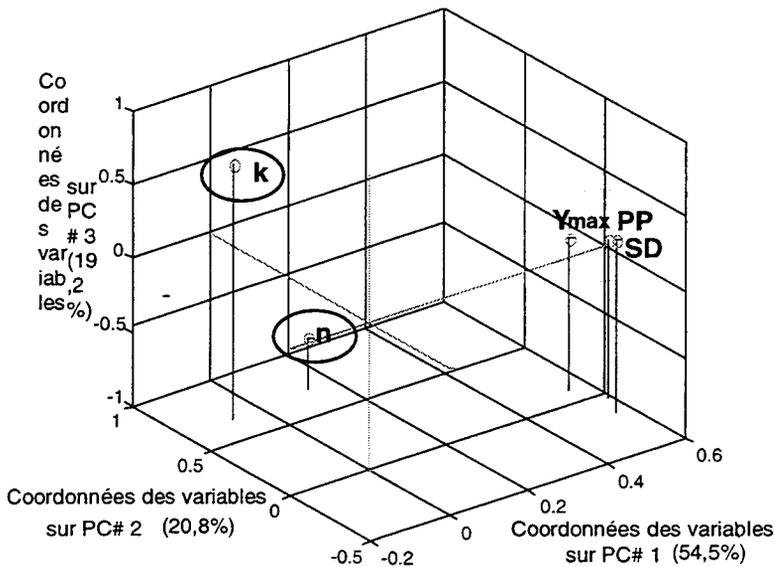


Figure 1 : Représentation des résultats de l'ACP (Variables: index *in vitro* et index *in situ*) pour le sixième prélèvement.

Par contre, la représentation des coefficients de covariance des paramètres pris deux à deux, au cours des prélèvements, montre que plus le temps d'exposition est élevé et meilleure sera la corrélation (Figure 2).

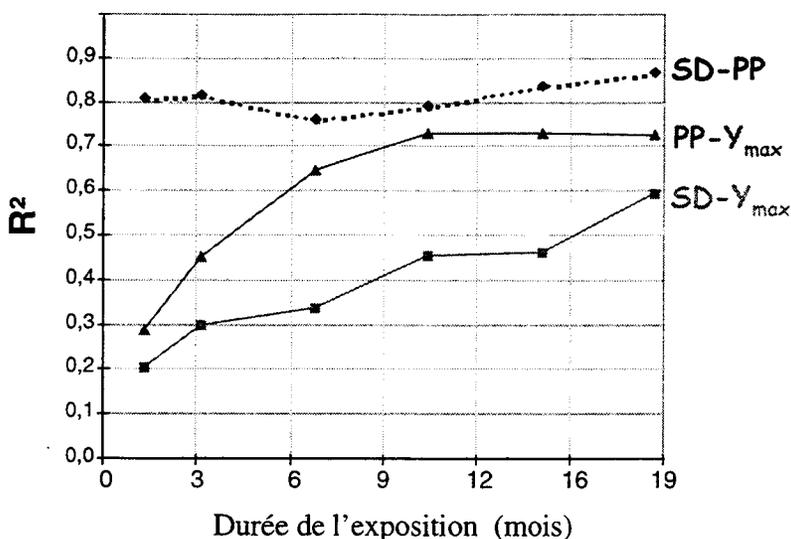


Figure 2 : Evolution des coefficients des covariances d'après les résultats des ACP (Variables: index *in vitro* et index *in situ*) pour chaque prélèvement.

Il faut attendre la fin de l'exposition en sol, pour obtenir une bonne corrélation car c'est à ce stade que les matériaux ont perdu en poids mais également en surface.

Nous pouvons alors représenter les matériaux dans les deux premiers plans factoriels et pour les données du sixième et dernier prélèvement (Figure 3). C'est à dire qu'un matériau est représenté par les triplicats et les 4 sites, soit 12 points.

Nous constatons qu'il n'y a pas d'influence du site c'est à dire que les douze points sont superposés pour les matériaux qui ne se dégradent pas ( T, Q ) ou pour les matériaux fortement dégradés ( J, S).

Pour les autres matériaux, nous observons un effet site important par la répartition des points en forme d'écharpe, ce qui caractérise la disparité des lieux d'enfouissement.

Par l'analyse descriptive, nous pouvons affirmer qu'il existe bien une relation entre les index *in vitro* et *in situ* et qu'au bout de deux ans on observe toujours un effet du site. Par conséquent, il est nécessaire de prendre les caractéristiques de ces sites en compte pour réaliser la prédiction.

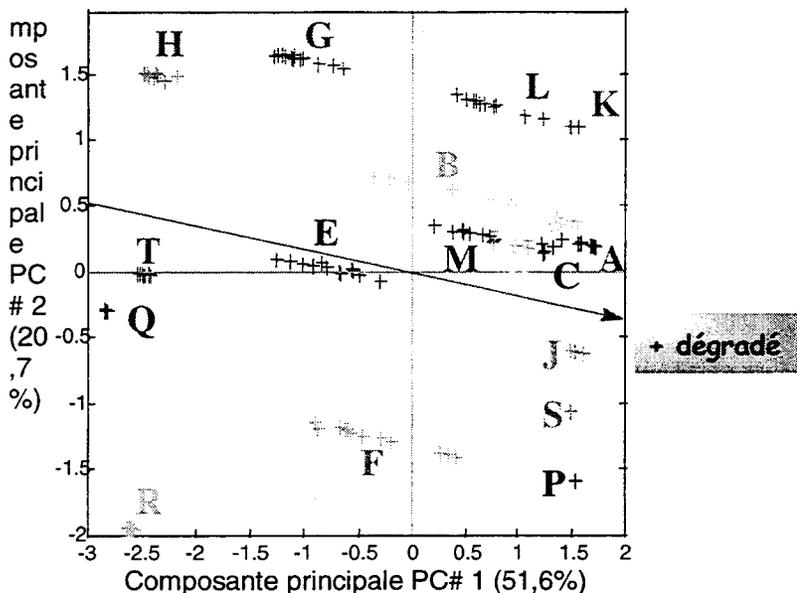


Figure 3 : Représentation des échantillons dans l'ACP pour le sixième prélèvement  
 (Variables: index in vitro et index in situ).

## 4. Modèle de Prédiction

La Figure 4 rassemble l'ensemble des données obtenues pour modéliser le taux de dégradation d'un matériau dans un environnement.

Pour construire ce modèle, nous avons utilisé les techniques neuronales<sup>2</sup> qui sont basées sur un modèle mathématique non linéaire qui permet de réaliser soit de la classification ou comme dans notre cas de la prédiction.

Comme le montre la Figure 5, la couche d'entrée comprend au maximum toutes les caractéristiques précédemment citées.

Le réseau est entraîné avec un grand nombre d'exemples, issus de la banque des 1440 échantillons enfouis, pour créer un modèle qui permet de prédire la surface dégradée et la perte de poids.

Des études préliminaires ont montré que les résultats de prédiction étaient sensiblement meilleurs en utilisant 6 nœuds dans la couche cachée et en prédisant séparément la surface dégradée de la perte de poids.

<sup>2</sup> Davallo E., Naim P. 1990. In : Des réseaux de neurones. Editions Eyrolles

Nous ne présenterons ici, que la prédiction de la surface dégradée.

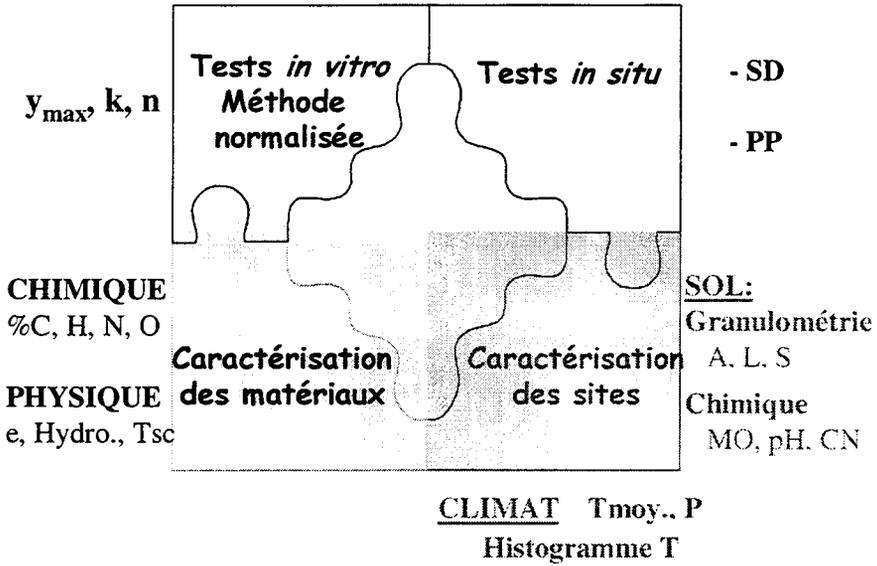


Figure 4 : Ensemble des données obtenues pour modéliser le taux de dégradation d'un matériau dans un environnement

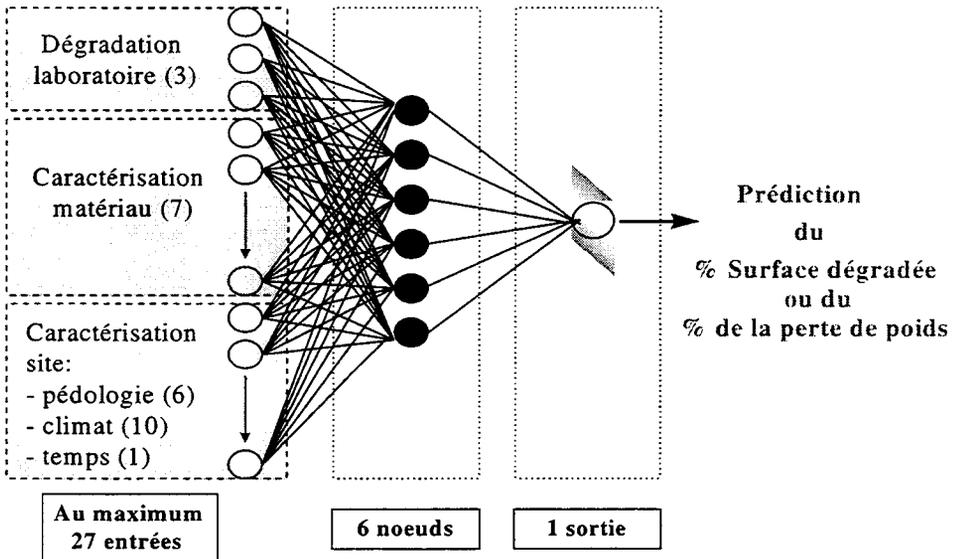


Figure 5 : Modélisation par un réseau de neurones

Prenons l'exemple du matériau à base de PolyHydroxyButyrate-HydroxyValérate (PHBV) et que nous souhaitons prédire son devenir sur le sol de Toulouse après une exposition de 10 mois (Figure 6).

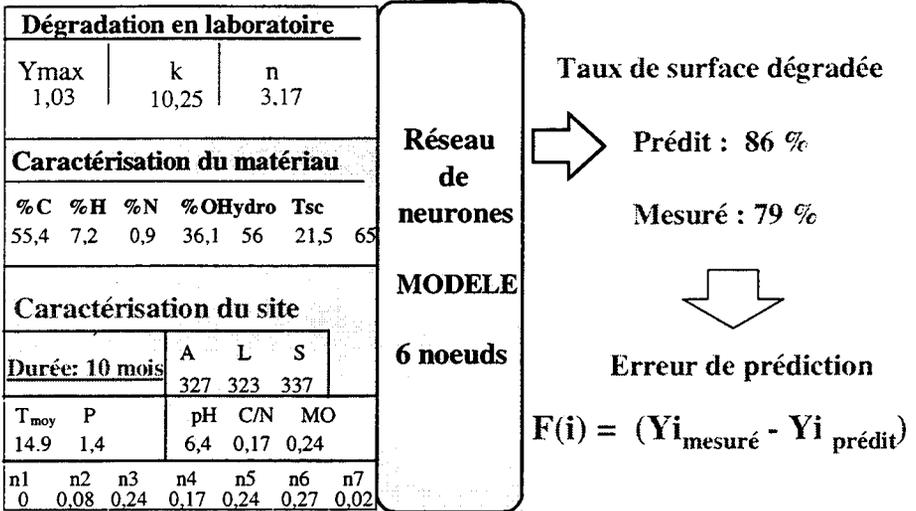


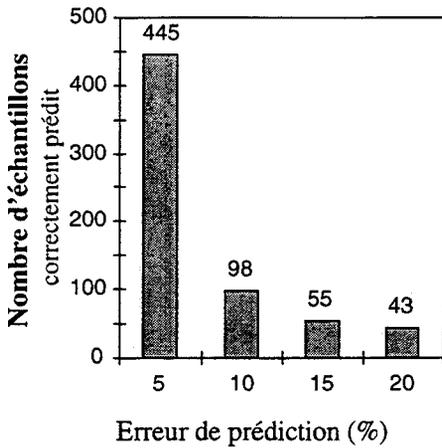
Figure 6 : Prédiction de la dégradation du matériau PHBV (55µm) pour une exposition de 10 mois sur le sol de Toulouse

Le modèle précédent obtenu sur l'ensemble des données en entrée conduit à un taux de surface prédit qui est de 86%. Or, si nous comparons à la valeur mesurée qui est de 79% nous observons un écart de 6 points. C'est ce que nous définissons comme l'erreur de prédiction du modèle avec pour chaque échantillon i, la relation suivante :  $F(i) = (Y_{i\text{mesuré}} - Y_{i\text{prédit}})$  (Eq.1).

De plus, si on représente le nombre d'échantillons en fonction de l'erreur de prédiction (Figure 7a), nous remarquons que l'histogramme est fortement décalé vers les faibles valeurs d'erreurs.

Les résultats cumulés (Figure 7b) montrent que 86% des échantillons sont correctement prédits avec un écart de prédiction inférieure à 15 points.

## A - Résultats bruts



## B - Résultats cumulés

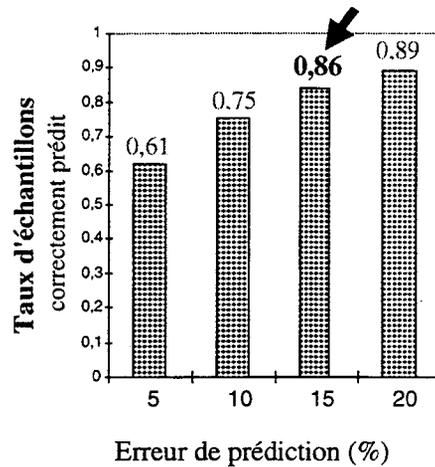


Figure 7 : Représentation du nombre d'échantillons en fonction de l'erreur de prédiction.

Nous avons donc une bonne prédiction mais pour finaliser le modèle, il faut rechercher les paramètres les plus significatifs. Pour cela, 8 groupes de paramètres ont été fixés : 1- *in vitro* ; 2- caractéristiques chimiques du matériau ; 3- caractéristiques physiques du matériau ; 4- caractéristiques chimiques du sol ; 5- granulométrie du sol ; 6- temps ; et deux groupes dans les caractéristiques du climat. A partir de ces groupes, nous avons effectué des combinaisons pour déterminer leur importance dans la prédiction.

Il ressort que les indices *in vitro* permettent à eux seuls de prédire 43% de la population avec moins de 15 points d'écart. En ajoutant la durée de l'exposition et les caractéristiques physiques du matériau, on prédit correctement 81% de la population. Enfin, pour obtenir le jeu optimal et la prédiction la plus élevée, il faut y adjoindre la composition chimique du matériau, un des groupes du climat et un des groupes du sol ce qui donne 86% des échantillons correctement prédits avec une erreur de prédiction inférieure à 15 points.

## 5. Conclusion

L'analyse descriptive, nous a permis de montrer qu'il existait une relation entre les index *in vitro* et *in situ*. Toutefois, cette corrélation est meilleure si l'on se place en fin d'exposition dans les sols.

A partir de ce constat, nous avons proposé deux modèles capables de prédire d'une part le taux de surface dégradée et d'autre part de taux de perte de poids. Cette prédiction doit être réalisée à partir des index de laboratoire, des caractéristiques physico-chimiques du matériau, du climat et du sol.

La prédiction de 85 % des échantillons avec moins de 15 points d'écart, nous autorise à corroborer la validité de la future norme européenne. Même si cette norme en milieu liquide est éloignée du devenir des matériaux, elle apparaît néanmoins comme représentative de ce qui se passe à l'extérieur et elle fournit un test accéléré.

## **6. Remerciements**

Nous remercions l'ADEME, AGRICE, le Conseil Régional de Midi-Pyrénées et la DRRT Languedoc-Roussillon pour le soutien financier.

# Biodégradabilité et lombriculture

## *Biodegradability and vermiculture*

Nathalie Alauzet<sup>1</sup>, Henri Garreau<sup>1</sup>, Marcel Bouche<sup>2</sup> et Michel Vert<sup>1</sup>

1- CRBA-CNRS UPRESA 5473, Faculté de Pharmacie,  
15 av. C. Flahault, Montpellier

Tel : +33 (0)4 67 41 82 60 - Fax : +33 (0)4 67 52 08 98

e-mail : garreau@pharma.univ-montp1.fr

2- Laboratoire de Zooécologie du Sol, INRA, 2 place Viala, Montpellier

Tel : +33(0)4 99 61 24 46

**Résumé :** Les poly(acide lactique)s ou PLAX (avec X=pourcentage d'unités L-lactyl) se dégradent hydrolytiquement et ce d'autant plus vite que la température est élevée. Lors de la phase thermophile d'un compostage ils arriveront donc au stade oligomères. Après avoir vérifié la non-toxicité des PLA et de leurs produits de dégradation vis-à-vis des vers de terre, nous avons montré que ces derniers sont capables d'utiliser les oligomères comme seule source de carbone pour leur croissance. Une étude utilisant des oligomères marqués au <sup>14</sup>C nous a permis de constater par autoradiographie que la bioassimilation de ces oligomères se fait de façon uniforme dans tout le corps du lombricien. Bien que les vers de terre ne soient probablement pas directement responsables de la dégradation des PLA (sauf action mécanique), ils apparaissent comme un bon témoin de la bioassimilation de plastiques biodégradables.

**Abstract :** *Poly(lactic acids (PLAX with X=percentage of L-lactyl units) can degrade hydrolytically. Higher is the temperature, faster is the degradation. During the thermophilic phase of composting, they can reach rapidly the oligomeric stage. For earthworms we first checked the non-toxicity of PLA and its degradation into by-products. Then we showed that the worms can use PLA oligomers as carbon source for their growth. The use of uniformly unique <sup>14</sup>C-radiolabeled oligomers allowed us to check through autoradiography that earthworms assimilate the radioactivity uniformly in their whole body. Although earthworms may not be directly responsible for PLA degradation, they are good biomarkers for the bioassimilation of plastics.*

**Mots-clés :** lombriciens, *Eisenia andrei*, poly(acide lactique), biodégradation, bioassimilation, lombricompostage, radiomarquage, toxicité, biomarqueurs

**Keywords :** *earthworm, Eisenia andrei, poly(lactic acid, biodegradation, bioassimilation, vermicomposting, radiolabeling, toxicity, biomarkers*

# 1. Introduction

L'élimination des plastiques après utilisation pose problème au niveau mondial, d'où de nombreuses recherches sur des plastiques dits « biodégradables ». Parmi ceux-ci, les PLA (utilisés aussi dans le domaine biomédical) sont un des candidats crédibles. On n'a trouvé jusqu'à présent que peu d'enzymes pouvant influencer la biodégradabilité du PLA. Quelques bactéries et champignons sont actifs, mais sur les oligomères seulement : le PLA est donc bioassimilable mais pas vraiment biodégradable.

Une des méthodes pour éliminer proprement des ordures ménagères est le compostage, qui peut être amélioré par un lombricompostage. C'est dans ce cadre que nous avons étudié la dégradation de PLA en lombricompost artificiel, afin de préciser les points suivants :

- le PLA et ses produits de dégradation sont-ils toxiques vis-à-vis des vers de terre ?
- Les vers de terre peuvent-ils se nourrir de PLA ?
- Peuvent-ils assimiler les éléments constitutifs des PLA dans leurs tissus ?

## 2. Le PLA et ses produits de dégradation sont-ils toxiques vis-à-vis des vers de terre ?

Avant d'étudier la biodégradation des PLA par les vers de terre, il a été nécessaire de vérifier leur innocuité vis-à-vis de ces animaux, ainsi que celle des produits que les PLA sont susceptibles de générer pendant leur décomposition, c'est-à-dire des oligomères (OLA) et, au final, de l'acide lactique.

L'étude a consisté à déterminer la CL 50, c'est-à-dire la Concentration Létale induisant 50% de mortalité en conditions standardisées.

Nous avons utilisé la norme AFNOR X 31-250 modifiée. Elle consiste à mettre pendant 14 jours les vers de terre (*E. andrei*) en contact cutané et digestif avec un sol artificiel (ou artisol) puis à introduire la molécule à étudier à différentes concentrations pour déterminer la CL 50. Au préalable, le sol artificiel doit être humidifié en tenant compte de l'hydrophilie de la molécule toxique. Les concentrations sont exprimées en poids sec de PLA par poids sec de milieu, et ont été choisies dans une gamme réaliste par rapport aux concentrations trouvées habituellement dans l'environnement. Des échantillons de PLA 50 (Mn=146000) et d'OLA 100 (Mn=1600) synthétisés en utilisant du lactate de zinc comme amorceur, du D,L-lactate de calcium, du D,L-lactate de sodium et du L-lactate de calcium ont été testés à différentes concentrations.

Les résultats sont présentés figure 1. On constate que le PLA 50 de hautes masses molaires (HMM) et les oligomères OLA 100 de basses masses molaires (BMM) ont une CL 50 élevée, dans la limite des concentrations testées (28% en poids sec). Par contre le produit final, l'acide lactique, a une CL 50 très basse lorsqu'il est utilisé pur, à cause de l'acidité qu'il engendre.

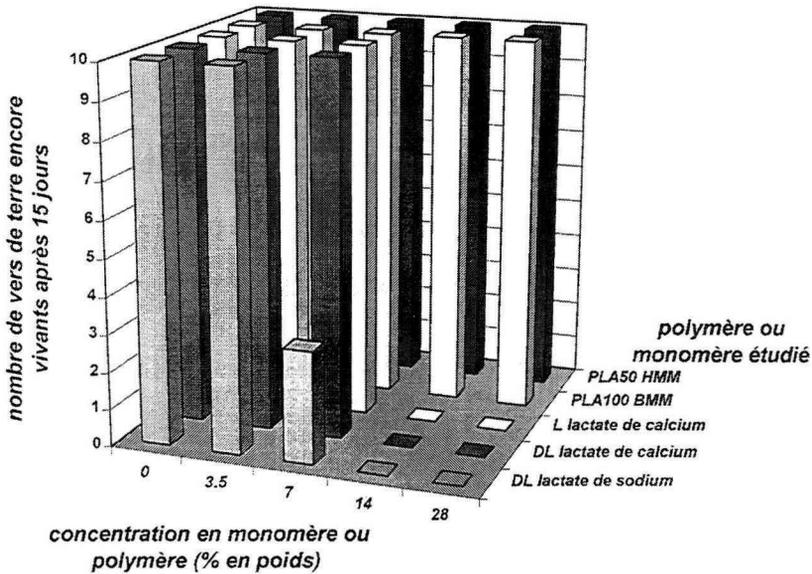


Figure n°1 : Détermination de la toxicité des PLA et de leurs produits de dégradation vis-à-vis des vers de terre

Par contre, sa CL 50 est assez élevée (entre 7 et 14%) lorsqu'il est neutralisé par du calcium. Ceci est tout à fait cohérent avec le fait que les milieux biologiques sont toujours tamponnés (le sol par exemple contient une grande quantité de calcium). De plus, les micro-organismes capables de dégrader l'acide lactique sont ubiquitaires.

Nous pouvons donc conclure que le PLA et ses produits de dégradation ne sont pas toxiques pour les vers de terre aux concentrations que ces derniers sont susceptibles de trouver dans l'environnement suite à une dégradation hydrolytique.

### 3. Dégradation du PLA en compost et lombricompost

Les divers essais de compostage de plastiques cités dans la littérature ont été réalisés avec des composts de compositions totalement différentes et non reproductibles.

Nous avons donc mis au point un compost artificiel, dont la composition (tableau 1) est reproductible et est la plus proche possible de la composition des ordures ménagères françaises<sup>1</sup>, ordures dans lesquelles se retrouveraient les sacs et autres emballages dégradables.

Composition		Simulant :
Luzerne	27%	Matériel décomposable
Papier	22%	Papiers et cartons
Sang séché	0,5%	Viande
Verre	50%	« inertes »
Eau	Qsp saturation	

**Tableau 1 : composition du compost artificiel**

Dans un compost, le dégagement de chaleur métabolique provenant de l'activité microbienne produit une élévation importante de la température, pouvant aller jusqu'à 70°C (Bouché et Nougaret, 1997)<sup>1</sup>. La température diminue ensuite progressivement. Afin de prendre en compte au plus près la réalité industrielle, nous avons choisi de reproduire dans notre compost modèle les variations de température observés dans les lombricomposts industriels<sup>1</sup>, c'est-à-dire des températures variant de 70°C à 20°C (figure 2).

Les PLA étudiés sont des PLA 50 (Mn=90000) et 96 (Mn=70000), synthétisés en utilisant du lactate de zinc comme amorceur. Ils étaient sous forme de fils de 3 cm de long et 1 mm de diamètre.

La figure 3 montre que le PLA 50 est très rapidement dégradé lorsqu'il est soumis à une température de 70°C. Au-delà de 6 jours, il n'est plus récupérable. On peut donc penser que le principal responsable de la dégradation du PLA 50 dans un compost pendant le début de la phase thermophile est l'hydrolyse fortement accélérée par la température.

En ce qui concerne le PLA 96, sa masse molaire diminue fortement pour atteindre le stade oligomère. Cependant, il garde encore une forme de bâtonnet pendant tout le temps du compost. On peut remarquer que dans le lombricompost les bâtonnets de PLA se retrouvent cassés en petits morceaux, du fait du brassage par les vers de terre. Nous avons aussi trouvé un feces contenant un morceau de PLA 96, ce qui nous permet de dire que l'« assouplissement » des fils de PLA 96 par les divers facteurs qui interviennent dans un lombricompost (chaleur, humidité, micro-organismes, brassage mécanique, vers de terre,...) peuvent jouer en faveur de l'ingestion de ces PLA par les vers de terre.

Le PLA de hautes masses molaires, mis en compost, est dégradé donc jusqu'au stade oligomères de basses masses grâce à la chaleur et à l'humidité de la phase thermophile, voire totalement dégradé lorsqu'il s'agit du PLA 50.

<sup>1</sup> Bouché, M. B. Nougaret, V.. 1997. In : *Advances in Solid State Fermentation*. S .Roussos et al., eds Kluwer acad. publ., Dordrecht, N.L., 541-555.

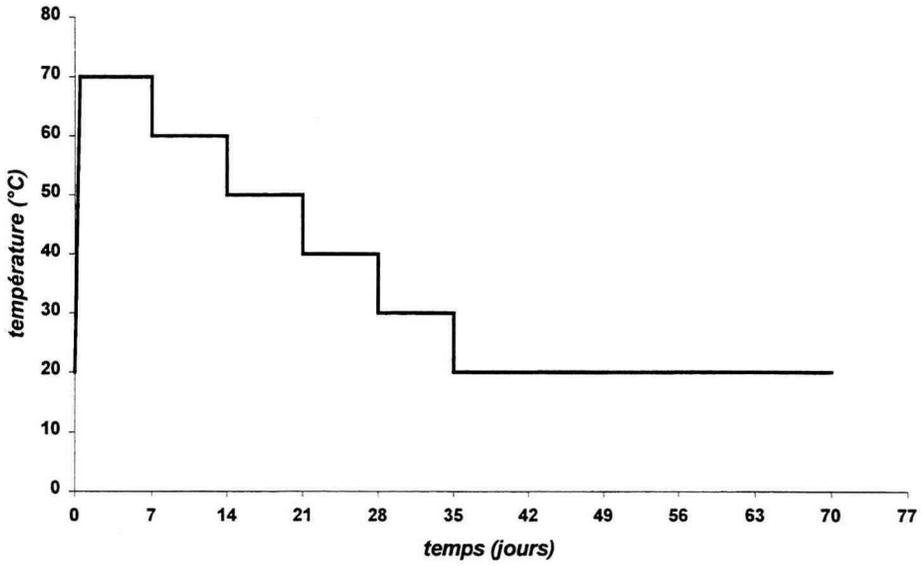


Figure n° 2 : profil de température utilisé pour simuler les phases thermophile et de maturation dans le compost modèle

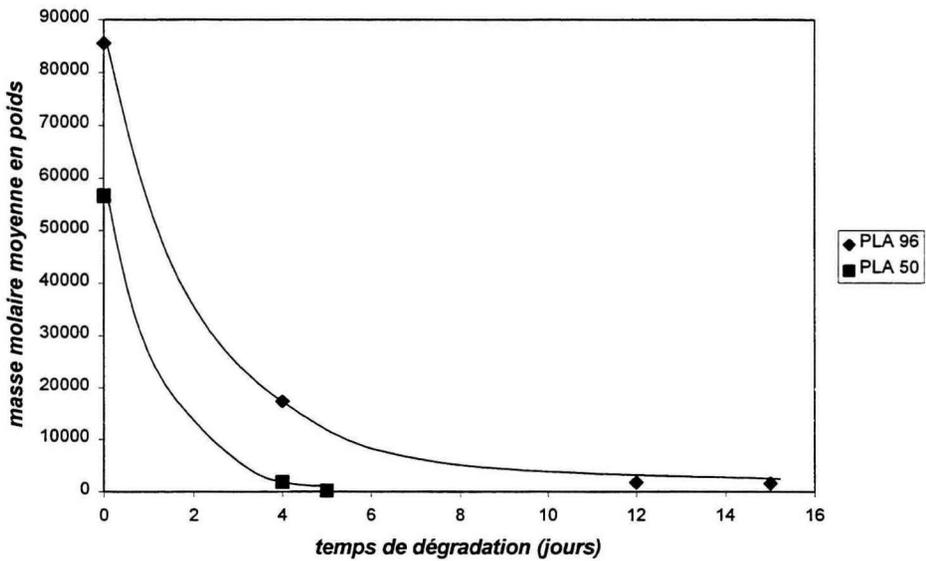


Figure n° 3 : Evolution de PLA 96 et 50 de hautes masses molaires en compost

## 4. Les vers de terre peuvent-ils bioassimiler les PLA ?

### 4.1 Utilisation des PLA comme seules sources de carbone par les vers de terre

Le PLA HMM peut être dégradé en OLA BMM lors de la phase thermophile du compost. Sous cette forme, l'OLA pourrait être bioassimilé par les vers de terre. Une des façons de le vérifier est d'utiliser le PLA comme seule source de carbone, avec un milieu synthétique modèle reproductible.

En effet, le compost artificiel du paragraphe précédent contient de nombreuses sources de carbone. Nous avons donc mis au point un milieu de culture entièrement synthétique et reproductible, dont on peut contrôler l'apport en source d'azote et de carbone.

Ce milieu de culture a été adapté à partir de celui mis au point par Abdul Rida et Bouché<sup>2</sup>. Il est constitué d'artisol additionné de milieu de Winogradsky, de sources de carbone et d'azote, et est appelé « biosynthésol ». Chaque bocal contient : 45 g de Lévilite (silice en poudre), 45 billes de verre, 112 ml d'une solution de Winogradsky simplifiée, 0.9 g de glucose (sucre à assimilation rapide, pour stimuler les micro-organismes), 2 g de cellulose (sucre à assimilation lente, à remplacer par du PLA en poudre), 0.1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (source d'azote).

Le milieu est préparé et laissé 13 jours pour que le pH se stabilise, avant d'y rajouter des vers de terre. Les milieux sont mis à incuber à 20°C.

Les *E. andrei* utilisés sont des adultes ou des subadultes, mis à jeûner 62 jours dans de la lévilite seule pour leur faire perdre 50% de leur poids. Au 62<sup>e</sup> jour, ils sont transférés 10 par 10 dans des bocaux contenant du biosynthésol, avec comme seule source de carbone (en remplacement de la cellulose) : PLA 50 (Mn=99000), PLA 96 (Mn=54000), OLA 50 (Mn=800), OLA 96 (Mn=720), de la cellulose (témoin positif), et rien (témoin négatif).

La figure 4 montre que lorsque la source de carbone est de la cellulose, la remontée du poids des vers de terre va jusqu'à 80% du poids initial après 2 semaines de contact. Lorsqu'il n'y a pas de source de carbone, les vers de terre continuent à perdre du poids sans reprise.

Lorsque le PLA de hautes masses est la seule source de carbone, que ce soit des PLA 50 ou 96, les vers de terre continuent à perdre du poids (figure 5). Les PLA ne sont donc pas assimilables par les vers de terre. On note cependant une légère remontée du poids dans le biosynthésol contenant du PLA 50 au bout de 160 jours. Ceci est probablement dû à l'avancement de la dégradation hydrolytique du PLA 50 qui libère des sources de carbone directement assimilables (monomères et oligomères basses masses molaires,..) comme vu précédemment.

---

<sup>2</sup> Abdul Rida A.M., Bouché, M. B. 1997. Soil Biology Biochemistry. 29(3/4) :699-703.

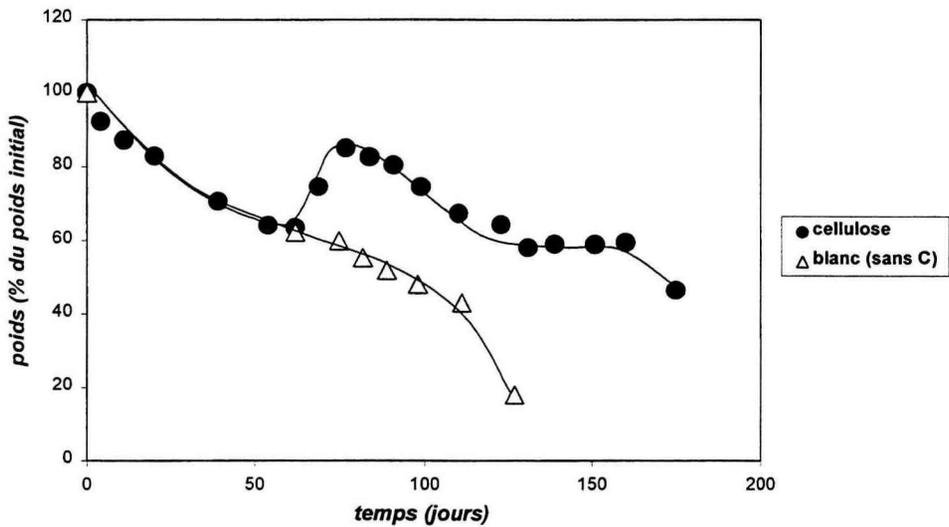


Figure n°4 : témoins négatifs (blanc : pas de carbone dans le milieu) et positifs (cellulose comme source de carbone) de prise de poids des vers de terre en fonction du milieu d'élevage

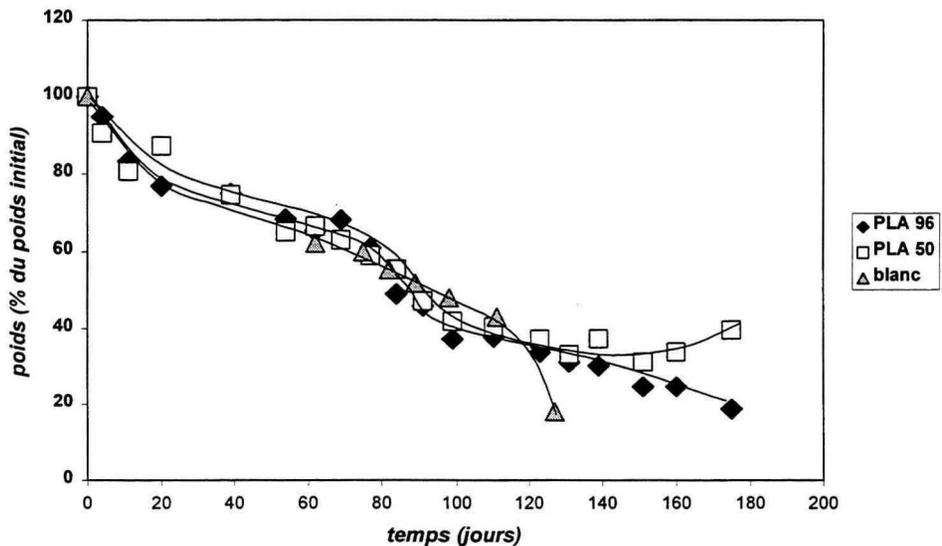


Figure n° 5 : variation du poids des vers mis à jeûner puis alimentés par des polymères d'acide lactique (seule source de carbone)

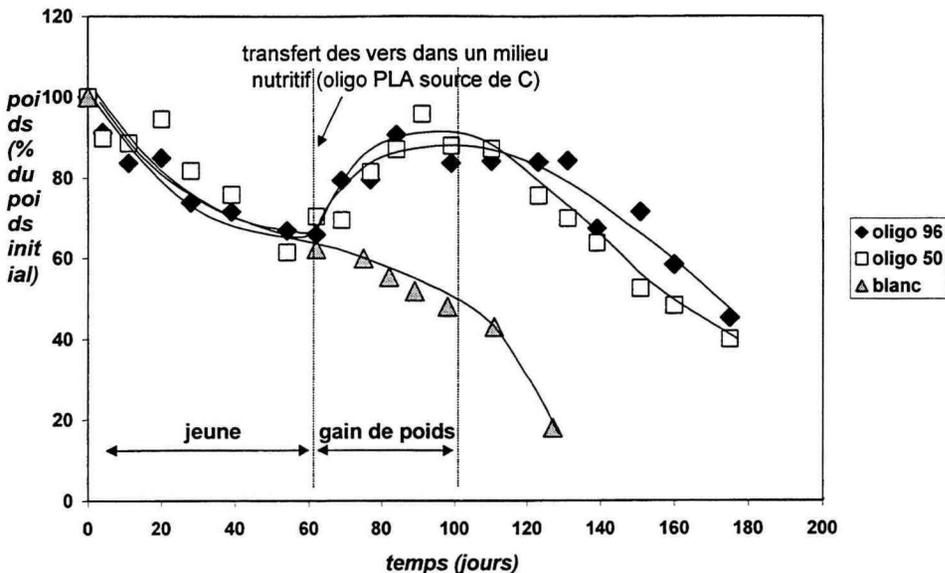


Figure n°6 : variation du poids des vers mis à jeûner puis alimentés par des oligomères lactiques (seule source de carbone)

D'après la figure 6, on peut constater une nette remontée du poids des vers de terre en présence d'OLA. Leur poids augmente jusqu'à 40 jours après mise en contact avec ces oligomères, et croît presque jusqu'au poids de départ (100%) quel que soit l'oligomère, alors que lorsque la cellulose est utilisée comme source de carbone (témoin positif), le poids n'atteint que 80% du poids de départ. On peut donc conclure que les lombriciens ont bioassimilé les oligomères de PLA 50 et 96. Il n'est cependant pas possible de savoir à partir de ces résultats si les vers de terre les ont directement bioassimilés, ou s'ils l'ont fait par l'intermédiaire de leurs micro-organismes commensaux.

#### 4.2 Localisation des métabolites obtenus dans les vers de terre par marquage au $^{14}\text{C}$

Un moyen de connaître plus précisément le devenir des produits de dégradation des PLA dans le ver de terre est d'utiliser des oligomères marqués radioactivement pour localiser les résidus de PLA dans les tissus. Nous avons utilisé un échantillon d'OLA radioactif uniformément marqué au  $^{14}\text{C}$  synthétisé au laboratoire.

Le but était de connaître le devenir des OLA 50 par suivi du  $^{14}\text{C}$  dégagé, et par autoradiographie des tissus lombriciens.

Expérimentalement, 2 *E.andrei* juvéniles sont placés dans des piluliers contenant 5 g de biosynthésol et 0.2 g d'OLA 50 radioactif ( $M_n=415$ ,  $RAS=1.62$  nCi/mg). Ces piluliers sont placés dans un bocal avec une arrivée d'air exempt de  $\text{CO}_2$ , le  $^{14}\text{CO}_2$  étant récupéré dans 2 pièges à  $\text{CO}_2$  (NaOH) placés en aval. A intervalles réguliers, un ver de terre est prélevé, disséqué sur la face ventrale, et autoradiographié entier à l'aide d'un Cyclone<sup>TM</sup>.

Deux autres expériences similaires, mais avec un seul pilulier dans un bocal, permettent de comparer le dégagement de  $^{14}\text{CO}_2$  en présence et en absence de ver de terre. Ce dégagement est mesuré à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

La figure 7 montre que le  $\text{CO}_2$  radioactif provenant de l'OLA 50 augmente jusqu'au 27<sup>e</sup> jour, et arrive à une phase plateau qui correspond à 100% de minéralisation de l'OLA 50.

Il y a une très faible différence de minéralisation entre les bocaux contenant des micro-organismes et ceux contenant des vers de terre. D'autres expériences ont corroboré le fait qu'il n'y a pas beaucoup de différences de dégradation en présence de vers de terre ou de micro-organismes.

La figure 8 montre l'autoradiographie d'un ver de terre entier prélevé 26 jours après le début de l'expérience, c'est-à-dire 12 jours après avoir été mis en contact avec le biosynthésol. On voit que la radioactivité est uniformément répartie, et donc que l'OLA 50 a été bioassimilé dans tous les tissus. Il semble cependant y avoir plus de radioactivité dans sa partie antérieure que dans sa partie postérieure.

Ces résultats montrent que les vers de terre sont capables d'assimiler les oligomères d'OLA 50, mais ils ne permettent pas de savoir si l'assimilation est directe, ou passe par l'intermédiaire des micro-organismes commensaux. Certains résultats inédits<sup>3</sup> suggèrent que les vers de terre se nourriraient de micro-organismes ayant bioassimilé les OLA 50 sous forme de métabolites, métabolites assimilés ensuite par les lombriciens. Ceci est visualisé sous la forme de grains radioactifs de  $^{14}\text{C}$  répartis dans tout l'organisme lombricien. Ces métabolites subissent ensuite un remplacement rapide (cycle de Krebs) qui permet le maintien et la croissance des vers de terre en leur fournissant l'énergie dont ils ont besoin, et en relâchant du  $\text{CO}_2$ .

---

<sup>3</sup> Alauzet et al., résultats non publiés

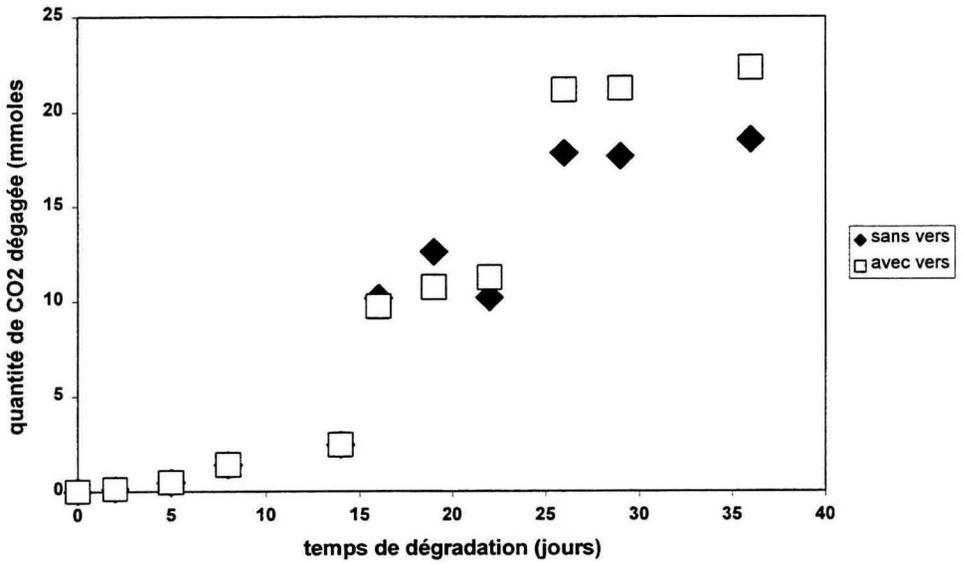


Figure n°7 : comparaison entre le dégagement de CO2 radioactif avec et sans vers

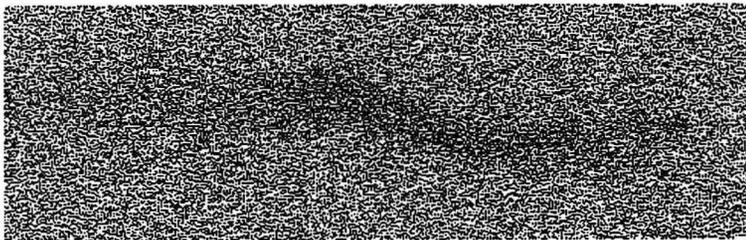


Figure n°8 : autoradiographie d'un ver de terre nourri pendant 12 jours à l'aide d'oligomères uniformément marqués au  $^{14}\text{C}$

## 5. Conclusion

En conclusion, ce travail montre que le poids d'une population de vers de terre peut être un bon moyen de suivre la bioassimilation de polymères dégradables ou biodégradables. Même si, dans le cas des PLA, seuls les oligomères autorisent les vers de terre à croître, il ne faut pas perdre de vue que les PLA HMM (qui possèdent des propriétés mécaniques les rendant éventuellement utilisables pour des applications industrielles dans le domaine de l'emballage ou du jetable) seront fortement dégradés pendant la phase thermophile du compostage, les vers de terre étant tout à fait capables d'en assimiler ensuite les résidus. De plus, les résultats obtenus suggèrent que la biodégradation des oligomères se fait principalement grâce aux micro-organismes du tube digestif des vers de terre, ces derniers se nourrissant ensuite de ces micro-organismes.

# Test de biodégradabilité sur lit de Vermiculite

## *Biodegradability test on Vermiculite bed*

Francesco Degli-Innocenti, Maurizio Tosin, Gaetano Bellia  
Novamont, via Fauser 8, I-28100 Novara, Italy  
tel. (+39)-0321-699607, E-mail: Novamont.DegliInnocenti@novara.alpcom.it

**Résumé :** La vermiculite, minéral argileux, peut être colonisée par les micro-organismes thermophiles et utilisée comme milieu de culture solide en remplacement du compost dans le test de compostage contrôlé qui est une méthode respirométrique largement répandue pour évaluer la biodégradabilité des plastiques. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent que la vermiculite activée n'affecte ni le taux de biodégradation, ni le niveau de biodégradation final. La vermiculite peut être suggérée comme procédure d'extraction en utilisant l'eau ou les solvants organiques, permettant la détection des métabolites intermédiaires et des résidus après biodégradation. Cette approche analytique est très difficile et très complexe avec du compost. C'est pourquoi, il est possible de déterminer la balance en carbone par les dégagements de CO<sub>2</sub> et par l'analyse des résidus en utilisant une extraction à la vermiculite. Ce travail a été en partie financé par la CE (DG XII) dans le cadre du contrat SMT « Labelling biodegradable products » n° SMT4 CT 972187

**Abstract :** *Vermiculite, a clay mineral can be colonised by thermophilic micro-organisms and used as a solid matrix in place of mature compost in the controlled composting test, a respirometric assay widely applied to assess biodegradability of plastics. The results obtained up to now indicate that activated vermiculite does affect neither the biodegradation rate nor the finale biodegradation level. On the other hand, the activation procedure can give rise to a more standardised inoculum. Vermiculite can be subjected to extraction procedures using either water or organic solvents, allowing the detection of possible metabolic intermediates and polymeric residues left after biodegradation. This analytical approach is difficult in mature compost, a very complex organic matter. Therefore, a test termination is possible to determine a carbon balance taking into account both the evolved CO<sub>2</sub> and the polymeric residue or the metabolic intermediates possibly extracted from vermiculite. This work was partly financed by the European Commission (DGXII) with the SMT "Labelling biodegradable products" project SMT4-CT97-2187.*

**Mots-clés :** biodégradabilité, test, vermiculite, bilan en carbone, résidus, polymères

**Keywords :** *biodegradation, test, vermiculite, carbon balance, residues, polymers*

## 1. Introduction

The biodegradability of plastics and packaging under composting conditions is measured using a specific test method originally developed by the Belgian Company Organic Waste Systems and standardised by the European Committee of Standardisation (CEN) and by the International Standardisation Organisation (ISO/DIS 14855). The environmental conditions of the composting test are the following: high temperature (58°C); aerobic conditions; proper water content (about 50%). Mature compost is used as a solid matrix, as a source of thermophilic micro-organisms (inoculum), and as a source of nutrients. The test method is based on the determination of the net CO<sub>2</sub> evolution, i.e. the CO<sub>2</sub> evolved from the mixture polymer-compost minus the CO<sub>2</sub> evolved from the unamended compost (blank) tested in a different reactor. The evaluation of the CO<sub>2</sub> is a very important indication of the ultimate biodegradation of the material, since it attests the level of mineralization reached by the organic carbon. However, the method takes into account only the appearance of CO<sub>2</sub> (the main product of the biodegradation reaction). The disappearance of the polymer (the original substrate), which should fit the appearance of the CO<sub>2</sub>, is not measured. This factor should be taken into account and also the production of low molecular weight substances, whenever toxic intermediates are expected should be assessed. Furthermore, in order to complete the carbon balance, the carbon trapped in new generated biomass should be determined, if possible. All these analyses are very difficult to perform because the compost is a very heterogeneous and complex matrix. The detection of test material's residues and of metabolic compounds produced during degradation could be more easily followed using liquid test systems, such as the Sturm test (ISO/FDIS 14852). However, the Sturm test is not a simulation of the real composting environment since it is run under liquid conditions and, usually, at room temperature, using mesophilic inocula, and at neutral pH. The pathway of degradation and of by-products formation could differ in the two systems. Results obtained in liquid conditions could drive to misleading conclusions, if applied to composting.

The knowledge of the good properties of vermiculite used as a microbial carrier for agriculture purposes (Pesenti-Barili et al., 1991; Pesenti-Barili and Degli-Innocenti, 1991), led us to the idea of applying this material as a solid bed, in place of the compost, for composting experiments. The general purpose is to set up a "comprehensive" solid phase biodegradation test method in order to: measure biodegradation as CO<sub>2</sub> evolution; retrieve possible final residues of the original polymer (to allow a cross-verification of the CO<sub>2</sub> results); detect possible low molecular weight molecules released into the solid matrix by the test material; perform ecotoxicological testing using a "clean" matrix, with a low background activity. In this paper the main results obtained in this study, partially financed by the European Commission with the project SMT SMT4-CT97-2187, are reviewed.

## **2. Vermiculite, a mineral substrate suitable for microbiological applications**

Vermiculite is a clay mineral applied as a concrete additive for building purposes, as a textural material in painting or as an aggregate in certain plaster formulations used in sculpture. Its formula is:  $(\text{Mg,Fe,Al})_3(\text{Al,Si})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Vermiculite is an inert mineral solid material which is neither active nor immediately suitable for biodegradation studies. It must be inoculated with an appropriate microbial population. In order to assure a viable and active microbial population and an homogeneous distribution of this population in the fermentation bed, it is necessary to add nutrients to allow a microbial growth. Vermiculite can be used as a substrate either for assessing disintegrability and mass loss under composting conditions or for measuring mineralization into  $\text{CO}_2$ .

### **2.1 Mass loss of samples under composting conditions using vermiculite as the solid substrate**

Vermiculite is supplemented with organic nutrients (cellulose, starch, nutrient broth), inorganic nutrients, water, and inoculated with compost extract. The plastic samples are either directly mixed with the vermiculite to follow the disintegration (the disappearance) or pre-weighed and inserted into net pockets for monitoring the mass loss. The mixture is incubated at high temperature ( $50\text{-}58^\circ\text{C}$ ), turned periodically, and its water content controlled by direct weighing. The procedures are very similar to a laboratory test method (Tosin et al. 1996) recently standardised by UNI (UNI 10785, January 1999). The only major difference is the use of vermiculite in place of a synthetic waste. Results obtained testing this system have shown that an active environment is developed and degradation rates measured in this system are consistent with those found using mature compost or synthetic waste as a solid bed (Tosin et al. 1996).

### **2.2 Activated vermiculite as a solid substrate for biodegradation studies under composting conditions**

In respirometric studies the background production of  $\text{CO}_2$  should be substantially lower than the expected  $\text{CO}_2$  production of the test material, otherwise the sensitivity of the measurement can be very low. The procedure found by us (Bellia et al. 1999) allows a background  $\text{CO}_2$  production which is compatible with the composting test. Vermiculite is supplemented with organic nutrients (cellulose, starch, nutrient broth), inorganic nutrients, water, and inoculated with compost extract. It is then incubated in a vessel at  $50^\circ\text{C}$  for 3 days (pre-fermentation step). In this period the vermiculite is turned periodically to allow aeration and its water content controlled by weighing the mass and adding water, if needed. A high microbial growth occurs and vermiculite is colonised by thermophilic microorganisms (from 8500 to a final value of  $4.7 \times 10^8$  CFU/g). At the end of the 3 days pre-fermentation, the  $\text{CO}_2$  evolution is comparable with the mature compost's initial production; vermiculite is now called "activated vermiculite" and can be dispensed into the bioreactors and used as a solid matrix in biodegradation experiments under composting conditions.

### **2.3 Use of activated vermiculite in place of mature compost in the controlled composting test**

In order to verify if the activated vermiculite could be successfully used as a solid matrix in place of mature compost, a controlled composting test was performed using microcrystalline cellulose (Avicel) as a reference material. The final level of degradation in compost and vermiculite was practically identical, after 68 days of incubation. However, the biodegradation rate of cellulose was higher in vermiculite than in compost (Figure 1). Considering the results of several tests done with cellulose (Degli-Innocenti et al. 1998), we believe the biodegradation rate of cellulose in mature compost in this experiment was lower than normal, while the behaviour in activated vermiculite was similar to what expected. We conclude that this is a consequence of the batch of compost used in the experiment, stored for a too long time in the laboratory, and probably having a low microbial concentration and/or activity. It is very interesting to remark that the same sample was used to inoculate vermiculite. This suggests another possible advantage in using the activated vermiculite. The activation phase, causing a microbial growth, would produce an active inoculum more standardised than the original sample of compost. The results of cumulative CO<sub>2</sub> production are plotted in Figure 2. The activated vermiculite produced less CO<sub>2</sub> than mature compost. This is expected considering that substantially no organic carbon is available in the vermiculite while compost is a matter reach of slowly degrading substances. A further validation of the test system was done with an experimental material called 2030/489, a blend mainly composed by starch, polycaprolactone and Estane 54351 (18%) plus minor amount of plasticizers. Estane 54351 (BF Goodrich, USA) is a thermoplastic polycaprolactone-type polyurethane (PU). The biodegradation in compost and in vermiculite was identical: the final biodegradation of the material was 89.7% in vermiculite and 88.2% in compost after 56 days (Figure 3).

The results of the respirometric tests indicate that the use of activated vermiculite in place of mature compost does not change the evaluation of the biodegradation, at least for the two materials tested up to now. Further materials shall be tested in order to confirm the full suitability of activated vermiculite for this purpose, especially aiming at using it in standardised test methods.

### **2.4 Biodegradation of glucose in vermiculite causes no "priming" effect**

It has been reported that glucose and its polymers can stimulate the mineralization of the organic matrices used in solid-phase biodegradation studies (Bartha and Shen 1996; Shen and Bartha 1996; Adamczyk 1996). This induction, called "priming effect", has raised many concerns regarding the reliability of the controlled composting test whenever a "priming" substrate is tested, because a significant overestimation of the real biodegradation can be expected. Since the priming effect is due to the extra degradation of the organic carbon present in the compost, it was speculated that the activated vermiculite, being basically an inorganic matrix, could be unaffected by this phenomenon. In order to check this hypothesis, the biodegradation of glucose (a strong "primer") has been measured with the

vermiculite composting test. The CO<sub>2</sub> production and the glucose concentration has been measured (residual glucose by water extraction and HPLC analysis). The results, in Figure 4, exclude that a priming effect causes an overestimation of the biodegradation of glucose.

### **3. Detection and recovery of residues from the composting beds after biodegradation**

Mature compost is a matrix which is not easily analysable because of its very complex organic composition. Extraction from compost is a long, tedious procedure and the extracts are generally not suitable for further analysis. This makes difficult the search for possible residues left in the fermentation bed after biodegradation. On the other hand, our studies indicate that vermiculite is particularly suitable for these purposes, since it is easily treatable both with water and with organic solvents, allowing the achievement of clear extracts which can be easily subjected to different analyses and recovery of precipitates.

In particular it was used the model plastic material 2030/489 (described above). The poly( $\epsilon$ -caprolactone)-type polyurethane contained in this material is based on the aromatic amine 4,4' diphenyl methane diisocyanate (MDI). A concern about the use of a MDI-based polyurethane in biodegradable materials is that during biodegradation the toxic breakdown product 4,4' diamino diphenyl methane (MDA), could be released (Figure 5).

#### **3.1 Water extraction and detection of 4,4' diamino diphenyl methane**

The MDI-based PU during biodegradation under composting conditions releases traces of the breakdown product MDA. At the end of the controlled composting test mentioned in paragraph 2.3, the fermentation beds of each series has been subjected to extraction with water followed by HPLC analysis. The chromatograms showed that a peak corresponding to MDA was only present in the vermiculite-2030/489 sample. In all the other samples, that is: compost+2030/489; vermiculite blank; compost blank; the peak was not detected. The total amount of MDA present in the fermentation bed was estimated to be 0,42% of the initial PU in one experiment (Bellia et al. 1999) and 0.49% in another (Tosin et al. 1998). In compost no MDA is detected. There are two possible explanations: either MDA is more degradable in compost than in vermiculite or MDA is not extractable from compost. We have shown (Tosin et al. 1998) that the recovery yield of MDA from compost is very low (10%) while the recovery from vermiculite is good (90%).

#### **3.2 DMSO extraction and detection of PU by UV spectroscopy**

The fermentation beds (compost or vermiculite) were subjected to an extraction with dimethyl sulfoxide (DMSO). An UV-Vis analysis showed that a peak with a maximum at  $\lambda=281-282$  nm, characteristic of the PU, was detected both in the vermiculite + 2030/489 extract and in the compost + 2030/489 extract, but was absent in the corresponding blanks. This indicates that the PU component of

2030/489 or a residue of it, containing its spectrophotometrically active group (the aromatic ring), was present in the DMSO extracts. The final amount of the PU was estimated to be the 96.5% of the initial amount in vermiculite and the 106.9% in compost. This finding, showing a same fate of the PU in the two fermentation beds, is an important indication, along with the CO<sub>2</sub> evolution data, that the use of activated vermiculite in place of compost does not change the biodegradation process.

### **3.3 The recovery of a polymeric residue from the DMSO extract is feasible only from vermiculite**

After acid addition, white flocks precipitated in the DMSO extract of the vermiculite + 2030/489 while no precipitation was observed in its blank extract. The compost extracts became both very turbid and filtration resulted to be a very difficult procedure so that, after several attempts, the operation was stopped. The precipitate formed in the vermiculite+2030/489 was easily recovered with filter-paper.

### **3.4 The precipitate is a residue of the PU partly degraded in the PCL moiety**

The extraction and analysis of the vermiculite bed after the biodegradation of the model material 2030/489 have been performed in two independent experiments with reproducible results (Tosin et al. 1998; Bellia et al. 1999). Through DMSO extraction, precipitation with acid and filtration, it was recovered a precipitate which, via elemental analysis, IR-spectroscopy, and NMR, has been identified as a residue of PU biodegradation. The PU component of this material was only partially degraded during the composting process. The prevailing reduction of the aliphatic moiety was in agreement with other studies indicating that the degradation of polyester-polyurethanes is due to the hydrolysis of the ester linkages (Kay et al. 1993) and that the proximity of the urethane linkage may interfere with enzyme accessibility to susceptible groups in the molecule (Seal and Pathirana 1982). The total solid precipitate recovered with this extraction was estimated to be the 54% of the initial PU in one experiment (Bellia et al. 1999) and 39% in another one (Tosin et al. 1998).

## **4. A carbon balance is feasible using the vermiculite bed**

It is possible to perform a carbon balance by measuring the biodegradation (the CO<sub>2</sub> evolution), and, at the end of the respirometric test, recovering the polymeric non biodegraded residues with an extraction procedure. This has been shown with the model material 2030/489 and also with glucose (Figure 4). The residue recovered from the 2030/249 fermentation bed has been subjected to elemental analysis. In Table 1 is shown the carbon balance where the test material before

degradation and the degradation products (CO<sub>2</sub> and residue retrieved from the fermentation bed) are compared. The carbon produced during biodegradation as CO<sub>2</sub> and the carbon present in the solid residue rescued from the fermentation bed, represent together the 101.11% of the organic carbon of the test material before biodegradation. This result indicates that a carbon balance in biodegradation studies under composting conditions is feasible using vermiculite as solid substrate in place of mature compost on condition that a suitable solvent of the test material is available. On the other hand, it has been confirmed that the handling of mature compost is difficult and the extraction procedures hindered by the complex nature of this organic substrate. The carbon balance (Table I) implicitly exclude biomass as a relevant reservoir of the test material's organic carbon. Obviously this should be confirmed with a direct biomass measurement. However, we consider it as a very reasonable hypothesis since the thermophilic metabolism is very accelerated: microbial cells are very soon forced into a starvation regime which enhances the consumption of endogenous reserves. The fraction of test material's carbon used in a first phase for anabolic reactions would be soon needed for catabolic reactions with an almost complete oxidation into CO<sub>2</sub>.

## 5. Acknowledgements

This work was partly financed by the European Community (DGXII) with the SMT "Labelling biodegradable products" project SMT4-CT97-2187.

## 6. References

Adamczyk T.J., Farrell R.E., Eberiel D.T., Gross R.A., and McCarthy S.P., 1996, 5<sup>th</sup> BEDPS Annual Meeting Sept.22-26, 1996 Nashville, USA

Bartha R. and Shen J., 1996, Potential for the priming effect during biodegradation testing with polymeric materials in soil, 5<sup>th</sup> BEDPS Annual Meeting, Sept. 22-26, Nashville, USA

Bellia G., Tosin M., Floridi G., Degli-Innocenti F., 1999, Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions, *Pol. Degrad. and Stability (in press)*.

Degli Innocenti F., Tosin M., Bastioli C., 1998, Evaluation of the Biodegradation of Starch and Cellulose Under Controlled Composting Conditions. *J. of Environ. Polymer Degrad.* 6:197-202

Kay M.J., McCabe R.W., and Morton L.H.G., Chemical and Physical Changes Occurring in Polyester Polyurethane during Biodegradation, 1993, *International Biodeterioration & Biodegradation* 31:209-225.

Pesenti-Barili B., Degli Innocenti F., 1991, Una nuova formulazione per il batterio *Agrobacterium radiobacter* K 84, utilizzato per la prevenzione della galla del colletto, *Agrobiotec*, Ferrara, 19-20 March,

Pesenti-Barili B., Ferdani E., Mosti M., Degli Innocenti F., 1991, Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on various carriers for crown gall control, *Applied and Environ. Microbiology* 57:2047-2051

Seal K.J. and Pathirana R.A., 1982, The microbiological susceptibility of polyurethanes. A review, *International Biodeterioration Bulletin* 18:81-85

Shen J. and Bartha R., 1996, Priming Effect of Substrate Addition in Soil-Based Biodegradation Tests, *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1428-1430

Tosin M., Degli Innocenti F., Bastioli C., 1996, Effect of the Composting Substrate on Biodegradation of Solid Materials Under Controlled Composting Conditions, *J. of Environm. Polymer Degradation* 4(1):55-63

Tosin M., Degli Innocenti F., Bastioli C., 1998, Detection of a Toxic By-Product released by a polyurethane-containing film using a composting test method based on a mineral bed. *J. of Environm. Polymer Degradation* 6:79-90.

Organic C in the test material before degradation (g)	51.9
C oxidised into CO <sub>2</sub> (g)	46.5
Residue of test material retrieved after degradation (g)	9.74
Carbon content of the residue (%)	60.9
Carbon content of the residue (g)	5.9
Total carbon in the degradation products (CO <sub>2</sub> + residue) (g)	52.5
Percentage of recovery of carbon (products/substrate) (%)	101.1

Table 1. Carbon balance of the degradation of 2030/489

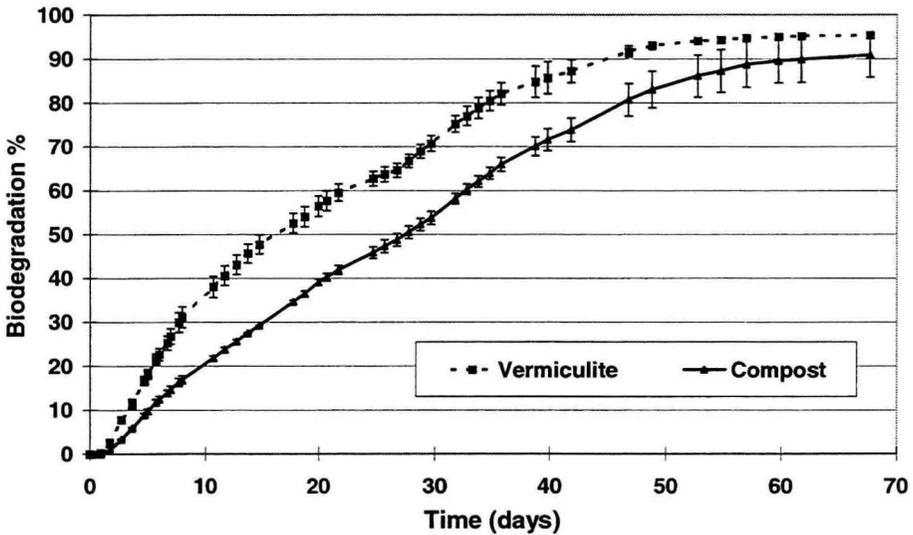


Figure 1. Biodegradation of cellulose measured with mature compost (traditional method) or with activated vermiculite (after Bellia et al. 1999)

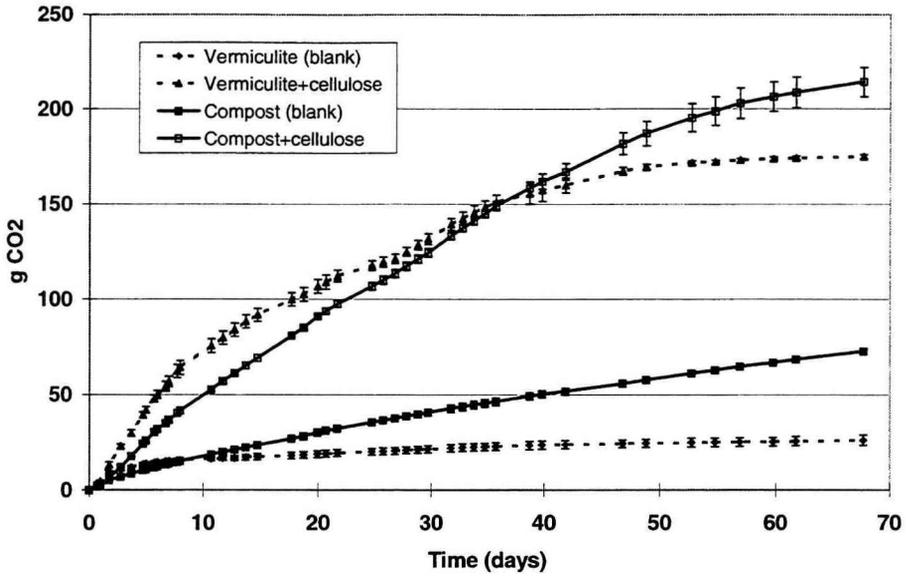


Figure 2. Cumulative carbon dioxide production under composting conditions (after Bellia et al. 1999)

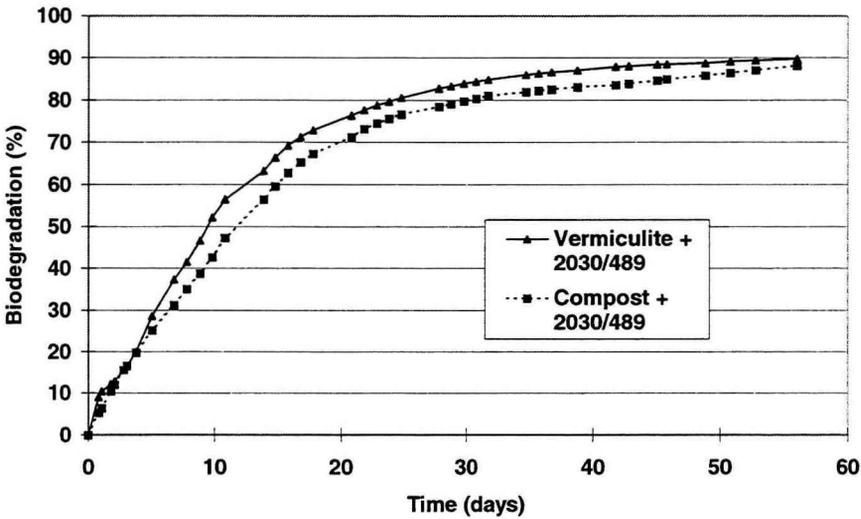


Figure 3. Biodegradation of cellulose measured with mature compost (traditional method) or with activated vermiculite (after Bellia et al. 1999)

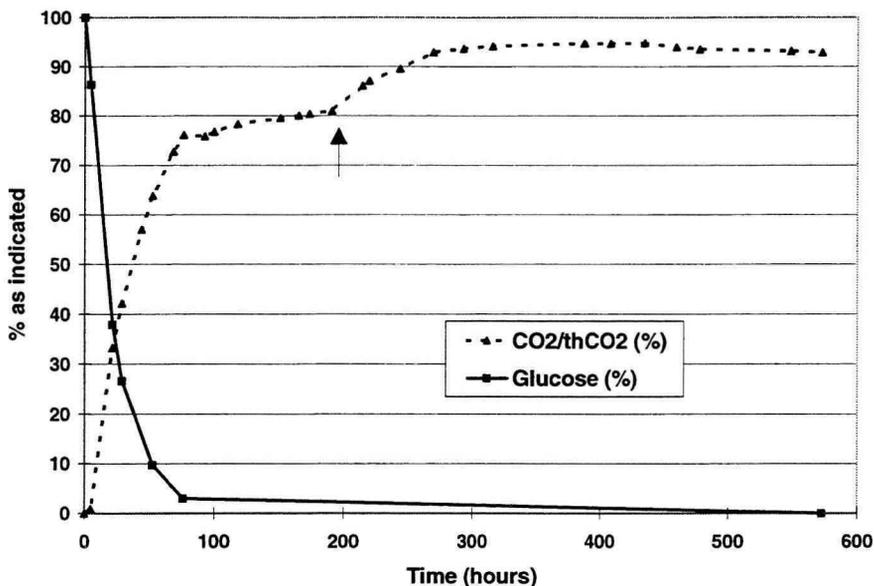


Figure 4. Biodegradation of glucose in vermiculite. CO<sub>2</sub>/theoretical CO<sub>2</sub> production and normalised glucose consumption curves are shown. Arrow indicates a mixing of the composting bed

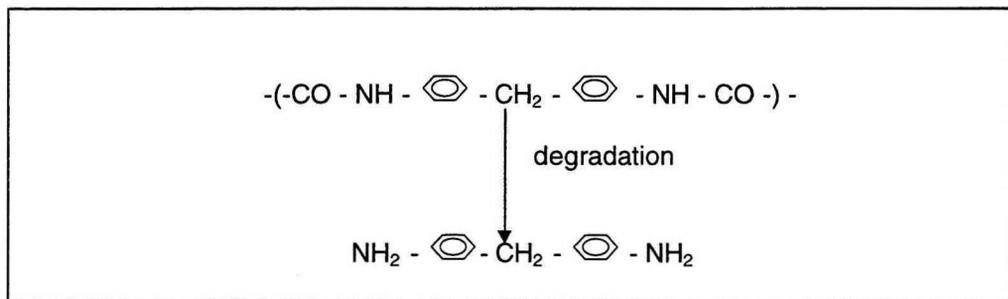


Figure 5. Production of 4,4' diamino diphenyl methane (MDA) from PU

## **LE MARCHÉ**

### **DES PRODUITS BIODEGRADABLES**

- Le marché des produits biodégradables : enjeux, utilisation, élimination, avantages et inconvénients  
Hilaire Bewa, ADEME Angers
- Les plastiques biodégradables au Japon  
Stéphane Guilbert, INRA Montpellier
- Labellisation des matériaux biodégradables  
Guy Jacques, AIB-Vinçotte Belgique



# **Le marché des produits biodégradables**

## **Enjeux, utilisation, élimination, avantages et inconvénients**

### *The market of biodegradable products*

#### *Challenges, uses, disposal, advantages and disadvantages*

Hilaire BEWA <sup>1</sup>, Philippe SCHIESSER <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ADEME - 2 square Lafayette - BP 406 - 49 004 Angers Cedex 1

<sup>2</sup> ECO-CONCEPTION CONSEIL 40, rue des Grands Champs 75 020 Paris

**Résumé :** Protection de l'environnement, gestion optimale des déchets et économie d'énergies, tels sont les principaux enjeux des biomatériaux pour un développement durable.

Après une revue des matières premières et des grandes familles de molécules utilisées dans la fabrication des matériaux biodégradables, un inventaire des principales applications et du marché est exposé. La problématique liée à la fin de vie de ces produits ainsi que celle concernant leur qualité écologique est examinée. Enfin, les effets de levier à court terme et à moyen terme permettant le décollage de ces produits sont exposés.

**Abstract :** *Wastes and environment management, and energy saving are the main challenge of biomaterials for a sustainable development.*

*A review of available raw materials and important families of molecules used for biodegradable material making, are given. An inventory, a list of main applications and an outline of the market are analysed. The problems raised by the end of life of these products (disposal, standards, labels, taxes...) as well as their ecotoxic qualities are examined. At last, short term and long term booming effects allowing the starting of these products on the market are exposed.*

**Mots-clés :** marché, application, qualité écologique, protection de l'environnement

**Keywords :** *market, use, ecologic quality, environment management*

# 1. Introduction

Protection des ressources et de l'environnement, création d'emplois en milieu rural, optimisation du système de gestion des déchets, économie d'énergie, tels sont les principaux enjeux des biomatériaux en terme de Développement Durable. Les biomatériaux représentent également un facteur d'innovation pour le consommateur. A l'heure où le public, de plus en plus sensible aux problèmes de l'environnement, recherche des produits plus naturels les biomatériaux possèdent des atouts non négligeables : bonnes qualités esthétiques et sensorielles (coloris blanc cassé ou couleurs naturelles, brillance et transparence, pas de bruit cassant, toucher plus agréable...)

Ces qualités sont notamment liées aux ressources utilisées (principalement agricoles mais parfois également minérales voire pétrolières pour les nouveaux plastiques biodégradables). Au-delà de l'intérêt consommateurs, ces nouveaux matériaux peuvent également être utiles dans des applications particulières, à forte valeur fonctionnelle ajoutée (applications médicales, biodégradation apportant un plus pour le produit tels les sacs à compost...).

Dans l'exposé seront abordés :

- une revue des matières premières et des grandes familles de molécules utilisées dans la fabrication des produits dits biodégradables ;
- un inventaire des principales applications et le marché ;
- la problématique liée à la fin de vie de ces produits (normes, labels, taxation type Point Vert) ainsi que celle concernant leur qualité écologique (méthodes et outils d'évaluation).
- les effets de levier à court et moyen terme permettant le décollage du marché des produits dits biodégradables.

## 2. Biopolymères et biomatériaux : caractéristiques et définitions ( tableau 1 )

Les produits biodégradables se caractérisent par :

- la « renouvelabilité » éventuelle des ressources
- la similitude des composés moléculaires
- le type d'application possible et le matériau « classique » éventuellement substitué
- les possibilités de dégradation offertes en fin de vie

Le terme « biopolymères » désigne originellement « *une partie des différents types de molécules de poids élevé formés par des organismes vivants au travers d'une polymérisation d'éléments monomériques. De structure plutôt cristalline, on y retrouve les acides nucléiques, les protéines et les polysaccharides* »<sup>1</sup>.

Dans l'usage actuel, ce terme est employé également pour désigner tout polymère organique dont les éléments monomériques sont générés par des matières

---

<sup>1</sup> source : NF 2000 Network, UK

premières agricoles au travers d'un processus de fermentation (par exemple les acides lactiques du sucre ou de l'amidon peuvent former des acides poly-lactiques (APL ou PLA) ou du polyhydroxy butyrate (PHB) et des polymères similaires.

Suivant donc le contexte, **plusieurs notions peuvent être implicites dans ce terme** :

- la **structure moléculaire** (origine du terme)
- la **biodégradabilité** (contraction de polymère biodégradable)
- la **renouvelabilité des ressources** (ressources non épuisables issues de la biomasse)

La première notion n'étant pas discriminante, nous garderons donc en vue renouvelabilité et biodégradabilité et opterons pour le terme plus général de **biomatériaux** que nous définirons ainsi :

*« tout matériau ou composé de matériaux possédant des qualités de biodégradabilité (le critère de renouvelabilité n'étant pas partagé par tous les matériaux, celui-ci sera précisé dès que nécessaire) ».*

Reste à définir évidemment les critères de biodégradabilité.

*Est dit biodégradable un matériau « apte à subir un processus de décomposition sous forme de dioxyde de carbone, de méthane, d'eau, de composés non organiques ou de biomasse, le mécanisme fondamental de ce processus reposant sur l'action enzymatique des micro-organismes, laquelle peut être mesurée au moyen de tests standards, à un moment donné, afin de déterminer les possibilités réelles de destruction du produit ». source ASTM.*

### **3. Les ressources**

On peut classer les ressources par rapport aux grandes industries concernées (tableau 2 ) ou par rapport à leur renouvelabilité potentielle ou avérée ou leur abondance (Ex : ressources minières ). A noter également les matériaux jouant le rôle de charges ( carbonate de calcium, déchets végétaux ).

### **4. La matière**

En considérant les matières premières utilisées on peut distinguer 4 grandes familles de composés moléculaires ( tableau 3 ), avec certaines matières premières plus utilisées que d'autres telles que l'amidon (produits ARD) ou le PLA (« Eco-pla »). Par ailleurs il existe la possibilité d'obtenir des produits avec des utilisations croisées ( amidon + PCL = « Mater-bi » par exemple).

## 5. Le marché des produits biodégradables

Bien que le marché des produits biodégradables soit encore limité, les produits disponibles sur le marché sont très variés et les applications nombreuses.

### 5.1. Sacs de collectes des déchets verts - emballage de calage

L'une des applications qui suscitent beaucoup d'intérêts chez de nombreux producteurs de plastique est le **sac à compost** qui est déjà utilisé par plus de 500 communes européennes. En France trois communes expérimentent actuellement les sacs mater-bi de Novamont. Il s'agit des communes de Castelnaudary, de Nior et de Rambouillet.

Les **emballages de calage** sont également un des débouchés les plus importants du marché des biopolymères notamment aux Etats Unis. Exemple : le produit Eco-foam de American Excelsior Company (fabriqué à partir d'amidon mis au point par les chercheurs de National Starch). Il se présente sous la forme de chips et autres petits blocs plastiques destiné à l'absorption des chocs.

Sacs de compostage et emballage de calage représentaient en 1996, 90% du marché des biopolymères.

### 5.2. Emballage alimentaire

Malgré des contraintes importantes c'est également un champ d'application des biomatériaux. Pour preuve le lancement en janvier 98 du pot en PLA de Danone associant DOW (1<sup>er</sup> producteur mondial de PS), Cargill (1<sup>er</sup> producteur de semences mondial) et le français AUTOBAR (fournisseur de pots thermoformés). Ce produit possède des qualités de thermoformage, d'imprimabilité, de protection du produit, de stabilité, de biodégradabilité dans des installations de compostage

Bien que le concept produit et emballage soit cohérent sur le plan marketing ( lait utilisé dans le yaourt issu de l'agriculture biologique et emballage en matériau biodégradable) la commercialisation a été arrêtée en 1999 en raison de son coût trop élevé (coût multiplié par 3 par rapport à celui du PS sans pouvoir obtenir des taxes DSD plus faibles) et d'une perception contrastée par le consommateur (qualité écologique du pot de yaourt : toujours présence de l'opercule en aluminium, degré réel de compostabilité du matériau).

### 5.3. Emballage non alimentaire

Le **non alimentaire** a vu le lancement dès 1990 de la bouteille WELLA, grande marque de cosmétique européenne (produit BIOPOL).

Il faut noter que les applications dans le domaine du non alimentaire sont beaucoup moins contraignantes en terme de sécurité que celles de l'emballage alimentaire.

### 5.4. Les produits d'hygiène et d'entretien

Ces produits à durée de vie très courte peuvent également être produits à partir de biomatériaux. C'est notamment le cas du rasoir en Biopol de Monsanto. Un exemple récent de lancement de matériaux biodégradables en France est illustré par le film hydrosoluble de papier de toilette ECOLUTION (base PVOH) avec un

marquage très ludique qui incite le consommateur à tester lui-même la qualité d'hydrosolubilité de l'emballage.

La société Soltec fournit quant à elle toutes les multinationales de l'entretien (Henkel, Reckitt et Coleman, Johnson) pour conditionner des produits désinfectants et des blocs de chasse d'eau également en PVOH.

Ciba-Geigy, Du Pont, Rhône-Poulenc utilisent du film hydrosoluble pour certains de leurs produits.

Greensol distribue près de 130 tonnes annuelles de ce type de produits pour des applications agro-chimiques, désinfectantes, bactéricides et autres petits marchés.

## 5.5. Restauration

Mc Donald's a lancé depuis janvier aux Etats-Unis (après des tests sur d'autres biomatériaux en Europe) un emballage comestible à base d'amidon de pomme de terre, de cellulose et de carbonate de calcium. Ce matériau est le résultat de 10 ans de recherche et celui de l'optimisation des qualités écologiques des matériaux utilisés en lien avec leur supériorité fonctionnelle ainsi que leur compétitivité économique.

La production prévue pour 99 est de 1,8 milliard d'emballages et 3 chaînes de production sont déjà construites. Peut-être bientôt en France ?

## 5.6. Commerce

Autre domaine sensible où les biopolymères pourraient trouver des débouchés importants : le sac de sortie de caisse. Possible levier : le projet d'éco-labellisation de sacs en plastique.

Autre produit couramment utilisé : la carte de crédit. Celle de la Co-opérative Bank (partenariat Greenpeace et Monsanto) reste le seul découché du Biopol.

## 5.7. Fournitures de bureau

Outre le papier classique, diverses pâtes à papier font désormais appel au chanvre ou à la fibre de banane comme par exemple dans les produits vendus par Nature et Découvertes.

Cette même chaîne de magasins commercialise les stylos à base d'amidon de maïs produits par Novamont.

## 5.8. Agriculture, chasse

Mis au point par DOW France, le film de paillage Terrasana (prix éco-produit 95-96) utilise du kénaf et des papiers recyclés. La gamme comporte 3 temps de biodégradation possible : 10 semaines, 6 mois, 1 an. A noter que la culture du kénaf n'exige pas d'engrais et nécessite très peu d'herbicides.

Le marché européen du volume de paillage plastique est de 75 000 tonnes. Le coût actuel en France du ramassage des paillages plastiques est de 1 800 F/ha environ, celui de l'élimination de 600 F/tonne.

Autres perspectives d'utilisation :

- le sac compostable pour les déchets horticoles des mairies
- le pot de fleur biodégradable

Des films en PVA peuvent également être utilisés dans le phytosanitaire pour éviter le contact des mains de l'utilisateur avec le contenu.

## 5.9. Plastiques spéciaux

Liés à une valeur fonctionnelle particulière, ces matériaux disposent d'atouts pour prendre rapidement le pas sur les matériaux traditionnels. Citons notamment

### les plastiques à usage médicaux

- film en PVA (poly vinyl alcool) produits par les sociétés Enak (polymer films) et Cambridge Consultants
- film imprégné d'un produit bactéricide pour la fabrication de pansements

Le marché du PVA (toutes applications) représente en Europe : 1 000 tonnes/an aux USA : 3 000 tonnes/an au Japon : 10 000 tonnes/an

**les films comestibles** (Méthyle hydroxyde propyle cellulose – MHPC, fabriqués notamment par des sociétés américaines dont Polymer Films et Chris Craft)

- applications : pâtisserie et panification industrielle (couche isolante entre une pâte de gâteau et sa garniture dans le cas d'un fourrage)

**les films barrière** (également MHPC) avec les qualités suivantes :

- améliorent la présentation ou la conservation de certains aliments
- limitent le rancissement des produits sensibles
- maîtrisent la respiration de fruits ou légumes frais ou en 4<sup>ème</sup> gamme
- retiennent des agents anti-microbiens à la surface d'un aliment

## 6. Fournisseurs de matériaux et de produits dits biodégradables

### 6.1. En France ( tableau 4 )

Il existe peu de fournisseurs et peu de capacités de production (certaines sociétés distribuent uniquement pour l'instant les matériaux) en raison d'une demande faible malgré des possibilités de valorisations agricoles importantes.

Plusieurs projets sont en cours notamment la construction d'une ligne pour la production par Roverc'h sous l'enseigne Polynat de deux produits le Getrex à base d'amidon de seigle et le Rofa composé de fibres naturelles compressées, extraites d'éclats de bois ou de pailles.

### 6.2. En Europe ( tableau 5 )

La capacité de production serait potentiellement importante car de nombreuses firmes de notoriété internationale envisageraient, en cas de décollage du marché du biodégradable, d'utiliser une partie des capacités de leurs lignes existantes.

Chacune de ces firmes ont conçu leur propre plastique biodégradable artificiel ou d'origine végétale. Par ailleurs de nouveaux offreurs ont apparu avec des produits positionnés « éco-conception » mais non biodégradables (ex. Ecolean avec un mélange utilisant notamment du carbonate de calcium).

Il est important de noter l'arrivée au cours de la période 94-97 de 6 nouveaux producteurs, tous acteurs majeurs du marché des polymères classiques : BASF, BAYER, DOW, DUPONT, EASTMAN, MONSANTO

### **6.3. Au Japon ( tableau 6 )**

Un regain d'intérêt se manifeste depuis quelques années pour les matériaux biodégradables et l'on trouve des matériaux plus spécifiques tel le polybutylène succinate de Showa Denko commercialisé sous le nom de Bionolle.

### **6.4. Aux. Etats-Unis ( tableau 7 )**

Le produit phare des biomatériaux pourrait être bientôt le PLA avec les capacités de production mondiale les plus importantes (DOW/CARGILL) suivi de près par le fournisseur de Mc Donald's avec un produit comestible.

## **7. Tendances mondiales**

Le tableau 8 donne la situation du marché en 1996 par zone géographique. La production totale a été de 14 600 tonnes pour une capacité estimée à 28 000 tonnes. Il faut noter une consommation en deçà des capacités de production (ne sont pas inclus l'utilisation des lignes actuelles des polymères classiques ni celles des produits issus de la sylviculture).

## **8. Prévisions**

De 14 000 tonnes en 1996, la production mondiale pourrait atteindre grâce aux gains de productivité et aux nouvelles capacités de production (notamment américaines) 200 000 tonnes en 2001 et avoisiner les 500 000 tonnes en 2005. Certaines sources font état d'une production de 1,4 million de tonnes en 2001. Les taux de croissance annuels seraient donc très largement supérieurs au taux de croissance du reste de l'économie. Ces produits seront constitués à 30 à 40 % de matériaux à base d'amidon. Quant à leur prix certains spécialistes pensent qu'ils varieront entre 3 et 5 \$ à l'échelle industrielle.

## 9. La fin de vie

L'élimination de ces produits biodégradables reste encore à clarifier par rapport à plusieurs paramètres :

- la biodégradabilité propre de ces matériaux : critères validés ? compostage domestique ? compostage industriel ?
- l'accessibilité de l'utilisateur final à ces installations : très forts taux par exemple aux Pays-Bas (90 %) ou en Allemagne (60 %)
- la durée et la qualité du compost ainsi obtenu (métaux lourds, phytotoxicité, écotoxicité...)

Une taxation différenciée pour ces matériaux pourrait également améliorer leur compétitivité économique. En Allemagne il existe un projet de taxer 10 fois moins les biopolymères par rapport aux polymères classiques.

## 10. Qualité écologique

- nécessité de positionner ces matériaux par rapport aux matériaux classiques
- de nombreux travaux en terme d'études environnementales existent pour les matériaux classiques mais très peu pour les biomatériaux
- le champ de l'Analyse du Cycle de Vie doit être élargi à d'autres problématiques : i) occupation du territoire, ii) sac à dos écologique ( consommations de ressources secondaires), iii) bilan émissions / fixation de CO<sub>2</sub>, iiiii) intérêt en terme de Développement Durable
- existence de peu de données à l'heure actuelle.

## 11. Effets de levier

*Au niveau de l'offre*

- baisse du prix significative des matériaux dès 2001
- augmentation des capacités de production
- amélioration des qualités fonctionnelles des matériaux

*Au niveau de la demande*

- programme de Verdissement de l'Administration : introduire des critères environnementaux dans les appels d'offres publics,
- politique d'éco-conception dans les entreprises : intégrer la qualité écologique dès la conception des produits,
- demande des citoyens et des consommateurs : respect de l'environnement (vision positive du compostage)

## 12. Conclusion

Le marché des produits biodégradables en est encore à ses premiers balbutiements et les véritables niches commerciales restent à développer. Parmi les freins qui limitent le développement de ces produits on peut citer l'amélioration des caractéristiques techniques de biomatériaux, leur élimination et le prix des

matières premières. Ce dernier facteur pourrait très prochainement évoluer grâce aux « éco-taxes » sur l'emballage, et aux nouvelles capacités de production. Au-delà des critères scientifiques et techniques, l'enjeu principal reste la perception de ces nouveaux matériaux par les différents acteurs. Il ne s'agit pas tant d'un simple changement de matériau, mais bien d'un changement en terme structurel, organisationnel et comportemental. Une pédagogie est à construire, autour notamment d'une démarche multicritère et globale, permettant d'évaluer précisément les intérêts environnementaux et de Développement Durable des produits et de communiquer de façon simple sur des éléments factuels et précis.

### **13. Références bibliographiques**

Actes du colloque « Les journées internationales de l'emballage ». Reims, mars 1999.

Catalogue Nature et Découvertes. Mars 1999.

Biodegradable resins gather momentum for mainstream use. *Plastiscope*. January 1999. 31, 32.

De curieuses usines à plastique. *Biofutur* N°184. Décembre 1998. 84, 86.

Matériaux biodégradables : l'élimination intégrée. *Emballage Digest*. Novembre 1998. 96 - 100.

Les déchets plastiques utilisés comme compost. *Caoutchoucs & Plastiques* N° 772 Novembre 1998.

Le « comme back » des plastiques biodégradables. *L'usine Nouvelle* Hors série. Novembre 1998. 71.

Certification, application and waste management options for biodegradable polymers : the latest experiences from the emerging german market. Jöran Reske, Johannes Schroeter, IBAW (Interessengemeinschaft biologisch abbaubare Werkstoff), décembre 1998

Etude d'évaluation de l'offre en biomatériaux utilisables en emballage primaire. Philippe SCHIESSER, Branche Produits Frais et Direction Scientifique. Groupe Danone, décembre 1998.

Le plastique biodégradable. Un nouveau filon pour les plasturgistes ? *Recyclage Récupération* N°37. 16 Octobre 1998. 18 - 22.

Des plastiques à base de végétaux. *La France Agricole*. 18 Septembre 1998. 35.

Betting big on biopolymers. *Chemical Engineering*. July 1998. 43 - 47.

Evaluation objective de la biodégradabilité des matériaux polymères : mise au point d'une méthode et d'un dispositif instrumental. Anne DECRIAUD-CALMON. Thèse

soutenue le 9 juillet 1998 à l'Institut National Polytechnique de Toulouse. N° d'ordre : 1439.

Breaking into the big time. Biodegradables : Ready to take off. Chemical Week, June N° 10. 1998. 24 - 27.

Plastiques biodégradables : quel avenir ? Packaging international, juin 1998

Wir werden alle Produkte in Bio-Kunststoff verpacken. Danone. Öko-Test, avril 1998.

Les avancées des plastiques biodégradables. L'usine Nouvelle, avril 1998.

Valorisation biologique : à quelle norme vouer le compost ? Environnement et Techniques, mars 1998.

Les plastiques se biodégradent enfin. L'environnement Magazine. Techniques. N° 1566. Avril 1998. 54, 55.

Polymères naturels d'origine agricole : la nouvelle révolution du plastique. Hexagone Environnement. N° 20. Mars-Avril 1998. 8 - 12.

Polymères naturels. Des matériaux biodégradables d'origine agricole. Instantanés Techniques. Mars 1998. 13, 14.

Gestion biologique des déchets : les atouts du compostage vert. La lettre de l'ADEME. Dossier n° 8, mars 1998.

Les plastiques biodégradables au Japon, recherche et production. Rapport de l'Ambassade de France au Japon au Ministère des Affaires Etrangères. Mars 1998. 30 pages.

Biodégradable polymers by Gregory Bohmann with Naoko Takei. CEH Marketing Research Report. Chemical Economics Handbook. SRI International. 1998.

This plastic is similar to LDPE, except that it's biodegradable. Chemical Engineering. December 1997. 27.

Compostage, traitements biologiques : la voie à réexplorer. Recyclage Magazine, août-septembre 1997.

Rapport d'activité AGRICE 1994-1997.

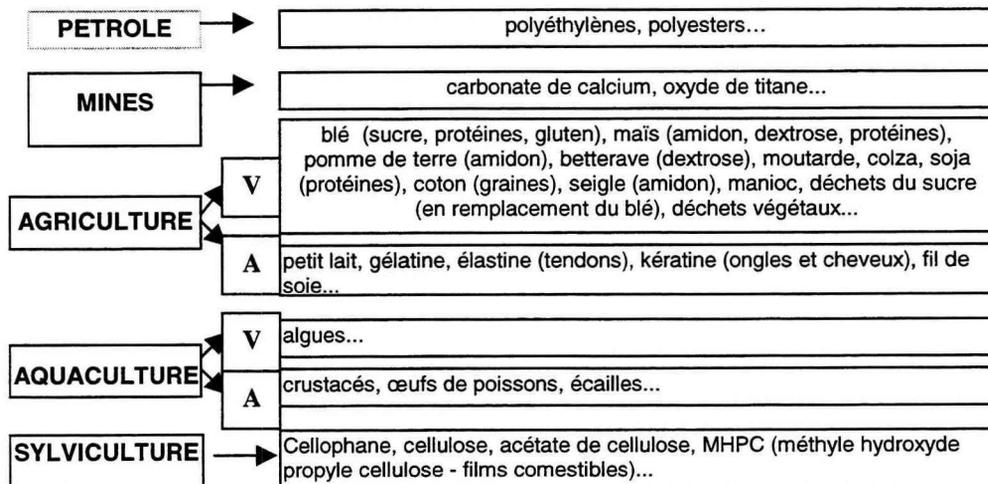
A new kind of plastic plant : a tree ! Chemical Engineering. January 1997. 23. Lettres du COBIO.

Plaquettes fournisseurs.

RESSOURCES	MOLECULES	APPLICATIONS	FINS DE VIE
RENOUVELABLES	POLYMERES : protéines, polysaccharides	TYPE PLASTIQUE	BIODEGRADABLE
		TYPE PAPIER	BIOASSIMILABLE/ BIORESORBABLE
NON RENOUVELABLES (plus ou moins abondants)	AUTRES COMPOSES		AUTRES APPLICATIONS
		COMESTIBLE	
		BIO FRAGMENTABLE	
			COMPOSTABLE

Tableau 1 : Biomatériaux et biopolymères : définitions

Tableau 2 : Ressources



		Renouvelables	Non renouvelables
1. POLYMERES NATURELS	amidon	X	
	acétate de cellulose	X	
	cellulose	X	
	protéines	X	
	chitosan	X	
2. POLYMERES ISSUS D'UN PROCESSUS DE SYNTHÈSE	acide polylactique	X	
	polycaprolactone		X
	alcool polyvinylique		X
3. POLYMERES BACTERIENS	polybutylène succinate et adipate		X
	poly 3-hydroxybutyrate/valérate	X	
	polysaccharides	X	
4. AUTRES	utilisation de matières premières pour leurs propriétés mécaniques ou de charges(carbonate de calcium, déchets végétaux....)		

Tableau 3 : Matière et molécules

type	nom produit	nom entreprise	capacités annuelles (T)
amidon		ARD	pilote <sup>2</sup>
carbonate de calcium, cellulose, alginate, latex	Fibralgues	CRECA	pilote <sup>3</sup>
cellulose + fibres de kénaf	Terrasana	DOW France/TERBATEC (Suisse)	pilote
farine de maïs		VALAGRO	1
farine de bois			
autres farines de céréales et protéagineux			
farine de seigle	Polynat	ROVERC'H	5 000 <sup>4</sup>
lin		LIN 2000	10 000
liège (granulés)	Biodalle	SADEF	?
maïs soufflé (pop com)		AGRIPACK	?
PLA	Déposa <sup>5</sup>	FIBERWEB	?
sorgho		EUROSORGHO	?

Tableau 4 : France

<sup>2</sup> production d'amidon à proximité du site > 100 000 T

<sup>3</sup> projet de construction d'un site de production en France

<sup>4</sup> projet de construction d'un site en Alsace

<sup>5</sup> marchés de l'agriculture, de l'hygiène et de la filtration

type	nom produit	nom entreprise	Pays	capacités annuelles (T)
Amidon	bioplast...	BIOTEC	D	1 000
Amidon		EMS-CHEMIE	CH	?
Amidon + PCL	mater-bi	NOVAMONT	I	8 000
Carbonate de calcium	leanpak...	ECOLEAN	S	?
Cellulose (acétate)	clarifoil	CLARIFOIL	GB	> 10 000
Cellulose (acétate)	Bioceta	RHONE-POULENC	B	1000
Cellulose (copolym.)		BASF/WOLFF	D	?
		WALSRODE		
Déchets végétaux		JUPITERRE	B	Pilote
PCL	capa 600 series	SOLVAY	GB	15 000 <sup>6</sup>
PCL	Tone	UNION CARBIDE	B	?
PHB/PHV	biopol	MONSANTO	B	1 000 <sup>7</sup>
PLA		NESTE	Fin	Pilote
PLA		PURAC	NL	?
Polyester (co-)	ecoflex	BASF	D	~ 100 000 <sup>8</sup>
Polyester (co-)	eastar bio	EASTMAN	GB	~ 100 000 <sup>9</sup>
Polyesteramide	bak 1095	BAYER	D	~ 100 000 <sup>10</sup>
Polyéthylène+additifs	tuffy	SYMPHONY ENV.	GB	?
PVOH	hydrolene	IDROPLAST	I	?

Tableau 5 : Europe

type	nom produit	nom entreprise	capacités annuelles (T)
Amidon		EVERCORN	?
Amidon (mélange)	Novon	CHISSO	2 000
PCL	Celgreen	DAICEL	300
PLA	lacea	MITSUI	500
PLA	lacty	SHIMADZU	100
PLA		TAKIRON	
Polybutylene succinate	bionolle	SHOWA DENKO	3 010
soja fermenté	natto	KYUSHU UNIVERSITY	?

Tableau 6 : JAPON

<sup>6</sup> possibilité d'utiliser les capacités existantes pour le nouveau produit

<sup>7</sup> arrêt en novembre 1998

<sup>8</sup> possibilité d'utiliser la ligne de polyester existante (donnée à confirmer)

<sup>9</sup> modification d'une usine de PET existante

<sup>10</sup> possibilité d'utiliser la ligne existante (donnée à confirmer)

type	nom produit	nom entreprise	capacités annuelles (T)
Amidon	Eco-foam	AMERICAN EXCELSIOR /NATIONAL STARCH AND CHEMICALS	2000
Amidon	Flo-pak bio 8	FP International	1 000
Amidon	star kore	UNI-STAR	500
Amidon + carbonate calcium+cellulose		EARTHSHELL / PRAIRIES	~ 40 000
Amidon + PCL	envar	BIOPLASTICS	500
Blé		ENPAC (DUPONT/CON AGRA)	5 500
Mélange	enviroplastic	PLANET POLYMER	500
PCL	tone	UNION CARBIDE	5 000
PLA	Heplon	CHRONOPOL	1 000
PLA	Eco-pla	DOW-CARGILL	5 000 à 100 000 <sup>11</sup>
Polyester (co-)	Eastar bio	EASTMAN	1 500
Polyester base PET	Biomax	DUPONT	~ 100 000 <sup>12</sup>
Soja (protéines)		MICHIGAN STATE UNIVERSITY	?
Blé (protéines, farines)			
Tissus sans composés toxiques		Designtex/Université de Virginie	?

Tableau 7 : Etats Unis

- situation 1996<sup>13</sup>

	Europe Ouest	USA	Japon	Total
Capacité annuelle	6 000	16 000	6 000	28 000
Production	4 000	10 000	600	14 600
Importations	2 000	500	500	
Exportations	500	2 000	100	
Consommation	5 000	8 000	900	<u>14 000</u>
% consommation	35 %	65 %	5 %	

**pois économique total : 70 millions d'euros**

Tableau 8 : TENDANCES MONDIALES POUR LES BIOPOLYMERES

<sup>11</sup> prévisions 2001

<sup>12</sup> possibilité de passer du PET au BIOMAX

<sup>13</sup> estimations CEH

# Les plastiques biodégradables au Japon

## *Biodegradable plastics in Japan*

Stéphane Guilbert

ENSAM/INRA, Unité de Technologie des Céréales et des Agropolymères

2 place Viala, 34060 Montpellier cedex 01, France

Tel 04 99 61 28 31, fax 04 67 52 20 94, e-mail [guilbert@ensam.inra.fr](mailto:guilbert@ensam.inra.fr)

**Résumé :** Ce document est une synthèse sur les plastiques biodégradables dans le monde, et en particulier au Japon.

Les principales applications des plastiques biodégradables et les raisons objectives de les utiliser sont exposées. Les obstacles au développement des biomatériaux sont expliqués (coût, législation, infrastructures...). Les principaux produits existants sur le marché sont décrits, ainsi que les fabricants.

Enfin, le marché actuel et potentiel (horizon 2001) est examiné pour les USA, l'Europe et le Japon, produit par produit, et une conclusion envisage l'avenir, spécialement pour le Japon.

**Abstract :** *This paper is a synthesis on biodegradable plastics in the world and in Japan.*

*Main applications and reasons why biodegradable plastics could be used, are exposed.*

*Obstacles to the development of these products are also listed (cost, legislation...).*

*The main existing products and their manufacturers are described. At last, the present and future market (2001 year) is discussed for USA, Europe and Japan, product per product. A conclusion gives the author's opinion about the future market for biodegradable plastics, especially in Japan.*

**Mots-clés :** marché, Japon, producteur

**Keywords :** *market, Japan, manufacturer*

## 1. Introduction

Japan is the second world-wide user of plastic materials after the USA (12 million of tons a year). Every year, seven million of tons of plastic waste are produced : 35 % are land filled, 55 % are incinerated and 10 % are recycled. Due to a current concern for environmental preservation, coupled with a tradition of innovation, several companies and public research centers have developed research programs dealing with biodegradable materials. These researches forms on materials with a high technological "potential" such as microbial polymers (polyalcanoates), semi-synthetic (polylactate, polyaspartate) or synthetic materials (polybutylène succinate/adipate). Specific studies on agromaterials are not especially developed because non-food uses of agricultural materials are not considered as a credible challenge.

Aimed applications are closed to the ones of Europe or USA (plastic materials devoted to recycling on composting – plastic material used in the environment – special plastic), but others are specific of the Japanese market, such as for

instance plastic devoted to civil engineering, building, controlled release of fertilisers, or single-use objects such as "lunch-boxes".

The global market can be estimated at around 3000 tons in 1998 and the lowest predictions plan 9000 tons for 2001. All the actors of the Biodegradable Plastic Society (BPS). This society contributes to promote research and commercial use of bioplastics, through standard and method development, labelling, information exchange, public relation ship, seminar and congress organisation. It is also a lobby aiming at promoting biodegradable materials in the Japanese legislation on wastes.

## 2. Application of biodegradable plastics

Biodegradables plastics can be used to form containers (by conventional technics such as foaming, injection moulding, thermoforming, blowmoulding,...) or films, sheets and wires (by casting, laminating, blowing, stretching, orientation,...). Due to the high cost of biodegradable polymers, actual applications are in special niches with environmental considerations. Loose fill packagings and compost bags are the two major end uses, constituting nearly 90% of deman in 1996 (Bohlmann and Takei, 1998). Applications of bioplastics can be classified in three categories:

plastics to be composted or recycled (fields were reuse or fine recovery are difficult)  
 plastics used in natural environment (fields were recovery is not economically or practically feasible)

speciality plastics (fields with specific features were bioplastics possess preferential properties).

Main reasons to use bioplastics in packaging and principals applications are listed respectively in table 1 and 2.

<b>When reuse or recycling is not feasible</b> <i>(economical or practical)</i>	<b>When the useful life cycle of a product is short</b> <i>(e.g. disposables and packaging)</i>
<b>When biodegradability is a functional advantage</b> <i>(e.g. moulching plastics, controlled release systems)</i>	<b>When edibility is a functional advantage</b> <i>(e.g. food coatings)</i>
<b>When biodegradability has an advantage in consumer perception</b>	<b>When biodegradability has a legal restriction</b> <i>(e.g. 3DM/Kg tax on non-degradable plastics in Germany)</i>
<b>Because the proportion of organic waste in domestic waste is increasing</b> <i>(~ 0.6 kg/ha/d)</i>	<b>When fully biodegradable complex/multicomponent material is needed</b> <i>(e.g. paper complex packagings)</i>
	<b>When bioplastics possess preferential properties</b>

Table 1: Main reasons to apply biodegradable polymers in packagings

<b>plastics to be composted or recycled</b>	
LOOSE-FILL PACKAGING BLISTERS WASTE and CARRIER BAGS DISHES AND CUTELRY HYGIENNE DISPOSABLES  MISCELLANEOUS SHORT LIFE GOODS FOOD PACKAGING  PAPER or CARDBOARD	chock absorbers  compost bags trays, spoons, cups... diapers, sanitary napkins, sticks for cotton swabs, razors, tooth brushes... pen tees, toys, gadgets, keys holders... dried foods, short life cycle food packaging (e.g. fast food packaging or egg box), fresh or minimally processed fruits and vegetable, dairy products, organically groth products... accesories or windows for paper envelopes or for cardboard packaging, coating for paper or cardboard
<b>plastics used in natural environment (no recovery)</b>	
BIODEGRADABLE/SOLUBLE/ CONTROLLED RELEASE materials for AGRICULTURE and FISHERY  CIVIL ENGINEERING, CAR INDUSTRY and CONSTRUCTION MATERIALS  DISPOSABLE LEISURE GOODS	mulching plastic, films for banana culture, twines, nursery pots... materials for controlled release fertilisers or agrochemicals high water retention materials for planting soluble sachets, biodegradable containers for fertilisers or agrochemicals fishing lines and nets... heat insulators, noise insulators, form wares... car interior door casings... retaining walls or bags for mountain areas or sea, protective sheets and nets for tree planting... golf tees, miscellaneous goods for marine or mountain sports...
<b>speciality plastics</b>	
MEDICAL GOODS  EDIBLE FILMS/ COATINGS  O2 BARRIER, SELECTIVE O2/CO2 bARRIER, AROMA BARRIER ( MATRIX FOR CONTROLLED RELEASE SYSTEMS SUPER-ABSORBENTS ADHESIVES	bone fixation, suture threads, films, non woven tissues... barrier internal layers, surface coatings, «active» superficial layers, soluble sachets for instant dry food and beverages, for food additives... component of simple or multilayer packagings  slow release of fertilisers, agrochemicals, pharmaceuticals, food additives... material for plant planting in desert, diapers...

*Table 2: Applications of biodegradable plastics*

### 3. Obstacles

Industrial future of biodegradable plastics is still a matter of discussion due to numerous problems. One of the main obstacle to wispread use of bioplastics is cost (actually similar to speciality plastics) of commercially avaiable products (but are now). Because they are complex to develop and sometimes to produce the total production of «modern thermoplastic bioplastics» is actually around 20 000 T (estimation for 1999). Then large scale application is not possible. Numerous projects of new plants are under consideration and, since predicted world production capacity is of 100 to 200 000 T in 2002, cost are expected falling fast. New legislation in western Europe and Japan, witch are in favour of biodegradable plastic users, help to spur the demand but the difficulty to develop international standards for biodegradable polymers (CEN-DIN 549000 standard is no yet adopted) is still an obstacle for some potential users. In addition to biodegradability,

the absence of ecotoxycity is now required. Bioplastics are still unknown to the processing industry. Moreover some have tested the first generation of starch based polymer and their expectations where not satisfied. New generations of bioplastics demonstrates their good biodegradability characteristics but their properties and mainly their water sensitivity (for most agricultural based plastics) often remain a problem. Hopefully performances and processability are fast improving.

An other major obstacle is the absence of country wide composting infrastructure except in some countries such as Germany, Benelux and Scandinavia.

#### 4. Commercial products

The industry of biodegradable plastics is still in a state of flux since numerous major polymer producers entering the market in the last four years even if one of them (MONSANTO) has recently announced that they temporarily stoped their production and research on «Biopol». A non exhaustive list of commercial bioplastics is given in Table 3 a and b respectively for products made with renewable and non renewable raw materials. This distinction is important since nobody knows if the demand (and then the future market) will emphasis on the biodegradable character or on the renewable one. Prices per kilograms (in euro) and estimated production are given for each type of bioplastic. It can be seen that numerous industrial products are comercialised in Japan.

agricultural products	
<b>Starch/starch based</b>  (4 to 5 euro/Kg, 5000 T/y)  Cellulose acetate (6 to 8 euro/Kg) Proteins chitosan based	Mater Bi, NOVAMONT (I) Paragon, AVEBE (NL) Bioplast, BIOTEC-MELITTA (D) NOVON (USA) Eco-ware NISSEI (JP) Eco-foam NATIONAL STARCH (USA) Ever corn JP CORN STARCH (JP/USA) Eco-Star CENTROLLENS (CDA) Polynat, ROVERC'H (F) Lunare, PLANET POLYMER TECH (USA)/ NIPON SHOKUBAI (JP) Cel-Green CA, DAICEL Chem. (JP) p.m. Doron, AICELO Chem. (JP)
biotechnological polymers/monomers	
Polyhydroxyalcanoates (5 to 8 euro/Kg,1000 T/y) Polylactic acids (5 to 8 euro/Kg, 6000 T/y)  Polyamino acids	Biopol, MONSANTO (USA) (stoped)  Lacea, MITSUI CHEMICALS (Japon) EcoPLA, CARGILL/DOW-POLYM. (USA) Lacty, SHIMAZU (JP) Chronopol, HEPLON (USA) BRUSSELS BIOTEC (B) NESTE (FIN) DAINIPPON INK (JP) MITSUI CHEMICALS (JP)

Table 3a: COMMERCIAL BIODEGRADABLE PLASTICS  
made from renewable resources

<b>synthetic polymers (4 to 8 euro/kg, 1000T/y)</b>	
<b>Polybutylene succinate/adipate</b>	Bionelle, SHOWA (JP)
<b>Polyethylene succinate</b>	Lunare, PLANET POLYMER TECH (USA)/ NIPON SHOKUBAI (JP)
<b>Polycaprolactone</b>	Tone, UCC (USA) Cel-Green, DAICEL Chem (JP)
<b>Polyester amide</b>	Back, BAYER (D)
<b>Modified PET</b>	Easter Bio, Eastman (USA) Biomax, Dupont (USA)
<b>Modified PBT</b>	SOLVEY Ecoflex, BASF (D)

Table 3b: COMMERCIAL BIODEGRADABLE PLASTICS made from non-renewable resources

## 5. Market opportunities

The market of biodegradable polymers in Western Europe and in USA has recently be reviewed by Bohlmann and Takei (1998). For Japan, data are based on a personal estimation. Actually the starch based bioplastics is dominant on the market but if announced polylacticacid production plants are effectively built (e.g. CARGILL/DOW-POLYMER project the construction of a 20 to 30 000 T/year plant for 2002!) the PLA will probably soon become prominent. The development of non renewable synthetic biodegradable plastic remain a question since new generations with high performance and processability appears very recently. The consumption (in thousand of tons) of biodegradable polymers by type and market for USA, Western Europe and Japan is given on table 4.

USA by type*	Starch based	PLA	PHB/V	Total
1996	8	1	<0.2	9
2001	11	8	<0.5	20

USA by market*	Loose-fill packaging	Compost bags	hygiene disposable	Paper coatings	agricultural usages	Total
1996	6.5	2	<0.2	<0.2	<0.2	9
2001	9	6	2.5	1.5	1.5	20

W Europe by market**	Loose-fill pack.	Compost bags	Packaging cutlery	Hygiene disposable	Paper coatings	Agricultural usages	Total
1996	1	3	<1	<0.5	<0.5	<0.2	5
2001	10	6	9	5	5	9	44

Japan by market**	Loose-fill pack.	Compost bags	Packaging cutlery	Hygiene disposable	Paper coatings	Agricultural usages	Total
1998	0.8	0.8	0.8	<0.5	<0.2	<0.2	3
2001	1	2.5	1.5	1.5	1	1.5	9

\*adapted from Bohlmann and Takei (1998). - \*\* personal estimation  
Table 4: Consumption of biodegradable polymers (k tons)

According to various experts, reasonable consumption perspectives in Western Europe in 2005 are of 300 to 500 000 tons at a price of 1.5 - 3.0 euro/kg (but about 50 to 70 % of potential applications requires authorisation for food contact !).

## Conclusion

After a long period of latence, biodegradable plastics are now credible. Major polymer manufacturers (part of Japanese manufacturers is important) are entering the market, material costs are falling fast and performances and processability are significantly improving. In Japan, as consumer demand is very important, significant niche markets are opening up. In addition Japanese new legislations and standards in favour of biodegradable plastic users is helping to spur the market growth.

Among the different categories of biodegradable plastics, synthetic and «biotechnological, i.e., semi-synthetic or microbial» biodegradable plastics have more future in Japan than natural bioplastics for they have a more important « technological content » and they satisfied the majority of the requirements asked by the plastic packaging industries (material qualities, processability, performances...).

An important debate in Japan concerns the material qualifications: biodegradable versus renewable and biodegradable. Nobody knows if the market will be sensitive or not to the «non-renewable» character of the new synthetic biodegradable plastics.

## 6. References

Bohlmann and Takei, 1998, CEH Marketing research report on Biodegradable Polymers, Plastics and resins, Chemical Economics Handbook, 580.0280 A, SRI International.

Colonna, P., 1992. Biodégradabilité et bioassimilabilité des matériaux d'emballage. Conditionnement Alimentaire : Innovation et Environnement, edited by ISECA (Pouzauges, ISECA), pp. 203-218.

Cuq, B., Gontard, N., and Guilbert, S. 1995. Edible films and coatings as active layers. In *Active Food Packagings*, M.L. Rooney (Ed.), p. 111-142, Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Dawes, E.A., 1990. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, edited by E.A. Dawes (London, Kluwer Academic Publishers).

Fritz, H.G., Seidenstücker, T., Bölz, U., Juza, M., Schroeter, J., and Endres, H.J., 1994. Study on Production of Thermoplastics and Fibers Based Mainly on Biological Materials, Science Research Development, European Commission, EUR 16102 EN.

Gontard, N. and Guilbert, S., 1994. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Food Packaging and Preservation*, edited by M. Mathlouthi (Glasgow, Blackie Academic & Professional), p. 159-181.

Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., and Guilbert, S. 1996. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J. Agric Food Chem.* 44(4): 1064-1069.

Guilbert, S., Cuq, B., and Gontard, N. 1997. Recent innovations in edible and/or biodegradable packagings. *Food Additives and Contaminants*. 14(6-7): 741-751.

Guilbert, S., Gontard, N., and Gorris L.G.M. 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebens. Wiss. Technol.* 29: 10-17.

Mujica Paz, H. and Gontard, N. 1997. Oxygen and carbon dioxide permeability of wheat gluten film: effect of relative humidity and temperature. *J. Agric. Food Chem.* 45(10): 4101-4105.

# Labellisation des matériaux biodégradables

## *Conformity marks and biodegradable materials*

Guy JACQUES

AIB VINCOTTE International - 27, av. A. Drouart, B-1160, Bruxelles

Tel 32 2 6745847 - Fax 32 2 6745959 - E mail guy.jacques@euronet.be

**Résumé :** Pour qu'un processus de labellisation ait un impact réel dans un secteur d'activité économique, la toute première condition est qu'il puisse répondre à un besoin réel des opérateurs économiques. Le domaine des matériaux biodégradables remplit cette condition nécessaire mais pas suffisante. Un bref regard en arrière nous confirme que plusieurs marques de conformité ont été mises sur pied avec de louable intentions et des résultats tout à fait décevants.

Le but du présent exposé sera d'abord de donner un bref aperçu de la situation actuelle en ce qui concerne les marques de conformité associées aux matériaux biodégradables et/ou compostables. En prenant les marques OK-Compost et OK-biodegradable comme exemples concrets, nous rappellerons quelques principes de base de la certification de produits en rappelant les enjeux et les risques qui sont sous-jacents. Cette approche nous permettra de constituer une base solide pour un système local/national. La définition d'un bon point de départ est une étape essentielle. Elle s'applique d'ailleurs à la situation que nous étudions : comme dans beaucoup d'autres secteurs, la labellisation des matériaux biodégradables a commencé par une démarche nationale (menée en parallèle dans plusieurs pays).

Après cette première étape de rodage, les opérateurs économiques en viennent tout naturellement à souhaiter la création de marques transnationales. A condition d'avoir une visibilité suffisante, ces dernières permettent une approche plus intégrée et plus rapide du marché. Le fait que le processus élimine la nécessité de répéter des essais similaires dans plusieurs laboratoires ajoute un avantage financier significatif.

Lors du 4ème symposium Eurolab, j'ai noté quatre conditions pour réussir une marque transnationale. Lorsque plusieurs marques locales/nationales existent en parallèle les progrès peuvent être rapides si :

- Les normes sont les mêmes
- On évolue dans une zone économique homogène
- La marque a le support de l'industrie
- Il y a une bonne coopération entre les organismes de certification

Vous aurez remarqué que nous ne parlons ni de la conformité aux normes de la série EN 45000 ni de la compétence et de la crédibilité des laboratoires et organismes de certification. Ce sont des conditions de base. Si ces éléments ne sont pas présents dès le départ du processus de certification, il vaut mieux ne pas se lancer sur la scène internationale. Ici aussi, nous illustrerons les différentes étapes de la démarche en nous basant sur certaines actions en cours dans le secteur des produits biodégradables.

Troisième et dernière étape du processus d'intégration, la certification globale. Dans une première phase, les marques transnationales sont souvent des accords de reconnaissance réciproque entre partenaires qui se connaissent bien. Dans le village planétaire, l'industrie

envisage une étape complémentaire qui peut se définir comme suit "tested once, approved once, accepted everywhere".

C'est une tendance qui présente plusieurs avantages significatifs à condition que la zone économique soit raisonnablement homogène. Derrière le caractère séduisant du concept, nous indiquerons quelques questions qui doivent trouver une réponse claire si on veut éviter de discréditer le système auprès des utilisateurs. Sachant que nous travaillons dans un schéma où la majorité des intervenants ne se connaissent pas du tout, il est utile de connaître les réponses aux questions suivantes :

- Quelle est la signification exacte de la marque de conformité. La question paraît simpliste mais les intérêts peuvent être contradictoires. Certains industriels voudront un niveau minimum capable de garantir la libre circulation des produits, d'autres voudront mettre la barre plus haut afin de porter la compétition non seulement sur les prix mais sur une "qualité" mise en évidence. Dans la plupart des cas, une marque donnée ne peut courir les deux lièvres à la fois.
- Qui est responsable de quoi en cas de problème ? Un organisme peut être prêt à "accepter" une certification ou un rapport d'essai sans pour autant les "reconnaître" (ce qui implique une prise de responsabilité).
- Comment organiser la surveillance du marché ?

**Abstract :** *In order for a labelling process to make a genuine impact in an economic sector, a precondition for its success is the ability to cater for a genuine need amongst business operators. Biodegradable materials meet this necessary condition, which is not sufficient however. A look back at recent history confirms how very many marks of conformity have been launched with praiseworthy intentions only to produce disappointing results.*

*The aim of this presentation is first of all to take a brief look at the current situation for conformity marks linked to biodegradable and/or compostable materials.*

*Taking "OK Compost" as a practical example, we shall describe a few basic principles of product certification and refer to the underlying challenges and risks. This approach will help us create a firm basis for developing a local/national system. It is of vital importance to determine an effective starting point. And this also applies to the situation under consideration: as in many other sectors, the process for labelling biodegradable materials got underway on a nation-wide scale (carried out in parallel in several countries).*

*Once this initial breaking-in stage is complete, business operators are naturally keen on seeing the creation of cross-border marks, which allow for a more integrated and faster-paced market approach, provided they have a high enough profile. The process eliminates the need to repeat similar tests in several laboratories, thereby cutting costs considerably.*

*When several local/national marks exist alongside each other, progress could be achieved at an early date, provided:*

- *the standards are the same*
- *there is a uniform economic area to operate in*
- *the conformity mark enjoys the backing of industry*
- *the certification bodies are ready to cooperate well with each other.*

*You may have noticed that no mention has been made of conformity to the EN 45000 series of standards nor of the expertise and credibility of the laboratories and certification bodies. If these key conditions are not met right at the very outset of the certification process, there is little point in getting launched on the world stage. Here, too, we will be throwing some light*

*on the different stages of the strategy by homing in on certain activities underway in the biodegradable products sector.*

*The third and final stage of the integration process takes the form of global certification. To start with, cross-border marks often reflect mutual recognition agreements between partners who are familiar with each other's activities. Against the background of the global village, industry is contemplating the idea of initiating a complementary stage that may be defined as "tested once, approved once, accepted everywhere".*

*This trend can offer several major advantages provided the economic area is fairly uniform. We will seek to go beyond the appealing nature of this concept and raise one or two questions for which clear answers are needed in order to prevent the system from becoming discredited in the eyes of users. Mindful that we operate in a context where most of those involved do not know each other at all, we see advantage in finding answers to the following questions :*

- *What is the exact meaning of the conformity mark? The question may appear somewhat simplistic, but it has to be remembered that interests at stake might be conflicting. Some industrialists seek just the bare minimum of measures needed to guarantee the free movement of products, whereas others aspire for a higher level so as to focus competition not only on prices but also on a "quality" that is clear to see. In most cases, a given mark is unable to cater for both requirements at the same time.*
- *Next we have to decide who is responsible in the event of a problem. An organisation might be prepared to "accept" a certification or test report without "recognising" them, which implies taking responsibility.*
- *Finally, we have to consider how the market monitoring process should be organised.*

**Mots clés :** certification de produits, reconnaissance mutuelle, marché global

**Key words :** product certification, mutual recognition, global market

# 1. Question préliminaire : faut-il vraiment des marques de conformité ?

L'ISO Guide 2<sup>1</sup> donne la définition suivante : « marque de conformité (en matière de certification) : marque protégée, apposée ou délivrée selon les règles d'un système de certification, indiquant avec un niveau suffisant de confiance que le produit, processus ou service visé est conforme à une norme ou autre document normatif spécifique »

Pour les produits qui portent déjà une marque commerciale, le fait d'apposer une marque de conformité en plus de cette marque doit indiquer que le fabricant ou le vendeur a fait quelque chose de plus que de veiller à la conception et/ou la fabrication et/ou la vente du produit. La marque de conformité doit porter un message aux opérateurs économiques, aux pouvoirs publics. La marque de conformité peut indiquer que le produit présente un haut niveau de qualité et/ou qu'il est conforme à une réglementation, et/ou que le fabricant a mis en place un système qualité supervisé par une tierce partie.

**Commentaire n°1 : la valeur ajoutée d'une marque de conformité repose beaucoup sur la clarté du message vis-à-vis des utilisateurs. Les garanties additionnelles de la marque de conformité doivent être claires pour ces derniers.**

Ceci étant posé, plusieurs constructeurs disent qu'ils n'ont pas besoin d'une marque de conformité : la réputation de leur marque commerciale est un message suffisamment clair vis-à-vis du marché. Pour la Commission européenne ce message est surtout valable pour les grosses entreprises qui ont des laboratoires, qui sont certifiées EN ISO 9000, qui ont des certifications volontaires et suffisamment de visibilité pour que l'image globale tienne la route au niveau international.<sup>2</sup> Et, même dans ce cas, l'intérêt d'une marque de conformité gérée par une tierce partie peut se révéler significatif. Derrière les déclarations relatives à la libre circulation des produits, il y a un choix de société que nous pouvons très facilement illustrer avec la problématique des emballages compostables ou biodégradables. Si nous considérons comme acquis que la compostabilité réelle du produit est importante dans le contexte du cycle écologique dans lequel il intervient, nous avons deux choix :

- Veiller à ce qu'une seconde ou tierce partie s'assure que les produits fournis répondent bien aux critères fixés. Ceci peut être confirmé par une marque de conformité, un certificat, un rapport d'essai....
- Faire confiance au fabricant qui déclare la conformité à des critères bien établis.

---

<sup>1</sup> ISO/CEI Guide 2 – « Normalisation et activités connexes – Vocabulaire général » - 1996

<sup>2</sup> J. Mac Millan – Commission européenne – Intervention lors du workshop EOTC  
« One-Stop Testing » - Bruxelles – Mars 1998

Dans le deuxième cas de figure, tant les pouvoirs publics que l'industrie considéreront qu'il est plus que souhaitable qu'il y ait une surveillance du marché. Dans beaucoup de cas, il est tout aussi clair que ce sont les pouvoirs publics qui sont censés prendre le problème en charge (et financer les actions nécessaires). La situation est clairement décrite dans un commentaire fait par la Commission européenne dans le cadre du marquage CE (voir encadré).

#### Une position de la Commission européenne

Un haut niveau de protection est prévu par les directives Nouvelle Approche. [...] Ceci implique que les Etats membres sont obligés d'organiser et d'exécuter une surveillance du marché d'une manière efficace et suffisamment large pour que l'on détecte les produits non conformes. Ceci non seulement pour protéger les intérêts des consommateurs, des travailleurs et des autres utilisateurs, mais aussi les intérêts des opérateurs économiques par rapport à une concurrence déloyale.<sup>3</sup>

L'aspect financier ne doit pas être sous-estimé dans le choix d'une politique générale. Si les contrôles ne sont pas faits en amont, ils doivent être faits en aval ne fût ce que pour éviter des mécanismes de concurrence déloyale. Il faut bien réaliser que ce ne sont pas les mêmes qui paient dans les deux cas. Le recours aux marques de conformité revient à demander au fabricant du produit producteur de payer les contrôles requis avant la mise sur le marché. A défaut, on en vient à demander au contribuable de pays utilisateur de payer les contrôles de surveillance après la mise sur le marché (pour autant que les produits considérés soient critiques, évidemment).

**Commentaire n°2 : pour autant que son intérêt économique ou social soit réel, la marque de conformité est un outil permettant d'éviter la privatisation des bénéfices et la socialisation des obligations de l'industrie vis-à-vis de la société.**

A ces réflexions générales viennent s'ajouter celles qui sont relatives à la taille des entreprises actives dans un secteur. Ce qui est vrai pour une multinationale ne l'est pas nécessairement pour une entreprise de taille plus modeste. Dans beaucoup de cas, les PME ont besoin d'un certificat pour donner confiance au marché. Et l'internationalisation des échanges commerciaux augmente encore ce besoin. Le fait que les utilisateurs aient une image beaucoup moins nette de la nature de fournisseurs lointains augmente le besoin de se voir rassurer par une marque de conformité « reconnaissable » et crédible. Pour les produits qui doivent se vendre dans un marché global, ce besoin conduit à une demande de regroupement et d'harmonisation des systèmes de certification locaux.

---

<sup>3</sup> Commission européenne – traduit de "Guide to the implementation of Community harmonization directives based on the New Approach and the Global Approach" – DRAFT of version 1.0. - October 1998

**Commentaire n°3 : dans un marché qui se globalise de plus en plus, la confiance que le marché donnera à une marque de conformité présuppose souvent que les certificateurs « locaux » mettent leur capital de crédibilité en commun pour assurer une reconnaissance large de la marque de conformité.**

Une position des associations de consommateurs

Dans TAM 412 de juillet/août 98, nous avons dénoncé la manière dont nombre de fabricants abusent sans vergogne des préoccupations écologiques des consommateurs. Nous déplorions notamment qu'il n'y ait « aucune législation belge contraignante en matière de publicité écologique » de sorte que les fabricants « utilisent les arguments qu'ils veulent sans contrôle officiel ».

Le député Van Dienderen a interpellé le ministre fédéral des Affaires économiques. Le ministre Di Rupo affirme épouser notre point de vue mais (nous y voici) il continue (jusqu'à plus ample informé) à parier sur une approche volontariste instaurant une autorégulation des fabricants. [...]

Une chose nous paraît claire : aussi longtemps qu'on n'aura pas élaboré une liste des « arguments » écologiques répondant à des critères bien définis et faisant l'objet de contrôles stricts, les fabricants pourront continuer à affirmer ce qu'ils veulent. Et l'on ne peut pas compter sur le Ministre pour l'instant. C'est lui-même qui dit « les instruments existent. Voyons comment les événements se dérouleront et espérons que les tests effectués par Test-Achats, dans un an peut-être, montreront que ces codes ont été respectés.

Tiens, tiens. Et nous qui pensions que c'est aux pouvoirs publics qu'il appartient de faire les contrôles<sup>4</sup>t

## **2. Cas pratique : la mise sur pieds d'OK-Compost - marque de conformité internationale pour les matériaux compostables.**

### **2.1 Un développement national (Belgique)**

Le développement des matériaux compostables/biodégradables suppose l'existence de trois ingrédients de base

- Une volonté politique au niveau de l'Union européenne, d'un Etat membre, d'une région ou d'une ville.
- Un système de collecte sélective des déchets ménagers ou une politique de promotion du compostage domestique.
- Une méthode d'essai reconnue pour la démonstration de la compostabilité/biodégradabilité

---

<sup>4</sup> Test-Achats magazine n°417 – janvier 1999

En ce qui concerne les sacs et les films compostables/biodégradables, la demande a été initiée par les pouvoirs publics locaux qui souhaitent imposer des collectes sélectives pour les déchets verts. Cette option suppose que le citoyen dispose de sacs poubelles qui soient compostables. Vous aurez déjà constaté que nous avons deux des trois ingrédients de base cités ci-dessus, reste à trouver le troisième qui comporte, en fait, quatre facettes

- L'existence d'une norme d'essai crédible : les travaux du CEN/TC 261 fournissent une base excellente
- L'existence de laboratoires compétents pour réaliser les essais : O.W.S (Organic Waste System), localisé à Gand est un laboratoire de réputation internationale dans le domaine.
- Un organisme compétent/reconnu dans le domaine de la certification : AVI s'est dès le départ déclaré partie prenante dans le processus.
- Des industriels qui sont prêts à investir dans le nouveau concept. Ces derniers se sont rapidement montrés intéressés. En date du 1 mai 1999, la situation peut se décrire comme suit :
  - Pour la qualification des matériaux de base (granulés et/ou films) : des firmes comme Biotec (D), Cargill Dow Polymers (USA), Fardem (B), Novamont (I), Showa Denko (J) et Wentus (D) sont titulaires de la marque OK Compost pour une partie de leurs produits
  - Pour les sacs, constitués à partir de matériaux compostables, des firmes comme Cargill Dow Polymers (USA), Fardem (B), IBI Plast (I), Jemaco (B), Novamont (I) et Wentus (D) sont titulaires de la marque VGS qui garantit la solidité des sacs dans leur première phase de vie : l'utilisation domestique. Dans ce contexte, la présence de la marque VGS implique obligatoirement que les produits de base sont certifiés O- Compost.

Vous aurez remarqué que nous parlons de deux marques de conformité distinctes. Ceci correspond bien au commentaire numéro 1 que nous avons fait lors de nos préliminaires. Dans le secteur qui nous concerne, il apparaît que le marché au sens large est demandeur pour trois caractéristiques différentes, la compostabilité, la biodégradabilité et la solidité des sacs. Ces caractéristiques concernent des opérateurs différents et, de plus, elles ne sont pas nécessairement liées. Après une année d'expérience, il est apparu que nous ne pouvions tout regrouper sous une seule marque de conformité, c'est la raison pour laquelle nous avons développé trois marques distinctes.

- La marque « **OK Compost** » garantit que le matériau est **compostable dans une installation industrielle de compostage**. Ces installations industrielles sont alimentées en produits organiques naturels et en produits compostables pour produire un compost utilisable en agriculture. A titre d'exemple, je citerai le procédé DRANCO mis au point par nos partenaires OWS (produit un compost commercialisé sous le nom de Humotex).
- La marque "**OK biodegradable**" est en cours de gestation. Son propos est de garantir que le matériau est **biodégradable dans l'environnement naturel spécifié sur le label** (terre, eau douce, eau de mer.....). Le but final n'est pas d'obtenir du compost utilisable mais d'éviter de voir notre

environnement se couvrir de matières plastiques tenaces. Une application pratique qui intéresse beaucoup les Japonais est la cartouche de chasse. Combien d'entre nous n'ont pas découvert de ravissants coins de montagne dont le vert de la végétation était relevé par le rouge et le bleu de cartouches de chasses plus ou moins décolorées ? Il y a beaucoup d'autres applications, les films destinés à l'agriculture, les films et sacs à usage funéraire, les films destinés à l'emballage des périodiques...

- La marque « **VGS** » reprend plusieurs programmes destinés à répondre aux besoins du particulier. En plus de leur compostabilité à moyen terme, les sacs compostables doivent être et **rester suffisamment solides chez l'utilisateur**. Pour contrôler ces caractéristiques, nous testons la solidité des sacs neufs mais aussi et surtout, nous vérifions leur comportement après stockage. En pratique, nous remplissons les sacs d'un mélange organique "standard" et nous les maintenons plusieurs semaines dans des conditions climatiques bien définies. Il s'agit ici de vérifier qu'il n'y a pas de désintégration prématurée du sac. Comprenez par là que le sac rempli doit garder ses propriétés mécaniques tant qu'il est dans votre cuisine ou dans votre garage en attendant le jour de la collecte sélective.

## **2.2 La première demande de l'industrie dans un marché global : éviter la duplication des essais**

Nous avons vu au paragraphe précédent comment AIB-VINCOTTE International, a lancé un programme de certification destiné à répondre à un besoin national en association avec OWS (Organic Waste System). Au départ, ce système est donc essentiellement belge (avec des critères techniques européens). Etant donné l'importance des investissements qui doivent être consentis pour développer les produits et les faire certifier (les essais durent au moins 6 mois), l'industrie a rapidement demandé que les systèmes de certifications aient une portée internationale. Cette demande a formellement été établie par I.B.P.M.A. (International Biodegradable Products Manufacturers Association).

La première étape du processus est la reconnaissance mutuelle des rapports d'essais entre différents opérateurs nationaux. Cette reconnaissance mutuelle suppose deux ingrédients

- Les critères (normes) techniques doivent être les mêmes ou, au moins, démontrer la conformité à des exigences fort comparables
- Les membres du réseau de reconnaissance mutuelle doivent avoir confiance dans la compétence technique des autres laboratoires.

C'est sur ces bases que des accords de coopération ont pu être signés au début de l'année 1998 entre

- L.N.E. (Laboratoire National d'Essais) – France
- O.W.S. (Organic Waste System) – Belgique
- I.F.A. (Institute for Agrobiotechnology Research) – Autriche

- A.V.I. (AIB- VINCOTTE International (Belgique)
- D.J.K. International Inc. – Japon
- OWS Inc. – U.S.A.

Cet accord implique une reconnaissance mutuelle des rapports d'essai et d'inspection dans les domaines d'activité concernés. Il implique également une reconnaissance automatique de ces rapports pour l'attribution des marques OK-Compost et OK-Biodegradable.

### **2.3 Deuxième étape : obtenir une harmonisation des différents systèmes de certification**

Parallèlement à cette démarche d'harmonisation technique, il est souhaitable que l'on arrive à une harmonisation des logos et des procédures nationales/régionales de certification. C'est le souhait final de l'industrie qui peut se formuler comme suit « tested once, certified once, accepted everywhere »

Lorsque plusieurs marques locales/nationales existent en parallèle il faut alors étudier les possibilités et les modalités d'une coopération étroite entre systèmes existants.

En faisant la synthèse des conditions de succès discutées lors de deux récents colloques internationaux, il apparaît que des progrès peuvent être rapides si <sup>56</sup>

- Les normes sont les mêmes
- Les marques sont sectorielles (difficulté d'identification pour les marques génériques dans un marché global)
- On évolue dans une zone économique homogène
- La(les) marque(s) a(ont) le support de l'industrie
- La structure globale se base sur des systèmes nationaux existants.
- Il y a une bonne coopération entre les organismes de certification.

Dans ce contexte, chacun comprendra rapidement que les enjeux sont beaucoup moins « techniques » que ceux qui sont relatifs à l'acceptation mutuelle des rapports d'essai. L'existence de critères techniques différents constitue déjà un premier frein efficace aux premières tentatives d'harmonisation. Un point positif est que la publication d'une norme européenne pourra déjà résoudre ce premier problème. Pour le reste, on constatera que plusieurs conditions de réussite sont réunies dès aujourd'hui.

---

<sup>5</sup> Fourth Eurolab Symposium - "Free global trade: Opportunity or Thread for Testing Laboratories and Product Certification ?" - Zurich - October 8 and 9, 1998

<sup>6</sup> EOTC Workshop « Marking – Is there a way forward ? » - Bruxelles – Mars 1999

### **3. Conclusion**

La certification crédible et efficace des produits dans un marché mondial sera très probablement un outil indispensable tant pour la libre circulation des biens.que pour leur utilisation optimale.

Dans un système où les partenaires ne se connaissent pas toujours directement, c'est un défi pour l'industrie, les pouvoirs publics, les systèmes d'accréditation, les laboratoires et, bien sûr, les organismes de certification. Les systèmes qui fonctionnent dans un environnement national un peu monopolistique doivent subir une mutation importante pour répondre aux nouveaux enjeux.

L'objectif du présent exposé a été de poser quelques questions de base et d'illustrer les premières solutions pratiques qui auront pu être trouvées dans un cas concret : les marques « OK-Compost » et « OK-biodegradable ».



## **TABLE RONDE**

### **Production, fabrication, utilisation, consommation de produits biodégradables**

**Animateurs :** Antoine GASET, ENSC Toulouse  
Benoît FABREGA, ARD de Haute-Normandie



# Présentation des animateurs et intervenants

## ◆ **Christophe Doukhi de Boissoudy, Société NOVAMONT.**

La Société NOVAMONT produit du plastique biodégradable à base d'amidon depuis la fin des années 80 (en 1989) avec le programme Life Chemistry. Nous avons mis au point plusieurs grades, c'est-à-dire plusieurs types d'applications plastiques, qui peuvent aller du film jusqu'à l'injection.

Nous avons participé également, à de nombreuses recherches sur la biodégradabilité et sur la possibilité de produire du plastique, toujours allié avec le produit renouvelable qui est l'amidon.

## ◆ **Bernard Finck, SNPE.**

La SNPE est spécialisée dans des matériaux spéciaux. Nous participons notamment à la réalisation et à la propulsion d'Ariane 5. Notre implication en biodégradabilité vient de nos compétences de formulateur. En ajoutant des additifs nous sommes en mesure de formuler d'accélérer ou de retarder la biodégradabilité -voire la photodégradabilité- et d'améliorer les propriétés mécaniques des matériaux.

## ◆ **Sylvie Cardon, Bio-Ressources Technologies.**

Nous avons pour principale mission de diffuser et de mettre en place du matériel et des technologies innovantes en vue de protéger l'environnement ou de mettre en valeur des ressources naturelles.

Notre principal produit est le compostage en sac ventilé. C'est un procédé qui permet de travailler avec des surfaces beaucoup plus restreintes que le système en andain traditionnel dans le compostage. Le grand avantage ici est d'éviter les odeurs ou les écoulements de jus à la suite des cycles de transformation. Cette transformation aérobie ventilée permet de durées de cycles beaucoup plus restreintes que dans d'autres méthodes.

D'autre part, nous avons en projet la vente d'enzymes qui permettraient de nettoyer des sites et des installations homologuées et contrôlées au niveau sanitaire.

## ◆ **Hélène Maréchal, Société SHOWA DENKO Europe.**

La Société SHOWA DENKO mère est au Japon et le siège « Europe » en Allemagne. C'est une très grosse société qui fabrique des produits chimiques, pétrochimiques. Elle a un chiffre d'affaires de 6,1 millions de US dollars et 13 555 employés.

Nous fabriquons le polymère biodégradable nommé Bionolle. Il est fabriqué par la Société SHOWA HIGH POLYMER qui est aussi une société japonaise filiale de la Société SHOWA DENKO.

Notre affiliée SHOWA DENKO Europe est responsable du marketing du Bionolle sur le marché européen. Le Bionolle est soit un polybutylène succinate, soit un polybutylène succinate et adipate. Le copolymère, c'est le Bionolle 3 000 qui a le label OK Compost et le homopolymère est le Bionolle de la série 1 000.

Le copolymère est biodégradable beaucoup plus rapidement, alors que le produit homopolymère a des propriétés beaucoup plus fortes. Mélanger ces deux types de composé nous permettra de jouer sur la rapidité de la biodégradation.

Selon le type de procédé mis en œuvre pour le soufflage par exemple, nous avons différents grades pour l'extrusion et la lamination, les matériaux expansés, les non-tissés.

Aujourd'hui, nous recherchons des contacts avec les transformateurs de plastiques et, bien sûr, les institutions de label pour savoir ce qui se passe au niveau des réglementations.

◆ **Cécile Lemaire, représentant M. Doumeizel de la Chambre d'Agriculture de l'Île-de-France.**

Suite à la réforme de la PAC, les agriculteurs ont vu une réduction de la valeur ajoutée concédée aux productions et une dépendance de plus en plus accrue vis-à-vis des subventions de Bruxelles.

Dans ce cadre, il y a trois enjeux pour nous : d'abord permettre la valorisation d'une production de notre région, ensuite répondre à des attentes du milieu agricole et aux besoins exprimés des industriels en tenant compte des contraintes technico-économiques, et enfin garantir la rentabilité économique d'une filière pour tous les intervenants en dehors de tout système de primes ou de subventions. C'est la seule possibilité pour garantir la pérennité d'une filière.

L'une de nos missions est la diversification pour promouvoir une agriculture compétitive, en adéquation avec les attentes de la société, notamment en terme de respect de l'environnement.

L'enjeu est de trouver des nouvelles valorisations des productions végétales et de développer de nouveaux débouchés.

Les productions végétales sont des ressources de biopolymères : vous comprendrez aisément que nous nous intéressons par ce biais, aux matériaux biodégradables.

Concrètement, nous avons développé un média abrasif biodégradable pour décaper des surfaces, ceci en collaboration avec le CRITT Chimie d'Île-de-France et l'Institut Supérieur Agricole de Beauvais. Les brevets déposés, nous sommes passés à des tests de qualification auprès des industriels, notamment dans le secteur de l'aéronautique, et une unité de production doit prochainement se mettre en place.

Lors d'un partenariat avec un centre de recherche pour lequel nous testons des films en paillage, en conditions réelles, nous avons pu voir qu'il y avait encore des améliorations à apporter. Les films de paillage représentent un réel intérêt pour les agriculteurs.

Nous sommes également en partenariat avec un industriel pour tester des pots biodégradables. Ces pots répondent à une demande constatée en Ile-de-France par les horticulteurs.

◆ **Bernard Girardeau, Comité des Plastiques en Agriculture.**

Le CPA est une association du type loi de 1901, qui a fêté son quarantième anniversaire l'an dernier. Sa vocation est de réaliser le lien entre les secteurs industriels concernés et les secteurs agricoles.

Les missions essentielles sont premièrement, d'assurer que les industriels comprennent bien les problèmes, les soucis et les besoins des utilisateurs ; et deuxièmement d'essayer de promouvoir la meilleure possible de toutes les nouvelles techniques.

Le fonctionnement du CPA est essentiellement basé sur l'organisation de commissions. Il y a quatre commissions :

- « Plasticulture et Horticulture » qui s'occupe essentiellement de techniques de semi-forçage et de culture abritée ;
- « Plasticulture et Elevage » qui touche essentiellement l'ensilage et les bâtiments d'élevage ;
- « Commission de Normalisation » ;
- « Commission Environnement ». Cette dernière s'intéresse de très près aux problèmes de la récupération et du devenir de toutes sortes de films agricoles une fois qu'ils ont été utilisés.

◆ **Patricia Erard, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes.**

Il y a en France quatre centres principaux : l'un est situé à Nantes, l'autre près de Bergerac, un autre Balandran, près de Nîmes, le dernier se situant à Saint-Rémy en Provence.

L'une des activités du CTIFL est d'expérimenter toutes les techniques de production en culture légumière et fruitière avec, pour objectif final bien sûr, d'améliorer le revenu des agriculteurs.

Le rendement -l'augmentation, l'amélioration du rendement- est toujours d'actualité mais en plus, se greffent les volets « protection de l'environnement », « amélioration de la qualité des fruits et légumes » et « amélioration de la précocité » qui peut être un facteur de revenu très important au niveau des entreprises horticolas.

A ce titre nous avons dans l'objectif d'expérimenter sur les techniques de paillage. C'est une technique qui est très largement utilisée en culture légumière. On utilise 6 300 tonnes par an, ce qui représente 3 300 hectares répartis sur l'ensemble du territoire, avec une localisation plus importante au niveau du Languedoc-Roussillon, la Région PACA, et également le Sud-Ouest.

Ces paillages sont principalement du polyéthylène et leur élimination pose problème. Ils rentrent dans le cadre des DIB c'est-à-dire Déchets Industriels

Banaux, mais leur élimination n'est pas prise en charge par la collectivité. Donc in fine, c'est l'agriculteur qui est financièrement et matériellement responsable de ces plastiques.

Les matériaux biodégradables pourraient être une des solutions pour au moins remplacer partiellement ces paillages. Il supprimerait la contrainte du retrait qui revient très cher avec d'une part le problème de la collecte et d'autre part le problème du lavage. En effet ce sont des matériaux très souillés à la fin des cultures ; on estime entre 60 et 85 % le taux de souillure.

◆ **Dominique Clergeot, Centre de Recherche sur l'Environnement, l'Energie et les Déchets**

Le CREED est le Centre de Recherche des pôles propriété et énergie du Groupe Vivendi. En tant qu'utilisateurs finaux des plastiques biodégradables, nous voyons deux enjeux à court et long terme.

A court terme, l'enjeu est l'utilisation de plastiques biodégradables, de sacs biodégradables pour la collecte des fermentescibles. En France, une vingtaine de collectivités pratiquent la collecte sélective de la partie fermentescible des ordures ménagères. Trois collectivités seulement utilisent des plastiques biodégradables.

L'intérêt évident de l'utilisation de plastiques biodégradables est la possibilité d'avoir une collecte propre dans la cuisine avec des sacs plastiques que l'on peut fermer et qui évitent les odeurs.

Par contre, il y a un problème de communication. Les consommateurs confondent le logo biodégradable et le logo éco-emballage. Il ne s'agit pas de faire des efforts pour collecter la fraction fermentescible et au final, retrouver des sacs Leclerc ou des sacs Carrefour au milieu de la fraction fermentescible parce que des personnes confondent les deux logos. Je comprends que les Allemands finissent par dire : on préfère ne pas avoir du tout de plastique de façon à ne pas risquer d'avoir de contamination, plutôt que d'avoir la moitié des plastiques biodégradables et l'autre moitié qui serait des erreurs.

Le deuxième enjeu à plus long terme est d'augmenter les quantités compostées grâce à l'apport de matériaux biodégradables. Imaginons que toute la partie plastique dans les ordures ménagères puisse être biodégradable, on augmenterait les quantités collectées, ce qui est un atout pour les composteurs. Pour l'instant la fraction fermentescible correspond à 30 % de notre poubelle en poids humide et il y a 11 % de plastiques en poids humide. Les plastiques correspondent à 30 % du volume.

Nous participons à un programme européen coordonné par le Cemagref, notamment par des tests en usine. Nous allons donc intégrer un certain nombre de plastiques dits biodégradables dans une usine de compostage. On intégrera 500 kg dans la moitié d'un silo de compostage ce qui correspond à 500 kg pour 500 tonnes, soit à peu près 1 % de plastiques biodégradables pour vérifier que ça disparaît bien.

La question est de savoir quand s'arrêter ? est-ce qu'il faut s'arrêter à 5 ou 10 % ? Est-ce que, à partir du moment où on va mettre 10 % en quantité, le compost au final sera de qualité compost ou on verra encore des petits bouts de plastique

Et même si ces plastiques sont biodégradables à terme, l'agriculteur qui achètera le compost verra des plastiques. Et l'aspect visuel qu'on ne peut pas vraiment quantifier sera déterminant.

◆ **Jean-Luc Martel, Groupe SITA.**

Le groupe SITA est le pôle propriété de Suez Lyonnaise des Eaux et développe en Europe, la collecte et le traitement des déchets solides principalement, et également le nettoyage et l'assainissement.

Le Groupe SITA est actuellement numéro 1 européen dans le métier de la collecte et du traitement des déchets grâce à une acquisition récente des actifs hors Amérique du Nord de BFI. Actuellement le groupe SITA est significativement présent en France, en Angleterre, en Espagne, en Allemagne et en Hollande.

La filière biologique est en cours de développement dans des pays comme la France, l'Espagne et la Grande Bretagne, est déjà bien arrivée à maturité en Allemagne et en Hollande. En France, je peux vous indiquer deux exemples qui permettent d'intégrer la problématique des plastiques biodégradables dans la filière de traitement des déchets.

Le premier exemple, c'est Castelnaudary où notre société intervient au niveau de la collecte et du traitement par compostage de la fraction fermentescible des ordures ménagères. C'est une expérience de faible quantité puisque nous collectons moins de 3 000 habitants une fois par semaine à l'aide de sacs biodégradables de type Materbi de 12 litres environ. La collecte est relativement, faible en termes de quantité par habitant, de l'ordre de 1 kg par jour et par habitant. On devrait consommer à peu près 20 sacs par habitant et par an, des sacs de 10 à 12 litres de contenance qui coûtent à peu près 50 centimes (cher) l'unité. Un calcul conduirait à un coût de l'utilisation de ces sacs de l'ordre de 100 F par tonne collectée ; ce qui est quand même beaucoup trop cher actuellement pour développer la filière dans ce sens là au niveau industriel.

Un deuxième axe concerne un programme de recherche, POLYVALOR, que nous développons actuellement avec le Cemagref, dédié à la valorisation des déchets organiques, notamment des déchets de l'industrie agro-alimentaire.

Nous avons identifié dans le secteur agro-alimentaire, notamment dans la charcuterie industrielle, un des sous-produits générés par la transformation ou la fabrication de plats cuisinés. Les petits bouts de plastiques qui sont issus des films qui couvrent les aliments sont finalement mélangés à des déchets organiques fermentescibles au niveau des installations de dégrillages des eaux usées.

La mise en place des collectes sélectives à un niveau industriel serait quand même plus facile à organiser que les filières de collecte de déchets urbains. Il y a beaucoup de choses à faire pour intégrer, au niveau de l'amont -c'est-à-dire- au niveau de l'industriel qui contrôle tout ce qui rentre dans son usine, des méthodes qui permettraient d'optimiser la qualité des filières de traitement et de recyclage des déchets en aval.

◆ **Antoine Bourely, PELLENC SA.**

PELLENC SA. est le leader des équipements viticoles au niveau mondial actuellement avec 180 millions de chiffre d'affaires et 50 % d'exportation à peu près.

Sur les aspects agricoles, nous construisons tous les équipements pour la viticulture. Deux d'entre eux ont des consommables contenant des plastiques. Le premier, c'est une releveuse qui au printemps prend les fils de palissage de part et d'autre de la végétation et les ramène ensemble pour enserrer la végétation, le tout étant maintenu par des agrafes actuellement en PVC.

Notre implication écologique a consisté pendant trois années à essayer de les faire en PVC recyclé à 75 %. C'était aussi un enjeu économique. L'enjeu de dégradabilité est important vu que les attaches doivent tenir un an, jusqu'aux vendanges, et si possible ne plus être là la saison prochaine, sans qu'on n'ait besoin de les retirer avec des outils spécifiques.

Le PVC a une capacité de photodégradabilité, mais le PVC recyclé, testé pendant trois ans n'était pas satisfaisant du point de vue des qualités mécaniques, en particulier sur les marchés export qui demandaient des tenues mécaniques plus importantes.

Actuellement le PVC est en quasi disparition et on se retourne sur le PET également recyclé. La seule crainte est qu'il soit trop peu dégradable.

La deuxième application est l'attachage des bois sur les fils de palissage qui se fait en fin d'hiver sur les vignes ; et également dans beaucoup d'applications arboricoles qui peuvent intéresser le CTIFL.

Il y a là deux enjeux : l'attachage pérenne, qui va structurer la végétation et l'attachage annuel (90 %) des applications. Il est réalisé avec un fil dont l'âme est en acier non inoxydable, donc qui va rouiller.

Pour ces deux applications, les matériaux biodégradables pourraient être intéressants.

◆ **Jean-Yves Dupré, Groupe DANONE**

Au titre du Groupe Danone, je voulais essentiellement vous donner un témoignage, celui d'une expérience de développement de pots de yaourts à base de polylactate en Allemagne.

L'origine du projet, c'était d'éviter les pots de yaourts en verre consignés en Allemagne. Il y a des quotas de matériaux recyclés, donc, la majeure partie des yaourts est en verre et réutilisable. Les pots sont consignés : il faut les laver, il faut les ramener, et le consommateur commençait à se lasser de le faire. Danone Allemagne cherchait une innovation. Le concept était a priori simple : prendre un produit d'origine agricole de la terre (à base de sucre fermentescible, de betterave ou d'amidon) et le renvoyer à la terre. Le choix a été fait sur un produit connu au niveau industriel, le polylactate, qui avait a priori de bonnes qualités techniques. Du point de vue de la protection du yaourt, c'était équivalent, voire presque meilleur que le polystyrène.

C'est un produit très stable pendant la durée de vie du yaourt et biodégradable en centre de compostage : le PLA est biodégradable à une température supérieure à 55° et dans des conditions d'humidité, conditions que l'on trouve dans les stations de compostage, mais pas nécessairement dans la nature.

Le partenaire était essentiellement CARGILL DOW POLYMER l'un des principaux acteurs dans le domaine du PLA.

La solution retenue pour le lancement, était que ces emballages soient jetés après utilisation dans la poubelle des plastiques. Nous n'avions pas été autorisés à les mettre dans la poubelle des matières organiques. Donc il fallait le mettre dans la chaîne des plastiques et les trier ensuite à la main au centre de tri. Avant de se lancer dans toute l'Allemagne, il y avait eu un test sur 21 centres de tri et 4 usines de compostage.

Le consommateur ne comprenait pas très bien pourquoi ce pot biodégradable devait être mis avec les plastiques. Le concept n'était pas clair, il y avait de grandes difficultés à communiquer.

Le DSD, l'organisme équivalent à Eco-Emballages, faisait payer la même redevance que pour un yaourt ordinaire. Enfin, ce projet n'a pas vraiment été accepté par les écologistes. L'un des arguments étant que le PLA n'est biodégradable qu'à 55° en présence d'humidité, et par conséquent si quelqu'un laissait un pot de yaourt sur la plage, on allait le retrouver pendant un certain temps.

Et enfin dernière contrainte importante qui doit absolument être citée, c'est que le prix du PLA reste très élevé sans possibilité de répercuter le surcoût sur le consommateur.

C'est Danone Allemagne qui devait supporter la charge, et dans un yaourt, le prix de l'emballage est à peu près le tiers du prix du produit. Ce n'est pas négligeable. Donc, le projet a été arrêté au bout d'une certaine période.

Les deux raisons principales, ont été le coût d'un côté et plus importante, l'image auprès du public qui n'a pas été bonne. Et également, une grande difficulté pour le faire passer dans le système de gestion des déchets allemands.

En conclusion : il n'est pas exclu que cela puisse être développé, notamment en Allemagne où la biodégradation serait maintenant acceptée comme mode de recyclage (donc, on pourrait mettre les pots de yaourt dans la poubelle brune). Il semble que la redevance DSD pourrait être moins élevée. Le problème est toujours le coût de ce matériau. Il faudra dépenser énormément en communication pour faire comprendre que maintenant, le produit qui était dans la poubelle plastique, va devoir finir dans l'autre poubelle, la poubelle brune !

Pour résumer, Danone continue bien sûr de surveiller et d'être très intéressé par les matériaux biodégradables. L'avenir des plastiques est un énorme problème. Des solutions de recyclage existent par exemple pour les bouteilles d'Evian qui sont en PET. Mais en dehors de ces corps creux que sont les bouteilles et un certain nombre de flacons, les autres plastiques vont dans la poubelle ordinaire. Il y a une grande difficulté à faire comprendre aux écologistes, à la Commission Européenne, qu'on ne peut pas trouver des solutions techniques et économiques de recyclage de tous les plastiques.

Les plastiques biodégradables ont un bon marché devant eux, mais à une condition : il faut que le prix ne soit pas très éloigné du prix des matériaux de

référence. Pour une société comme la nôtre, il ne faut pas que ça dépasse 20 ou 25 % du prix du plastique équivalent.

Et enfin, il faut bien se préoccuper du concept vis-à-vis du consommateur et de la communication.

◆ **Benoît Fabréga, Agence Régionale de Développement de Haute-Normandie.**

Notre objectif est la création de nouvelles activités dans notre région en Haute-Normandie. Dans ce sens la biodégradabilité est pour nous un thème très important. Nous y travaillons depuis 4 ans. Nous avons aidé l'association COBIO à se créer, en étant membre fondateur de cette association.

◆ **Antoine Gaset, Laboratoire de Chimie Agro-industrielle-CATAR - Ecole de Chimie de Toulouse.**

Les recherches de ce laboratoire ont toujours eu un objectif finalisé dans le domaine de la valorisation non alimentaire des productions agricoles, des sous-produits de l'agriculture et des co-produits des agro-industries.

L'originalité de notre ensemble est que sur un même site regroupant environ 80 personnes, se trouvent des doctorants, c'est-à-dire la recherche universitaire, un CRITT avec une dizaine de personnes et une halle de transfert. L'ensemble est un CRT (Centre de Ressources Technologiques), avec un balancement entre la recherche et la partie économique et appliquée.

Parmi les thèmes qui sont développés, nous avons lancé le thème de la biodégradabilité avec Françoise Silvestre, et en collaboration avec le Cemagref avec Madame Bellon-Maurel, il y a quelques années. Un autre thème du laboratoire avait été lancé quelques années auparavant : la fabrication d'agro-matériaux à partir de productions agricoles ou de fractions de productions agricoles. Ceci consiste à fractionner, puis à partir des caractéristiques et des propriétés de ces polymères à essayer de faire des matériaux ayant des propriétés permettant de répondre aux exigences d'une cible visée.

Donc, après une opération dans le domaine des matériaux, nous avons décidé d'avoir une opération complémentaire au niveau de la biodégradabilité.

Pour nous, biodégradabilité et agro-matériaux sont intimement liés. Egalement, sont intimement liés biodégradabilité et éco-toxicologie.

Nous participons à un programme européen et un groupe de réflexion au niveau des agro-matériaux avec l'ADEME et Agrice.

## Débat

- **Les verrous qui freinent le développement des matériaux biodégradables.**

*M. Gaset lance le débats sur les verrous qui enrayent le développement des matériaux biodégradables :*

Ces verrous sont de divers ordres. Ils sont d'ordre technique, psychologique, réglementaire et sociétal.

*Les intervenants ne placent pas tous les verrous au même niveau.*

*M. de Boissoudy estime qu'ils sont principalement d'ordre réglementaire et économique. Il n'y a plus selon lui de verrou technique :*

Le premier verrou, au niveau de la recherche ou en tout cas mise au point d'une matière, est déjà dépassé.

Le verrou, est à l'aval. Une fois que la matière est mise au point et disponible, les deux verrous principaux sont d'ordre réglementaire et d'ordre économique.

L'Allemagne est un des pays à forte sensibilité environnementale, qui met en place une réglementation pour inciter les consommateurs et les industriels à faire davantage attention à l'environnement. C'est la raison pour laquelle c'est davantage dans ces pays que le marché peut s'ouvrir plus rapidement. Ce n'est pas encore le cas de la France, même si la France est très sérieusement en train de se pencher sur le problème. Le verrou réglementaire est le premier de tous car sans forte implication politique, qui se traduit nécessairement par une implication réglementaire, les industriels ne sont pas incités à aller vers ces produits.

Le deuxième verrou est économique, et ce pour deux raisons. D'abord parce que, les produits biodégradables qui sont viables sur le marché, sont effectivement plus chers que les produits qu'ils sont appelés à remplacer, à savoir les produits plastiques. Ceux-ci, connus depuis déjà bien longtemps, ont au niveau industriel tous les cycles qui permettent d'avoir les coûts les plus bas. Ce n'est pas encore le cas des produits biodégradables.

Par exemple, l'Italie du Nord a de gros problèmes d'élimination des déchets : on n'avait tout simplement plus de décharges ou alors il fallait aller très loin pour en trouver. Les solutions de remplacement coûtaient cher dans la mesure où on faisait appel à l'incinération qui devait avoir une certaine garantie environnementale. Les produits biodégradables pouvaient alors éventuellement s'intégrer car le coût du traitement du compost est environ trois fois moins cher que le traitement par incinération. Si le compost est moins cher, il est possible éventuellement d'utiliser, comme à Castelnaudary, des sacs plastiques biodégradables, ils ont un surcoût qui au global ne va pas forcément grever le budget de cette filière.

La deuxième raison économique est liée au coût de l'élimination des déchets. Les matériaux biodégradables se développeront si le traitement des déchets devient trop cher.

*M. Bourély confirme l'importance des verrous réglementaires et économiques :*

Les deux verrous sont réglementaires et économiques. Une façon de lier les deux, ce sont les taxes.

Actuellement, si la filière du recyclage se développe c'est parce que Eco-Emballages en est à des subventions qui peuvent atteindre 6 F du kg de plastique recyclé au niveau de la collecte. C'est considérable puisque le prix du plastique lui-même est de l'ordre de 4 à 5 F.

Transposons au niveau des pots de yaourt. L'emballage de base en France doit être taxé à 1 centime environ, contre environ 10 centimes en Allemagne. Si on se mettait à taxer le pot de yaourt non biodégradable à 10 centimes comme en Allemagne, le problème de coût serait réglé du jour au lendemain. Donc, pourquoi ne pas militer pour faire taxer les pots de yaourt non biodégradables ?

*M. Dupré apporte une note d'espoir pour l'avenir des matériaux biodégradables :*

La prise en compte des problèmes de CO<sub>2</sub>, d'effet de serre va dans le bon sens. Sans trop en attendre dans l'immédiat (le consommateur ne paiera pas plus cher parce que le bilan effet de serre est meilleur), on peut espérer à des horizons lointains, qu'il y ait des mesures de taxations différentielles par rapport aux économies de CO<sub>2</sub>.

*Les consommateurs seraient-ils prêts à accepter un surcoût ?*

*Les avis sont partagés. M. Dupré estime qu'il faut être très prudent en matière d'acceptation de coût par le consommateur :*

Revenons à l'expérience concrète des biocarburants : le consommateur n'a jamais accepté de payer un centime de plus pour un gasoil contenant x % d'ester de colza, même si il y avait des propriétés écologiques intéressantes.

Il n'est pas exclu que certains marchés très spécifiques, notamment un marché de collectivité locale ou d'administration acceptent pendant un certain temps, de faire un effort. Ce serait plus une aide au démarrage qu'une perspective réelle à prendre en compte dans le cadre d'un marché.

*L'opinion de M. Dupré est partagée par un intervenant qui rappelle que les surcoûts maximum révélés par les études étaient de 10 à 15 %.*

*Enfin, ce qui rejoint parfaitement l'expérience malheureuse de Danone, l'aspect communication/marketing ne doit pas être négligé.*

*M. Dupré souligne l'importance des études techniques de fonctionnalité et de communication :*

Les analyses du cycle de vie doivent être très documentées, très sérieuses, allant de la culture, jusqu'à la fin de vie. Ces études sont très longues, très coûteuses, et doivent être faites à plusieurs partenaires pour couvrir l'ensemble.

Ceci entraîne des frais de développement, puis des frais de communication pour expliquer pourquoi ce produit se différencie des autres.

*Cet avis est également exprimé par un intervenant de la salle qui insiste aux moyens dont on doit se doter pour apprécier les qualités écologiques d'un produit :*

Un consommateur a probablement plus d'attente en matière d'écologie envers un emballage biodégradable qu'envers un emballage plastique. Cela voudrait dire qu'il faut améliorer les concepts de bilan écologique. Certes ils ne permettent pas de comparer un matériau biodégradable à un matériau synthétique. Ils pourraient cependant faire ressortir les aspects du matériau biodégradable, à développer pour en améliorer la qualité écologique. Ils fourniraient également des arguments à ceux qui veulent commercialiser le matériau biodégradable sous le label écologique, notamment pour convaincre la grande distribution.

*Si les verrous évoqués sont les plus visibles, souvent apparus lors de la mise en marché de matériaux biodégradables, M. Guilbert estime que la recherche doit se poursuivre pour améliorer la fonctionnalité des matériaux :*

Il semble que les matériaux biodégradables proposés à l'heure actuelle sur le marché répondent mal aux cahiers des charges des utilisateurs ou aux cahiers des charges de ceux qui ont en charge leur élimination ou la maîtrise de leur devenir.

Il y a un gros effort de recherche à faire pour améliorer la qualité, les performances, et les propriétés de ces matériaux. Les pouvoirs publics ont très certainement un effort significatif à faire pour soutenir ce type de travaux, que ce soit les travaux de laboratoires privés ou publics.

- **Les utilisations agricoles**

*Mme Erard donne des précisions sur l'utilisation agricole :*

Deux solutions existent pour éliminer les déchets de paillage plastique puisque la législation requiert de valoriser ces déchets. Il y a la valorisation énergétique et la valorisation matière. La valorisation matière est concurrencée en fait par le coût de la matière première des polymères. Elle revient plus cher, et en outre les plastiques recyclés n'ont pas la même qualité. Donc, actuellement c'est une filière très difficile à se mettre en place.

De plus, la collecte et le coût du transport sont problématiques car beaucoup d'entreprises recyclent ces films plastiques agricoles, alors que les paillages sont un peu répartis un peu partout en France.

Une des solutions serait l'emploi des paillages biodégradables. Le coût entre en jeu car les agriculteurs sont prêts à les utiliser, seulement à partir du moment où les matériaux seront abordables sur le plan financier.

Or pour le moment, ce n'est pas le cas. Sans doute parce qu'on en est aux balbutiements, aux premiers essais.

Actuellement, les paillages biodégradables proposés sont au double ou même au triple du paillage traditionnel. Il ne faudrait pas que le coût de ces matériaux biodégradables soit supérieur au coût du plastique traditionnel plus le coût demandé pour leur élimination actuellement.

En ce qui concerne le temps de ramassage, des essais ont été faits au Cemagref par M. Gratraud et le coût manuel était évalué entre 1 700 et 1 900 F/ha.

Maintenant des machines permettent de ramasser le paillage après culture et le coût est très variable.

*Mme Lemaire insiste sur le fait que l'introduction de matériaux biodégradables ne doit en aucun cas induire un coût d'équipement :*

Avec la diminution de la présence de main-d'oeuvre sur les exploitations, avoir à disposition un film biodégradable et qui ne nécessite pas un temps de ramassage représente un réel intérêt pour les agriculteurs. C'est pourquoi ce film ne doit pas être mis en compost.

Mais ces films sont-ils adaptés aux machines actuellement utilisées pour le paillage. S'il faut demander aux agriculteurs de racheter des machines pour effectuer le paillage, c'est un surcoût. Seraient-ils vraiment prêts à le faire ?

*Pour reprendre les propos de Mme Erard, Mme Binet de l'ADEME rappelle que la plasticulture est du fait des déchets plastiques -une activité polluante- qu'il faudra peut être taxer :*

Actuellement certaines communes sont prêtes à taxer les agriculteurs qui mettent leurs déchets DIB dans les déchets ménagers par des redevances spéciales. Bientôt, certains agriculteurs devront peut être s'acquitter d'une taxation spécifique sur leurs déchets, sur les activités polluantes. Ce coût-là n'est pas négligeable. Dans sa démarche globale pour son image vis-à-vis de la société, l'agriculteur est prêt sans doute à payer un peu plus sur certains points comme peut-être les plastiques, etc.

Cela met du temps, mais certaines zones en Picardie travaillent sur ce point-là.

Au delà des matériaux biodégradables, il faut également réfléchir à la réduction à la source des déchets.

*Enfin, deux intervenants dans la salle ont annoncé la sortie de matériaux adaptés à l'agriculture.*

*M. Ebel de BPI, annonce des polyéthylènes « biodégradables » :*

Face à l'insuccès notoire des films photodégradables, notamment dans le paillage des grandes cultures maïs, BPI vient d'achever la mise en place en France de couvertures très importantes de parcelles de maïs et bientôt de haricots verts avec des films « biodégradables » très minces de 8-10-12 microns.

Les essais lancés depuis quelques années montrent que le produit retourne dans la biomasse du sol et que tout disparaît complètement.

BPI attaquera le marché des cultures légumières en remplacement des paillages de 30 microns, de 25 microns classiques par des polyéthylènes « biodégradables ». Ces produits ne devraient pas être plus chers ou beaucoup plus chers que les produits classiques. Mais des adaptations seront nécessaires parce qu'on n'utilise pas un 8 microns sur un sol maraîcher de la même manière qu'on utilise un 30 microns sur le plan préparation du sol, importance des modes, etc.

Il faudra donc adapter des solutions mécanisées à ces nouvelles applications.

*Enfin, M. Rabouin présente un container biodégradables destiné aux pépiniéristes :*

Ce conteneur biodégradable permet d'emballer les mottes des arbres qui ont été élevés en pleine terre et il permet surtout d'être planté avec cette motte. Il disparaît en 6 mois à 95 %, les 5 % restants étant les agrafes métalliques et le cercle de la base (4/10 de mm d'épaisseur) qui met quelques mois de plus pour disparaître. La S.E.V.E est à la recherche de partenaires.

- **Matériaux biodégradables et compost**

*Mme Cardon répond au problème de l'avenir du compost :*

Le problème des déchets doit être pris en charge par l'ensemble de la population qui a le souci des déchets.

Le compost a l'avantage de réduire le volume. Certains composts ont aussi l'avantage d'avoir une certaine qualité. Ces composts peuvent être réutilisés dans des milieux naturels. Cependant, si on en vient à composter des volumes considérables et sans prendre le soin d'analyser les approvisionnements en substrats de compost, que fera-t-on de ces importants volumes de compost ?

*Cependant Mme Binet, de l'ADEME, souligne que le compost n'est qu'une petite partie de la matière organique qui est réabsorbée par l'agriculture :*

Aujourd'hui les tonnages de compost produit sont dérisoires par rapport à la matière organique qui revient globalement en agriculture : effluents d'élevage, qui ne sont pas des déchets à proprement parler mais qui dans certaines zones sont

les principaux apports de matière organique ; boues de stations d'épuration qui sont en augmentation puisqu'il y a de plus en plus de communes qui s'accordent au réseau.

*Et quoiqu'il en soit sur l'avenir du compost, des matériaux biodégradables de qualité ne peuvent qu'encourager son développement. C'est ce que reprend M. de Boissoudy :*

Le compost actuellement souffre d'une très mauvaise image parce qu'on a composté jusqu'à présent des déchets sur ordures brutes. On ne faisait pas forcément très attention à la qualité du compost. Il y a eu des exemples retentissants, par exemple en Champagne où on utilisait du compost parce qu'on avait besoin de structurant pour mettre au pied des vignes. Le sol était couvert de petits morceaux de plastique, ce qui n'était pas abominable pour les vignes, mais qui donnait une très mauvaise image pour le champagne. Il est absolument fondamental, que le compost soit de bonne qualité, ce qui ramène au problème de l'écotoxicité des produits, des éléments, des matériaux biodégradables.

• **Conclusion : Les matériaux biodégradables ont-ils un avenir ?**

*M. Girardeau du CPA conclut sur une note positive :*

Les plastiques sont bien sûr au cœur du débat. En Europe de l'Ouest, annuellement toutes applications confondues à peu près, trente millions de tonnes de thermoplastiques sont utilisés. Ce marché ne s'est pas développé du jour au lendemain, ça s'est étalé sur cinquante ans à peu près, cinquante ans de culture du jetable.

Ces plastiques ont donc commencé il y a cinquante ans avec des capacités de l'ordre de 5 000, 10 000 tonnes comme les biodégradables maintenant. Donc tous les espoirs sont permis.

*Pour que les matériaux biodégradables puissent exprimer leur potentiel et connaître un développement commercial durable, M. Vert suggère deux voies sur lesquelles des efforts doivent être consentis :*

Un, il faut accepter l'échec. Il ne faut pas s'imaginer qu'on va trouver la solution du jour au lendemain. Il faut surtout que les utilisateurs acceptent l'échec.

En revanche, nous avons fait beaucoup de progrès en dix ans.

Le deuxième point, c'est d'éviter le saupoudrage des efforts financiers dans le domaine. Aux Etats-Unis, c'est la même chose, des sociétés sont capables de s'associer et de financer de la recherche fondamentale d'intérêt collectif.

En France jusqu'à présent, on n'a pas su organiser. Quand on propose à plusieurs sociétés de financer un programme de recherche fondamentale, la réponse est

souvent : je ne paierai jamais pour quelque chose qui pourrait profiter à une autre entreprise.

C'est là un comportement qu'il faudrait essayer d'éradiquer, pour grouper aussi bien les organismes publics, que les entreprises, et les municipalités qui sont intéressées. Il faudrait aussi constituer un fond de recherche qui puisse être impliqué sur les programmes les plus crédibles et sur les produits les plus prometteurs. En dispersant les efforts, compte tenu de la complexité des phénomènes biologiques, on aura peut être un résultat positif, mais on mettra vingt ans ou trente ans de plus pour l'atteindre.

*M. Gaset propose en conclusion de transformer les différents problèmes évoqués en voies de recherche :*

Tous les points qui ont été soulevés peuvent pour certains apparaître négatifs. Lorsqu'ils sont évoqués, ces points deviennent des challenges pour tous. Cet inventaire, que nous avons réalisé ensemble, doit constituer pour notre futur des objectifs que nous nous attacherons à atteindre et dont nous parlerons lors du prochain colloque COBIO.



## SESSION POSTERS

- Préparation de Mélanges PHBV/Amidon par Mélange Reactif et leur Caractérisation  
M. Avella, M. E. Errico
- Formulation, Fabrication et Propriétés fonctionnelles de bioemballages à base de protéines myofibrillaires  
Bernard Cuq, Stéphane Guilbert
- Les Protéines Sources d'Agro-Polymères pour la Production d'Emballages  
Bernard Cuq, Nathalie Gontard, Stéphane Guilbert
- Ecotoxicité de matériaux biodégradables après compostage  
J. Fritz, U. Link, R. Braun
- Evaluation de la biodégradabilité primaire d'huiles de base utilisées dans la fabrication des lubrifiants  
F. Haus, G.-A. Junter, J. German, E. Poitrat
- Utilisation de la biodiversité des Pseudomonas pour la synthèse de polyesters à architecture contrôlée  
Delphine Mallarde, Valérie Langlois, Odile Bouvet, Philippe Guerin
- La biodégradation du polybutylène succinate (pbs) et du polybutylène succinate/adipate (pbsa) dans différents environnements  
Yoshihisa Yokota, Hélène Maréchal
- Conteneur bio-dégradable  
Maurice Rabouin
- Hydrophobation de films protéiques obtenus par filmage en milieu humide  
Vincent Rampon, Noël Nicolas
- Les poly(glyoxylate de méthyle - co - glyoxylate de potassium) : nouveaux copolymères bio-dégradables à hydrophilie variable  
C. Vauglade, C.-H. Brachais, K. Glinel, J. Belleney, C. Bunel



# Préparation de Mélanges PHBV/Amidon par Mélange Réactif et leur Caractérisation

## *Preparation of PHBV/Starch Blends by Reactive Blending and their Characterization*

M. Avella\* and M. E. Errico

Istituto di Ricerca e Tecnologia delle Materie Plastiche, IRTeMP-CNR

Via Toiano, 6-80072 Arco Felice (NA) -Italy

E-mail : mave@mail.irtemp.na.cnr.it

**Résumé** : Une nouvelle méthodologie a été employée pour obtenir des matériaux biodégradables (PHBV/amidon) avec des propriétés finales valables.

Les mélanges ont été préparés avec une quantité d'amidon allant jusqu'à 30% et comparés à des mélanges mécaniques ayant la même composition. La caractérisation thermique, mécanique et morphologique des matériaux est rapportée dans cet article.

Enfin la biodégradabilité des mélanges a été étudiée à l'aide d' un test de simulation du «compost» afin de discuter l'influence de la phase amidon sur la biodégradabilité du PHBV.

**Abstract** : An innovative ractive blending methodology was used to achieve PHBV/Starch blends in order to obtain biodegradable materials with good final properties. PHBV-based blends containing up to 30% of starch were prepared and compared to mechanical blends having the same composition. Thermal, mechanical and morphological characterisations are reported. Finally, the biodegradability of the blends was also investigated by a compost simulation test in order to study the influence of starch phase on the PHBV biodegradability.

**Mots clés** : amidon, PHBV, caractérisation, thermique, mécanique, compost

**Keyword** : Starch, PHBV, characterisation, thermal, mechanical, compost

## Introduction

During the last decade, the research on biodegradable materials has received a new strong impulse by the growing interest about environmental impact of discarded plastics and resources conservation<sup>(1,2)</sup>. Products from agricultural sources, such as starch, are considered as good fillers for polymeric materials owing to their low cost, recyclability, biodegradability and availability<sup>(3)</sup>.

The Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) is a member of the family of bacterially derived polyesters<sup>(4)</sup>. The properties of these polymers (melting temperature, glass transition temperature, crystallinity) are very similar to some widely used polyolefins (PP, PE, PET) and they can be processed using conventional extrusion and moulding process. Due to these characteristics they are being developed and commercialised as ideal candidate for the substitution of non-biodegradable polymeric materials in commodity applications<sup>(5,6)</sup>. A drawback of PHBV is its high cost compared to that of petroleum-based commodity plastics that prevents a larger commercial usage.

A rather recent strategy to increase the biodegradability, simultaneously lowering the cost, consists in dilution (of in blending) of polymers with natural products. Among these latter starch is widely available in nature and it can be used as an additive for thermoplastic materials<sup>(7)</sup>.

In this work some results on the preparation and characterisation of PHBV/Starch blends are discussed. Particularly two methodologies of preparation were used: no reactive and reactive blendings. In the first case the composites were prepared by melt mixing the two polymers (the PHBV used had 5-mol% of HV); in the second, a little amount of an organic peroxide was added.

The reactive blending is extremely popular in preparing blends in the synthetic polymer industry. This methodology is known to improve the compatibility and to promote the interfacial adhesion of two immiscible polymers<sup>(8)</sup>. The blending is performed under the conditions that promote the chemical interaction between functional groups of the two components responsible to a compatibilization of the two polymers stabilizing their morphology<sup>(9)</sup>; in our case between the hydroxyl groups of the starch and the PHBV carboxyl groups.

For both methodologies two composite compositions were prepared having 70 and 80 weight percent of PHBV. On these blends thermal (DSC), morphological (SEM), mechanical and biodegradation analyses were performed.

Finally, the biodegradability of the blends was also investigated, by a compost simulation test, in order to study the influence of starch phase on the PHBV biodegradability.

## Experimental

### Materials

Starch with high content of amylose (70%) was supplied by Cerestar.

Poly-(3-hydroxybutyrate-co-valerate) (PHBV) with 5-mol% of HV was supplied by Monsanto.

### Preparation of PHBV/Starch blends

As far as the no-reactur metho is concerned, the PHBV was mixed in the melt with high-amylose starch using a Brabender-like apparatus operating at 185°C for 15 min and at 32 rpm (NR-type blends).

In the case of reactive blending, a little amount of an organic peroxide was also added XXX similar operating conditions (R-type blends).

### Mechanical tests

Impact tests were performed with an instrumented Charpy pendulum (Least Autographic Pendulum MK2) at room temperature and at 1m/s impact speed . For this test the samples (in the form of small bars with dimensions 6.5 x 0.6 x 0.3 mm) were notched with a fresh razor blade, ~ 0.2 mm depth. The final value of notch depth was measured after fracture by using an optical microscope.

The impact properties were analysed according to the linear elastic fracture mechanism (LEFM) approach.

### Morphological analysis

Morphological analysis was carried out by using a Philips SEM 501 electron microscope. Scanning electron micrographs were taken on a Au/Pd coated fractured surface of the dumbbell specimens.

### Biodegradation test

The biodegradability of the neat PHBV and PHBV/starch blends was investigated by a compost simulation test. This test was a modification of the ASTM D5338 procedure of controlled composting (ASTM D 5338-1992). A 3 L reactor was filled with 2 kg of mature compost and thermostated at  $55 \pm 2^\circ\text{C}$ . The system was continuously aerated with previously water-saturated and thermostated pressurized air. The test specimens, having the same initial shape (i.e. the same surface of exposure to the biodegradation treatment), were buried inside the reactors. The samples were withdrawn from the compost reactors at different times, washed with distilled water and dried at 60°C to constant weight and the disintegration of the materials was evaluated (referred as % of weight loss). The mature compost was a mixture of residual sludges (municipal sewage treatment plant), grass and wood chips (maintenance of civic parks). The compost was stored indoors for several months. Prior to use, the compost umidity was adjusted to 60%.

### Results and Discussion

The PHBV/ Starch blends were prepared by means of two preparation methodologies : a reactive (RB) and no-reactive blending (NRB), according if a little amount of an organic peroxide wad added during the blending (RB). In the general acceptance, RB methodology depending on whether consists in generating strong interactions (covalent bonds, ionic bonds..) between two incompatible

polymers in order to improve their interfacial adhesion thus positively influencing the final properties of the composites. PHBV is characterised by the presence of carboxyl groups in the backbone chains that constitute the sites of potential chemical interactions with the starch hydroxyl groups. The chemical interaction is normally limited to a few percent of PHBV chains as confirmed by the fact that the composites are easily processed in the melt in the same conditions as the neat PHBV. Moreover also the thermal properties of the blends are not different to those of PHBV.

The used starch presented a high amylose content and it was characterised by a lower granule size and a greater number of hydroxyl groups on its surface with respect to conventional starches. These properties allowed a good dispersion of the granules in the PHBV matrix and a higher reactivity with the PHBV carboxyl groups.

The preparation of the blends was carried out at the melting temperature of PHBV and two blend compositions were prepared having 70 and 80% by weight PHBV for both methodologies (RB and NR).

### Mechanical properties

The impact properties, as obtained by Charpy-type tests, of neat PHBV and PHBV/ Starch blends (RB and NR-types) are reported in tab. 1 and 2. It is evident that the impact resistance of the polymeric matrix was deteriorated by the presence of the starch as far as the NR-type composites were concerned, because in this case the spherical starch granules can act as defects and stress concentrators.

In the case of RB-type blends (PHBV/starch 70/30) the impact resistance value was comparable to that of neat PHBV, while it was even higher when the polymer was blended with 20% of starch.

### Morphological analysis

In figs. 1 and 2 the SEM micrographs related to the fractured surface of the NR and RB blends are shown respectively. It can be outlined that the blends have a typical surface of a brittle material. In fact they are characterised by long stepped fracture lines with no evident mechanism of crack stopping such as for the neat PHBV. Moreover in the case of NR-type blends, no adhesion between starch and PHBV is present. In fact the starch granules, after the mechanical test, pulled out; thus showing the lack of adhesion between the matrix and the starch as responsible for poor mechanical properties of the blends. On the contrary, SEM micrographs of the fractured surface of the RB-type composites show that the starch granules are still covered by the polymeric matrix. This result can be attributed to a stronger PHBV/ Starch interfacial adhesion and it justifies better mechanical performances.

### Biodegradation analysis

In order to study the influence of the starch on the PHBV biodegradability, biodegradation tests were performed on the neat matrix and NR-type blends. The influence of the organic peroxide was also investigated, carrying out the test on the

RB blend containing the 30% of the starch. As it is shown in tab. 3, the presence of the starch was responsible of a faster biodegradation than the neat PHBV and the presence of the organic peroxide had no influence on this process.

## Conclusions

From the above described results the following can be concluded:

Impact tests outline that the PHBV/Starch blends prepared by means of a reactive approach (RB-type) exhibited better mechanical performances than PHBV/Starch NR-type blends. SEM analysis performed on the fractured surface of the samples showed that PHBV/starch RB-type blends are characterised by a stronger interfacial adhesion comparable to PHBV/Starch NR-type blends. This result agrees with the impact properties of the blends.

Biodegradation tests carried out on the neat PHBV and PHBV/Starch blends revealed that starch is responsible of a faster biodegradation than neat PHBV and the organic peroxide has no influence on the process of biodegradation.

## References

T. M. Aminabhavi, R. H. Balundgi, and P. E. Cassidy, *Polym. Plast. Technol. Eng.*, **29**, 235 (1990)

J. C. Huang, A. S. Shetty, and M. S. Wang, *Adv. Polym. Technol.*, **10**, 23 (1990)

W. M. Doane, C. L. Swanson, and G. F. Faute in R. M. Rowell, T. P. Schultz, and R. Narayan (Ed.), *Emerging Technologies for Materials and Chemicals from Biomass*, ACS Symposium Series No. 476, American Chemical Society, Washington, DC, 197-230 (1992)

E. A. Dawes «*Microbial Energetics*», Blackie, Glasgow (1986)

Y. Doi «*Microbial Polyesters*», VCH, New York (1990)

S. J. Holland, A. M. Jolly, M. Yasin, and B. J. Tighe, *Biomaterials*, **8**, 289 (1987)

G. J. L Griffin in *New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates*, P. D. Hill, and L. Munck (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 201-210 (1985)

M. Narkis, European Regional Meeting, PPS, Palermo, Italy, 3 (1991)

M. Seadan, D. Graebing, M. Lambla, *Polym. Networks Blends*, **3**, 115 (1993)

Sample	Resilience (KJ/m <sup>2</sup> )
PHBV	1.82
PHBV/Starch 80/20	1.20
PHBV/starch 70/30	0.90

**Tab. 1** Mechanical properties of PHBV and PHBV/Starch blends (NR-type)

Sample	Resilience (KJ/m <sup>2</sup> )
PHBV	1.82
PHBV/Starch 80/20 (RB)	2.10
PHBV/starch 70/30 (RB)	1.85

**Tab. 2** Mechanical properties of PHBV and PHBV/Starch blends (RB-type)

Sample	Time of incubation 10 days	Time of incubation 20 days
PHBV	17%	41%
PHBV/Starch 70/30 (NR)	*	100%
PHBV/Starch 80/20 (RB)	*	100%

**Tab. 3** % of weight loss of PHBV and PHBV/Starch blends in the biodegradation test  
Samples completely deteriorated

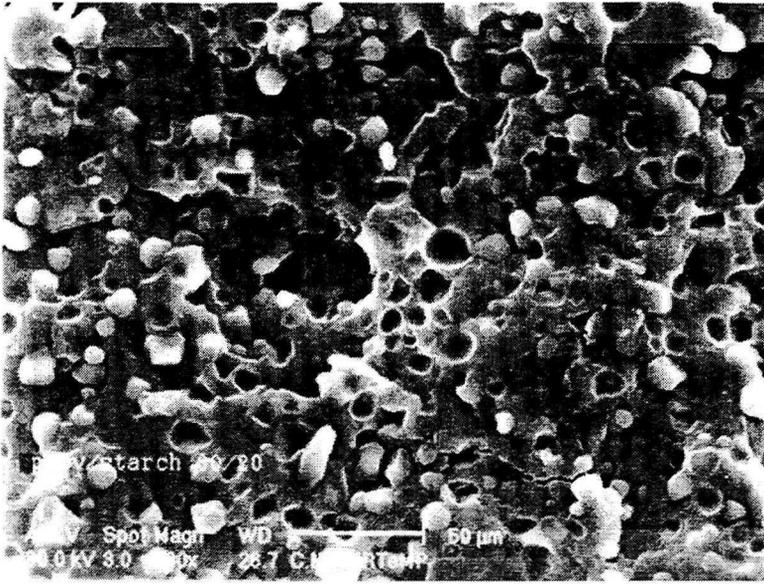


Fig. 1a SEM micrograph of fractured surface of PHBV/Starch 80/20 blend (NR-type)

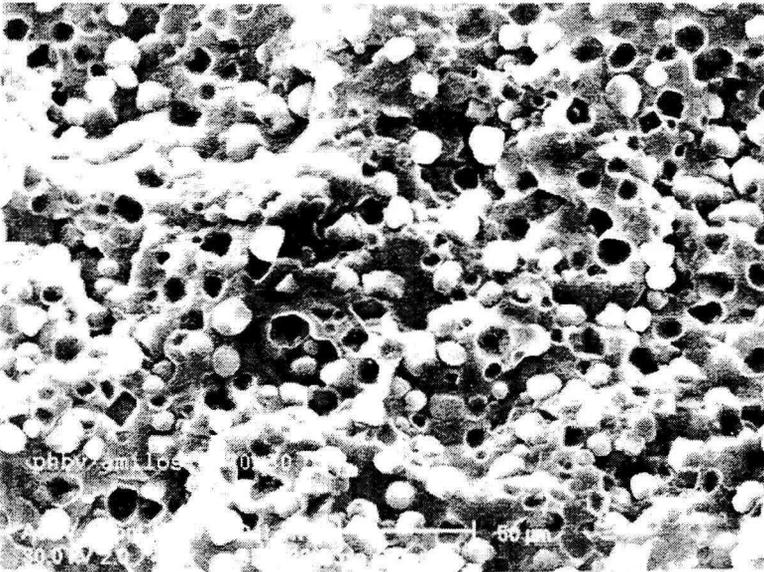


Fig. 1b SEM micrograph of fractured surface of PHBV/Starch 70/30 blend (NR-type)

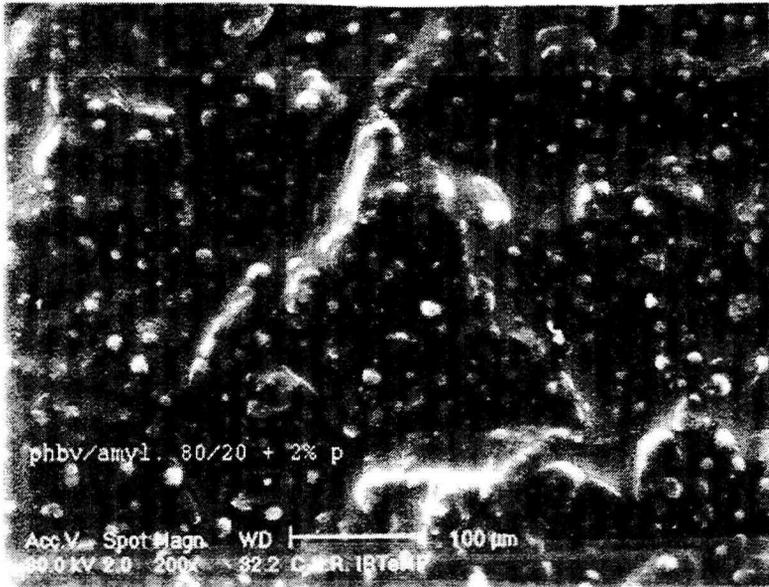


Fig. 2a SEM micrograph of fractured surface of PHBV/Starch 80/20 blend (RB-type)

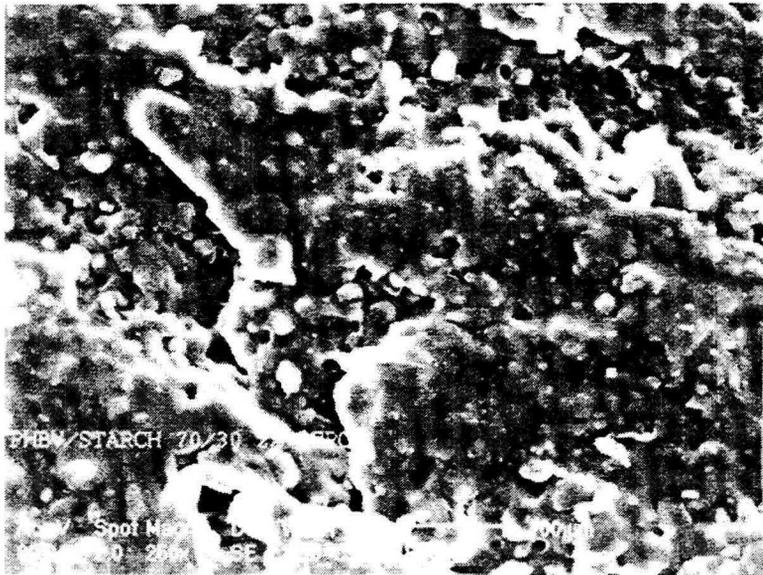


Fig. 2b SEM micrograph of fractured surface of PHBV/Starch 70/30 blend (RB-type)

# Formulation, Fabrication et Propriétés fonctionnelles de bioemballages à base de protéines myofibrillaires

## *Formulation, Fabrication and Functional Properties of Biopackaging based on Myofibrillar Proteins*

Bernard Cuq, Stéphane Guilbert  
Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier  
2 Place Viala, 34060 Montpellier, France  
Tel. : 04-99-61-28-60; Fax : 04-67-52-20-94 ; e-mail : cuq@ensam.inra.fr).

**Résumé :** Des bioemballages à base de protéines myofibrillaires de poissons ont été développés par deux procédés. Le procédé en milieu solvant basé sur l'étalement en couche mince d'une solution filmogène est sensible aux variations de concentration en protéine et de pH de la solution. Le "procédé thermoplastique" est basé sur les propriétés thermoplastiques des protéines myofibrillaires. La transition vitreuse des protéines sèches est observée entre 215 et 250°C. L'addition d'eau ou de plastifiants hydrophiles (saccharose et sorbitol) induit une grande diminution de la température de transition vitreuse (Tg). Les bioemballages sont formés à des températures supérieures à la Tg des protéines par un procédé simple de thermoformage. Les propriétés fonctionnelles des bioemballages sont proches de celles qui ont été déterminées pour divers films à base de protéines. Les effets de l'hydratation et de la température sur les propriétés fonctionnelles ont pu être expliqués par la théorie de la transition vitreuse.

**Abstract :** *Packaging films based on fish myofibrillar proteins have been developed by two processes. The "solvent process" based on the casting of a film-forming solution is affected by protein concentration and pH. The "thermoplastic process" is based on thermoplastic properties of myofibrillar proteins. The glass transition was observed between 215 and 250°C for the dry protein : addition of water or hydrophilic plasticizers (sucrose and sorbitol) induced large decreases in the glass transition temperature (Tg). Packagings were shaped at temperature higher than the Tg for a given moisture content by a thermomoulding technique. The functional properties of the packaging films were close to those determined for known protein-based films, with tensile strength close to those of low density polyethylene films. Hydration and temperature effects on functional properties could be explained by the glass transition theory.*

**Mots clés :** Protéines myofibrillaires, bioemballages, transition vitreuse, propriétés mécaniques, propriétés barrières.

**Key words :** *myofibrillar proteins, biomaterials, glass transition, plasticizers, mechanical properties, barrier properties.*

# 1. Introduction

Although not extensively studied, protein-based films have highly interesting properties (Gontard et Guilbert, 1994 ; Krochta et al., 1994 ; Cuq et al., 1995b ; Guilbert et al., 1998 ; Cuq et al., 1998). Animal proteins have been used historically to form edible barriers. Many protein-based materials have been tested; these include, wheat gluten, corn zein, soybean, collagen, ovalbumin, whey protein, and casein. Fabrication of film packagings based only on proteins could be expected from two processes. The "solvent process" requires the protein dispersion in a film-forming solution and has been extensively studied and applied to produce edible or biodegradable films and coatings. The "dry process" is based on thermoplastic properties of proteins in low water content conditions and had been applied with success to produce edible and/or biodegradable materials by using common melt processing technologies (e.g. extrusion, moulding, rolling mill procedure, etc.). Few studies on proteins as thermoplastic raw materials are available. For instance, thermoplastic properties of wheat gluten proteins would be exploited to made biopackagings. The mechanical and barrier properties of protein-based films are generally better than those of polysaccharide-based films. This is due to the fact that, contrary to polysaccharides which are homopolymers, proteins have a specific structure (based on 20 different monomers) which confers a wider range of potential functional properties, especially high intermolecular binding potential. High molecular weight proteins are generally insoluble or only weakly soluble in water and are thus very interesting film-forming molecules to form water resistant films.

Myofibrillar proteins have unusual film-forming properties. They represent more than 50% of total muscle weight. They include contractile proteins (actin and myosin) and muscle contraction regulatory proteins and are characterized by their unusual functional properties. Our objective was to explore the potential packaging film forming properties of myofibrillar proteins by a "solvent" or a "themoplastic" process. We also compared their functional properties with other protein-based films and synthetic films.

## 2. Methods

*Raw materials* - Washed fish mince was prepared from fresh Atlantic sardines (Cuq et al., 1995a). The composition was 76 g ( $\pm$  1g) water, 23 g protein ( $\pm$  1g), and 0.2 g ( $\pm$  0.2g) lipid / 100g fish mince.

*Process* - Films were prepared from a film-forming solution based on fish mince in distilled water and acetic acid or ammonium hydroxide (Cuq et al., 1995a). Glycerol at 35 g/100g dry matter was added as plasticizer. Solutions were casted on a PVC plate and dried. Transparent and easily handled films were thus formed. Packagings materials were prepared using pilot thermomoulding process apparatus from myofibrillar protein-based powders, hydrated at various level by liquid water addition (Cuq et al., 1997b).

*Functional Properties* - Mechanical properties of films were determined using a SMS TAXT2 Rheometer (Champlan, France) operated in a perforation mode (Cuq et al., 1996) or according to the ASTM standard method D 882-88 (Cuq et al., 1995a). Water vapor permeability tests were conducted using a modified ASTM procedure (Cuq et al., 1995a). Dynamic mechanical thermal analysis (DMTA) were carried out with a Perkin Elmer apparatus DMA-7 (Cuq et al., 1997b).

### 3. Discussion

*Film-forming solution processing* (Cuq et al., 1995a) - To form film, myofibrillar proteins must not precipitate in solution and solution must be characterized by a low viscosity at casting to be easily spread in thin layers. The solution viscosity was greatly modified by pH due to variations in ionization state of the protein lateral chains. At isoelectric pH range, film formation was inhibited by protein precipitation. Films can be formed at pH between 2.5 and 4.0, and pH > 9.0. Films obtained in basic conditions were not used because of a persistent repulsive ammonia odor. Response surface methodology was used to determine influence of pH, protein concentration and temperature on viscosity. Temperature did not appear to be the prime factor affecting viscosity. The main factors influencing apparent viscosity were pH and protein concentration. Conditions that could be used to form films, involved pH between 2.75 and 3.5, and protein concentration between 0.5 and 2.5 g / 100 g solution. Standard conditions for forming myofibrillar protein-based films were so determined at pH 3 ; 2 g of protein / 100 g solution and 25°C.

*Thermoplastic processing* (Cuq et al., 1997b) - Thermoplastic properties of proteins were defined in relation with the glass transition, that is a sufficient tool to explain textural changes which occur during thermoplastic polymer processing. Heating thermoplastic proteins above glass transition temperature ( $T_g$ ) produces soft materials, and gives the possibility to shaped them. Cooling at room temperature reconverts the product to a glassy material, giving a stable form of the desired structure. Thermoplastic properties of myofibrillar proteins were studied by DMTA. Brutal changes in mechanical behavior between 215 and 250°C were associated to the glass transition of myofibrillar proteins. The  $T_g$  range is located near  $T_g$  classically observed for collagen, gelatin, or starch (Table 1). Differences in  $T_g$  between these biopolymers could be associated to differences in structure, molecular weight, or intermolecular interactions density. Molecular organization and structural characteristics of myofibrillar proteins are probably responsible of the noted differences in thermomechanical properties when compared with common thermoplastic synthetic polymers. Thermal degradation of myofibrillar proteins was observed to occur up to 250°C.

Polymer	Method	T <sub>g</sub> (°C)	Reference
Starch	DSC	250	Biladeris <i>et al.</i> , 1986
Myofibrillar proteins	DMTA	215-250	Cuq <i>et al.</i> , 1997b
Gelatin	DSC	210	Marshall and Petrie, 1980
Collagen	DSC	200	Batzer and Kreibich, 1981
Elastin	DSC	197	Batzer and Kreibich, 1981
Gluten	DMTA	160	Hoseney <i>et al.</i> , 1986
Casein	DMTA	144	Kalichevski <i>et al.</i> , 1993
Zein	DMTA	139	Kokini <i>et al.</i> , 1995
Gliadin	DMTA	121	Kokini <i>et al.</i> , 1995

*Table 1: Glass transition temperatures of various dry natural polymers and synthetic polymers (adapted from Cuq et al., 1997b); (DSC is the differential scanning calorimetry, and DMTA is the dynamical mechanical thermal analysis).*

It was interesting to note that the glass transition for the dry proteins (between 215 and 250°C) occurred just before their thermal degradation, so that the workable temperature range for film thermomoulding was very restricted. Incorporation of hydrophilic plasticizer (with sucrose and sorbitol) in myofibrillar proteins involves a large decrease (> 75°C) in the T<sub>g</sub> value. The depressive effect of water on the T<sub>g</sub> for myofibrillar proteins was also very important. Thermomoulding of myofibrillar proteins was only possible when the process temperature was higher than the T<sub>g</sub> value at a given moisture content. In addition, structure of packagings depended on processing conditions (structure such as translucent glass or foamed structure such as polystyrene).

*Functional properties of myofibrillar protein-based packagings* (Cuq *et al.*, 1995a, 1997b, Gontard *et al.*, 1996) - Myofibrillar protein-based films have mechanical properties similar to those of various biomaterial-based films (Table 2). Tensile strength was slightly above (films were more mechanically resistant) and elongation was slightly below (films were less deformable) values determined with already known protein-based films. They have substantially lower tensile strength than polymeric materials such as poly(vinylidene chloride) and polyester, but are relatively close to values of polyethylene synthetic films. They have a lower percentage elongation (22.7%) than poly(vinylidene chloride), polyester and polyethylene films.

Myofibrillar protein-based films were characterized by relatively poor water vapor barrier properties, like all hydrocolloid-based films (Table 3). The permeability values were slightly lower than values determined for protein-based films. Resistance of protein-based films to water vapor transmission is limited due to the inherent hydrophilicity of proteins. Transmission of water vapor through protein-based films is also facilitated by the presence of glycerol, a hydrophilic plasticizer, which favors adsorption of water molecules. Water vapor permeability constant values were higher by 100 as compared to those of typical polymeric films.

Film	Tensile Strength (MPa)	Elongation (%)	T (°C)	RH (%)
Polyester (1)	178	85	--	--
Poly(vinylidene chloride) (1)	93.2	30	--	--
Cellulose acetate (1)	65.6	30	--	--
High density polyethylene (1)	25.9	300	--	--
Low density polyethylene (1)	12.9	500	--	--
Methylcellulose film (2)	56.1	18.5	25	50
Myofibrillar protein film (3)	17.1	22.7	25	57
Hydroxypropylcellulose film (2)	14.8	32.8	25	50
Whey protein isolate film (4)	13.9	30.8	23	50
Soy protein film-pH=3 (5)	1.9	35.6	25	50
Wheat gluten protein film-pH=3 (5)	0.9	260	25	50
Corn zein protein film (6)	0.4	--	26	50

D'après (1) Briston, 1988 ; (2) Park et al., 1993 ; (3) Cuq et al., 1995a ; (4) McHugh and Krochta, 1994 ; (5) Gennadios et al., 1993 ; (6) Aydt et al., 1991.

*Table 2: Mechanical properties of myofibrillar protein-based films and of various films ; (RH is relative humidity and T is temperature).*

Film	Water Vapor Permeability ( $10^{-12}$ mol.m.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> .Pa <sup>-1</sup> )	T (°C)	RH %
Starch, cellulose acetate film (1)	142	38	100 - 30
Sodium caseinate film (2)	24.7	25	100 - 00
Soy protein film (3)	23.0	25	100 - 50
Corn zein film (4)	6.45	21	85 - 00
Hydroxypropyl methylcellulose film (5)	5.96	27	85 - 00
	5.23	30	11 - 00
Methylcellulose film (6)	5.08	30	100 - 00
Wheat gluten film (7)	3.91	25	100 - 00
Myofibrillar protein film (8)	2.89	30	11 - 00
Hydroxypropylcellulose film (2)	0.0482	38	95 - 00
Low density polyethylen film (9)	0.0230	30	100 - 00
Wheat gluten - beeswax- bilayer (7)	0.0122	38	97 - 00
High density polyethylene film (9)	0.0122	25	87 - 00
Beeswax film (10)			

(1) Allen et al., 1963 ; (2) Avena-Bustillos and Krochta, 1993 ; (3) Gennadios et al., 1993 ; (4) Park and Chinnan, 1990 ; (5) Hagenmaier and Shaw, 1990 ; (6) Park et al., 1993 ; (7) Gontard et al., 1994 ; (8) Cuq et al., 1995a ; (9) Myers et al., 1961 ; (10) Landman et al., 1960.

*Table 3: Water vapor permeability of myofibrillar protein-based films and of various films ; (RH is relative humidity and T is temperature).*

Generally the main functional properties of these proteins materials strongly depend on their water content and therefore on the surrounding humidity. Water

interactions with proteins must first be considered to explain physical property modifications induced by the presence of sorbed moisture. Relationships between equilibrium relative humidity and myofibrillar protein-based film water content have been described by measuring water sorption isotherms (Cuq et al., 1997a). Increasing the water content generally causes changes in barrier and mechanical properties (Figure 1). These changes were observed at temperature dependent relative humidities ; this relative humidity was reduced by increasing the temperature. The temperature dependence of the hydration effect on functional properties could be explained by the glass transition theory.

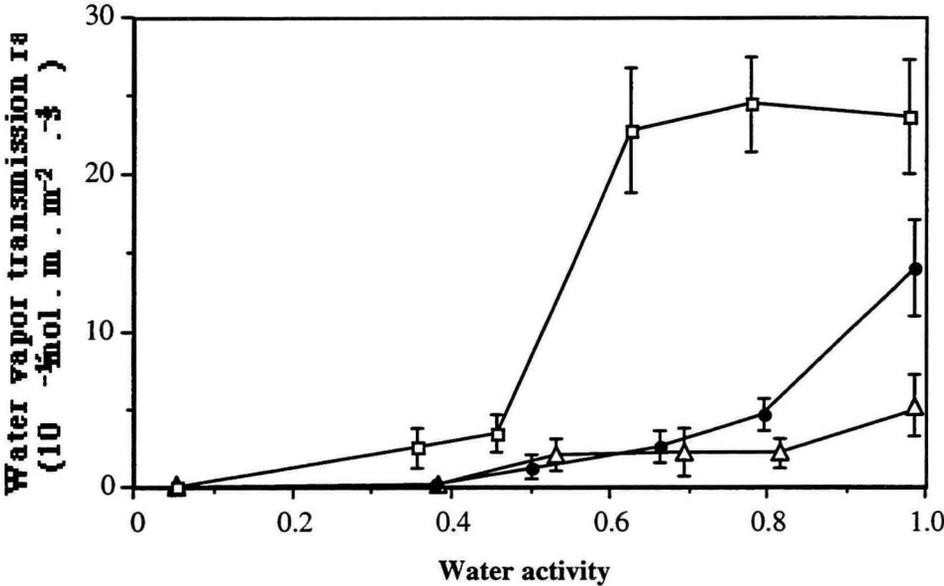


Figure 1: Effect of mean water activity on the water vapor transmission rate of myofibrillar protein-based films at 5°C (—△—), 20°C (—●—), or 50°C (—□—) (adapted from Cuq et al., 1997a).

#### 4. References

Allen, L., Nelson, A.I., Steinberg, M.P., and McGill, J.N. 1963. Edible corn-carbohydrate food coatings. 1. Development and physical testing of a starch-algin coating. *Food Technol.* 17(11): 1437-1441.

Avena-Bustillos, R.J. and Krochta, J.M. 1993. Water vapor permeability of caseinate-based films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. *J. Food Sci.* 58(4): 904-907.

Aydt, T.P., Weller, C.L., and Testin, R.F. 1991. Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Trans. ASAE.* 34(1): 207-211.

Batzer, H. and Kreibich, U.T. 1981. Influence of water on thermal transitions in natural polymers and synthetic polyamides. *Polym. Bulletin* 5: 585-590.

Biliaderis, C.G., Page, C.M., Maurice, T.J., and Juliano, B.O. 1986. Thermal characterization of rice starches: a polymeric approach to phase transitions of granular starch. *J. Agric. Food Chem.* 34: 6-14.

Briston, J.H. 1988. *Plastics films*, 3rd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.

Cuq B., Aymard C., Cuq J.L. and Guilbert S. 1995a. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science.* 60(6): 1369-1374.

Cuq, B., Gontard, N., and Guilbert, S. 1995b. Edible films and coatings as active layers. In *Active food packaging*, M.L. Rooney (Ed.), p. 111-142, Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Cuq B., Gontard N., Cuq J.L. and Guilbert S. 1996. Rheological model for the mechanical properties of myofibrillar protein-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44: 1116-1122.

Cuq B., Aymard C., Gontard N. and Guilbert S. 1997a. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. *Polymer Gels and Networks.* 5: 1-15.

Cuq B., Gontard N. and Guilbert S. 1997b. Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: application to the biopackaging fabrication. *Polymer.* 38(16): 4071-4078.

Cuq B., Gontard N. and Guilbert S. 1998. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry.* 75(1): 1-9.

Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Weller, C.L., and Testin, R.F. 1993a. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *J. Agric. Food Chem.* 41(11): 1835-1839.

Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.L., and Guilbert, S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* 29(1): 39-50.

Gontard, N. and Guilbert, S. 1994. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. In *Food packaging and preservation*, M. Mathlouthi (Ed.), p. 159-181, Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Gontard N., Thibault R., Cuq B. and Guilbert S. 1996. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(4): 1064-1069.

Guilbert S., Cuq B. and Gontard N. 1997. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*. 14(6-7): 741-751.

Hagenmaier, R.D. and Shaw, P.E. 1990. Moisture permeability of edible films made with fatty acid and (hydroxypropyl)methylcellulose. *J. Agric. Food. Chem.* 38(9): 1799-1803.

Hoseney, R.C., Zeleznak, K., and Lai, C.S. 1986. Wheat gluten: a glassy polymer. *Cereal Chem.* 63: 285-286.

Kalichevski, M.T., Blanshard, J.M., and Tobarczuk, P.F. 1993b. Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate. *Int. J. Food Sci. Technol.* 28: 139-151.

Kokini, J.L., Cocero, A.M., and Madeka, H. 1995. State diagrams help predict rheology of cereal proteins. *Food Technol.* 368(10): 74-82.

Krochta, J.M., Baldwin, E.A., and Nisperos-Carriedo, M. (Ed.). 1994. *Edible films and coatings to improve food quality*, Technomic Publishing Company, Lancaster, PA.

Landman, W., Lovegren, N.V., and Feuge, R.O. 1960. Permeability of some fat products to moisture. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37(1): 1-4.

Marshall, A.S. and Petrie, S.E. 1980. Thermal transition in gelatin and aqueous gelatin solutions. *J. Photographic Sci.* 28: 128-134.

McHugh, T.H. and Krochta, J.M. 1994b. Sorbitol- vs glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 42(4): 841-845.

Myers, A.W., Meyer, J.A., Rogers, C.E., Stannett, V., and Szwarc, M. 1961. Studies in the gas and vapor permeability of plastic films and coated papers. The permeation of water vapor. *TAPPI J.* 45(1): 58-67.

Park, H.J. and Chinnan, M.S. 1990. Properties of edible coatings for fruits and vegetables. Paper No. 90-6510 presented at the International Winter Meeting, American Society of Agricultural Engineers, Chicago, IL., December 18-21.

Park, H.J., Weller, C.L., Vergano, P.J., and Testin, R.F. 1993. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *J. Food Sci.* 58(6): 1361-1364, 1370.

# Les Protéines Sources d'Agro-Polymères pour la Production d'Emballages

## *Proteins as Agro-Polymers for Packagings Production*

Bernard Cuq<sup>1</sup>, Nathalie Gontard<sup>2</sup>, Stéphane Guilbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

2 Place Viala, 34060 Montpellier, France

Tel. : 04-99-61-28-60; Fax : 04-67-52-20-94 ; e-mail : cuq@ensam.inra.fr).

<sup>2</sup> ENSIA-SIARC, 1101 avenue Agropolis, BP 5098, 34033 Montpellier, France

Tel : 04-67-61-70-53; Fax : 04-67-61-70-55; E-mail : gontard@cirad.fr).

**Résumé :** Les avantages, les différentes formes, la formation, et les propriétés d'agro-matériaux à base de protéines avec des exemples sont passés en revue en détail. Les protéines sont utilisées de manière empirique pour la formation de matériaux d'emballages biodégradables, renouvelables, et/ou comestibles. Les agro-matériaux sont généralement formés à partir de protéines végétales (zéine de maïs, gluten de blé, protéines de soja, etc...) ou de protéines animales (protéines du lait, collagène, gélatine, kératine, protéines myofibrillaires, etc...). Deux procédés technologiques ont été utilisés pour faire des matériaux basés sur des protéines. Le procédé par voie solvante est basé sur la dispersion ou la solubilisation des protéines dans un système solvant ; le procédé par "voie sèche" prend en considération les propriétés thermoplastiques des protéines dans des conditions de faible hydratation. Les propriétés macroscopiques (solubilité, propriétés mécaniques, propriétés barrière, etc...) des agro-matériaux à base de protéines dépendent principalement de la structure macromoléculaire du réseau tridimensionnel et des interactions entre les protéines.

**Abstract :** *Advantages, types, formation, and properties of agro-materials based on proteins with examples are reviewed in detail. Proteins have long and empirically been used to make biodegradable, renewable, and/or edible packaging materials. Numerous vegetable proteins (corn zein, wheat gluten, soy proteins, etc.) and animal proteins (milk proteins, collagen, gelatin, keratin, myofibrillar proteins, etc.) are commonly shaped in agro-materials. Two technological processes have been investigated to make materials based on proteins : the "wet (or solvent) process" based on dispersion or solubilization of proteins in a solvent medium and the "dry process" turning into account the thermoplastic properties of proteins under low water content conditions. The macroscopic properties (solubility in water, mechanical properties, barrier properties, etc.) of agro-material based on proteins are dependent in the main part of the structure of the macromolecular three dimensional network and of interactions between proteins, plasticizers, and cross-linking agents.*

**Mots clés :** Protéines ; Agro-matériaux ; Bioemballages ; Mise en forme ; Propriétés

**Keywords :** *Proteins ; Agro-materials ; Agro-packagings ; Shaping ; Properties*

# 1. Introduction

For many years, various raw materials from agricultural resources have been used to produce renewable, biodegradable, and/or edible packagings, often called "agricultural materials" or "agro-packaging". The agro-material concept is generally associated with use of renewable products and control of their end uses. Among agricultural products, proteins have long and empirically been used as packagings (e. g. traditional lipoprotein "skins" in Asia, collagen sausage casings...) or as materials. For instance, buttons were made from caseins treated by formaldehyde, and soy proteins mixed with phenolformaldehyde resins were used by Henry Ford to produce automobile body parts. In addition, contrary to homopolymers constituted of one repeated monomer (e.g. polysaccharides), proteins are heteropolymers characterized by specific structures that permit various interactions and bindings differing in position, type, and/or energy. Generally, agro-materials based on proteins are characterized by "remarkable" functional properties (Cuq *et al.*, 1998).

# 2. Proteins as Agricultural Polymers

Numerous vegetable and animal proteins are commonly used as raw material to make agro-materials. Table 1 lists the main proteins tested as polymeric materials to form films or coatings along with their fabrication methods. Other proteins have been also used for films, including ones from rye, pea, barley, sorghum, rice, silk, fish, and serum albumin (Cuq *et al.*, 1998).

Proteins	Tested methods to obtain films			
	Film forming solution (a)	Collect the "skin" (b)	Enzymatic treatment (c)	Thermoplastic Extrusion
Corn zein	+			+
Wheat gluten	+	+		+
Soy proteins	+	+		
Peanut proteins		+		
Cottonseed proteins	+			
Keratin	+			
Collagen				+
Gelatin	+			
Caseins	+	+	+	
Whey proteins	+	+	+	
Egg albumin	+	+		
proteins	+			+
Myofibrillar proteins				

Table 1 : The main proteins used as polymeric materials to form agro-packagings. (a) Casting in thin layer and drying of a film-forming solution, (b) collect "skin" formed after boiling protein solutions, (c) enzymatic polymerization.

*Corn zein proteins* - Film-forming properties of corn zein have been studied (Aydt *et al.*, 1991, Herald *et al.*, 1996, Di Gioia *et al.*, 1999). The films obtained by drying of alcoholic aqueous dispersions are not water-soluble, but are relatively brilliant and grease-resistant. Films and coatings based on zein are for instance used to preserve fresh food, to retain the enriching vitamins, and for controlled release of medically active compounds. These films are used to protect dry or dried fruits, and frozen or intermediate moisture foods. Injection molded plastics display high water sensitivity, while cross-linked materials produce plastics with reduced water absorption and high mechanical properties.

*Wheat gluten proteins* - Numerous studies refer to the film-forming properties of wheat gluten proteins (Aydt *et al.*, 1991, Gennadios and Weller 1990, Gontard *et al.*, 1992). Wheat gluten-based films are classically obtained by casting in a thin layer and then drying of aqueous alcoholic proteic solutions (in acidic or basic conditions) in the presence of disruptive agents such as sulfite. Wheat gluten-based films have also been produced by collecting the "skin" formed after boiling protein solutions or by wheat gluten extrusion in the presence of disruptive agents. The wheat gluten films have been used to encapsulated additives, and improve quality of cereal products, and to retain antimicrobial or antioxydant additives on food surfaces (Redl *et al.*, 1996). Many "non-food uses" could be expected from gluten proteins due its thermoplastic behavior and possibilities for chemical modifications (change in cross-link density, modify hydrophobicity rate, or make it compatible with "synthetic" materials). The potential applications of gluten such as windows in envelopes, as surface coatings on paper, in biodegradable plastic films for agricultural uses, in water-soluble bags with fertilizers, as detergents, cosmetics, cigarette filters or additives (Guilbert and Gontard 1995) and in molded objects, are very diverse.

*Milk proteins* - The film-forming properties of milk proteins have been indirectly demonstrated by films formed on processing equipment surfaces and at air - water interfaces during heating of nonfat milk (Wu and Bates 1973). The film-forming properties of whey proteins have been used to produce transparent, flexible, colorless, and odorless films, such as those produced from caseins (Galiotta *et al.*, 1998). Mahmoud and Savello (1992) have also produced films through enzymatic polymerization of whey proteins using transglutaminases. Films have also been obtained after collecting the lipoproteic "skin" formed after boiling heated whey dispersions. Water insolubility of films based on whey proteins is partly due to the network stabilization by disulfide covalent bonds.

*Cottonseed proteins* - Biodegradable films based on cottonseed proteins, obtained from a film-forming solution treated with various cross-linking agents, have been studied and developed by Marquié *et al.* (1995).

*Myofibrillar proteins* - Recent studies have shown film-forming properties of fish myofibrillar proteins (Cuq *et al.* 1995, 1997). The films obtained from an aqueous solution are water-insoluble, perfectly transparent, and have good mechanical (close to polyethylene films) and gas barrier properties. The thermoplastic properties of myofibrillar proteins suggest industrial production of these films by the

classical processes usually applied to thermoplastic synthetic polymers (e.g. extrusion, thermomoulding).

### **3. Packaging materials formation from proteins**

Protein-based materials are constituted by continuous, low moisture, and more or less ordered macromolecular networks. Interactions among proteins need to be numerous and uniform. The probability of forming intermolecular bonds depends on protein shape (*i.e.* ratio chain length / diameter) and on condition during fabrication. High molecular weight proteins (e.g. glutenin) and fibrous proteins (e.g. collagen, glutenin) generally have interesting film-forming properties and form films with good mechanical properties, while globular or pseudo-globular proteins (e.g. gliadin, glycinin, casein) usually need to unfold before network formation. At present, however, we still can not realistically predict functional properties of proteins from their primary structures. Formation of a macromolecular network from proteins requires three steps : (i) rupture of low energy intermolecular bonds that stabilize polymers in the native state, (ii) arrangement and orientation of polymers chains (shaping), and (iii) formation of a three dimensional network stabilized by new interactions and bonds after the agent that ruptured intermolecular bonds is removed. Two technological processes are used to make materials based on proteins : a "wet process" based on dispersion or solubilization of proteins, and a "dry process" based on the thermoplastic properties of proteins under low water conditions (Figure 1).

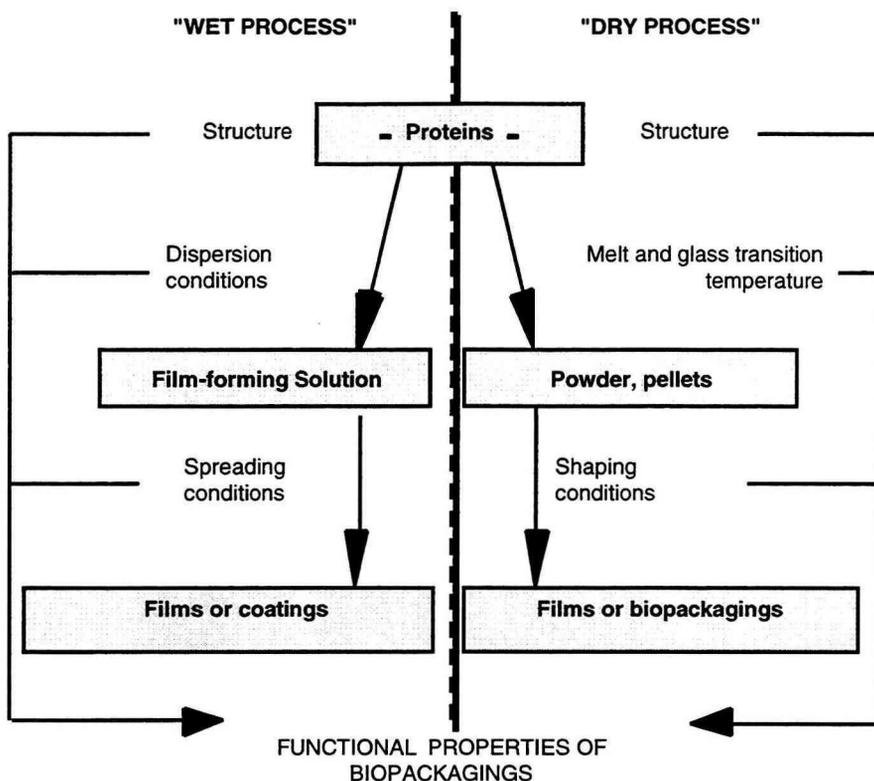


Figure 1: Schematic representation of the two technological processes used to form agro-packagings based on proteins.

*The wet process* - Formation of materials from a protein solution or dispersion has been extensively studied. This process under controlled laboratory conditions, requires formation of a thin layer of protein solution; it is thus often described as "casting" or "continuous spreading" method. Protein solubility, as defined by Osborne in 1924, varies greatly : no general procedure to solubilize proteins for these applications exists. However, it is interesting to know the types and proportions of interactions that need to be broken to solubilize the proteins. The film formation is based on separation of proteins from the solvent phase by precipitation or phase changes due to (i) changes in solvent conditions (polarity or pH changes, electrolyte additions), (ii) thermal treatments (heating), or (iii) solvent removal (drying). Film formation by solvent removal is due to increased polymer concentration in the medium, inducing bonds and forming a three-dimensional network. The solvents used to prepare protein "film-forming" solutions are generally based on water and/or ethanol, and occasionally acetone. However, dispersing proteins in solvents may require addition of disruptive agents (mercaptoethanol, sodium sulfite...), pH adjustment by addition of acids (lactic, hypochloric, or

acetic) or bases (ammonium, sodium, or potassium hydroxydes, triethylamine), or ionic strength control by electrolyte addition.

*The dry process* - The thermoplastic behavior of proteins has been recently studied and used to make agro-packagings by thermal or thermomechanical processes under low moisture conditions (*i.e.* "the dry process"), similar to thermoplastic starch-based materials. Thermoplastic properties of proteins were defined in relation to the glass transition theory, which explains textural changes during thermoplastic polymer processing. The glass transition phenomenon is affected by macromolecule characteristics and by presence and content of plasticizers (Slade and Levine 1993). Plasticization (by water or polyhydroxy compounds) is critical for the interaction of proteins to form a continuous network from powdered raw materials. Understanding the physicochemical factors that are involved remains difficult because we lack knowledge of modifications in proteins above the glass transition at low water content. Heating amorphous thermoplastic agro-polymers above the glass transition temperature produces soft and rubbery materials, and may permit their incorporation into specific products such as packaging materials (Figure 2). Cooling to room temperature can reconvert rubbery products to glassy materials, giving more or less "rigid" forms having desired structure.

In general, material formulation requires addition of plasticizer agents. A plasticizer is a small, molecule of low volatility which, when added to polymeric materials modifies the three-dimensional organization, decreases attractive intermolecular forces, and increases free volume and chain mobility. As a result of these changes in molecular organization, addition of plasticizers modifies the functional properties of films, by increasing in extensibility, distensibility and flexibility and decreasing cohesion, elasticity, mechanical resistance, and rigidity. With the exception of water molecules that could be considered as the "natural" plasticizer of most hydrocolloid-based films, the most usual plasticizers are polyols and mono- di-, and oligo-saccharides. It is also interesting to note that the addition of plasticizers results in a decrease of the glass transition temperature of amorphous materials, often necessary for forming materials by a thermomoulding process.

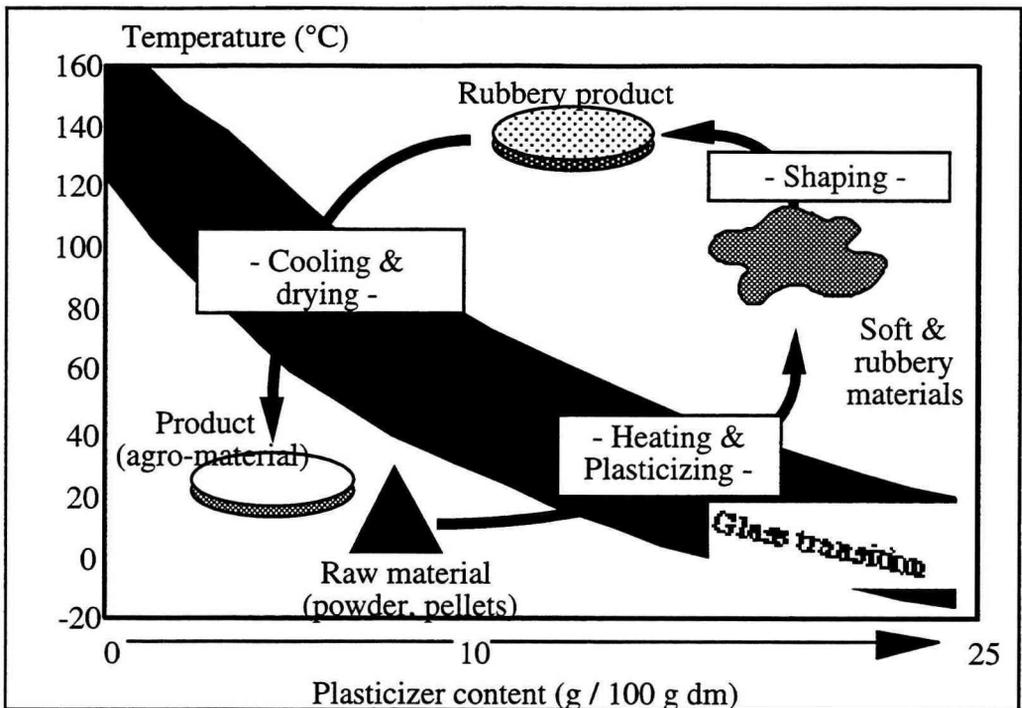


Figure 2: Schematic representation of the thermoplastic process applied to shape agro-packagings based on wheat gluten proteins in relation to the glass transition temperature.

Cross-linking agents are classically used to improve water resistance, cohesion, rigidity, mechanical strength and barrier properties of materials, although becoming less transparent (Guilbert 1988; Marquié *et al.*, 1995). Functional properties of films based on caseins have thus been highly improved by calcium addition. Commonly used covalent cross-linking agents are glutaraldehyde, glyceraldehyde, formaldehyde, gossypol, tannic acid and lactic acid. Enzymatic cross-linking by transglutaminases or peroxidases can also stabilize films based on proteins (Motoki *et al.*, 1987). However, food use of films made with such cross-linking agents is highly questionable.

#### 4. Properties of agro-materials based on proteins

The macroscopic properties of agro-materials based on proteins and macromolecular three dimensional networks are largely dependent on interactions between polymers. Water-solubility of protein-based materials depends on type and density of intermolecular interactions in the network. Intermolecular bonds in water-soluble materials are probably of lower energy than interactions between free water and polar groups not involved in network.

Substantial gas- and moisture-barrier properties of protein-based films are required for many applications : to control gas exchange for fresh or oxidizable foods, to reduce moisture exchange with the external atmosphere... (Cuq et al., 1995b). Water vapor permeabilities of some protein-based films are given in table 4. Due to their relatively low water vapor barrier properties, protein-based films can only be used as protective barrier layers to limit moisture exchange for short-term applications or in low-moisture foods. The O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> permeabilities of some biopolymer-based and synthetic films are given in table 2. Protein-based films have impressive gas barrier properties when they are not moist, especially against O<sub>2</sub>. For instance, O<sub>2</sub> permeability of wheat gluten film was 800 times lower than low density polyethylene and twice lower than polyamide 6, a well know high O<sub>2</sub> barrier polymer. When moisture is present, the macromolecule chains become more mobile which leads to a substantial increase in O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> permeability. The development of packaging or edible films with selective gas permeability could be very promising for controlling respiratory exchange and improving the conservation of fresh or minimally processed fruits and vegetables.

Film	O <sub>2</sub> Permeability	CO <sub>2</sub> Permeability	T	a <sub>w</sub>
	(10 <sup>-18</sup> mol.m.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> .Pa <sup>-1</sup> )		(°C)	
Methylcellulose (3)	522	29900	30	0
Beeswax (5)	480	--	25	0
Corn zein (4)	35	216	38	0
Soy protein (2)	2	--	23	0
Wheat Gluten (6)	1	7	25	0
Fish myofibrillar proteins (6)	1	9	25	0
Pectin (6)	1340	21300	25	0.96
Wheat Gluten (6)	1290	36700	25	0.95
Starch (1)	1085	--	25	1
Fish myofibrillar proteins (6)	873	11100	25	0,93

*Table 2: Oxygen and carbon dioxide permeabilities of various films.*

(According to Allen et al 1963 (1), Gennadios et al 1990 (2), Park and Chinnan 1990 (3), Aydt et al 1991 (4), Donhowe and Fennema 1993 (5), Gontard et al 1996 (6)).

## 5. Conclusion

Use of proteins as agro-polymers for packaging, coating and film fabrication suggest many applications in the food, agricultural, pharmaceutical and medical industries. Indeed, the specific functional properties (including mechanical, barrier, and optical properties) of these agro-materials could be exploited for many applications. Products could be formed from these proteins using classical shaping methods, such as thermoplastic processing technologies (extrusion, rolling milling, or thermomoulding) and solvent processes (such as spreading, bed fluidizing, or dipping, with subsequent drying). In addition, proteins (wheat gluten, corn gluten meal...) are inexpensive, widely available, and relatively easy to handle.

## 6. References

- Allen L., Nelson A.I., STEinberg M.P. and McGill J.N. 1963. Edible corn-carbohydrate food coatings. 1. Development and physical testing of a starch-algin coating. *Food Technol.* 17:1437-1441.
- Aydt T.P., Weller C.L. and Testin R.F. 1991. Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Trans. ASAE.* 34:207-211.
- Cuq B., Aymard C., Cuq J.L. and Guilbert S. 1995a. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *J. Food Sci.* 60:1369-1374.
- Cuq B., Gontard N. and Guilbert S. 1995b. Edible films and coatings as active layers. Pages 111-142 in: *Active Food Packagings*. M.L. Rooney, eds. Blackie Academic & Professional: Glasgow.
- Cuq B., Gontard N. and Guilbert S. 1997. Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: application to the biopackaging fabrication. *Polymer* 38:4071-4078.
- Cuq B., Gontard N. and Guilbert S. 1998. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry.* 75(1): 1-9.
- Di Gioia L., Cuq B. and Guilbert S. 1999. Mechanical and water barrier properties of corn protein-based biodegradable plastics. *Journal of Material Research*. Submitted for publication.
- Donhowe I.G. and Fennema O. 1993. The effects of solution composition and drying temperature on crystallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films. *J. Food Process. Preserv.* 17:231-246.
- Galiotta G., Di Gioia L., Guilbert S. and Cuq B. 1998. Mechanical and thermomechanical properties of whey protein-based films as affected by plasticizer or cross-linking agents. *Journal of Dairy Science.* 81(12): 3123-3130.

Gennadios A., Weller C.L. and Testin R.F. 1990. Modification of properties of edible wheat gluten films. Paper No. 90-6504 presented at the International Winter Meeting, American Society of Agricultural Engineers, Chicago.

Gennadios A. and Weller C.L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technol.* 44:63-69.

Gontard N., Guilbert S. and Cuq J.L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* 57:190-195 199.

Gontard N., Thibault R., Cuq B. and Guilbert S. 1996. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J. Agric Food Chem.* 44:1064-1069.

Guilbert S. 1988. Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis. Pages 199-219 in: *Food Preservation by Moisture Control*. C.C. Seow, T.T. Teng, and C.H. Quah, eds. Elsevier Applied Science Publishers: London.

Guilbert S. and Gontard N. 1995. Edible and biodegradable food packaging. Pages 159-168 in: *Foods and Packaging Materials - Chemical Interactions*. P. Ackermann, M. Jägerstad, and T. Ohlsson, eds. The Royal Society of Chemistry: Cambridge.

Herald T.J., Hachmeister K.A., Huang S. and Bowers J.R. 1996. Corn zein packaging materials for cooked turkey. *J. Food Sci.* 61:415-421.

Mahmoud R. and Savello P.A. 1992. Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. *J. Dairy Sci.* 75:942-946.

Marquié C., Aymard C., Cuq J.L. and Guilbert S. 1995. Biodegradable packaging made from cottonseed flour: formation and improvement by chemical treatment with gossypol, formaldehyde and glutaraldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 43:2762-2766.

Motoki M., Aso H., Seguro K. and Nio N. 1987.  $\alpha$ S<sub>1</sub>-casein film prepared using transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 51:993-996.

Park, H.J. and Chinnan, M.S. 1990. Properties of edible coatings for fruits and vegetables. Paper No. 90-6510 presented at the International Winter Meeting, American Society of Agricultural Engineers, Chicago.

Redl, A., Gontard, N. and Guilbert S. 1996. Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films. *J. Food Sci.* 61:116-120.

Slade L. and Levine H. 1993. The glassy state phenomenon in food molecules. Pages 35-102 in: *The Glassy State in Foods*. J.M. Blanshard and P.J. Lillford, eds. Nottingham University Press: Loughborough.

Wu L.C. and Bates R.P. 1973. Influence of ingredients upon edible protein-lipid characteristics. *J. Food Sci.* 38:783-787.

# Ecotoxicité de matériaux biodégradables après compostage

## *Ecotoxicity of Biodegradable Materials After Composting*

J. Fritz\*, U. Link and R. Braun

Institute for Agrobiotechnology

Department of Environmental Biotechnology - 3430 Tulln, Austria

**Résumé :** Durant 3 ans, 14 matériaux du commerce, leurs composants de base et certains mélanges faits à partir de matériaux synthétiques ou d'origine naturelle ont été testés, dans des tests de laboratoire de biodégradabilité. Des échantillons de compost issus de ces tests ont été analysés pour déterminer leurs paramètres physiques, chimiques et la toxicité aiguë vis à vis des plantes, vers, daphnies et bactéries bioluminescentes. Dans certains cas, des effets écotoxiques sont apparus, qui n'auraient pas pu être détectés par des analyses chimiques de routine seules.

**Abstract -** During a period of three years 14 market available materials, all of their known single components and some self made mixtures of materials of biogenic and synthetic origin have been tested for their biodegradation in laboratory tests. The compost samples deriving from those tests have been analysed for several physical and chemical parameters and for acute ecotoxicity to plants, earthworm, daphnia, algae and bioluminescent bacteria. It could be demonstrated, that in some cases negative ecotoxic effects appeared which would not have been detected by routine chemical analysis alone.

**Mots-clés :** compostage, qualité du compost, écotoxicité

**Keywords -** biodegradable materials, composting, compost quality, ecotoxicity.

# 1. Introduction

During the past decade a number of biodegradable materials have been developed to replace conventional plastics which do not fit into closed loop production and sustainable market development. For the intended biological treatment of such biodegradable waste specific criteria are needed and already defined by the European standard prEN 13432.

It was the goal of a continuous research field at the IFA-Tulln to determine the biodegradability and the disintegration of successively all market available biodegradable materials in laboratory composting tests. Additionally the ecotoxicity of the remaining composts was analysed. The analysis data were collected over a period of three years and summarised into an ecotoxicological profile data sheet.

The presented data are a part of those which have been generated by two Ph.D. thesis (Link, 1999 and Fritz 1999). The main topic of one of this two works had been the methodology of biodegradation testing and of the other it had been the method development for ecotoxicity testing in soil and compost.

This short paper shall give a summarised overview of the most important results from the systematic ecotoxicity testing of biodegradable materials.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biodegradable materials

The used biopolymers were starch (J.T.Baker, 4010), cellulose (Fluka, 22181), copy-paper (80 g/m<sup>2</sup>, Agfa, 601) and in one case wood (saw dust).

The commercially available materials based on biogenic sources were drinking bakers made of coated paper (Polarcup), FASAL (IFA-Tulln, thermoplastic material based on saw dust), ÖKOPUR (IFA-Tulln, thermoplastic material based on sugar beet residues), poly-hydroxybutyrate PHB (Zeneca, BIOPOL G08) and another PHB (Biomer P101RT).

Synthetically produced biodegradable polymers were poly-butylene-co-butylene adipate (Showa, Bionolle 3010), poly-lactic-acid PLA (Neste), PLA-co-urethane (Neste), poly-butylensuccinate-co-ethylenesuccinate (Sun Kyong, Skygreen G1111) and two variations of poly-e-aminocapronate-co-butylene adipate (Bayer, BAK 401 and 1095).

### 2.2. Laboratory composting tests

Between 70 and 110 g (12% in mass on dry weight basis) of each one of the materials was initially mixed with 900 g of three month old biowaste compost that could be called as immature green compost. The degradation tests were performed in closed, aerated and at 58°C thermostated vessels according to the EN-draft WI 261 085 (figure 1). Due to the limited amount of available vessels all the substances were degraded in several separated tests which ran sequentially. The tests ran for 45 to 90 days as the plateau phase in microbial activity was reached

normally between the 40<sup>th</sup> and 80<sup>th</sup> day. The biodegradation was followed by measurement of the released carbon dioxide.

### 2.3. Sample preparation

After the degradation process the composts were matured at room temperature by storage in open bakers for 7 to 14 days. During that time the dry matter of the compost samples increased from about 45% to 60% and the consistency improved for the use in plant compatibility tests and for bioassays with earthworms.

Aqueous eluates were produced in accordance to the method DIN 38414 S4 by 24 hours overhead shaking of the compost samples with distilled water in a relation of 1:5 based on dry matter (1 part compost with known water content + water to add up to the fivefold dry weight). The mixtures were first roughly sieved and finally filtered through a common paper filter. The filtrate was used for some chemical analysis and for aquatic bioassays.

### 2.4. Chemical and physical analysis

All chemical and physical analysis were done following the methods in the Austrian standard ÖNORM S2023 which is specialised for compost analysis. Those methods were similar to the corresponding DIN or ISO methods for soil or compost analysis. The colour of the eluate was quantified by measuring the spectral absorbance at 485 nm.

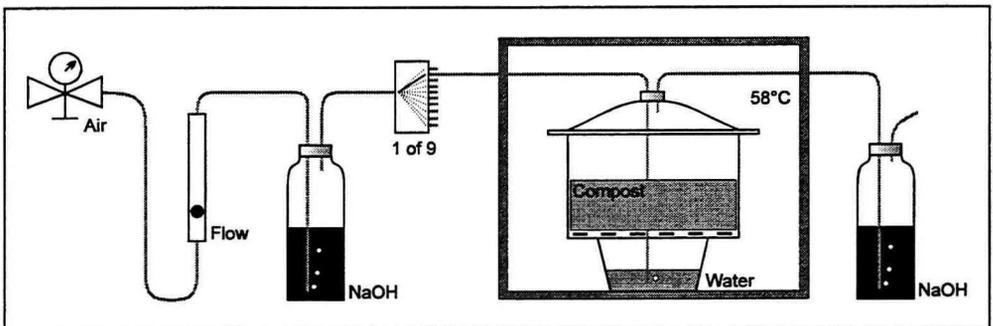


Figure 1: Scheme of the unit for the laboratory composting test (prEN 261 085).

### 2.5. Bioassays

Bioassays were done in accordance to standardised methods, which had been: ÖNORM S2023 for plant compatibility using the three plant species cress, millet and rape as suggested in the procedure OECD 208,

OECD 207 for earthworm toxicity testing using self cultivated *Eisenia foetida*,

DIN 38412 L30 for aquatic bioassays using self cultivated *Daphnia magna*,

OECD 201 for aquatic bioassays using the three single cell algae species *Scenedesmus subs.*, *Selenastrum capr.* and *Chlorella sp.*

The methods for plant tests and for the aquatic tests were validated before their routine use to document the influence of solved humic substances (colour).

### 3. Results

#### 3.1. Optimisation and validation of bioassays for compost samples

##### 3.1.1. Optimisation of critical parameters for bioassays with plants

Following the procedure as described in OECD 208 and ÖNORM S2023 no recommendation for an optimised watering of the test trays is given. It could be demonstrated, that the water saturation is responsible for most of the variations in the resulting plant biomass (figure 2).

The substrate in the plant trays should be kept at around 60 to 80% water saturation during the whole growth time. Any excess of water can decrease the plant growth dramatically, especially in the presence of not degraded but biodegradable substances or residues.

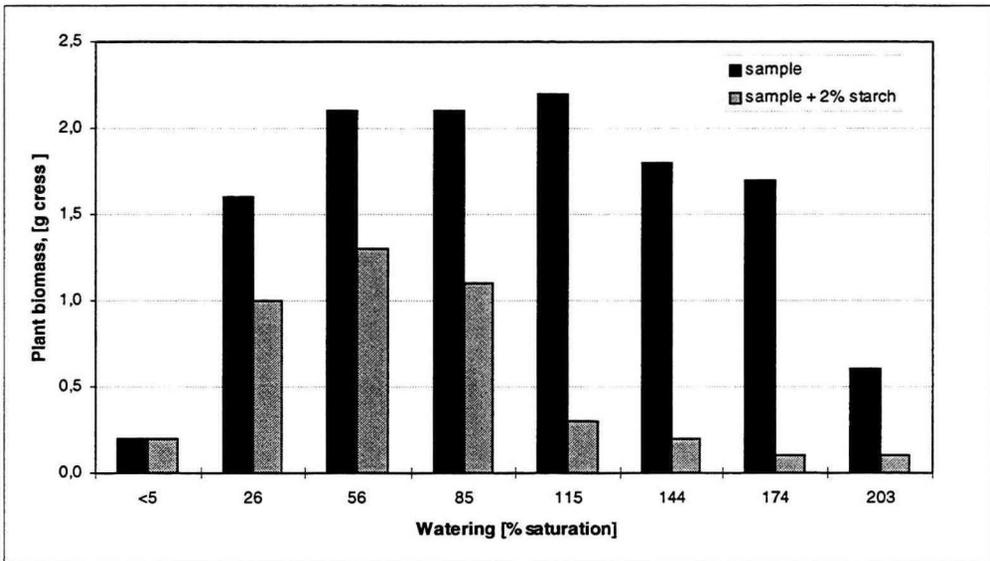


Figure 2: Biomass production of cress at different watering rates. The presence of not degraded substances (starch) reduces the plant growth dramatically at higher watering rates.

##### 3.1.2. Documentation of influencing parameters for bioassays with algae

Soluble organic fractions, especially humic substances, can change the growth of algae due to an extinction of the light from the table illumination (fluorescent lamps, 7000 lux). An experiment was performed with multiple dilution series of sepia ink (Rohrer & Klinger, Leipzig, absorbance spectrum close to compost eluates) which was used as a whole and filtered through a 0.2  $\mu$  membrane to remove the colour particles. The difference of the growth inhibition between the filtered and the not filtered series was defined as the net inhibition due to the darkening. The results can be seen in figure 3. Up to an absorption of about 1.0 at 485 nm no significant

inhibition of the algae growth appeared. More intensively coloured eluates should be diluted in advance.

Additionally the same dissolved humic substances may change the toxicity of heavy metals and organic substances (Suffet et al., 1989). The results of an experiment with chromate and aniline added to a compost eluate is shown in table 1. As it could be seen, the toxicity of the chromate was reduced significantly but the toxicity of the aniline was more or less unchanged.

The input of additional nutrients (nitrogen and phosphorus) into the bioassays could support the growth of plants and algae. The nutrient concentrations could not be influenced but the analysis results should be reported. Any influence on the plant growth is unavoidable, the influence on the growth of algae in aquatic bioassays could be limited by using a mineral medium with concentrations of N and P at the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ).

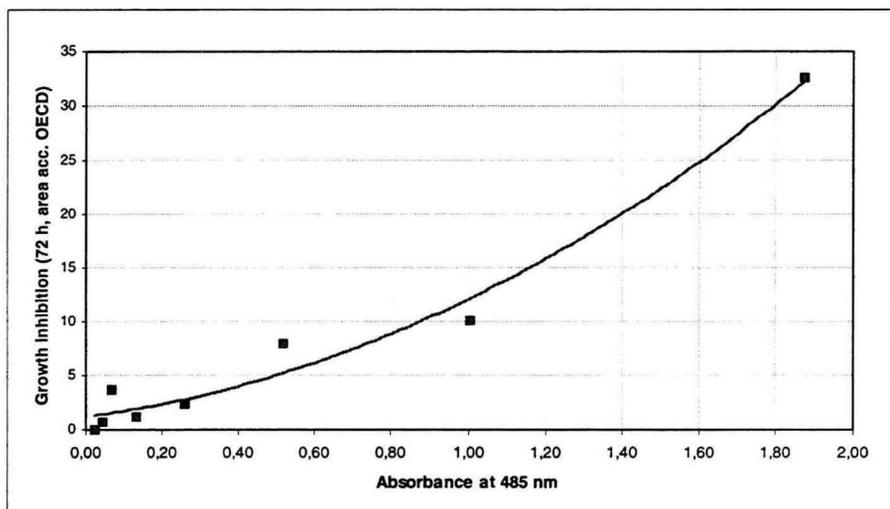


Figure 3: Growth inhibition of *Sc. subsp.* in dependence of the colour intensity of a sample solution measured as absorbance at 485 nm. Synthetic colour from sepia ink was used to avoid any interactions with unknown contents of real compost samples.

Substance	conc. [mg/l]	Inhibition to <i>Sc. subsp.</i> , all in %, 72 h duration			
		in water	in eluate	diff. to zero	rel. to water
Potassium dichromate	0	0	-8,3		
	0,20	47,8	-4,5	3,8	8 %
	0,75	94,5	29,1	37,4	40 %
Aniline	0	0	-4,1		
	30	39,0	37,0	41,1	105 %
	60	52,9	47,3	51,4	97 %

Table 1: Change of the acute toxicity of two substances added to compost eluates.

### 3.1.3. The need of matrix reference samples

The calculation of dose-response relations as suggested in the standard methods was in nearly all cases impossible for compost samples. The blinds from the degradation tests (which were pure composts without any additions) did show in many cases positive effects to the used organisms compared with the biomass production or growth rate in the synthetic reference media. The calculation of EC-values did not make any sense.

Example plant test: one degradation blind produced 52% plant biomass, one sample (saw dust) produced 67% of the plant biomass in the synthetic reference. The net effect is -30% relative inhibition (30% support) compared with the blind and not 33% inhibition if compared with the reference.

Example algae test: one sample did show a growth rate of 117% but in the eluate from the degradation blind the algae growth rate was 169% of the reference. Therefore the net effect of the sample was an inhibition of 31% and not -17%.

## 3.2. Results from bioassays with compost samples

During the three year long experimental period all together 13 degradation tests in laboratory scale and three in pilot scale have been performed. The results obtained from the first four experiments were not considered as the used methods had not been optimised and influences to the test organisms had not been reported. As an example the table 2 shows the results of the chemical analysis and table 3 of the bioassays done from the compost samples of one laboratory degradation test. As it could be seen, the material BAK 1095 and BAK 401 did slightly increase the pH and the nitrogen content of the compost. Non of these values is a sign for an insufficient compost quality. Exactly these both materials had been the only one which caused significant negative ecotoxic effects to all used organisms.

In repeated experiments it could be seen that the reproducibility of the bioassays is not better than +/- 30%. Therefore the accuracy of one single test result is limited. An improvement could be achieved by summarising multiple test results into one average value, similar to the profile analysis which is used for the registration of agrochemicals. Such a summary data sheet is given in table 4 together with the number of considered test results and their standard deviations.

The accuracy of that summary is high enough to detect those materials which may influence the compost quality negatively and should therefore be excluded from the biological treatment.

Analysis	degr. [% th- CO <sub>2</sub> ]	NH <sub>4</sub> -N [% of dm]	TKN [% of dm]	pH	Cond. [mS/cm]	A <sub>485nm</sub>	DOC [g/l]
Bionolle 3010	78,4	0,002	1,2	7,24	6,00	1,26	0,62
Fasal	61,1	0,006	1,2	7,10	6,66	3,69	1,27
Fasal + BAK	63,5	0,004	1,2	7,40	6,73	1,84	0,88
BAK 1095	85,3	0,236	1,7	7,80	6,78	53	5,41
PLA-U	88,0	0,009	1,2	7,37	8,46	4,18	1,20
PHB	83,6	0,003	1,2	7,47	6,22	2,27	0,95
BAK 401	77,1	0,165	1,6	7,81	6,01	10,8	2,49
Blind	-	0,003	1,2	7,33	7,10	1,42	0,66

Table 2: Results of the chemical analysis of the compost samples deriving from one degradation test.

Biotest	cress		daphnia		Sc. subsp. (72h)		Chlorella (72h)	
	[% Ref.]	[% blind]	[% surv.]	[% ref.]	[% blind]	[% ref.]	[% blind]	
Bionolle 3010	125	123	90	157	138	162	106	
Fasal	127	125	90	130	114	143	93	
Fasal + BAK	101	99	80	117	103	139	91	
BAK 1095	31	30	30	18	16	74	48	
PLA-U	119	117	90	105	92	157	103	
PHB	97	95	90	100	88	180	118	
BAK 401	76	75	50	71	62	141	92	
Blind	102	100	90	114	100	153	100	

Table 3: Results of the bioassays of the compost samples deriving from one degradation test (the same as in table 2).

Substance	Degrad. [%th- CO <sub>2</sub> ]	Analysis from the eluate			Rel. tox. profile [% inh.]			
		ΔpH	ΔCond.	A <sub>485nm</sub>	median	mean	sigma	n
Starch	85	+0,2	-9,2 %	135 %	2	-7	23	6
Cellulose	51	-0,2	-14,2 %	102 %	-18	-37	47	7
Copy-paper	76	-	-	-	-4	-7	6	5
Fasal	46	-0,3	-8,6 %	260 %	0	-16	43	14
Ökopur	60	-0,1	-3,7 %	104 %	-3	-9	22	11
PHB	73	-0,1	-16,7 %	200 %	0	-10	25	11
Biomer P101RT	60	-	-	-	0	-14	31	3
Bionolle 3010	78	-0,1	-15,5 %	89 %	-6	-25	37	7
PLA	62	-	-	-	4	0	12	3
PLA-U	69	-0,6	-5,0 %	238 %	7	-1	20	6
Skygreen G1111	71	+0,2	-12,5 %	108 %	-11	-16	31	4
BAK 1095	79	+0,5	-5,2 %	>10000 %	70	71	23	7
BAK 401	77	+0,5	-15,4 %	>1000 %	32	29	14	4

Table 4: Summary of the most important analysis and of all ecotoxicity data of all degradation tests. The summary of the ecotoxicity data into a profile does increase their accuracy and confidence. Δ-values are changes compared to the blinds.

## 4. Discussion

It could be demonstrated, that the routinely applied quality control of compost may not detect a possible toxicity deriving from residues or degradation products of biodegradable materials after the biological treatment. The inclusion of mandatory bioassays into the testing procedures for such materials is highly recommended for national and international standards.

Aquatic bioassays are influenced by dissolved organic substances which are typically present in high concentrations in compost eluates. More research work is necessary to systematically quantify the already known interactions between humic acids and organic and inorganic toxic substances.

In the meanwhile the continuous collection of data may generate a proper data base for the characterisation of the suitability of materials or polymer types for the biological waste treatment. The data base should additionally be extended with results from anaerobic treatment experiments which are currently not considered enough although the biogas production from organic waste is a promising technology for the future.

The remaining uncertainty of the presented data is caused by the scale of the degradation tests. It is not possible to predict the behaviour of the materials under the conditions of a real scale composting facility nor any properties of the compost after its application on arable land. Nevertheless, the presented results are a first base for the selection of suspect materials which should be investigated more intensively.

## 5. References

Fritz J., 1999, Ökotoxizität biogener Werkstoffe während und nach ihrem biologischen Abbau, PhD.-thesis at the University of Agriculture, Vienna.

Link U., 1999, Biologische Abbaubarkeit biogener und handelsüblicher Polymerwerkstoffe - Untersuchung der Aussagekraft bestehender Normtestmethoden, PhD.-thesis at the University of Agriculture, Vienna.

OECD (1992): Guidelines for the testing of chemicals; Volume 1; Section 2: Effects on biotic systems.

ÖNORM S2023, 1993, Analytical methods and quality control of compost, Austrian Institute for Standardisation, Vienna.

prEN 13432, 1998, Requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation - Test scheme and evaluation criteria for the final acceptance of packaging, European Committee for Standardisation, Brussels.

prEN 261 085, 1997, Evaluation of the ultimate aerobic degradability and disintegration of packaging materials under controlled composting conditions -

Method by analysis of released carbon dioxide, European Committee for Standardisation, Brussels.

Suffet I.H. and MacCarthy P., 1989, Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants. Symposium of the American Chemical Society, USA.

# Evaluation de la biodégradabilité primaire d'huiles de base utilisées dans la fabrication des lubrifiants

## *Evaluation of the primary biodegradability of mineral base oils used in lubricant manufacturing*

F. Haus\*, G.-A. Junter\*\*\*, J. German\*, E. Poitrat\*\*

\*Mobil Oil Française, BP 37, 76330 Notre Dame de Gravenchon,  
tél : 02-32-84-42-41, fax : 02-32-84-41-74

\*\*Ademe, 27 rue Louis Vicat, 75737 PARIS Cédex 15,  
tél : 01-47-65-20-19, fax : 01-46-45-52-36

\*\*\*Laboratoire des Polymères, Biopolymères et Membranes, UMR 6522 CNRS,  
Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cédex,  
tél : 02-35-52-29-93, fax : 02-35-52-84-85

**Résumé:** La biodégradabilité primaire de différentes huiles de base a été évaluée selon le test CEC L-33-A-93 afin de corréliser cette biodégradabilité avec les propriétés physico-chimiques et le procédé de fabrication des huiles. Une étude préliminaire de l'influence de la nature et de l'origine de l'inoculum microbien sur les résultats des tests a permis de mettre en évidence l'absence de variations significatives de ces résultats, bien que la concentration microbienne soit variable (de  $10^4$  à  $10^7$  UFC/ml). Les tests de biodégradabilité ont donc ensuite été réalisés avec le même inoculum (effluent secondaire) dont la reproductibilité est vérifiée par analyse de deux huiles de référence lors de chaque essai. Il a ainsi pu être montré que la biodégradabilité d'une huile diminue avec son point d'écoulement et son indice de viscosité alors qu'elle augmente lorsque sa viscosité diminue. De même, il apparaît que les huiles hydrocraquées constituent la catégorie d'huiles minérales la plus biodégradable avec une biodégradabilité comprise entre 66 et 75 %. Les huiles végétales (huiles de colza, polymérisées ou non), quant à elles, présentent une biodégradabilité supérieure à 95 %.

**Abstract:** The primary biodegradability of different base oils has been evaluated by the CEC L-33-A-93 test to correlate this biodegradability with physical-chemical properties and manufacturing processes of base oils. Preliminary experiments showed no significant variations in the biodegradability data according to the nature and origin of microbial inoculum although the inoculum size varied between  $10^4$  and  $10^7$  CFU/ml. Therefore, all biodegradability tests were performed with the same inoculum (secondary effluent) whose reproducibility was systematically checked by the analysis of two reference oils. It has been demonstrated that the biodegradability of an oil decreases with its pour point and viscosity index but increases when its viscosity decreases. It also appears that hydrocracked oils are the most biodegradable mineral oils with biodegradabilities ranging from 66 to 75 %. The biodegradability of vegetable oils (rapeseed oils, polymerised or not) is higher than 95 %.

**Mots clés:** huiles de base, test CEC L-33-A-93, biodégradabilité, inoculum

**Keywords:** base oils, CEC L-33-A-93 test, biodegradability, inoculum

## 1. Introduction

Les lubrifiants sont constitués d'une huile de base et d'un ou plusieurs additifs. Leur fonction principale est d'atténuer le frottement et l'usure entre les pièces métalliques. Cependant, l'utilisation des lubrifiants dans divers secteurs d'activité peut poser le problème de leur élimination dans l'environnement, notamment à la suite de fuites ou de rejets accidentels. C'est le cas par exemple pour les lubrifiants des moteurs deux temps hors-bord et des machines à huiles perdues (chaînes de scie et tronçonneuses). Ainsi, sur les 4,5 millions de tonnes d'huiles que consomme chaque année la Communauté Européenne, il en disparaît 600 000 tonnes dans la nature (Van Donkelaar P., 1990), ce qui représente pour l'environnement un réel danger de pollution - d'où l'intérêt croissant porté à la biodégradabilité des lubrifiants.

## 2. Test de biodégradabilité CEC L-33-A-93 : principe

Le test CEC L-33-A-93 est un test de biodégradabilité primaire mis au point par le Conseil Européen de Coordination (CEC, 1995). Ce test est utilisé depuis 1982 pour l'évaluation de la biodégradabilité des huiles de moteur hors-bord deux temps, ainsi que d'autres bases lubrifiantes et additifs de formulation. Il a d'abord été publié sous forme préliminaire en 1982 (CEC L-33-T-82) avant d'être approuvé sous la désignation définitive CEC L-33-A-93. La norme AFNOR NFT60-198 homologuée en juillet 1994 lui est équivalente.

Malgré la spécificité de son application, le test CEC est utilisé pour déterminer la biodégradabilité d'une grande variété d'huiles minérales. Cette méthode a même été incorporée dans plusieurs labels pour "lubrifiants compatibles avec l'environnement", comme le label allemand "Blue Angel" (Umweltbundessamt, 1990).

Le principe de ce test consiste à introduire dans de l'eau additionnée de sels minéraux une très faible quantité de lubrifiant dilué dans du trichlorotrifluoroéthane et un inoculum microbien. Le tout est alors placé sous agitation, pendant 21 jours, à 25 °C et dans l'obscurité. Au bout de 21 jours, le mélange est soumis aux ultrasons, acidifié, et extrait avec le solvant chloré. La quantité d'huile résiduelle est alors déterminée par infra-rouge en comparant le maximum d'absorption de la liaison CH des groupements  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  à  $2930\text{ cm}^{-1}$  avec le maximum d'absorption obtenu pour un mélange préparé de façon similaire mais analysé immédiatement après sa préparation. La biodégradabilité est ensuite calculée en comparant cette quantité à la quantité obtenue avec un mélange empoisonné, c'est-à-dire non inoculé et contenant une substance inhibitrice de l'activité microbienne ( $\text{HgCl}_2$ , par exemple).

Pour chaque test, deux mélanges empoisonnés sont préparés ainsi que six mélanges inoculés ; trois sont analysés immédiatement après préparation et trois

au bout de 21 jours. Les résultats obtenus sont alors exploités comme représenté dans le tableau 1.

Jours	0			21				
	Flacons inoculés			Flacons inoculés			Flacons empoisonnés	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Maximum d'absorption à 2930 cm-1	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>
Moyenne des maximums d'absorption	X							
Quantité d'huile résiduelle/100 (%)	F <sub>1</sub> /X	F <sub>2</sub> /X	F <sub>3</sub> /X	F <sub>4</sub> /X	F <sub>5</sub> /X	F <sub>6</sub> /X	F <sub>7</sub> /X	F <sub>8</sub> /X
Moyenne des quantités d'huile résiduelle	100			T			E	
Biodégradation (%)	0			$(E-T)/E * 100$				

Tableau 1 : Calcul de la biodégradation selon le test CEC L-33-A-93

### 3. Influence de l'inoculum

Parmi les paramètres entrant dans la réalisation du test CEC L-33-A-93 et des tests de biodégradabilité en général, l'inoculum est le moins bien maîtrisé (Thouand G., 1993). En effet, les tests normalisés donnent pour seule indication d'utiliser un inoculum provenant d'une station d'épuration de vidanges domestiques en supposant que celui-ci contient une flore microbienne suffisamment variée pour simuler les conditions environnementales réelles. Ainsi, pour le test CEC L-33-A-93, notamment, il est recommandé d'utiliser un effluent primaire (issu des étapes de traitement mécanique) ou un effluent secondaire (issu des étapes de traitement biologique) d'une station d'épuration de vidanges domestiques.

Nous avons donc procédé dans un premiers temps au choix de l'inoculum. Pour cela, des inocula de différentes natures (effluent primaire, effluent secondaire, boues activées) ou provenant de différentes stations d'épuration de la région havraise ont été évalués.

Lors de chaque test, l'inoculum est caractérisé par son nombre de bactéries viables sur milieu gélosé, exprimé en UFC/ml (Unités Formant Colonies/ml). Immédiatement après prélèvement, l'inoculum est filtré sur papier filtre de taille de pores 3µm, afin d'éliminer les grosses particules, et le filtrat est utilisé directement.

### 3.1. Influence de l'origine de l'inoculum

Trois inocula provenant d'effluents secondaires des stations d'épuration de Notre Dame-de-Gravenchon, Lillebonne et Gruchet le Valasse (région havraise), respectivement, ont été utilisés pour évaluer la biodégradabilité de quatre huiles de base données.

Les valeurs de biodégradabilité obtenues sont regroupées en figure 1. On remarque que l'inoculum provenant de Notre-Dame-de-Gravenchon donne les valeurs de biodégradabilité les plus basses tandis que celui provenant de la station d'épuration de Lillebonne donne les valeurs les plus élevées. Ces valeurs restent cependant relativement voisines. En effet, la norme CEC spécifie que la différence entre deux tests indépendants et réalisés avec le même appareillage dans les mêmes conditions peut dépasser 14,8 % dans un cas sur vingt.

L'inoculum provenant de la station d'épuration de Notre-Dame-de-Gravenchon a été retenu pour la suite de cette étude pour des raisons de commodité (station d'épuration proche géographiquement, personnel disponible sur place tous les jours,...).

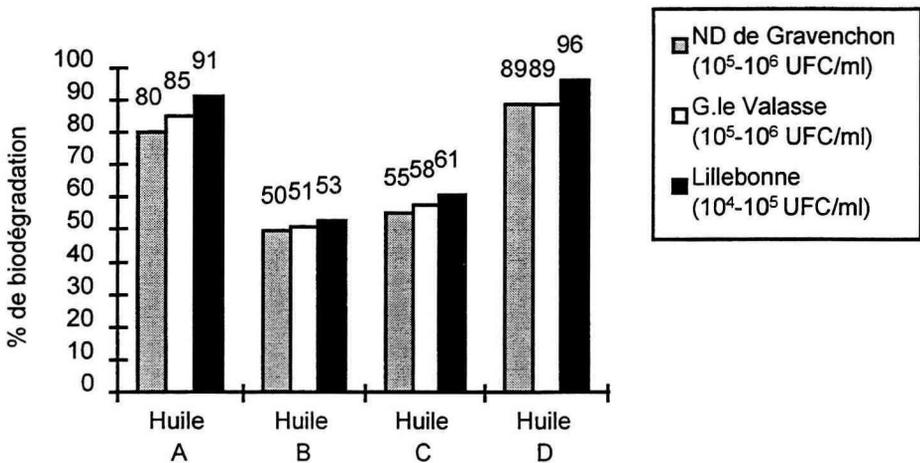


Figure 1 : Influence de l'origine de l'inoculum sur les valeurs de biodégradabilité obtenues selon le test CEC L-33-A-93

### 3.2. Influence de la nature de l'inoculum

Des inocula prélevés dans l'effluent primaire, l'effluent secondaire et les boues activées de la station d'épuration de Notre-Dame-de-Gravenchon ont été utilisés pour évaluer la biodégradabilité de cinq huiles de base (figure 2).

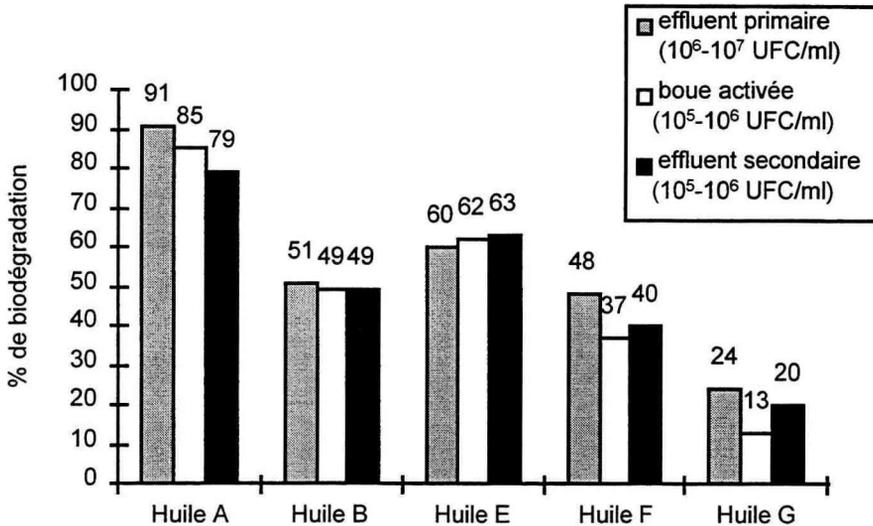


Figure 2 : Influence de la nature de l'inoculum sur les valeurs de biodégradabilité obtenues selon le test CEC L-33-A-93

On constate qu'il y a peu d'influence de la nature de l'inoculum sur les valeurs de biodégradabilité obtenues. L'effluent secondaire a été retenu pour le criblage des différentes huiles de base car celui-ci est plus facilement accessible que les deux autres types d'inoculum.

### 3.3. Conclusions

Les tests de biodégradabilité ont été effectués avec un effluent secondaire provenant de la station d'épuration de Notre-Dame-de-Gravenchon. La reproductibilité de l'inoculum a été vérifiée en analysant lors de chaque test deux huiles de référence (tableau 2).

Date	19-06-98	26-08-98	09-09-98	23-09-98	07-10-98	18-11-98	20-01-99
Huile A	80	78	80	75	80	81	85
Huile B	49	/	49	46	51	54	46

Tableau 2 : Pourcentages de biodégradation de deux huiles de référence déterminés à différentes dates

## 4. Biodégradabilité de différentes huiles de base

### 4.1. Influence des propriétés physicochimiques des huiles sur leur biodégradabilité

### 4.1.1. Viscosité

La viscosité est la propriété la plus importante d'un lubrifiant qui conditionne son application. Celle-ci se définit comme étant la résistance au mouvement que manifestent tous les fluides; c'est la traduction des forces qui s'exercent entre les molécules dont ils sont constitués et qui contrarient leurs mouvements relatifs. Plus ce freinage est accusé, plus la résistance à la déformation est forte et plus grande est la viscosité.

Les résultats des tests de biodégradabilité d'huiles de base minérales de différentes viscosités sont illustrés par la figure 3.

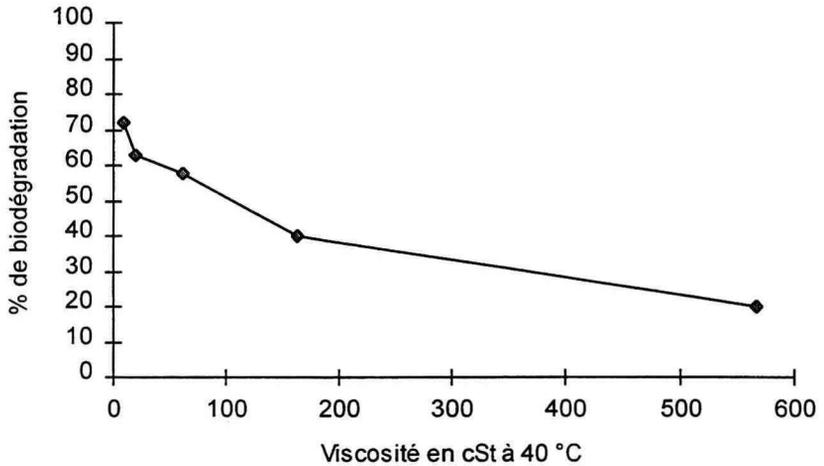


Figure 3 : Influence de la viscosité sur la biodégradabilité

On constate que la biodégradabilité de l'huile diminue lorsque sa viscosité augmente. Ceci peut s'expliquer par le fait que les microorganismes dégradant les hydrocarbures réagissent à l'interface huile/eau. Or, le degré de répartition de l'huile dans l'eau dépend directement de la viscosité de l'huile. Ainsi, plus la viscosité augmente, moins la surface disponible aux microorganismes sera importante et donc plus lente sera la biodégradation (Atlas R.M., 1981).

### 4.1.2. Point d'écoulement

Le point d'écoulement d'une huile est défini arbitrairement par la température à laquelle cette huile, versée dans une éprouvette cylindrique de dimensions déterminées et ensuite progressivement refroidie, reste immobile dès qu'on incline l'éprouvette et qu'on la place horizontalement durant 5 secondes. Le point d'écoulement est l'un des paramètres fondamentaux pour les huiles de base moteur car à basse température, l'huile doit rester fluide dans le carter. Elle ne doit donc pas par refroidissement se prendre en masse par cristallisation empêchant ainsi son écoulement.

On constate d'après la figure 4 que les huiles de très bas point d'écoulement sont moins biodégradables que les huiles de viscosité voisine mais de point d'écoulement plus élevé. Ceci n'est pas surprenant car le point d'écoulement d'une huile est directement lié à sa teneur en paraffine: il diminue lorsque la teneur en paraffine diminue. Les huiles à très bas point d'écoulement sont donc légèrement plus naphténiques et aromatiques que les autres types d'huile. Or, les naphtés et les aromatiques sont connus pour être peu biodégradables (Perry J.J., 1984; Riis V., Miethe D. and Möder M., 1996).

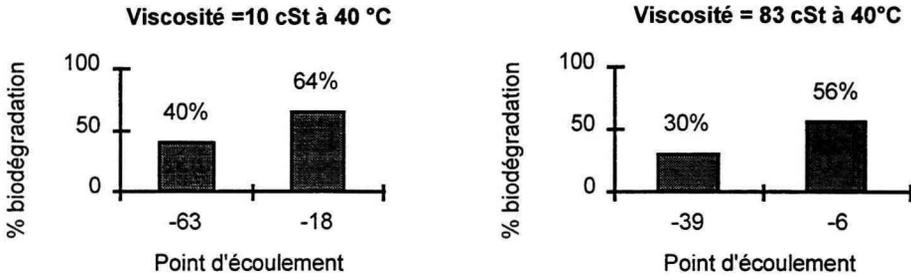


Figure 4 : Influence du point d'écoulement sur la biodégradabilité

#### 4.1.3. Indice de viscosité

L'indice de viscosité est un nombre arbitraire utilisé pour caractériser la variation de la viscosité cinématique d'une huile en fonction de la température. Plus cette variation est faible, plus l'indice de viscosité est élevé, et inversement. L'indice de viscosité est également un critère industriel très important, car dans un moteur, les huiles sont susceptibles de travailler à des températures très différentes. Ainsi, les lubrifiants doivent conserver à chaud une viscosité minimale mais cette viscosité ne doit pas être trop élevée à froid sous peine d'apporter une résistance trop importante aux mouvements.

La figure 5 suivante compare la biodégradabilité d'huiles d'indices de viscosité différents mais de viscosités voisines.

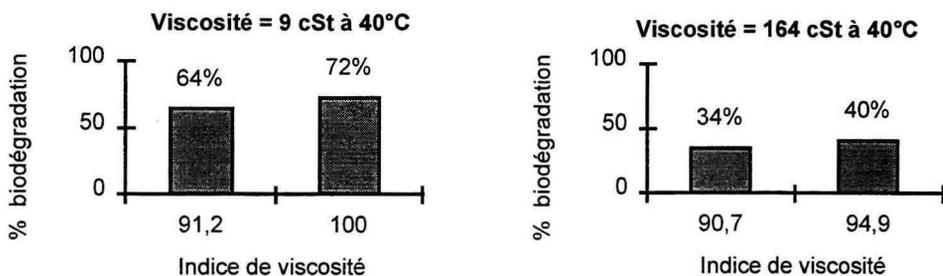


Figure 5 : Influence de l'indice de viscosité sur la biodégradabilité

On constate que la biodégradabilité d'une huile diminue légèrement lorsque son indice de viscosité diminue, ce qui n'est pas surprenant non plus puisque l'indice de viscosité d'une huile est également lié à sa teneur en paraffines; celle-ci diminue lorsque l'indice de viscosité diminue.

#### 4.2. Influence du procédé de fabrication des huiles sur leur biodégradabilité

La figure 6 représente les valeurs de biodégradabilité de différents types d'huiles en fonction de leur viscosité.

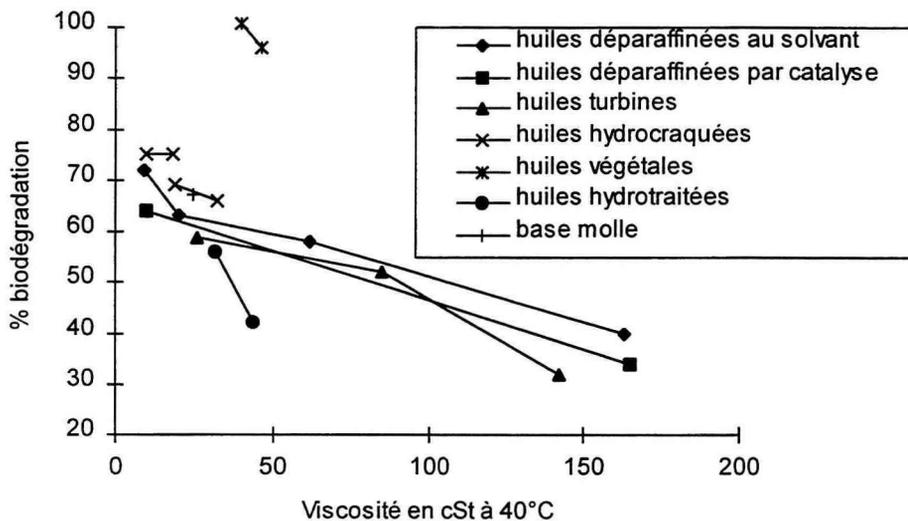


Figure 6 : Biodégradabilité de différents types d'huiles de base provenant de différents procédés

Différentes observations peuvent être faites à partir de la figure 6 :

- les huiles végétales (huiles de colza polymérisées ou non) présentent une biodégradabilité supérieure à 95 %

- les huiles hydrocraquées constituent la catégorie d'huiles de base minérales la plus biodégradable, avec une biodégradabilité comprise entre 66 et 75 %. Ceci est vraisemblablement dû au fait que ces huiles contiennent moins d'aromatiques, bien connus pour être récalcitrants à la biodégradation.

- la base molle, qui par définition est très riche en paraffines, présente une biodégradabilité égale à 67 %.

- à viscosité égale, les huiles déparaffinées au solvant sont légèrement plus biodégradables que les huiles déparaffinées par voie catalytique - ces dernières étant légèrement moins paraffiniques que les huiles déparaffinées au solvant.

- les huiles turbines semblent moins biodégradables que les huiles déparaffinées au solvant pour une même viscosité. Ceci est surprenant car les huiles turbines sont connues pour être plus paraffiniques (leur indice de viscosité et leur point d'écoulement sont plus élevés). Leur biodégradabilité semble équivalente à celle des huiles déparaffinées par voie catalytique.

- les huiles hydrotraitées présentent une biodégradabilité étonnamment faible, entre 42 et 56%. Il est cependant important de noter que ces huiles sont additivées en sortie unité par un antioxydant. Une étude des huiles hydrotraitées avant additivation devra être menée.

## 5. Conclusion

Ce travail montre que la biodégradabilité primaire des huiles de base varie significativement avec les caractéristiques physico-chimiques de ces huiles. De même, la biodégradabilité des différentes huiles est tributaire de leur procédé de fabrication. La prochaine étape consistera à étudier de façon plus approfondie l'influence de la composition chimique des huiles sur leur biodégradabilité. Les tests de biodégradabilité seront étendus au test de Sturm Modifié (méthode OCDE 301B), qui est un test de biodégradabilité ultime.

## 6. Références bibliographiques

Atlas R.M., 1981, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective, *Microbiological Review*, 45, p 180-209.

Co-ordinating European Council for the development of performance tests for transportation fuels, lubricants and other fluids, 1995, Biodegradability of Two-Stroke Cycle Outboard Engine Oils in Water, CEC L-33-A-93.

Perry J.J., 1984, Microbial metabolism of cyclic alkanes, *Petroleum Microbiology*, Macmillan, NY, ed R.M. Atlas, p 61-97.

Riis V., Miethe D., Möder M., 1996, Analytical characterization of the persistent residues after microbial degradation of mineral oils, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 356, p 378-384.

Thouand G., Block J.C., 1993, Utilisation d'inocula précultivés dans les essais de biodégradabilité, *Environmental Technology*, 14, p 601-614.

Thouand G., 1993, Maîtrise des inocula bactériens utilisés dans les essais de biodégradation aérobie, Thèse doctorat, Université Nancy I.

Umweltbundesamt, 1990, The environmental label introduces itself, Berlin, Germany.

Van Donkelaar P., 1990, Environmental effects of crankcase-and mixed lubrication, *The Science of The Total Environment*, 92, p 165-179.

# Utilisation de la biodiversité des *Pseudomonas* pour la synthèse de polyesters à architecture contrôlée

## *Biodiversity of Pseudomonas bacteria as a tool in the macromolecular synthesis of polyesters with controlled architectures*

Delphine Mallarde<sup>1</sup>, Valérie Langlois<sup>1</sup>, Odile Bouvet<sup>2</sup>, Philippe Guerin<sup>1</sup>

1 : Laboratoire de Recherche sur les Polymères, UMR CNRS C7581, Université Paris XII, F- 94320 THIAIS

2 : Institut PASTEUR, Unité des Entérobactéries, INSERM U389, F- 75724 PARIS Cedex 15

**Résumé** : Seize souches de *Pseudomonas* ont été utilisées lors de la synthèse de poly(hydroxyalcanoates) à chaînes latérales de longueur moyenne. Quatre souches ont été sélectionnées car elles permettent la synthèse de polymères dans des conditions intéressantes, et nous avons montré que leur capacité à produire des polyesters ayant des propriétés différentes dépendait du type de la bactérie et de la nature du substrat.

**Abstract** : Sixteen *Pseudomonas* strains have been tested with a view to develop medium chain lengths polyhydroxyalkanoates. Four strains have been selected and it has been showed their ability for producing three different polyesters with variable properties was depending on bacteria and substrates.

**Mots-clés** : polyester, *Pseudomonas*, bactéries

**Keywords** : polyester, *Pseudomonas*, bacterias

## 1. Introduction

A wide variety of prokaryotic microorganisms is used in the synthesis of poly(hydroxyalkanoates) PHAs aimed at environmental or therapeutic applications (1). These polymers serve as intracellular and energy reserve materials and can be produced in large quantities by a fermentation process. The presence of a R-configuration stereogenic center in the skeleton leads to controlled and reproducible architectures; main chains contain ester bonds which can be cleaved by depolymerase systems and/or by simple hydrolysis. To date, about hundred different repeating units have been found in this PHAs family (2). Among these structures, 3-hydroxyacids exist with 6 to 14 carbon atoms and a large spectrum of saturated, unsaturated, linear, branched chain or functional pendant groups (3). The ability to accumulate medium-chain lengths PHAs is now well established for the group of *Pseudomonas* (4). *Pseudomonas oleovorans* keeps a particular place due to its versatility; this bacterium is able to uptake and to incorporate substrates containing among other functionalized groups, terminal double or triple bounds or epoxy groups. Moreover, the composition of the produced copolyester is the strict reflection of the nutrients composition (5). One may consider biological synthesis of bacterial polymers as a substituting or complementary method of the macromolecular chemistry dedicated to polyesters. To succeed in this approach, it will be necessary to control chemical structure, molecular weight and molecular weight distribution of PHAs produced in the host organism. A first stage must be devoted to the selection of bacteria which present differentiated metabolisms in connection with substrates.

In this paper, we wish to show, it is possible to obtain - medium - chain lengths PHAs with variable characteristics by using different species of the *Pseudomonas* group. For a well defined application and according to the prerequisites, by selecting bacterium and substrate, an appropriate polymeric material will be producible by biotechnology.

## 2. Experimental part

### *Growth conditions*

The conditions used in the production of PHAs were medium M70. Growth medium was treated at different temperatures 17, 23 and 30°C in a 500 mL erlenmeyer and the culture volume represents 10 % of the erlenmeyer volume. Substrates(sodium heptanoate, octanoate and decanoate) were autoclaved in a M70 milieu solution. A two step batch fermentation was carried out : the first step consisted in a preculture (M70 medium) containing the required substrate (agitation speed, 200rpm and temperature). Growth was monitored measuring the absorbance at 540 nm. When optical density reached 2, a small part of the preculture (30 mL) was put in the culture milieu (300 mL). At the stationary phase, the milieu is limitant and the quantity of PHAs is maximum. The cells were harvested by centrifugation and the

whole pellets were lyophilized to yield the dry cells. The produced PHAs were extracted by refluxing in chloroform.

**Bacterial strains** : Sixteen bacterial strains have been used

<i>P. alcaligenes</i> <sup>T</sup>	CIP 101034 <sup>T</sup> - DSM 50342 - LMG 1224)
<i>P. aureofaciens</i> <sup>*</sup>	DSM 50082 - LMG 1245
<i>P. chlororaphis</i> <sup>T</sup>	CIP 6322 <sup>T</sup> - DSM 50083 - LMG 5004
<i>P. cichorii</i> <sup>T</sup>	DSM 50259 - LMG 2162
<i>P. citronellolis</i> <sup>T</sup>	CIP 104381 <sup>T</sup> - DSM 50332
<i>P. sp. (P. denitrificans)</i>	CIP 104375 - DSM 1650
<i>P. fluorescens</i>	CIP 104377 - DSM 50108
<i>P. fluorescens</i>	CIP 5927 - DSM 50415 - LMG 5939
<i>P. marginalis</i>	CIP 104378 - DSM 50276
<i>P. mendocina</i> <sup>T</sup>	CIP 7521 <sup>T</sup> - DSM 50017 - LMG 1223
<i>P. oleovorans</i>	ATCC 29347 - LMG 2229
<i>Hydrogenophaga . palleronni</i> <sup>T</sup>	CIP 103304 <sup>T</sup> - DSM 63
<i>P. putida</i> <sup>T</sup>	CIP 52191 - DSM291 - LMG 2257
<i>P. resinovorans</i> <sup>T</sup>	CIP 619 <sup>T</sup> - ATCC 14235 - LMG 2274
<i>P. syringae subsp syringae</i>	CIP 104379 - DSM 50312
<i>P. syringae subsp syringae</i>	CIP 104380 - DSM 50315

**Thermal analysis** Thermal analysis was carried out using a Perkin Elmer differential scanning calorimeter (DSC 7) at a rate of 10°C: min.

**Methanolysis of polymers** For determination of the composition of PHO, 4mg of sample were mixed with 1mL chloroform in a small screw-capped test tube. Then, 0.85 mL of 2%(v:v) sulfuric acid in methanol was added, and the solution was heated for 6 h at 98°C. After cooling the samples, 1 mL of demineralized water was added. The chloroform layer was analyzed by GC. Tetradecane was used as an internal standard.

**Gas chromatography analysis (GC)** The solution of methanolized polymers were analyzed with a Varian 3300 chromatograph equipped with a 15m x 0.53 mm Ohio Valley column (1mm film thickness). The on-column injector temperature was programmed from 50°C to 250 °C at a rate of 100°C/min. The column temperature was programmed from 50 to 170 at a rate of 5°C then from 170 to 230 at a rate of 20°C . The FID detector temperature was set at 280°C .

**Molecular weight measurements** Molecular weight measurements were determined by SEC with Waters apparatus (510 pump). The mobile phase was THF, with an eluent flow rate of 1.,1 mL/min. A refractive index detector (Waters 410) was used for detection.

### 3. Results and discussion

Poly(3-hydroxybutyrate) PHB and bacterial polyesters with short - chain - lengths are now well known (6). Many studies concern these polymeric materials, their production, their potential applications and their biodegradation. Medium - chain - lengths PHAs present a great interest due to their hydrolytic stability and their suppleness thanks to the presence of lateral hydrophobic groups. In a precedent study (7) we have shown poly(hydroxyoctanoate) PHO is not biodegradable in soil and is difficult for hydrolyzing in water at different pHs. With a view to use this subclass of bacterial polyesters for the encapsulation of bioactive molecules or extrusion applications, we have chosen to test sixteen *Pseudomonas* species in regard to their ability to uptake sodium octanoate and to grow on this substrate for producing a corresponding PHO. Two growth temperatures have been used (23°C and 30°C) to determine the optimal experimental conditions. Results are displayed in Table 1.

Strain	23 °C			30 °C		
	maximal absorbance (1)	Time of culture (h)	Yield PHA (% occupancy)	maximal absorbance (1)	Time of culture (h)	Yield PHA (% occupancy)
<i>P. alcaligenes</i>	1.00	90	< 10	2.15	48	40
<i>P. aureofaciens</i>	2.40	10	< 10	3.15	9	40
<i>P. chlororaphis</i>	5.00	25	50	3.80	10	40
<i>P. cichorii</i> (2)	1.60	57	20	2.30	28	20
<i>P. citronellolis</i>	2.60	10	< 10	3.05	10	20
<i>P. denitrificans</i>	3.32	10	20	3.25	10	30
<i>P. fluorescens</i> 108	3.10	37	20	1.30	37	< 10
<i>P. fluorescens</i> 415	2.20	25	50	4.85	33	50
<i>P. marginalis</i> (2)	2.20	61	< 10	1.30	61	< 10
<i>P. mendocina</i>	1.20	33	< 10	2.80	28	20
<i>P. oleovorans</i>	2.25	10	< 10	4.15	10	40
<i>P. palleronii</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. putida</i>	3.00	47	30	2.50	10	20
<i>P. resinovorans</i>	1.55	10	20	3.10	10	50
<i>P. syringae subsp syringae</i> 312	nd	nd	nd	1.10	129	< 10
<i>P. syringae subsp syringae</i> 315	2.00	133	<10	nd	nd	nd

Table 1 : Ability of *Pseudomonas* strains to grow on sodium octanoate at 23 and 30°C

(1) Maximal absorbance is determined at the stationary phase

(2) concentration of the substrate :  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> instead of  $2.10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>. For these bacteria, the substrate is toxic when the concentration exceeds  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>.  
nd : no bacterial development

Only one strain did not develop in these conditions, *P. palleronii*. The comparison between different bacteria displayed important gaps for the latence time (9 h to 133 h for *P. syringae* 312) due to a different adaptability to sodium octanoate. Maximal absorbances vary between 1,10 and 5,00 in the best cases (*P. chlororaphis*, *P. oleovorans*, *P. fluorescens* 415) and PHAs occupancy in the bacterium volume varies from about 10% to about 50% ( at 30°C for *P. alcaligenes*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens* 415, *P. resinovorans* and at 23 °C for *P. chlororaphis*.) Further experiments on sodium salts of heptanoate and decanoate have been carried out at 23°C and 30°C. From this study four strains have been selected as shown in Table 2.

Strain	sodium heptanoate			sodium decanoate		
	maximal absorbance (1)	Time of culture (h)	Yield of PHA (% occupancy)	maximal absorbance (1)	Time of culture (h)	Yield of PHA (% occupancy)
<i>P. aureofaciens</i>	1.85	43	30	2.35	25	40
<i>P. chlororaphis</i>	2.10	67	30	2.40	25	40
<i>P. fluorescens</i> 415	2.10	66	30	nd	nd	nd
<i>P. oleovorans</i>	2.20	26	30	5	28	40

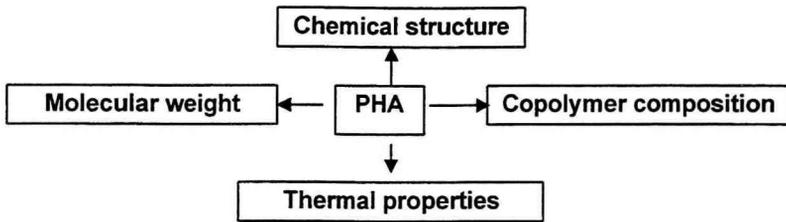
Table 2 : Selection of *Pseudomonas* strains for growing on different substrates

(1) : maximal absorbance is determined at the stationary phase

(2) : concentration of the substrate :  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> instead of  $2 \cdot 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>. For these bacteria the substrate is toxic when the concentration exceeds  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>.  
nd : no bacterial development.

*P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. oleovorans* can produce medium - length - chain PHAs from the three substrates, and *P. fluorescens* 415 has the ability to grow on sodium heptanoate and octanoate.

The four bacterial strains have been used for studying the relationship between bacterium, substrate and PHA structure in the view to mastery the four principal factors as displayed on the following scheme.



Concerning molecular weight ( $M_n$ ), it is worth to note the evolution of this physical characteristic according to the culture time (Figure 1). In the case of PHO produced by *P. oleovorans*, we have observed a large decrease of  $M_n$  (150 000 g/mol to 80 000g/mol ) when the absorbance increases from 50 to 200. In the same time, polydispersity does not vary (2,3). This result has been already observed for PHB (8) and no complete explanation has been delivered. The hypothesis of a polymer turnover during the biosynthesis has been involved (9,10). Biosynthesis in bacterial cells occur via a cyclic metabolic process.

The comparison of PHOs molecular weight for polymers prepared from sodium octanoate and different bacteria disclose large discrepancies (Table 3). The obtention of oligomers ( $M_n = 8\ 000\ \text{g/mol}$ ) by using *P. fluorescens* could be taken in advantage for the preparation of blends to modulate degradation rates or mechanical properties. Moreover, by changing length of the substrate, the physiological response is conducting to a significant modification of molecular weight (Table 4 ).

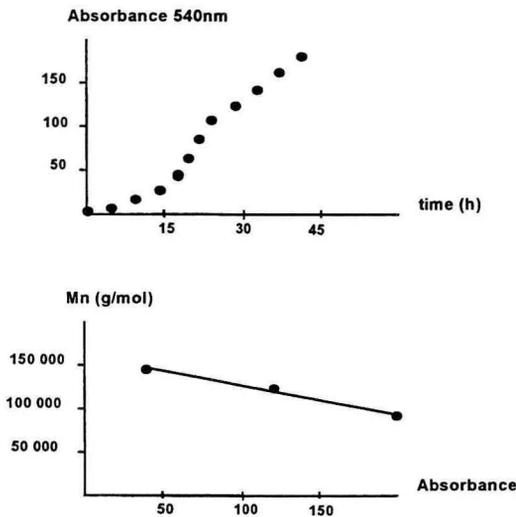


Figure 1: Molecular weight variation during the culture

	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. oleovorans</i>
Yield (%)	27	40	26
Mn (g/mol)	100 000	8 500	130 000
Ip	1.5	3.4	1.5

Table 3 : Molecular weights obtained by different strains on sodium octanoate

	Sodium heptanoate	Sodium octanoate
Mn (g/mol)	83 000	8500
Ip	1.4	3,4

Table 4 : Molecular weights obtained by *P. fluorescens* on different substrates

At last, the composition of the polymer resulting from the fermentation process is varying with the microorganisms (Table 4). In the case of sodium octanoate as substrate, 3-hydroxyoctanoate (C8) is the major repeating unit. The percentage of this 3-hydroxyacid repeating unit changes in a narrow scale. Composition of the polymer produced from sodium decanoate is also very depending on the producing bacterium. In this case also the C8 repeating unit is the principal constituent of the macromolecular chain. During the metabolism leading to the polymer, an important percentage of the substrate is subject to a C2 cleavage (Table 5 ). PHAs produced by the four *Pseudomonas* bacteria and using the three precedent nutrients have been characterised in regard to their thermal properties. Morphology and characteristics temperatures are very depending on the bacterium and on the substrate (Table 5 ). With sodium heptanoate as substrate, *P. chlororaphis* and *P. aureofaciens* lead to an amorphous polymer, contrarily to both other selected microorganisms which lead to semi -crystalline polymers. In the case of sodium octanoate, the four polymers are semi-crystalline and the degree of crystallinity vary just as melting transition temperature. No simple explanation can be proposed, but a key could be the distribution of the different repeating units in the macromolecular chain.

%	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. oleovorans</i>
C <sub>4</sub>	0.5	0.8	0
C <sub>6</sub>	6.9	7.7	10
C <sub>8</sub>	60.5	52.6	67.7
C <sub>10</sub>	30.3	36.3	23.3
C <sub>12</sub>	0.5	0.6	0

Table 5: Copolymers composition obtained by different strains on sodium decanoate, determined by gas chromatography

## 4. Conclusion

The number of microorganisms involved in the synthesis of PHAs is permanently increasing. For one given substrate or one given bacterium, it appears that produced polyesters have versatile characteristics, which are depending on many physiological and biosynthesis factors. Importance of the structure/properties relationship is evident in regard to the use of such fascinating polymers. Consequently, the development of medium-length chains PHAs will have to comply with a better understanding of the bacterium physiology and its metabolism. Furthermore, the knowledge of effectors which play a role in the complex enzymatic system will be a great assistance for the complete mastery of the bacterial polyester synthesis.

## 5. References

- LEE S.Y., *Biotechnology and bioengineering*, 49,1(1996)
- STEINBUCHER A., VALENTIN H.E., *FEMS Microbiol. Let.*, 128, 219 (1995)
- POIRIER Y. , NAWRATH C., SOMERVILLE C., *Biotechnology*, 13,142(1995)
- KIM Y.B., LENZ R.W. , FULLER R.C., *Macromolecules* 24, 5256 (1991)
- KIM Y.B., RHEE Y.H., LENZ R.W., FULLER R.C., *Polymer Journal*,29,894 (1997)
- ANDERSON, A.J. , DAWES E.A., *Microbiol. Rev.*, 54,450, (1990)
- BEAR M.M., LÉBOUCHER - DURAND M.A., LANGLOIS V., LENZ R.W., GOODWIN S., GUERIN Ph., *Reactive Polymer*, 34, 65 (1997)
- SIM S.J. , SUELL K.D., HOGAN S.A., STUBBE J. , RHA C., SINSKEY A.J. , *Nature Biotechnology* ,15, 63 (1997)
- TAIDI B., MANSFIELD D.A., ANDERSON A.J., *FEMS Microbiol. Let.*, 15, 201 (1995)
- KAMAGUCHI Y. ,DOI Y., *Macromolecules*, 25, 2324 (1992)

# La biodégradation du polybuthylène succinate (pbs) et du polybuthylène succinate/adipate (pbsa) dans différents environnements

## *Biodegradability of poly(butylene) succinate (pbs) and poly(butylene) succinate /adipate (pbsa) in different environments*

Yoshihisa Yokota <sup>a)</sup> and Hélène Maréchal <sup>b)</sup>

a) Manager, Bionolle Project, Petrochemical Administration & Planning Department, Showa Denko K.K., 13-9 Shiba Daimon 1-chome, Minato-ku Tokyo 105-8518, Japan

Tel: +81-3-3293-8411, Fax: +81-3-3293-8995

b) Manager, Showa Denko (Europe) GmbH

Uhlandstr. 9, 40237 Düsseldorf, Germany

Tel: +49-211-68 40 35, Fax: +49-211-679 86 65, marechal@sde.de

**Résumé:** Cette étude porte sur la biodégradation du Bionolle (PBS et du PBSA) dans divers environnements, mais plus particulièrement dans le compost selon la norme ISO/FDIS 14851. Selon le type de Bionolle, il est dégradé à plus de 90% par les micro-organismes vivants, plus ou moins rapidement.

D'autre part, cette étude traite du temps nécessaire aux films de Bionolle (25 µm) pour se dégrader dans des environnements comme la terre, l'eau fraîche, l'eau de mer, dans les stations d'épuration et le composte chaud, de sorte que d'autres champs d'applications vont s'ouvrir où la compostabilité n'est pas requise mais uniquement la biodégradation.

L' institut belge indépendant, AVI, a certifié que Bionolle est biodégradable dans le compost selon des conditions aérobiques et anaérobiques, en lui accordant le label "OK compost" qui assure aux transformateurs de films plastiques que la matière première utilisée répond aux critères de compostabilité.

Pour compléter cette étude, les propriétés du Bionolle et sa facilité de mise en œuvre seront présentées aux personnes qui sont confrontées à la transformation de ce plastique dans leur équipement. Il est intéressant de soulever qu'ils existent divers grades de Bionolle dépendant des propriétés requises, du type d'équipement à utiliser pour les applications finales.

Pour conclure, cette rapide présentation montrera une comparaison de la biodégradation des films dans le compost entre Bionolle et d'autres polymères biodégradables comme le PLA, le PHB/BV et le PCL.

**Abstract:** *This study will treat the biodegradability of Bionolle (PBS and PBSA) in different environments, in particularly in compost according to the norm ISO/FDIS 14851. Depending on the Bionolle type and the compost conditions, it will degrade more or less quickly, generally more than 90% is decomposed by micro-organisms after 30 or 45 days.*

*Furthermore, this study will demonstrate the biodegradability speed of films made of Bionolle (25 µm) in other environments like soil, fresh water, activated sludge, sea water or*

*hot compost, which widen the possibility of using Bionolle for other application fields where compostability is not requested, but only the biodegradability.*

*The Belgian and independent Institute, AVI, has awarded Bionolle with the OK compost label, which proves that Bionolle is biodegradable in compost under aerobic and anaerobic conditions, therefore plastic converters are assured that the raw material used will meet the defined standards of compostability*

*In order to complete this study, the properties of Bionolle and its easily processability will be demonstrated, for those who will be converting this plastic in their equipment. It is interesting to point out that different grades of Bionolle are available depending of the properties requested and of the process type available for the applications expected.*

*Finally, this poster will show a comparison of the biodegradation of films in compost between Bionolle and other biodegradable polymers like PLA, PHB/BV and PCL.*

**Mots-clés :** biodégradation, Bionolle, PBSA, PBS, application, label, "norme ISO", "OK compost", comparaison, PLA, PHB/BV, PCL, "mise en oeuvre"

**Keywords:** biodegradation, Bionolle, PBSA, PBS, application, label, "ISO Norm", "OK compost", comparison, PLA, PHB/BV, PCL, processability

## 1. Introduction

Showa Highpolymer Co. Ltd. (SHP), an affiliate company of Showa Denko K.K. (SDK) and the Petrochemicals Administration & Planning Department of SDK are making a joint development for Research & Marketing on the biodegradable aliphatic polyester called Bionolle™ (PBS and PBSA). The current capacity of Bionolle is 3,000t/y and the plant is located in Tatsuno (West of Osaka)

## 2. Characteristics of Bionolle

### 2.1 Chemical structure

Bionolle™ is a thermoplastic aliphatic polyester produced through the polycondensation of glycol (1,4-butanediol) with dicarboxylic acids and others. Its main molecular structure can be expressed by the following formula:



Here “m” represents the number of methylene groups derived from dicarboxylic acids as raw materials.

At present, we are selling on the market two series of Bionolle™ different in molecular structure. The first one is poly(butylene) succinate (PBS) and the second one is poly(butylene) succinate/adipate (PBSA).

PBS and PBSA are high in molecular weight ranging from 40,000 to 300,000 with a molecular weight distribution as narrow as those of other aliphatic polyesters. In the series #1000 in addition to normal linear-type polyester grades, long-chain branched (LCB) grades having a much broader molecular weight distribution are available. LCB grades such as #1901 and #1903 of PBS have significantly higher crystallization temperature (T<sub>c</sub>) or melt strength. LCB helps improve the processability of both PBS and PBSA.

### 2.2 Basic physical properties

Table 1 shows the physical properties of PBS and PBSA in comparison with conventional plastics such as polyolefins. In terms of mechanical properties, PBS and PBSA are similar to those of polyethylene and polypropylene.

Compared with polypropylene and polylactic acid, Bionolle is softer and has higher impact resistance at low temperatures. Bionolle is more resistant to hydrocarbons and mineral oils than polyolefins. It is not permeable to oxygen, but permeable to water vapor and alcoholic vapor at above 40°C, in contrast with polyethylene. However, it would undergo hydrolysis under the conditions of higher temperatures and high humidity, bringing about deterioration over time.

Items	Unit	PBS			PBSA		PP	HDPE	LDPE
Density	g/l	1260			1230		900	950	920
Heat of combustion	kJ/g	23.6			23.9		43.9	46.0	46.0
H.D.T. (at 0.45 MPa)	°C	97			69		110	82	49
Degree of crystallinity	%	35~45			20~35		56	69	49
Melting point (T <sub>m</sub> )	°C	114~115			93~95		164	130	108
Glass transition temperature	°C	- 32			- 45		+5	- 120	-120
Grade		#1001	#1020	#1903	#3001	#3020			
MFR (190°C)	g/10 min.	1.5	25	4.5	1.4	25	4 (230°C)	2	2
Crystallization temp.	°C	75	76	88	50	53	120	104	80
Flexural modulus	MPa	656	680	690	323	340	1370	1070	176
Tensile strength at yield	MPa	32	34	39	19	19	31	27	12
Tensile strength at break	MPa	57	21	35	47	34	44	39	35
Elongation at break	%	700	320	50	900	400	800	650	400
Structure		Linear		LCB	Linear		Linear		LCB

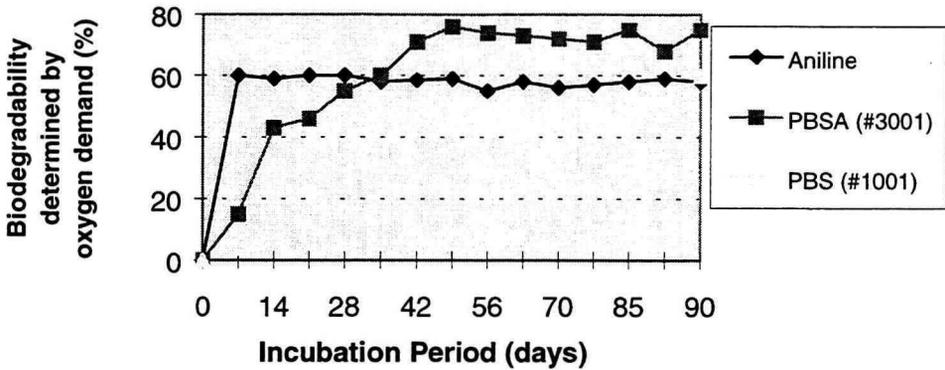
Table 1: Physical properties of different Bionolle grades in comparison with conventional polyolefins

Note: The values in the above table are the results of measurement by Showa Denko. The values are not guaranteed.

### 3. Biodegradability in different environments

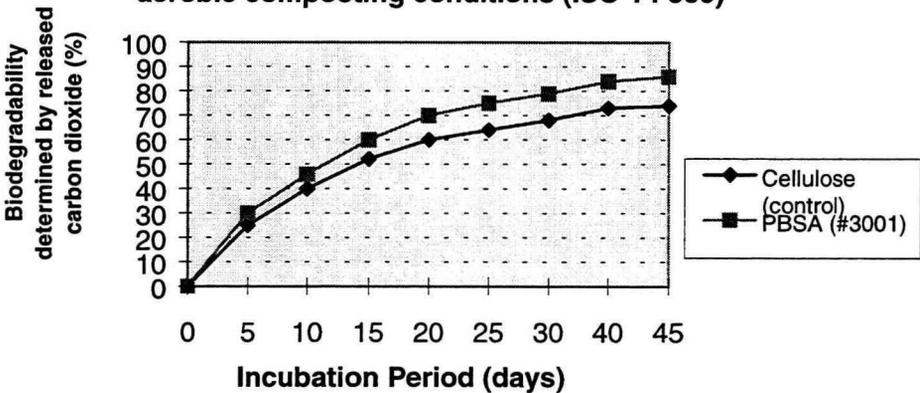
Bionolle has been tested in different environments, which are shown in the following figures.

**Ultimate Aerobic Biodegradability in aqueous solution  
(ISO/FDIS 14851) Soil: 0.5%, Test Substance: 100 ppm**



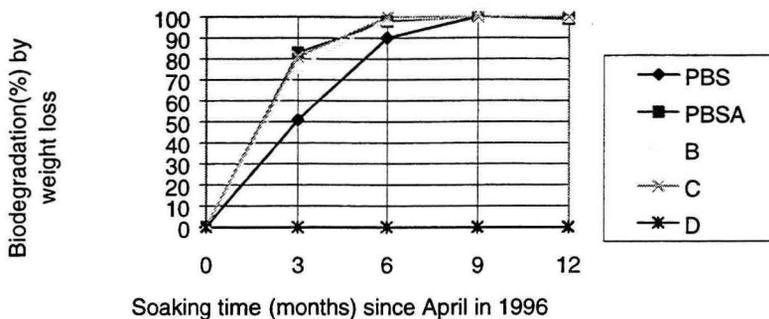
Furthermore, PBSA is biodegradable under aerobic controlled composting conditions according to ISO/FDIS 14855.

**Evaluation of biodegradability of PBSA under controlled  
aerobic composting conditions (ISO 14 855)**

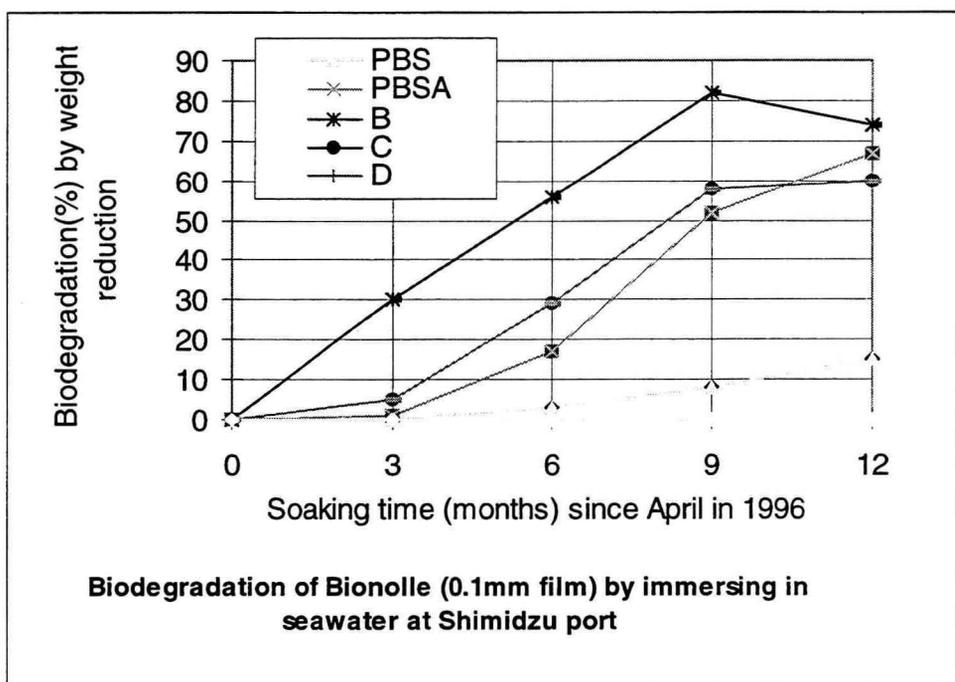


Thus the "OK-compost Label" certificate from AVI, a certification organization in Belgium, has been awarded to our PBSA films. This proves that the PBSA film is compostable and disintegrates within 12 weeks, and that the compost is safe for plants and daphnia.

Additionally, field tests of PBS and PBSA films in soil, fresh water and seawater were carried out by the Biodegradable Plastics Society of Japan (BPS). The test results showed that biodegradable plastics degraded in the order of  $PBSA \geq B \geq C > PBS \gg D$ , in all environments mentioned above. All biodegradable plastics biodegraded fast in the order of environment in fresh water  $>$  soil  $\geq$  seawater.



Field test of Bionolle (0.1mm film) by immersing in fresh water at Shiga in Japan



Biodegradation of Bionolle (0.1mm film) by immersing in seawater at Shimidzu port

#### 4. Processability

Bionolle can be processed easily on conventional polyolefin processing equipment without adding special devices and at temperatures ranging from 120 to 270 °C, into various forms of products such as blown, extruded, fiber-formed, foamed and injection molded products. Furthermore, it is designed to have a thermally stable structure with its end groups free from carboxylic acids. Thus Bionolle can stand high temperatures of about 270 °C during processing. Bionolle is available in several grades with Melt Flow Rates (MFRs) ranging from 1 to 45 g/10 min. (at 190°C), as shown in Table 2.

MFR ranges specified	Grade name		Applied processing methods	Process Temp. (°C)
	#1000 series (PBS)	#3000 series (PBSA)		
1 - 3	#1001	#3001	Blow-molding Blown-film, flat yarn, sheet, Monofilament	120-150 160-180 220-240
4 - 9	#1003	#3003	T-die cast film, extrudate	160-190
2 - 9	#1903	-	Foamed sheet (gas-foaming) Extrusion coating As additives (10-20 wt %)	150-170 240-270
9 - 15	#1010	#3010	Monofilament, Multifilament	200-220 200-240
20 - 34	#1020 (#1020x 15)	#3020	Injection molding Stable fiber	140-230 190-220
35 - 45	#1030	-	Spunbonded nonwoven	200-230

*Table 2: Bionolle's grades and various processing methods*

Note: Grade names starting with "1" and "3" are PBS grades (#1000 series) and PBSA grades (#3000 series), respectively.

The last row shows the preferable temperatures to be used during the process. As shown above Bionolle can be processed by different methods (injection molding, extrusion molding, blown film, staple fiber, spun woven, etc...) according to the Bionolle grade.

Table 3 shows the molecular weight and polydispersity index ( $Q=M_w / M_n$ ) of typical grades of Bionolle within specified range of MFR.

Grades	Structure	MFR (190°C)	$M_n \times 10^{-4}$	$M_w \times 10^{-4}$	Mw/Mn
#1001 (PBS)	Linear	1.4	8.2	22	2.7
#1003 (PBS)	Linear	7.6	6.9	17	2.4
#1030 (PBS)	Linear	36	5.9	12	2.1
#1903 (PBS)	LCB	4.0	5.7	24	4.1
#3001 (PBSA)	Linear	1.0	10	27	2.6
#3001 (PBSA)	Linear	1.2	10	24	2.4
#3003 (PBSA)	Linear	3.7	7.4	20	2.7

*Table: 3 Molecular weight and molecular weight distribution of typical grades of Bionolle*

Furthermore, Bionolle can be freely colored with a pigment or dyestuff, and is printable. Films for bags also have excellent heat seal strength; for example, more

than 1 kg/15 mm width, among other biodegradable plastics or conventional polyethylene.

## 5. Applications

The following figure represent the potential and commercial applications of Bionolle according to the processing method by making use of the good mechanical and biodegradable properties of Bionolle.

For agricultural and civil engineering use, biodegradation of biopolymers should be controlled within a given time frame. Bionolle can be used in combination with other biodegradable plastics.

## 6. Controllability of the biodegradation

### INJECTION MOLDING

ELECTRO-CONDUCTIVE TRAYS FOR LSI PARTS,  
GOLF TEES, COLORED TRAFFIC CONES, CAPS OF  
COSMETICS BOTTLES, CLIPS FOR PLANTS, PILES  
FOR PLANTATIONS, LURE FOR FISHING

### LAMINATION

MAGNETIC CARDS, CLOTH-ADHESIVE TAPE, BAGS  
FOR FISH-FOOD

### TUBULAR-BLOWN FILM

GARBAGES BAGS FOR ORGANIC WASTES (20-90I)  
MULCH FILM FOR AGRICULTURE, VARIOUS  
PACKAGING FILMS, SLITTED & STRETCHING FOR  
FLAT-YARN INTO NETS

### SPUN-BONDED NONWOVEN FABRIC

CONTAINERS (POTS) FOR PLANT PLANT-MATS  
CONTAINING SEEDS AND FERTILIZERS

### STAPLE FIBERS

WOOD-PULP/BIONOLLE-STAPLE MIXED PAPER  
FOR SLOW-RELEASE OF INSECTICIDES

### MONOFILAMENT

FISHING LINES (300-400 denier) KNITTED NETS  
FOR FISHING or ENGINEERING

### BLOW MOLDING

FLOWER POTS AND BOTTLES

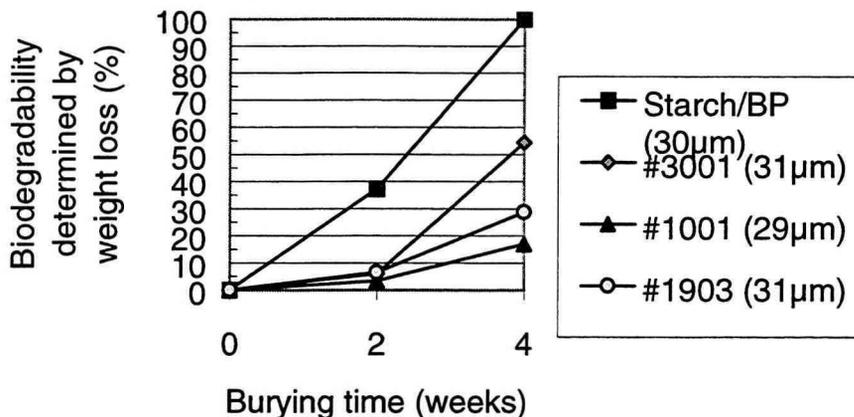
### FOAMED SHEETS

PACKAGING BAGS FOR ELECTRIC PARTS FOOD  
PACKAGING IN THE NEAR FUTURE

### EXTRUSION FORMING -> THERMOFORMING

CARDS, TUBULAR RUNNER CLIPS FOR  
AGRICULTURE & FOOD PACKAGING

## Biodegradability of Biodegradable plastic films with 30 $\mu\text{m}$ thickness at 25°C



The figure above shows the difference of biodegradation speed according to the mixture of biodegradable polymers. The quickest biodegradation speed is obtained by mixing biodegradable polymer with starch as a blend. For lowering the speed a mixture of Bionolle #3000 and Bionolle #1000 is best suitable.

Therefore depending of the application field, the biodegradation speed will play an important role in the choice of the blend.

## 7. Safety information

Bionolle's acute toxicity is more than 5,000 mg/kg by oral dosing method (rats) and its mutagenicity is "negative" by Ames test method. Our study of environmental influences showed that the Ames test results were negative.

## 8. Acknowledgment

I would like to thank Mr. Yokota, Chief Manager - Bionolle Project of Showa Highpolymer Co., Ltd, Mr. Hamada, President of Showa Denko (Europe) GmbH for providing their support as well as Mr. Feuilloley of Cemagref, for giving us the chance to present this poster on Bionolle at this conference.

# Conteneur bio-dégradable

## *Bio-degradable container*

Maurice Rabouin

Société d'Etude et Valorisation d'Equipements - 12, rue des Merens 64 000 PAU

Tél. 05 59 32 10 87 - Fax 05 59 72 96 30 - E mail S.E.V.E. @wanadoo.fr

**Résumé :** Ce conteneur bio-dégradable en bois de peuplier est destiné aux pépinières de pleine terre.

Il permet l'emballage des mottes pour le transport, la vente et protège celle-ci jusqu'à la plantation. Une fois en terre, il se décompose pour laisser les racines se développer.

Le CONTENEUR BIO-DEGRADABLE est un modèle déposé en France et à l'étranger (Europe et USA)

**Abstract :** *This bio-degradable container, made of poplar wood, is designed to be used in nurseries.*

*When the tree is removed from the ground,, the rootball is packed in it for shipment and sale. After transplantation, the container disappears to let the roots develop.*

*The BIO-DEGRADABLE CONTAINER design is patented in France and abroad (Europe and USA).*

**Mots-clefs :** Pépinière, Conteneur, Environnement.

**Keywords:** *Nursery, Container, Environment.*

# 1. Introduction

La Société d'Etude et Valorisation d'Equipements fait l'ingénierie de matériels, produits et services.

Elle est orientée vers la recherche et la mise au point de procédés visant à réduire les coûts de production et/ou améliorer la qualité des produits.

Elle propose un nouveau type de conteneur, dont la principale caractéristique est de se dissoudre dans le sol dès qu'on n'a plus besoin de lui, sans prétendre remplacer le plastique dans toutes ses applications.

Ce document répond à 2 questions: POURQUOI et COMMENT remplacer certains conteneurs plastiques?.

## 2. Pourquoi faut-il un nouveau type de conteneur?

La gamme des conteneurs plastiques est très vaste.

Prenons l'exemple d'un conteneur de polyéthylène moulé de 600 gr pour des dimensions de 29 par 35 centimètres, et une contenance de 20 litres. Son prix est de l'ordre de 10 FF.

Dans la fourchette des 15 à 25 litres, on en utilise environ 1,5 millions chaque année en France.

Cela conduit à générer près de 900 tonnes de déchets plastique.

Le recyclage n'est pas organisé car il pose de nombreux problèmes :

- la collecte et le tri sont coûteux
- le soleil qui rend le plastique cassant, et les manutentions induisent des pertes importantes
- avant réutilisation, les pots doivent être désinfectés pour éviter la propagation de maladies.

L'utilisation de ces conteneurs pour la culture proprement dite est très répandue car elle présente de nombreux avantages: c'est une alternative à la culture en pleine terre.

Le conteneur plastique est de plus en plus utilisé en terminaison de cycle de culture de pleine terre, pour présenter à la vente un produit plus esthétique. C'est précisément dans ce domaine qu'un conteneur bio-dégradable est utile: il devra remplir les mêmes fonctions de protection de la motte pendant les diverses manutentions, puis disparaître sans laisser de résidus.

### **3. Comment répondre à ces impératifs?**

Nous proposons un conteneur en bois de peuplier, d'une contenance de 20 litres, donc équivalent à celui en polyéthylène. Il pèse 800 grammes, pour des dimensions de 30 par 30 centimètres. Son prix est de l'ordre de 12 FF.

Mais il est se dégrade à 95 % naturellement dans le sol en six mois. Le reste (les agrafes et le cercle métallique) disparaissent un peu plus tard par oxydation.

Ce conteneur est destiné aux pépiniéristes qui cultivent en pleine terre et vendent des végétaux de 3 à 4 ans minimum.

Pour des raisons qu'on examinera tout à l'heure, il concerne les plantes nécessitant une transplantation avec un volume de 15 à 20 litres de terre autour des racines, ce qui correspond à une plante de 1 à 2 mètres de haut.

Pour un conteneur plastique, le cycle est le suivant : le végétal est placé dans son conteneur et doit y séjourner 6 à 12 mois pour y installer ses racines avant de pouvoir être manipulé.

Cela oblige à l'installer en culture hors sol, et cela alourdit les coûts de production. De plus, lorsque le client plante, il doit retirer le conteneur, ce qui est parfois délicat quand la motte est friable.

Pour ce conteneur, le cycle est différent : le moment venu, le végétal est sorti de terre avec précautions pour que les racines restent entourées de terre. Puis la motte est placée dans le conteneur qui la protège pendant le transport et l'exposition sur les lieux de vente. Lors de la plantation, le conteneur est enfoui dans le sol en même temps que la motte.

Il se décompose en quelques mois et se laisse traverser par les racines qui se développent.

Cet emballage est constitué de lames de bois déroulé, assemblées à un fond circulaire, en bois également, et maintenues par un cerclage en feuillard mince d'acier. L'assemblage est fait à la presse grâce à un outillage spécial. Puis les lames sont ajustées et maintenues en place par un cerclage bois agrafé en partie haute. A la fabrication, le conteneur est légèrement conique pour faciliter l'introduction de la motte cylindrique découpée par une motteuse adaptée.

Le choix du bois utilisé est fait en fonction de sa non-toxicité pour les racines : il s'agit de peuplier.

A l'inverse du conteneur plastique, le coût de production de ce conteneur est plus sensible au coût de la main d'œuvre qu'à celui de la matière première, le bois de peuplier étant déjà très répandu et bon marché.

Le temps de fabrication croissant peu lorsque la taille augmente, l'avantage sur son concurrent plastique s'affirme donc pour les plus grandes tailles.

Les dimensions actuellement prévues en fabrication s'étagent de 15 à 25 litres, qui correspondent à des végétaux de hauteurs comprises entre 1 et 2 mètres.

Le CONTENEUR BIO-DEGRADABLE est un modèle déposé en France et à l'étranger (Europe et USA). Il fait l'objet d'essais en situation réelle depuis 1996 pour vérifier sa complète décomposition dans le sol, et le développement normal de l'arbre. La station expérimentale du GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest de Ste Livrade a participé à ce programme d'essai.

# Hydrophobation de films protéiques obtenus par filmage en milieu humide

## *Hydrophobation of protein films obtained by wet spinning*

Vincent Rampon, Noël Nicolas

Institut National de la Recherche Agronomique

Laboratoire d'Etude des Interactions des Molécules Alimentaires

Rue de la Géraudière - BP 71627 - 44316 Nantes Cedex 3

Tel : 02 40 67 50 83 - Fax : 02 40 67 50 84 - E-mail : rampon@nantes.inra.fr

**Résumé :** Les biopolymères et notamment les protéines présentent une alternative intéressante par rapport aux polymères d'origine fossile pour la réalisation de films biodégradables. Ainsi, des films protéiques ont été produits par le procédé de filage en milieu humide et acide. Les matériaux obtenus étant hydrophiles, nous avons ajouté du latex à la solution filmogène et testé l'effet de ce composé sur les caractéristiques des films réalisés. En ce qui concerne la composition, les films « latex » ont des teneurs en eau, minéraux et protéines plus faibles que des films sans latex, témoins. Ces différences s'expliquent par la présence du latex qui contrebalance les autres constituants du film. Le comportement des films vis à vis de l'eau est amélioré avec le latex puisque l'angle de contact avec l'eau est supérieur à 80°, la reprise d'eau est inférieure à 100% et le trempage ne modifie pas les propriétés mécaniques et la composition des films. Le latex joue en outre un rôle plastifiant puisque, contrairement aux témoins, les films ne sont pas cassants.

**Abstract :** *Biopolymers and specially proteins are widely used to produce biodegradable films. Protein films have been produced using wet acid spinning process. Since the products were hydrophilic, latex was added to film-forming solution. The effect of this compound on film characteristics has been tested. We observed lower water, minerals, and proteins content in film with latex compared with blank films. These differences are explained by the presence of latex. The behaviour of films towards water was tested using contact angle measurement, rehydration capacity and immersion in water. Contact angle was higher than 80° and rehydration capacity lower than 100%, mechanical characteristic and film content are not modified by immersion. Thus the behaviour of films towards water was improved. Moreover « latex » films are less brittle than the blanks.*

**Mots-clés :** filage, films protéiques, latex, propriétés mécaniques

**Keywords :** *spinning, protein films, latex, mechanical properties*

# 1. Introduction

Les biopolymères constituent une matière première de choix pour réaliser des films biodégradables (Ching C. *et al*, 1993). En effet ils permettent une valorisation des ressources agricoles renouvelables. Ces matières premières présentent cependant l'inconvénient d'avoir un caractère hydrophile marqué et de fait de générer des matériaux sensibles à l'eau. Un certain nombre de solutions sont à l'étude pour rendre ces films plus hydrophobes (Yamada *et al*, 1995 ; Rhim *et al*, 1999). L'incorporation d'agents hydrophobants dans la solution filmogène est une voie d'étude possible. C'est dans ce cadre que nous avons résolu d'ajouter du latex dans la formulation de films protéiques. Ces derniers sont obtenus par le procédé de filage en milieu humide et acide initialement utilisé pour produire des fibres textiles puis alimentaires (Lundgren H.P., 1949, Culioli *et al*, 1996). Après adaptation, cette technique nous a permis d'obtenir des films protéiques biodégradables (Rampon V. et Dumont J.P., 1997,1998) dont la structure a été étudiée (Rampon V. *et al*, 1999). Ce travail a pour objectif de tester l'effet du latex sur les caractéristiques de films protéiques de soja.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Le procédé de filmage

14 % (p:p) d'isolat de soja (Supro 590, PTI, France) est solubilisé dans une solution de soude (pH final 12) : films témoins. Pour la réalisation des films avec latex, ce dernier est ajouté initialement au mélange. La solution filmogène obtenue est extrudée à débit constant à travers une buse (Photo 1) immergée dans un bain de coagulation contenant 4% (p :p) d'acide acétique et 12% (p :p) d'acétate de sodium trihydraté. Le film formé est alors récupéré à l'extrémité du bain de coagulation sur un rouleau collecteur de façon continue (Photo 2). Les films sont ensuite tannés dans une solution aqueuse de formaldéhyde puis conditionnés une semaine à 65% d'humidité relative et 20°C.

Photo 1 : Film à la sortie de la buse

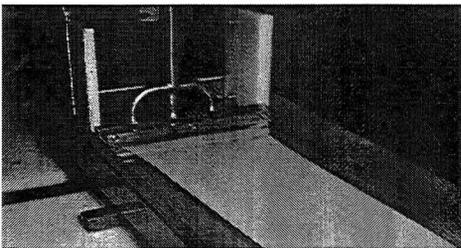
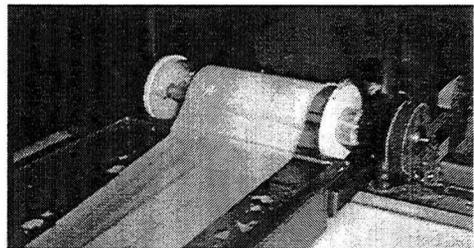


Photo 2 : Récupération du film humide



## **2.2 Caractérisations des films**

### **2.2.1 Comportement vis à vis de l'eau**

Les films sont trempés dans un excès d'eau pendant 24h. Le gain de poids aussitôt après trempage est mesuré. Après conditionnement, les compositions et les propriétés mécaniques des films initiaux et des films trempés sont mesurées. L'hydrophobicité de surface est évaluée par mesure de l'angle formé par une goutte d'eau déposée à la surface du film (mesure réalisée uniquement pour le film avec latex).

### **2.2.2 Compositions**

Les teneurs en eau et en minéraux ont été mesurées après passage des échantillons de films respectivement à 103 et 800°C pendant au moins 24h. L'azote total a été mesuré par la méthode de Kejdhal (Godon et Loisel, 1982) (N = 6). La teneur en latex a été estimée par différence à partir des compositions précédemment établies.

### **2.2.3 Evaluations mécaniques**

Après mesure de l'épaisseur au micromètre et de la force en fonction de l'allongement sur un appareil INSTRON (4mm/min), le pourcentage d'élongation, la contrainte maximale et le module d'Young ont été calculés pour chacun des films (10 répétitions par essai).

## **3. Résultats et discussion**

### **3.1 Caractéristiques générales des films**

Les films contenant du latex sont incolores, souples et reprennent à peine leur poids en eau aussitôt après trempage contrairement aux films témoins (sans latex) qui sont légèrement jaunes, cassants et reprennent leur poids en eau après trempage.

Par ailleurs, la mesure d'angle de contact réalisée sur un « film latex » est supérieure à 80°. Cette valeur est caractéristique de matériaux hydrophobes et représente le meilleur résultat que nous ayons obtenu pour un film protéique.

Composition des films avant et après trempage dans l'eau

Le trempage ne modifie pas la composition des films, que ce soit les films témoins ou les films avec latex (Fig. 1). La réticulation des protéines par le formaldéhyde les rend en effet insolubles, ce qui explique en grande partie ce résultat. De plus, le latex est un constituant qui polymérise par séchage et devient lui aussi insoluble. La comparaison des films témoins avec les films contenant du latex (Fig. 1) indique que les teneurs en minéraux, eau et protéines sont inférieures pour ces derniers. Ceci s'explique par la présence du latex qui contrebalance les autres constituants dans ces films. On a alors estimé sa teneur aux alentours de 24%.

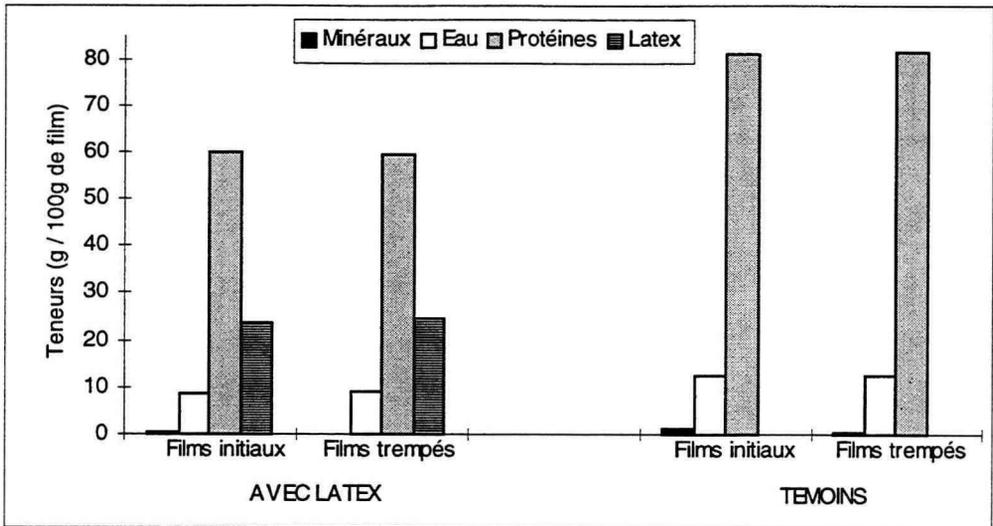


Figure n° 1 : Composition des films

### 3.2 Propriétés mécaniques des films « latex » avant et après trempage dans l'eau

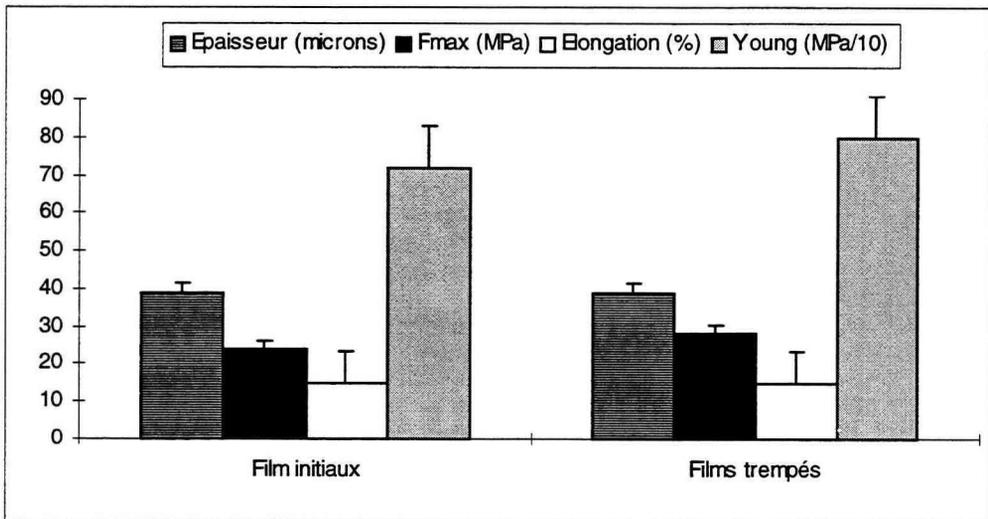


Figure 2 : Propriétés mécaniques des films avec latex

Seuls les films avec latex ont pu être caractérisés ; en effet les films sans latex n'étaient pas exploitables compte tenu de leur caractère cassant. Dans nos conditions de fabrication, les films présentent une épaisseur moyenne de 40 micromètres. Après calcul des différents paramètres mécaniques, même si les films trempés sont plus résistants et moins extensibles que les films initiaux, les différences ne sont pas très marquées (Fig.2). Ces résultats étaient attendus dans

la mesure où, par ailleurs, les compositions des films étaient identiques (Fig.1). Des valeurs moyennes de 26 MPa, 15% et 750 MPa sont obtenues respectivement pour la force maximale, le pourcentage d'élongation et le module d'Young. Ces valeurs indiquent que les films réalisés sont relativement résistants au détriment de leur caractère extensible : même si le latex joue un léger rôle plastifiant, ce n'est pas sa fonction première ; l'emploi d'un véritable plastifiant permettrait d'augmenter l'élongation des films.

## 4. Conclusion

L'incorporation de latex dans les films améliore de façon notable leur comportement vis à vis de l'eau. En outre, le latex confère aux films des caractéristiques mécaniques intéressantes malgré l'absence de plastifiant. Seul point négatif, les films ne sont plus biodégradables à 100% ; des études complémentaires seraient à mener pour évaluer de façon précise la biodégradabilité du mélange, protéines / latex.

*Cette étude a reçu le soutien financier de l'ADEME dans le cadre du programme AGRICE.*

## 5. Références bibliographiques

Ching C., Kaplan D.L., Thomas E.D., 1993, *Biodegradable polymers and packaging*, Lancaster, Technomic, 407 p.

Culioli J., Goutefongea R., and Rampon V., 1996. Les procédés de texturation des matières protéiques végétales. Dans *Protéines Végétales*, Lavoisier, Paris, Ch. 8, p. 517-565.

Lundgren H.P., 1949, Synthetic fibers made from proteins, *Advances in protein chemistry*, 5, p. 305-351.

Rampon V., Dumont J.P., 1997, Réalisation de films protéiques par le procédé de filage en milieu humide et acide. I - Effets combinés du lavage et de l'ajout d'un plastifiant, *Sciences des aliments*, 17, p. 107-112.

Rampon V., Dumont J.P., 1998, Réalisation de films protéiques par le procédé de filage en milieu humide et acide. II - Effets combiné de l'urée et du formol sur les propriétés de films de protéines de pois. *Sciences des aliments*, 18, p. 95-100.

Rampon V., Robert P., Nicolas N., Dufour E., 1999, Protein structure and network orientation in edible films prepared by spinning process, *Journal of food science*, 64, 2 (sous presse).

Rhim J.W., Wu Y., Weller C.L., Schnepf M., 1999, Physical characteristics of emulsified soy protein-fatty acid composite films, *Sciences des aliments*, 19, p. 57-71.

Yamada K., Takahashi H., Noguchi A., 1995, Improved water resistance in edible zein films and composites for biodegradable food packaging, *International journal of food science and technology*, 30, p. 599-608.

# Les poly(glyoxylate de méthyle - co - glyoxylate de potassium) : nouveaux copolymères biodégradables à hydrophilie variable

*Poly (methyl glyoxylate - co - potassium glyoxylate) : new biodegradable polymers with variable hydrophilicity*

C. Vaugelade, C.-H. Brachais, K. Glinel\*, J. Belleney\*\*, C. Bunel  
Laboratoire de Matériaux Macromoléculaires, INSA ROUEN, pl. E. Blondel BP 08,  
76131 Mont Saint Aignan Cedex  
\* UMR 6522, Université de Rouen ; \*\* UMR 6710 Université Paris VI

**Résumé :** Le polyglyoxylate de méthyle (PGMe) et son sel de sodium (PGCOONa) sont des polymères biodégradables, dont le stade ultime de dégradation est l'acide glyoxylique qui est un métabolite du cycle de Krebs. Entre le PGMe, hydrophobe, et le PGCOONa, hydrophile, nous avons synthétisé des copolymères poly (glyoxylate de méthyle - co - glyoxylate de potassium) par saponification partielle et statistique des fonctions ester du PGMe. Les copolymères ont été caractérisés par diverses techniques (RMN, IRTF, thermogravimétrie, photométrie de flamme, flux force couplé diffusion de la lumière...). Un suivi, par RMN  $^1\text{H}$  de la dégradation en milieu aqueux des copolymères montre que les fonctions sel ralentissent la dépolymérisation. La modulation de la balance hydrophile / hydrophobe permet d'envisager des applications de ces copolymères dans le domaine de la libération contrôlée de composés actifs.

**Abstract :** *Poly(methyl glyoxylate) (PGMe) and its sodium salt (PGCOONa) are biodegradable polymers whose ultimate degradation product is glyoxylic acid, a Krebs metabolite. Between hydrophobic PGMe and hydrophilic PGCOONa, we synthesized poly(methyl glyoxylate - co - potassium glyoxylate) copolymers by partial and statistic saponification of ester groups. Copolymers have been analysed by several techniques (NMR, IR, thermogravimetry, flame photometry, flow field fractionation coupled light scattering...). An NMR study of copolymers degradation in aqueous medium showed that salt groups slow down temporarily the depolymerization. Modulation of the hydrophilic/hydrophobic balance enabled us to consider copolymers applications in the field of active compounds delivery systems.*

**Mots-clefs :** métabolite, poly (glyoxylate de méthyle - co - glyoxylate de potassium), copolymères amphiphiles, dégradation

**Keywords :** *Krebs metabolite, poly(methyl glyoxylate - co - potassium glyoxylate), amphiphilic copolymers, degradation*



Comme dans le cas du PGMe la molécule résiduelle est également l'acide glyoxylique. En outre, une étude préliminaire de toxicité a montré que le PGMe n'est pas toxique chez le rat et la souris par voies intraveineuse ou orale (Brachais C.H., à paraître).

Cependant, l'hydrophobie du PGMe limite son utilisation en milieu aqueux en tant que matrice pour la libération de composés actifs. Afin de moduler cette libération et la solubilité en milieu aqueux, une saponification partielle et contrôlée (par la potasse) a été envisagée, l'objectif étant de créer des groupes hydrophile répartis statistiquement le long de la chaîne.

## **2 Partie expérimentale**

### **2.1 Glyoxylate de méthyle (GMe) :**

Le monomère pur est obtenu après distillation sur bande tournante et sur  $P_2O_5$  de l'hémiacétal méthylique du glyoxylate de méthyle fourni par la Société Clariant.

### **2.2 Polyglyoxylate de méthyle (PGMe):**

L'homopolymérisation du GMe est réalisée en solution dans le dichlorométhane ( $[GMe] = 7,6 \text{ M}$ ). L'amorceur utilisé est la triéthylamine ( $2 \mu\text{l}$  par g de GMe). La polymérisation est conduite à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 1 heure. Le milieu réactionnel est alors dilué ( $[PGMe] = 5 \text{ M}$ ) dans le dichlorométhane et 2 équivalents d'hexaméthylène diisocyanate (HMDI) sont ajoutés, en présence de dilaurate de dibutylétain, afin de bloquer les extrémités de chaîne.

### **2.3 Poly (glyoxylate de méthyle -co- glyoxylate de potassium) :**

Une solution aqueuse contenant la potasse nécessaire est ajoutée à une solution de PGMe dans l'acétonitrile. Le milieu est laissé à température ambiante et sous agitation avant d'être évaporé. La phase aqueuse restante est concentrée, congelée puis lyophilisée. On récupère les copolymères sous forme de poudre.

### **2.4 Suivi cinétique :**

Le méthanol libéré par la saponification est dosé par Chromatographie en Phase Gazeuse après étalonnage. La conversion est déterminée par rapport au degré de saponification théorique, lui-même fonction de la potasse ajoutée.

### **2.5 Thermogravimétrie**

Un échantillon de masse connue de copolymère est attaqué par de l'acide sulfurique dans un creuset de platine. Le creuset est laissé deux heures au bain de

sable (300°C) avant de passer une nuit au four à 600°C. Le taux de saponification est calculé à partir de la masse de  $K_2SO_4$  récupéré.

## 2.6 Photométrie de flamme :

Un échantillon de masse connue de copolymère est dissous dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique. Cette solution est analysée à l'aide d'un photomètre de flamme (Electro Synthèse THF 80) étalonné avec du KCl. La concentration en  $K^+$  de la solution permet de calculer le taux de saponification réel.

## 2.7 Spectroscopie (RMN et I.R.T.F)

Les spectres RMN  $^{13}C$  sont enregistrés à 62.5 MHz sur un appareil Brücker ARX250 et les spectres RMN  $^1H$  à 200 MHz sur un Brücker AC 200.

Pour les spectres I.R.T.F., les copolymères ont été broyés avec du KBr et analysés sous forme de pastilles, en transmission, sur un appareil Perkin Elmer Spectrum 2000.

## 2.8 Flux force couplé diffusion de la lumière :

Le système de séparation est un FF Universal Fractionator F-100 équipé d'une membrane d'ultrafiltration en acétate de cellulose (seuil de coupure de 10000 g/mol). Le flux linéaire est fixé à 0.3 ml/min par une pompe "Intelligente FLOM P-500". Le flux croisé est de 2.5 ml/min pendant une minute puis décroît exponentiellement jusqu'à 0 en 30 min grâce à une pompe "Pharmacia Biotech P-500". L'éluant est une solution de  $LiNO_3$  0.1 N.

# 3 Résultats et discussion

## 3.1 Synthèse des copolymères

Les copolymères poly(glyoxylate de méthyle-co-glyoxylate de potassium) sont réalisés en milieu homogène mixte eau / acétonitrile et leur synthèse nécessite des conditions strictes, variant en fonction du taux de saponification désiré. L'acétonitrile qui solubilise le PGMe favorise l'accessibilité des groupements ester à la potasse. Néanmoins, en milieu concentré (PGMe = 20 % en masse), le milieu devient hétérogène et les produits obtenus ne sont en fait que des mélanges de copolymères à différents taux.

Par contre, la synthèse en milieu mixte et dilué (PGMe : 1 % en poids) se déroule en solution homogène si l'on choisit la bonne proportion de chacune des 2 phases organiques et aqueuses. Les conditions optimales sont portées sur la Figure n° 3 qui décrit l'évolution de la proportion d'acétonitrile dans le milieu solvant en fonction du taux de saponification envisagé.

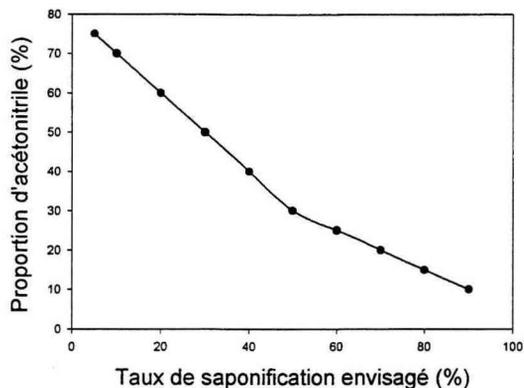


Fig. n° 3 : Conditions de saponification

Les copolymères sont récupérés après lyophilisation sous forme d'une poudre pulvérulente soluble dans l'eau et dans le mélange eau / acétonitrile de synthèse pour les taux de saponification supérieurs à 7 % et très hygroscopique pour les taux élevés. En dessous de 7%, les copolymères sont solubles dans l'acétonitrile et dans le mélange de synthèse.

La cinétique de ces synthèses en milieu homogène a été suivie par C.P.G. La réaction est extrêmement rapide (e.g. Figure n° 4 pour 50% de saponification).

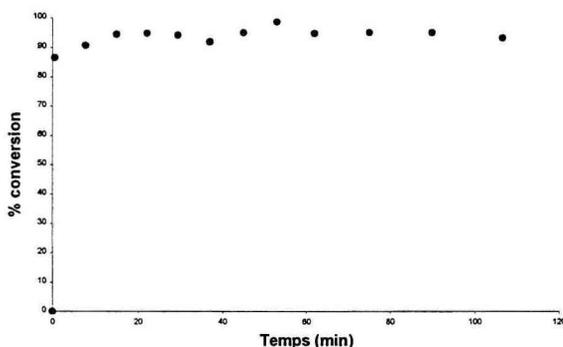


Fig. n° 4 : Cinétique d'une saponification à 50%

### 3.2 Caractérisation

Plusieurs méthodes ont été testées pour la détermination du taux de saponification réel. La microanalyse s'est révélée très imprécise. De même, le suivi du MeOH

libéré (au maximum 450  $\mu$ l dans 100 ml de solution) ne permet pas d'obtenir une précision suffisante (< 5%).

Les méthodes comparatives de dosage des groupements ester et sel (I.R.T.F. et R.M.N.  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ ) ne donnent pas non plus de résultats satisfaisants. En effet la RMN dans  $\text{D}_2\text{O}$  fournit des taux de saponification supérieurs à ceux attendus car les groupements ester sont vraisemblablement masqués par agrégation. Néanmoins, des espoirs sont permis en ce qui concerne la RMN  $^{13}\text{C}$  car il existe deux bandes carbonyle, ester et sel, bien distinctes. De plus, la bande CO ester se présente sous la forme de trois épaulements correspondant aux trois environnements envisageables pour le groupe ester (ester/ester/ester ; ester/ester/sel et sel/ester/sel). Ces observations nous encouragent à rechercher actuellement les meilleures conditions de solvants pour l'analyse RMN afin d'accéder à la microstructure des copolymères. Par I.R.T.F les résultats obtenus sur les deux bandes carbonyles (ester :  $1765\text{ cm}^{-1}$ , sel :  $1631\text{ cm}^{-1}$ ) révèlent une variation des coefficients d'absorption de ces bandes en fonction de leur environnement.

Nous nous sommes donc intéressés à deux méthodes "absolues" qui s'appuient sur la mesure des ions  $\text{K}^+$  associés. La thermogravimétrie et la photométrie de flamme permettent en effet de déterminer la quantité de  $\text{K}^+$  contenue dans les copolymères et donc la quantité de groupements saponifiés. Ces deux méthodes sont fiables et précises pour des taux de modification allant jusqu'à 50 %. Au-delà, la présence d'eau, due à l'hygroscopie des copolymères, fausse la pesée initiale et les résultats sont systématiquement inférieurs aux taux attendus.

Enfin, une étude en couplage flux force / diffusion de la lumière a permis de vérifier que des phénomènes d'agrégation existent en solution aqueuse diluée, mais en très faible proportion (Figure n° 5).

La technique de flux force permet la séparation des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique, selon les lois de la diffusion, directement dans la phase mobile ; les espèces de petites tailles sont éluées plus rapidement.

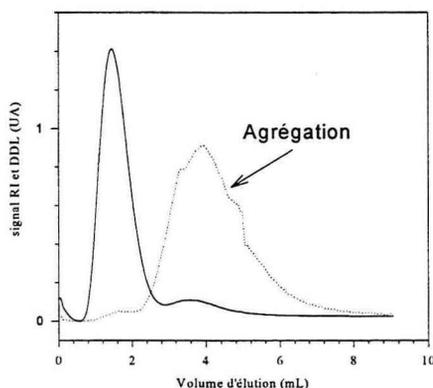


Fig n° 5 : Profils réfractométriques ( ) et de diffusion de la lumière ( " ) d'un copolymère à 50% de taux de saponification

Sur la Figure n° 5 sont portés les profils réfractométrique (relié à la concentration) et de diffusion de la lumière (proportionnel à la taille des macromolécules) d'un copolymère à 50 % de taux de saponification. On remarque deux populations différentes : la première largement majoritaire diffuse très peu et correspond aux chaînes libres en solution, la seconde concerne une faible fraction du produit et montre un profil de d.d.l. correspondant à une agrégation.

Ce phénomène marginal d'agrégation est en accord avec la distribution statistique des motifs ester et sel, que nous souhaitons obtenir.

#### Dégradation

En solution aqueuse, la dégradation *in vitro* des copolymères montre, par RMN  $^1\text{H}$ , une décroissance beaucoup plus rapide de la bande CH des motifs ester que de celle des motifs carboxylate. Ce résultat confirme le mécanisme proposé pour le PGMe (Figure n° 2) qui consiste d'abord en une hydrolyse des fonctions ester qui génère des groupements acide carboxylique capables de provoquer des coupures de chaîne et, par là-même, une dépolymérisation. Cependant, on peut interpréter la persistance des groupes carboxylate par la formation d'une extrémité de type 4-oxo-1,3-dioxolane qui nécessite la présence d'un autre proton pour s'hydrolyser (Figure n° 6).

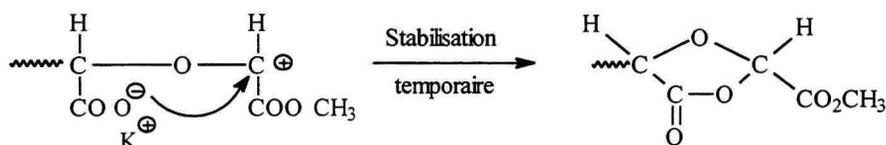


Fig. n° 6 : Mécanisme de stabilisation temporaire de la dépolymérisation

Ainsi, la dépolymérisation des copolymères dépend du pourcentage de groupements carboxylate présents.

## 4 Conclusion

Nous disposons donc d'une gamme de copolymères dont l'hydrophilie et la dégradabilité dépendent du pourcentage de saponification. Les perspectives envisagées pour ces produits sont la libération de composés actifs. En effet, compte tenu de l'innocuité des polymères et de leur produit de dégradation, on peut envisager de les utiliser comme matrice pour la libération contrôlée et prolongée de composés tels que des engrais, des pesticides, des insecticides... Des expérimentations en milieu ouvert sont prévues pour étudier l'efficacité de tels systèmes.

## 5 Références bibliographiques

Brachais C.H., Huguet J, Bunel C., 1997, Synthesis, characterization and stabilization of poly(methyl glyoxylate), *Polymer*, 38, n° 19, p 4959-4964.

Brachais C.H., Huguet J, Bunel C., Brachais L., 1998, In vitro degradation of poly(methyl glyoxylate), *Polymer*, 39, n° 4, p 883-890.

Brachais C.H., Duclos R., Guerbet M., Huguet J., Van Dessel-Bierre C., Bunel C., à paraître, Toxicity of poly(methyl glyoxylate) : preliminary studies, *International Journal of pharmaceuticals*.

Gledhill W.E., Saeger V.W., 1987, Degradation of sodium polyglyoxylate a non persistent metal sequestrant in laboratory ecosystem, *Journal of Industrial Microbiology*, 2, p 97-105.

Monsanto, 1979, Process for preparing polymeric acetal carboxylate salts, *US Patent 4, 140, 676*.

Monsanto, 1981, Selectively controlling the hydrolytic stability of acetal carboxylate polymers, *US Patent 4, 302, 564*.



# Dossier de presse

## Contacts presse

Véronique Leclerc, Cemagref  
Service communication  
Tél. 01 40 96 61 30  
Fax 01 40 96 61 39  
E-mail : veronique.leclerc@cemagref.fr

Marie-Ange Folacci, Ademe  
Service communication  
Tél. 01 47 65 24 30  
Fax 01 46 45 52 36  
E-mail : marie-ange.folacci@ademe.fr

Ce dossier comprend :

- . **Communiqué de synthèse** - Matériaux biodégradables et Environnement
- . **Fiche 1** - De la biodégradabilité des plastiques
- . **Fiche 2** - Quel marché pour les produits biodégradables ?
- . **Fiche 3** - Environnement et biodégradabilité
- . **Fiche 4** - Réglementation pour les matériaux biodégradables
- . **Fiche 5** - Recherche et outils de mesure

# Communiqué de synthèse

## *Matériaux biodégradables et Environnement*

*Ce colloque international organisé par l'Ademe, le Cemagref et le Cobio, a permis de réunir pour la première fois les 5 et 6 mai 1999, plus d'une centaine de scientifiques, d'industriels et d'utilisateurs de matériaux biodégradables. C'est le premier colloque à être autant tourné vers l'application. Son point fort est de confronter les points de vue scientifiques avec les problèmes rencontrés sur le terrain.*

Les plastiques représentent 10 % du poids des déchets ménagers. 5 % seulement sont recyclés, 58 % vont en décharge alors que 37 % sont incinérés. A partir du 1<sup>er</sup> juillet 2002, seuls les déchets ultimes seront acceptés en décharge. Les autres types de déchets devront être valorisés.

### **Quand traitement des déchets et respect de l'environnement riment avec biodégradation**

Le recyclage par exemple, doit être précédé par un tri minutieux des matériaux plastiques qui ne supportent pas les mélanges de polymères. L'incinération, quant à elle, peut être à l'origine de l'émission de substances toxiques pour l'environnement.

Pour éviter ces problèmes, l'utilisation de matériaux biodégradables pourrait être une solution d'avenir. Actuellement, les principaux inconvénients des matériaux biodégradables sont leur coût élevé et leurs performances plus faibles que celles des matériaux conventionnels. Ces matériaux biodégradables deviendront concurrentiels quand de véritables niches commerciales se seront développées. Certaines filières s'avèrent d'ores et déjà prometteuses, comme les sacs de compostage et certains plastiques agricoles. A terme, 10 à 15 % de la production mondiale de plastiques pourrait être concernée par la biodégradation.

### **Réglementations pour un marché en expansion**

Pour protéger l'environnement et les utilisateurs de ces matériaux biodégradables, un projet de normalisation est actuellement soumis à la commission européenne. C'est le premier cadre législatif officiel accordé aux matériaux biodégradables mais il reste incomplet, notamment par rapport à la notion de "non écotoxicité" pour l'environnement.

Ainsi, des recherches sont actuellement menées pour définir des tests d'innocuité dans l'environnement, mais aussi pour mesurer la biodégradabilité réelle des matériaux dits biodégradables et pour accorder les essais en laboratoire avec les conditions rencontrées sur le terrain.

# *Fiche 1 : De la biodégradabilité des plastiques*

## **Contacts scientifiques**

Stéphane Guilbert, INRA Montpellier

Tél. 04 99 61 28 31

Fax 04 67 52 20 94

E-mail : [guilbert@ensam.inra.fr](mailto:guilbert@ensam.inra.fr)

Michel Vert, CNRS Montpellier

Tél. 04 67 41 82 60

Fax 04 67 52 20 94

E-mail : [vertm@pharma.univ-montp1.fr](mailto:vertm@pharma.univ-montp1.fr)

En France, la production de déchets ménagers est de 30 millions de tonnes/an soit 1 kg de déchets par habitant et par jour. Le plastique représente 30 % du volume des déchets de nos poubelles et 10 % de leur poids. Où vont se retrouver ces plastiques ? Incinération, décharge, recyclage... Avec la directive L 364.10.23-1994 impliquant que seuls les déchets ultimes seront mis en décharge à partir de 2002, une des solutions pourrait être de produire de la matière plastique qui se dégrade comme du déchet vert.

## **Moins polluer avec les plastiques biodégradables**

Un matériau est dit biodégradable s'il est dégradé par des micro-organismes. Le résultat de cette dégradation doit être de l'eau, du gaz carbonique et/ou du méthane, avec éventuellement production d'une nouvelle biomasse non toxique pour l'environnement.

La biodégradabilité des matériaux doit pouvoir s'effectuer en compost avec d'autres produits fermentescibles ou dans le sol, pour les matériaux destinés à rester sur le terrain comme certains plastiques agricoles (paillage, tunnels) trop souillés pour être recyclés (près de 70 % de salissure).

## **Les recherches se développent et les industriels s'investissent**

Les plastiques biodégradables ont été développés au début des années 70 au moment de la première crise pétrolière, pour trouver des substituts aux produits dérivés du pétrole. Outre leur biodégradabilité, ces matériaux possèdent des avantages incontestables. Ils sont recyclables, incinérables et compostables. Souvent d'origine agricole, ils peuvent être un nouveau débouché pour les agriculteurs et les cultures destinées à les produire peuvent même être réalisées sur des terres en jachère imposées par la CEE, comme pour les cultures énergétiques.

Leur principal inconvénient est leur coût, puisqu'ils sont au moins 1,2 fois à 3 fois plus chers que leur concurrent d'origine pétrolière. Pourtant, la pression sociale exercée par des consommateurs de plus en plus motivés pour respecter

l'environnement, pourrait être le moteur pour que l'industriel prenne en charge le surcoût imposé par l'emploi de ces matériaux. De toute façon, la plupart des experts estiment que les coûts s'équilibreront dès que le marché se sera affirmé. Pourtant, d'autres inconvénients limitent encore leur utilisation. En effet, chaque application va avoir son propre cahier des charges à remplir. Or actuellement, aucun matériau biodégradable n'est encore capable de remplacer les plastiques usuels, car ils ne possèdent pas les mêmes propriétés mécaniques. Les recherches progressent et des matériaux biodégradables obtenus par synthèse chimique apparaissent même sur le marché, comme les polyesters modifiés et le PCL (polycaprolactone). Maintenant, la plupart des grands chimistes industriels proposent des matériaux biodégradables dans leur palette de produits plastiques. Actuellement, les matériaux biodégradables les plus utilisés dans le monde sont l'amidon à 47%, utilisé pur ou en mélange avec le PCL, le PCL à 32 % et le PLA (polylactic acid) à 14 % (1996).

## *Fiche 2 : Quel marché pour les produits biodégradable ?*

### **Contacts scientifiques**

Pierre Feuilloley, Cemagref  
Unité de recherche Génie instrumental pour la qualité agro-alimentaire  
Tél. 04 67 04 63 27  
Fax 04 67 63 57 95  
E-mail : pierre.feuilleley@cemagref.fr

Hilaire Bewa, Ademe Angers  
Tél. 02 41 20 41 20  
Fax 02 41 20 42 00  
E-mail : hilaire.bewa@ademe.fr

Chaque année, la production mondiale de plastiques est d'environ 100 millions de tonnes. On estime que 10 à 15 % de ces plastiques pourraient être remplacés par des matériaux biodégradables, alors que la production mondiale actuelle de plastiques biodégradables est seulement de 14 000 tonnes.

### **Rechercher des niches commerciales**

Actuellement, les principales filières d'utilisation des matériaux biodégradables sont les sacs de compostage (38 %), les emballages alimentaires (6 %), l'agriculture (6 %) et le reste, emballages non alimentaires, chips de calage, récipients de produits cosmétiques, etc. (50 %).

Ainsi, des sacs compostables à base d'amidon sont testés depuis un an, pour la collecte de déchets fermentescibles dans 500 communes européennes de 5 000 à 100 000 habitants. En France, trois communes se prêtent à ces essais, Rambouillet, Niort et Castelnaudary.

Outre les sacs compostables, les applications actuelles portent sur les sacs de supermarché, les couches culottes, les éléments de calage, les cotons tiges solubles, le papier toilette soluble, les films d'emballage, les couverts, les pailles, les verres et les assiettes, etc. Le marché des produits biodégradables en est encore à ses premiers balbutiements et les véritables niches commerciales restent encore à se confirmer et à se développer.

### **Une filière prometteuse, l'agriculture**

L'agriculture par exemple, s'avère une filière encore peu exploitée et pourtant prometteuse. En France, l'agriculture utilise chaque année 170 000 à 190 000 tonnes de plastiques. Moins de 1 % des plastiques agricoles utilisés sont biodégradables, alors que le tiers pourrait être remplacé par des matériaux biodégradables.

Le paillage, les petits tunnels, les serres, l'enrubannage et la ficelle agricole, sont des applications où les matériaux biodégradables pourraient résoudre le problème de l'élimination des plastiques.

L'horticulture est particulièrement concernée par l'utilisation de plastiques biodégradables en films minces pour le paillage et les petits tunnels (ou chenilles) qui seraient compostés en bout de champ, ou laissés sur place pour une biodégradation dans le sol. Le marché potentiel actuel de films biodégradables horticoles est de 30 500 t/an pour la France et de 120 000 t/an pour l'Europe.

D'autres estimations indiquent que 10 % des plastiques employés dans l'industrie et dans l'agro-alimentaire pourraient être remplacés par des matériaux biodégradables. En moyenne, c'est près de 15 % du marché des plastiques qui serait concerné par l'utilisation de matériaux biodégradables.

#### **Consommation de plastiques en tonnes par an, pour l'agriculture en 1995 (source CPA)**

##### **POLYETHYLENE**

Films épais	35 000 t (ensilage, couverture de serres)
Films minces	25 000 t (paillage, petits tunnels, bâches à plat)
Sacs grande contenance	16 000 t
Tubes et tuyaux	10 000 t
Fûts, bidons, filets	10 000 t

##### **POLYPROPYLENE**

Ficelles, liens, sacheries, non tissés, poteries...	35 000 t
---	----------

##### **Pvc**

Plaques transparentes semi-rigides, tuyaux et tubes...	35 000 t
--	----------

##### **AUTRES PLASTIQUES**

Isolation, substrats, citernes (polystyrène, polyester, polyuréthane...)	9 000 t
--	---------

#### **La production mondiale des plastiques en 1996**

- *États-Unis* → 30 %
- *Europe* → 20 %
- *Japon* → 20 à 30 %
- *Reste du monde* → 30 %

## *Fiche 3 : Environnement et biodégradabilité*

### **Contact scientifique**

Christophe Douky de Boissoudy, NOVAMONT

*Nuisances physiques et visuelles*

Tél. 01 45 88 01 75

Fax 01 53 62 02 91

E-mail : [cdbmb@club-internet.fr](mailto:cdbmb@club-internet.fr)

Pour produire 1 kg de fraises, 25 g de plastiques sont nécessaires ; pour 1 melon, il faut 30 g de plastique et pour 1 l de lait de montagne, il en faut 40 g...

L'utilisation et l'utilité des polymères de synthèse ne sont plus à démontrer. Si les plastiques rendent de grands services à l'industrie et à l'agriculture, le traitement de ces déchets n'est pas encore résolu.

### **L'environnement pollué par les plastiques**

Une chose est sûre, les déchets plastiques dispersés dans la nature nuisent visuellement. Ce qui pose le plus de problème, ce sont les films plastiques de type sacs de supermarché. Ainsi, dans certaines régions, comme aux Antilles, le problème est sérieux car les sacs plastiques utilisés en agriculture pour protéger les cultures de bananes par exemple, sont emportés par le vent et se répandent dans toutes les îles.

Même en compost, les plastiques non retirés par un tri ultérieur peuvent provoquer une gêne visuelle lors de l'utilisation du compost d'ordures brutes. Ainsi, en Champagne, il y a une dizaine d'années, la région a préféré ne plus utiliser le compost d'ordures ménagères au pied des ceps de vigne. La réputation de ce vignoble ne pouvait pas s'accorder à la piètre image de ce type de compost, repérable par des morceaux de plastiques.

Les plastiques dispersés dans l'environnement, peuvent non seulement provoquer une gêne visuelle mais ils peuvent aussi être dangereux pour les animaux. Ainsi, des tortues sont régulièrement retrouvées mortes, étouffées par l'ingestion de morceaux de plastiques. Les vaches aussi sont victimes de l'absorption de plastiques et meurent par occlusion intestinale. L'océan n'est pas épargné avec la mort de dauphins, de phoques et de tortues, confondant le plastique avec les méduses, les seiches ou les calamars dont ils se nourrissent.

### **Accorder biodégradation et innocuité pour l'environnement**

Actuellement, la réglementation portant sur l'écotoxicité des matériaux biodégradables est encore timide, car trop sévère elle pourrait en limiter la production. Un projet CEN concernant les matériaux biodégradables a été déposé à la commission européenne, fin 1998. Il est extrait des recommandations OCDE pour les tests chimiques dont il réadapte les procédures. Seront dits

biodégradables les matériaux qui le sont à 60 % en 6 mois, pour les polymères simples, ou à 90 %, pour des polymères plus complexes. Cependant, plusieurs problèmes ne sont pas résolus par cette nouvelle réglementation. Quel est le devenir des 40 % ou des 10 % restants de matériaux non biodégradés ? Et quelle est la véritable fraction biodégradable de ces matériaux dans les conditions réelles de compostage qui est de 2 à 3 mois et non pas de 6 mois comme dans le test ?

De plus, des essais de non écotoxicité de ces matériaux sur l'environnement ont été supprimés du projet CEN, car ils sont considérés comme non valables en compost. Il est pourtant indispensable que des contrôles de l'innocuité des matériaux biodégradables sur l'environnement soient mis en place le plus tôt possible.

Des recherches sont d'ailleurs menées par des chercheurs pour vérifier qu'il n'y a pas de libération de toxiques dans le sol au cours du processus de biodégradation des plastiques. Il est même envisagé de développer des tests de validation de la non écotoxicité de ces plastiques dans l'environnement, afin de pouvoir délivrer un label "plastique biodégradable qualité agricole".

# *Fiche 4 : Réglementation pour les matériaux biodégradables*

## **Contact scientifique**

Yves Aitken, CTP

Tél. 04 76 15 40 15

Fax 04 76 15 40 60

E-mail : Yves.Aitken@meije.ctp.inpg.fr

L'intervention des autorités administratives dans le secteur des matériaux biodégradables est très récente puisqu'elle date de 1994, après une première tentative en 1990, en Italie. Elle a fait son apparition dans un souci de protection de l'environnement et d'harmonisation des législations.

## **Des règles pour protéger l'environnement et les utilisateurs**

Le cadre législatif a été fixé par la directive européenne 94/62/CE, du 31 décembre 1994, "Emballages et déchets d'emballages". Les objectifs à atteindre sont alors énoncés et les exigences essentielles à respecter sont précisées pour tous les emballages mis sur le marché européen. Cette directive doit être traduite dans le droit national de chaque état, ce qui a été fait, pour la France, par le décret n° 98-638 du 20 juillet 1998 "Prise en compte des exigences liées à l'environnement dans la conception et la fabrication des emballages".

Pour le recyclage organique, les traitements aérobie (compostage) ou anaérobie (biométhanisation) ont été acceptés comme moyens, à l'exclusion de l'enfouissement en décharge.

## **Harmoniser le marché par la normalisation européenne**

Simultanément à l'aspect administratif, la normalisation européenne dans le cadre du CEN TC 261/SC4 "Emballage et environnement" a harmonisé, avec les différents partenaires concernés (administratifs, industriels et experts scientifiques), les normes spécifiant les critères et les méthodes de mesure à mettre en œuvre. En ce qui concerne le recyclage organique, le projet prEN13342 précise le programme d'essai et les critères d'acceptation :

- caractérisation du produit,
- biodégradabilité des constituants,
- désintégration du produit,
- qualité du compost.

La mise en application réglementaire de la conformité aux exigences essentielles, se fera de façon progressive dès la publication des textes normatifs. Les prescriptions pour les métaux lourds sont quant à eux, d'ores et déjà en vigueur.

## **LES EXIGENCES LIEES A LA PRESENCE DES METAUX LOURDS**

*suyant l'article 3-1 du décret 98-638*

La teneur en métaux lourds correspond à la somme des niveaux de concentration en plomb, cadmium, mercure et chrome hexavalent.

Les concentrations à ne pas dépasser sont les suivantes :

- 600 ppm si les emballages sont fabriqués avant le 30/06/1998,
- 250 ppm si les emballages sont fabriqués avant le 30/06/1999,
- 100 ppm si les emballages sont fabriqués avant le 30/06/2001.

## Fiche 5 : Recherche et outils de mesure

### Contacts scientifiques

Anne Décridaud-Calmon, ENSC Toulouse

Tél. 05 61 17 57 44

Fax 05 61 55 94 00

E-mail : [adecridaud@ensct.fr](mailto:adecridaud@ensct.fr)

Françoise Silvestre, ENSC Toulouse

Tél. 05 61 17 57 25

Fax 05 61 55 94 00

E-mail : [lcacatar@cict.fr](mailto:lcacatar@cict.fr)

Jean-Luc Rols, INSA Toulouse

Tél. 05 61 55 94 47

Fax 05 61 55 94 00

E-mail : [rols@insa-tlse.fr](mailto:rols@insa-tlse.fr)

Dire qu'un matériau est biodégradable nécessite d'évaluer son taux de biodégradation. Pour cela, des mesures de la biodégradabilité peuvent être effectuées en laboratoire ou en milieu naturel, selon trois catégories de tests :

- le test de STURM (1973) qui est un test de laboratoire en milieu liquide pour lequel le milieu est bien maîtrisé et reproductible,
- les tests de simulation en laboratoire, en milieu liquide ou solide, où les conditions sont moins maîtrisées,
- les tests *in situ* sur sol et compost où les conditions sont connues mais non maîtrisées.

### Mesurer la biodégradabilité, un défi européen de normalisation

En France, il existe deux laboratoires d'essais certifiés pour réaliser des tests de biodégradabilité des matériaux, le LNE et l'INERIS. Le prix des tests est de l'ordre de 15 000 à 30 000 F HT pour chaque produit testé.

Les essais peuvent être effectués en milieu liquide (avec des micro-organismes provenant d'une boue de station d'épuration) ou en milieu solide (sol ou compost, réel ou reconstitué). En laboratoire, la biodégradabilité est mesurée directement par la consommation d'oxygène ou par la production de gaz carbonique.

Les essais de normalisation ne permettent pas encore actuellement d'obtenir des résultats reproductibles. Ce problème est lié à la qualité de l'inoculum microbien qui n'est pas encore maîtrisée malgré la fixation d'une densité cellulaire minimale. Des recherches sont menées pour proposer un protocole de préparation de l'inoculum adapté aux caractéristiques initiales de la boue activée utilisée comme

source de micro-organismes, afin d'obtenir un inoculum microbien standard. Actuellement, un projet européen de normalisation de la mesure de la biodégradabilité des matériaux en milieu liquide est en préparation (projet CEN).

### **Accorder les essais en laboratoire aux conditions de terrain**

Des expérimentations et des essais menés en laboratoire mais aussi sur le terrain, selon différentes conditions de sol et de climat, ont révélé que la biodégradabilité des matériaux biodégradables actuels s'étale de deux mois à deux ans.

Ces recherches ont mis en évidence par exemple, que les matériaux composés de 90 % de PE (polyéthylène) et de 10 % d'amidon ne sont absolument pas biodégradables, ni même l'amidon du produit qui est indisponible pour une biodégradation.

Certains matériaux ont des comportements différents s'ils sont enterrés dans le sol ou compostés. Ainsi, le PLA (acide polylactique) se dégrade très bien en compost mais peu dans le sol.

En revanche, d'autres matériaux perdent leur capacité à se dégrader, car la température élevée dans le compost (60 °C) durcit leur structure. De toute façon, pour que la biodégradation se réalise bien en compost, il ne faut pas dépasser 10 % de plastiques biodégradables au sein de l'andain. En effet, les additifs utilisés par les industriels comme colorants, conservateurs ou antioxydants peuvent avoir un rôle inhibiteur sur la croissance des micro-organismes.





Les matériaux biodégradables, encore trop peu développés, font l'objet de travaux de recherche dans les laboratoires publics et privés s'intéressant aux polymères.

Les communications regroupées dans cet ouvrage restituent les travaux présentés lors du colloque "*matériaux biodégradables et environnement*" qui s'est tenu à Paris les 5 et 6 mai 1999.

Ces travaux émanent des laboratoires de recherche et des acteurs du marché de ces matériaux, à savoir les industriels producteurs, les utilisateurs et les services publics.

D'une manière générale, les communications présentées contribuent à mieux caractériser les attentes qualitatives et quantitatives des utilisateurs afin que les producteurs puissent orienter leurs recherches. Elles concourent aussi à l'élargissement de la connaissance des propriétés de ces matériaux dans la perspective d'une meilleure appropriation par les utilisateurs. Enfin, elles permettent aux pouvoirs publics d'arrêter des décisions argumentées quant à l'utilisation des différents produits en relation avec l'environnement.



**ADEME**



ISBN 2-85362-546-X

Prix : 215 F TTC (32,78 €)



9 782853 625463