



HAL
open science

Biodégradation de matériaux polymères à usage agricole : Etude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental

S. Grima

► To cite this version:

S. Grima. Biodégradation de matériaux polymères à usage agricole : Etude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental. Sciences de l'environnement. Doctorat, spécialité Sciences des Agroressources, Institut National Polytechnique, Toulouse, 2002. Français. NNT: . tel-02581368

HAL Id: tel-02581368

<https://hal.inrae.fr/tel-02581368>

Submitted on 14 May 2020

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.

N° d'ordre : 1945

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

SPECIALITE : Sciences des Agroressources

par

Sophie GRIMA

**BIODEGRADATION DE MATERIAUX POLYMERES A USAGE
AGRICOLE : ETUDE ET MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE
METHODE DE TEST, ANALYSE DES PRODUITS DE
DEGRADATION ET IMPACT ENVIRONNEMENTAL**

Soutenue le 16 décembre 2002 devant le jury composé de :

M.	Wolf-Rüdiger MÜLLER	DR Université Stuttgart	Rapporteur
M.	Michel VERT	DR CNRS Montpellier	Rapporteur
M.	Antoine GASET	Professeur INP Toulouse	Examineur
M.	Hilaire BEWA	Ingénieur ADEME Angers	Examineur
M.	Christophe De BOISSOUDY	Chargé de Mission Novamont	Invité
M.	Francesco DEGLI-INNOCENTI	Chercheur Novamont	Invité
Mme	Patricia ERARD	Ingénieur CTIFL Balandran	Invité
M.	Pierre FEUILLOLEY	IR Cemagref Montpellier	Invité
M.	Pascal PANDARD	Ingénieur INERIS Verneuil	Invité
Mme	Véronique BELLON-MAUREL	DR Cemagref Montpellier	Directeur de Thèse
Mme	Françoise SILVESTRE	MCF HDR INP Toulouse	Directeur de Thèse

LABORATOIRE DE CHIMIE AGRO-
INDUSTRIELLE
UMR 1010 INRA / INPT – ENSIACET
118, Route de Narbonne
31077 Toulouse Cedex 04

INFORMATION ET TECHNOLOGIE POUR LES
AGRO-PROCEDES
UMR CEMAGREF-ENSAM-CIRAD
361 rue JF Breton BP 5095
34033 Montpellier Cedex 1

RESUME

Les problèmes d'accumulation des déchets solides dans l'environnement et la mise en place de législations sur les déchets non-ultimes ont provoqué ces dernières années un intérêt croissant pour les matériaux polymères biodégradables.

Avant de généraliser leur utilisation il est nécessaire de vérifier leur innocuité sur l'écosystème. Pour cela, une analyse des produits et résidus de dégradation est indispensable.

Dans le cadre d'une étude sur les films plastiques à usage agricole, nous avons développé les points suivants :

Nous avons étudié et mis au point un nouveau test de biodégradation en simulation de sol, sur support inerte, la pouzzolane, en conditions aérobies. Le taux de biodégradabilité est évalué par le taux de carbone converti en CO₂. Ce test a été automatisé pour une meilleure reproductibilité des résultats.

La biodégradabilité de trois matériaux (constitués majoritairement d'amidon et de polyesters) a alors été évaluée en simulation de sol et par différents tests plus classiques (test de Sturm, enfouissement en sol *in situ*, test en conditions de compost sur vermiculite).

Puis, nous avons mis au point une méthode d'extraction quantitative et rapide par ultrasons, en présence de N-méthylpyrrolidone.

L'utilisation de la chromatographie par perméation de gel, de la spectroscopie IR et RMN, de l'analyse enthalpique différentielle et de la microscopie électronique à balayage, sur les produits extraits nous a permis d'étudier le comportement de ces matériaux vis-à-vis de la dégradation dans différentes conditions : simulation de sol et de compost et enfouissement *in situ*.

Parallèlement, des tests d'écotoxicité terrestre et aquatique ont été menés afin de mettre en évidence un éventuel effet toxique. Des tests agronomiques sur culture de melons complètent cette étude et vérifient l'applicabilité des films biodégradables dans l'agriculture.

Mots-clés : Biodégradation, Simulation sol et compost, Dégradation *in situ*, Extraction des produits de dégradation, Analyses spectroscopiques (IR, RMN), Chromatographie par perméation de gel, Mécanismes de dégradation

ABSTRACT

The issues associated with solid waste continuous increase, impacting the environment as well as regulations about non-ultimate waste created a real interest in biodegradable polymer materials.

Before using intensively these materials, it is necessary to check that they are harmless to the environment. To achieve this objective, analyses on by-products and residues resulting from biodegradation were performed.

A thorough study on agricultural plastic films was conducted.

First, a biodegradation test on soil medium under aerobic conditions was developed using an inert medium called pouzzolane. The biodegradation rate was evaluated based on the calculated carbon dioxide rate. This test was automated using many duplicates to confirm the results.

Biodegradation of these three materials (mainly starch and polyester) was measured on soil medium using the most well known tests (Sturm test, *in situ* soil test, composting simulation test using vermiculite).

Then, we set up a rapid quantitative extraction method based on ultrasounds, using N-Methylpyrrolidone.

We studied material biodegradation under various conditions (soil medium, compost medium and *in situ* medium) using gel permeation chromatography, RMN and IR spectroscopy, differential scanning calorimetry, scanning electronic microscopy.

In the meantime, terrestrial and aquatic ecotoxicity tests were performed to show a potential toxic effect. Agronomic tests on cantaloupe cultures were conducted to assess the effectiveness of biodegradable films for agricultural purpose uses.

Key words : Biodegradation, soil and compost medium, degradation in-situ, degradation by products extraction, spectroscopic analyses (IR, RMN), gel permeation chromatography, degradation mechanisms

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle de Toulouse, sous la direction de Mme Françoise Silvestre, à la division « Génie Instrumental pour la Qualité Agro-alimentaire » au Cemagref de Montpellier, sous la direction de Mme Véronique Bellon-Maurel.

Ce travail a été effectué grâce à un financement ADEME-Cemagref

Mes plus sincères remerciements,

A M. A. Gaset,

Je vous remercie pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour la confiance que vous m'avez accordée durant ces années de recherche.

A MM. W-R Müller et M. Vert

Vous avez accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je vous remercie d'avoir accepté de le juger et ainsi de m'avoir fait partager vos connaissances dans le domaine de la biodégradation.

A l'ADEME et plus particulièrement à M H. Bewa

Vous avez soutenu activement et financièrement ce travail de recherche. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée et d'avoir accepté de juger ce travail.

A Mmes V. Bellon-Maurel et F. Silvestre

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me proposant ce travail. Vous avez encadré mes recherches sans économiser votre temps, bien que vous ayez subi les contraintes de lieux. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre patience, notamment lors de la rédaction de la thèse, votre gentillesse et pour tout ce que vous m'avez apporté durant ces trois années.

A M. P. Feuilloley

Je vous remercie pour le suivi quotidien de la thèse, lors de mon séjour à Montpellier et pour les conseils que vous m'avez donné lors du démarrage de mes travaux.

A Mme P. Erard

Vous avez réalisé les tests agronomiques sur melons et vous m'avez ainsi permis d'aborder le point important des conditions réelles. Vous vous êtes également intéressée au reste de mes travaux durant ces trois années et je vous en remercie.

A M. P. Pandard

Vous avez réalisé les tests d'écotoxicité et vous m'avez apporté votre aide technique dans ce domaine. Vous avez ainsi permis de compléter cette étude et je vous en remercie.

A MM. C. de Boissoudy et F. Degli-Innocenti

En m'accueillant dans votre laboratoire à Novara, vous m'avez fait partager votre expérience sur la biodégradation sur support inerte. Vous avez également suivi ces travaux pendant les trois années et m'avez apporté votre aide, en tant que « fabricants » de plastiques biodégradables. Je vous remercie vivement de votre collaboration.

A M. J.L. Lablee

Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de mes recherches au Cemagref, notamment par l'automatisation du banc solide.

A Melle I. Bettoni

Je te remercie pour tous les conseils que tu m'as donnés, particulièrement en ce qui concerne la microbiologie.

A l'INRA d'Auzeville

Vous m'avez permis de réaliser une expérimentation sur Toulouse, en mettant une parcelle à ma disposition et je vous en remercie.

A Mmes M. Egea, A. Merlot, T. Catarelli, M. Juan et M.C. Talou

Je vous remercie de votre efficacité dans les tâches administratives et pour votre bonne humeur.

A tout le personnel du *Cemagref* de Montpellier et du *Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle* de Toulouse, et plus particulièrement à ceux qui ont facilité mon intégration au sein de ces deux laboratoires et m'ont fait partager leurs connaissances scientifiques. A Montpellier, *Olivier, Anne-Gaëlle, Jean-Luc, Jérémie, Rémi, Laetitia, Nicolas, Serge*, et à Toulouse, *Christophe, Sam, Julien, Ika, Belinda, Antoine, Olivier, Gaëlle, Laure, Dana, Jérémie, Gérald, Sandrine, Jérôme, Eric, Cathy, Urbain, Isabelle, Anne, Céline, Michel, ...* je vous remercie pour votre bonne humeur et votre aide. Vous avez contribué à la bonne ambiance dans laquelle j'ai eu la chance de travailler.

A Jérôme,

Je te remercie pour ton soutien, ta patience, tes conseils, ...

Liste des sigles et abréviations

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AFNOR	Association Française de Normalisation
ASE	Extraction par Solvant Accélérée
ASTM	American Society for Testing and Materials
COD	Carbone Organique Dissous
Cemagref	La Recherche pour l'Ingénierie de l'Agriculture et de l'Environnement
CEN	Comité Européen de Normalisation
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CTIFL	Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes
CRE	Capacité de Rétention en Eau
DMSO	DiMéthyle SulfOxyde
DMT	DiMéthyle Téréphtalate
DSC	Analyse enthalpique différentielle (Differential Scanning Calorimetry)
GPC	Chromatographie par perméation de gel (Gel Permeation Chromatography)
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
MA	Matériau A
MB	Matériau B
MC	Matériau C
MDA	4,4'-diamino diphenyle méthane
MEB	Microscope Electronique à Balayage
Mn	Masse moléculaire en nombre
Mw	Masse moléculaire en masse
MO	Micro-ondes
M/V	Concentration en masse par volume
NMP	N-Méthylpyrrolidone
OCDE	Organisation pour la Coopération et le Développement Economique
PAH	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
PBA	Poly(Butylène Adipate)
PBT	Poly(Butylène Téréphtalate)
PCB	Biphényle PolyChloré
PCL	Polycaprolactone
PLA	Poly (Acide Lactique)
PLGA	Poly (Acide Lactique <i>co</i> glycolique)
RDS	Déviation Standard Relative
SFE	Extraction par Fluide Supercritique
SSE	Extraction par Fluide Sous-critique
T _m	Température de fusion
T _g	Température de transition vitreuse
ThCO ₂	Dioxyde de Carbone Théorique
UFC	Unités Formant Colonies
US	Ultrasons

Les matériaux polymères, appelés plus communément « plastiques », sont largement présents dans de très nombreux domaines d'application en raison de leur compétitivité sur les plans fonctionnel (large gamme de propriétés) et économique. De cette utilisation intense et de leur grande résistance résulte une forte augmentation des rejets qui leur sont associés. Et malgré les efforts accomplis ces dernières années dans la mise en place de filières adaptées à la gestion de ces déchets, leur traitement et leur élimination posent encore de nombreux problèmes. Plusieurs voies sont envisagées :

- Le recyclage matière qui consiste en la collecte des déchets pour les valoriser, les réutiliser tels quels ou les réintroduire dans le cycle de production dont ils sont issus. Mais cette méthode conduit souvent à des produits présentant une qualité inférieure à celle des composés originaux. De plus, la mise en place de systèmes de collectes est alors nécessaire.
- L'incinération qui peut être une technique intéressante, si elle est combinée à une valorisation énergétique de la combustion et si les procédés sont bien maîtrisés.
- La mise en décharge, la voie la plus utilisée, mais qui ne peut plus accueillir que des déchets ultimes.
- La biodégradation qui ne peut s'appliquer qu'à une gamme bien particulière de matériaux. Ils doivent être, évidemment, formulés de façon à être assimilables par les microorganismes. Cette voie est adaptée au traitement des produits souillés, de faibles poids.

Les plastiques utilisés en agriculture sont un exemple de déchets éliminables par biodégradation. Il devient alors nécessaire de remplacer les plastiques "traditionnels", issus de la pétrochimie, par des matériaux biodégradables. Pour cela il est impératif, d'une part, de prouver leur biodégradabilité par des méthodes rapides et d'autre part, de vérifier leur non-toxicité pour le milieu naturel (Bewa, 1999 ; Soulas, 1999).

Les méthodes pour évaluer la biodégradation ont été largement étudiées (Decriaud-Calmon, 1998; Decriaud-Calmon *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1994; Van der Zee *et al.*, 1994) et ont conduit à de nombreux tests normalisés (ASTM, 1992a; 1992b; 1992c; CEN, 1998a; CEN, 1998b; ISO, 1999a; 1999b; OECD 301B, 1992).

Toutefois, elles ne répondent pas à toutes les attentes et ne s'intéressent qu'à un des deux objectifs visés. Dans ce cadre, et en vue d'apporter quelques réponses aux interrogations du monde agricole, nous avons adopté la démarche scientifique suivante :

Après un rapide positionnement du sujet, nous avons étudié et mis au point un protocole de test laboratoire de biodégradation respirométrique en conditions aérobies simulant un sol. Ce test, qui a lieu sur support inerte, offre deux avantages. Il permet d'une part de se rapprocher des phénomènes observés dans le sol en offrant une capacité de mesure supérieure, et d'autre part d'extraire les produits et résidus de dégradation. Ce protocole a ainsi été mis en œuvre et comparé à quatre autres méthodes de test pour l'évaluation du taux de biodégradation de trois matériaux.

La mise au point des conditions optimales d'extraction des matériaux et produits de dégradation du support inerte a alors fait l'objet d'une étude approfondie.

Puis, les extraits recueillis ont été étudiés. Pour cela, nous avons d'abord analysé les matériaux avant dégradation afin de connaître leurs structures chimiques et de sélectionner les techniques analytiques les mieux appropriées aux produits de dégradation obtenus en cours et en fin de test. Ces analyses sont en effet indispensables dans l'acquisition de connaissances en vue de déterminer des mécanismes de biodégradation.

Enfin, une étude environnementale rassemblant des tests agronomique et d'écotoxicité a été réalisée afin de déceler une éventuelle toxicité des produits de dégradation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASTM 1992a. D5209-92 Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge.

ASTM 1992b. D5210-92 Standard test method for determining anaerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge.

ASTM 1992c. D5338-92 Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions.

Bewa, H. 1999. Enjeux, utilisation, élimination, avantages et inconvénients des matériaux biodégradables. *Matériaux biodégradables et Environnement*. Paris. ISBN 2-85362-546-X.

CEN 1998a. Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of packing materials under aqueous medium-method by analysis of released carbon dioxide.

CEN 1998b. Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of packaging materials under controlled composting conditions - Method by analysis of released carbon dioxide.

Decriaud-Calmon, A. 1998. Evaluation objective de la biodégradabilité des matériaux polymères : mise au point d'une méthode et d'un dispositif expérimental. *Thèse à l'Institut National Polytechnique de Toulouse*

Decriaud-Calmon, A., Bellon-Maurel, V., Silvestre, F. 1998. Standard methods for testing the aerobic biodegradation of polymeric materials. Review and perspectives. *Advances in Polymer Science*. **135**: p307-226.

ISO 1999a. Determination of the ultimate aerobic biodegradation of plastic materials under simulated composting conditions in an inert, carbon-free fixed bed - Method by analysis of evolved carbon dioxide.

ISO 1999b. Plastics - Determination of the ultimate aerobic biodegradability in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide released.

Müller, R.F., Augusta, J., Walter, T., Widdecke, H. 1994. The development and modification of some special test methods and progress in standardisation of test methods in Germany. in: Y. Doi, K. Fukuda (eds.), *Biodegradable plastics and polymers*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Pays-Bas. p237-249.

OECD 301B. 1992. Guidelines for testing of chemicals. Paris France. ISBN 92-64-12221-4.

Soulas, G. 1999. Risques ecotoxiques des substances xénobiotiques, cas de la microflore des sols. *Matériaux biodégradables et Environnement*. Paris. ISBN 2-85362-546-X.

Van der Zee, M., Sisma, L., Tournois, H., De Wit, D. 1994. Assessment of the biodegradation of water insoluble polymeric materials on aerobic and anaerobic aquatic environments. *Chemosphere*. **28**(10): p1757-1771.

CHAPITRE 1 : POSITIONNEMENT DU
SUJET

CHAPITRE 1 : POSITIONNEMENT DU SUJET	7
1 PROBLÉMATIQUE.....	9
1.1 Réglementation.....	9
1.2 Composition des déchets.....	10
1.3 Traitement des déchets.....	13
1.4 Le cas particulier de l'élimination des plastiques agricoles.....	14
2 DÉFINITIONS ET MÉCANISMES DE DÉGRADATION.....	15
2.1 Définitions.....	15
2.2 Les différentes étapes de la biodégradation.....	18
2.3 Les facteurs biologiques de la biodégradation	19
2.3.1 Les microorganismes.....	19
2.3.2 Les enzymes	19
2.4 Les mécanismes de dégradation.....	20
2.4.1 Hydrolyse chimique.....	20
2.4.2 Hydrolyse biologique	20
2.4.3 Photo-oxydation	21
2.4.4 Oxydation biologique	21
3 ORIGINE ET CLASSIFICATION DES POLYMÈRES BIODÉGRADABLES	22
3.1 Polymères naturels.....	22
3.2 Polymères synthétiques.....	27
3.3 Polymères composites	30
4 MARCHÉ ET APPLICATIONS DES POLYMÈRES BIODÉGRADABLES.....	30
5 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	32

1 PROBLEMATIQUE

Les matériaux polymères synthétiques ont aujourd'hui envahi notre quotidien, et sont présents dans tous les domaines d'application (chirurgie, pharmacologie, emballage, agriculture ...). Leur essor fulgurant provient de leur grande diversité et de leurs nombreuses qualités qui en font des matériaux offrant une palette de propriétés quasi infinie. Ils sont, en effet, économiques, durables, polyvalents et d'un rapport poids/performance, en général, exceptionnel.

Cependant, ils génèrent un volume de déchets considérable qu'il faut éliminer. La production mondiale annuelle de polymères plastiques est de 148 millions de tonnes. L'augmentation constante de cette masse a fait prendre conscience de la nécessité de mettre en place une réglementation adaptée pour le traitement des déchets qu'ils génèrent.

1.1 Réglementation

En droit français, la loi 75-633 du 15 juillet 1975 traite la première de cette question délicate. Elle définit le déchet comme étant un « résidu d'un processus de production, de transformation, ou d'utilisation et cette définition vise aussi toute substance, tout matériau, tout produit ou bien meuble que son détenteur destine à l'abandon ». Une précision est donnée quant au déchet ultime : « Est ultime, au sens de la présente loi, un déchet, résultant ou non du traitement d'un déchet, qui n'est plus susceptible d'être traité dans les conditions techniques et économiques du moment, notamment par extraction de la part valorisable ou par réduction de son caractère polluant ou dangereux ». Elle stipule que le producteur du déchet est responsable de son avenir et que le détenteur doit éliminer ce dernier.

La loi 92-646 du 13 juillet 1992 a rénové la loi cadre 75-633 sur les déchets, en initiant une politique axée sur le développement de la prévention, de la valorisation, et du recyclage. Elle prévoyait la limitation du stockage des déchets réservé, à partir du 1^{er} juillet 2002 (échéance ensuite repoussée), aux seuls déchets ultimes. Elle a donc introduit l'obligation des plans d'élimination des déchets et a créé l'Agence de l'Environnement et de la Matrice de l'Energie (ADEME).

En droit communautaire, la directive 75/442/CEE du 15 juillet 1975 (modifiée en 1991) considère qu'un déchet désigne « toute substance ou objet dont le détenteur se défait ou

a l'obligation de se défaire ». L'omniprésence des déchets d'emballage dans les ordures ménagères où ils représentent 30% en poids (et 50% en volume) des déchets générés par les ménages, a rendu nécessaire leur prise en compte spécifique. La directive européenne 94/62/CEE du 20 décembre 1994 relative aux emballages et aux déchets d'emballage a été mise en place. Elle impose une valorisation globale de l'ensemble des déchets d'emballage comprise entre 50 et 65% du poids, pour 2001, et un taux de recyclage compris entre 25 et 45%. Il est alors nécessaire de faire une collecte dans cinq filières : bois, verre, papier-carton, plastiques et métaux.

1.2 Composition des déchets

La production de déchets ménagers française augmente régulièrement, et est une des plus élevée en Europe (Tableau I-I). En 1998, elle est de 28 millions de tonnes, soit 450 kg/(habitant*an).

Tableau I-I : Evolution de la production des déchets ménagers. Comparaison européenne

Pays	Déchets ménagers (Mt)		Déchets ménagers (kg/(hab.a))	
	1980	1990	1980	1990
France	15.57	20.32	290	360
Allemagne	21.42	21.17	348	333
Royaume Uni	15.50	20.00	312	348
Italie	14.04	20.03	252	348
Espagne	10.10	18.54	270	322
Source : Europe's Environment, statistical compendium for the Dobris Assessment, 1995				

Les plastiques représentent 11.1% en poids humide des déchets ménagers, soit 29.5 millions de tonnes, ce qui correspond à 20% en volume (Miquel *et al.*, 1999) (Figure I-1).

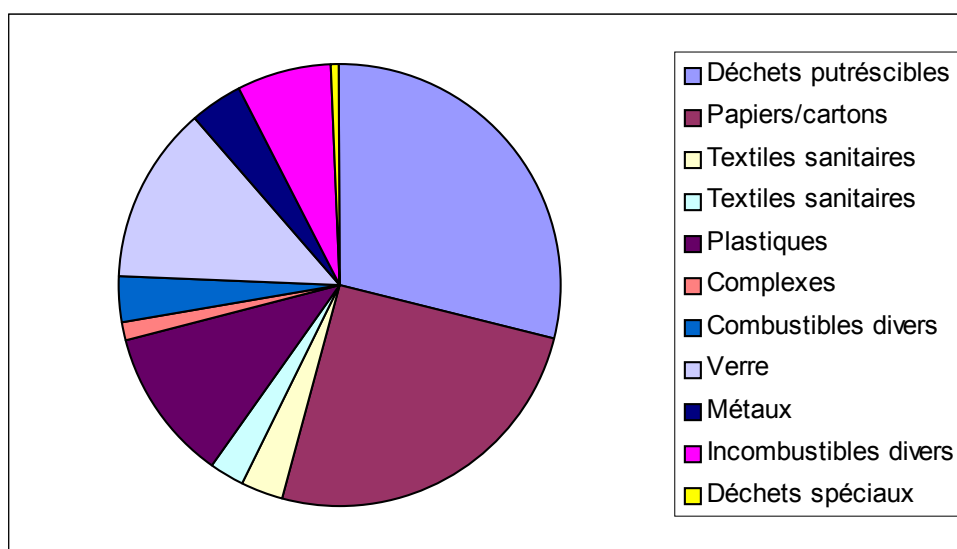


Figure I-1 : Composition des ordures ménagères – moyenne nationale (Répartition en poids humide – 1998) (ADEME, 1998)

Dans le secteur agricole, l'industrie du plastique propose une large gamme de matières et de films. Chaque année, 180000 tonnes sont utilisées en France, dans ce domaine. Le tableau I-II présente la répartition du tonnage des plastiques agricoles selon leur nature.

Tableau I-II : Répartition du tonnage des plastiques agricoles selon leur nature (Miquel *et al.*, 1999)

Films	Tonnage	Utilisation	Caractéristiques
Films de paillage	14 000	<ul style="list-style-type: none"> • Cultures maraîchères (film noir au pied des plantes) • Protection des abords 	<ul style="list-style-type: none"> • PE • Limite l'évaporation, le tassement ou le ravinement des sols (bords d'autoroute). • Agit comme accélérateur de croissance. • Permet une récolte propre en évitant le contact des fruits et légumes avec la terre.
Films de serre et tunnels	17 000	Cultures maraîchères, fleurs (films transparents)	<ul style="list-style-type: none"> • PE • Permet d'obtenir un « microclimat » (réglage température, humidité...). • Favorise la production et permet de modifier le calendrier de production (dates de semis, de récoltes...)
Films d'ensilage	29 000	Silos de protection, fourrages, betteraves (films épais)	<ul style="list-style-type: none"> • PE • Protection étanche en silos
Autres	43 000	Tuyaux	<ul style="list-style-type: none"> • Liens et sacs en PP • Tuyaux en PVC
	18 000	Ficelles	
	17 000	Sacs	
	32000	Divers	

Les déchets provenant des films agricoles représentent des tonnages importants. En effet, ils ne sont pas seulement composés du film plastique d'origine, mais aussi de la saleté qui y adhère (eau, terre et déchets organiques). Les taux de saleté constatés sont

en moyenne de 50%. En considérant que sur les 180000 tonnes de plastiques produites chaque année un tiers est à usage unique, c'est environ 120000 tonnes de déchets qu'il faut éliminer.

1.3 Traitement des déchets

Les voies de traitement des ordures ménagères sont l'incinération, le recyclage, et le compostage et autres traitements biologiques. Les destinations du flux global des déchets sont indiquées dans le tableau I-III.

Tableau I-III : Modes de traitement des ordures ménagères en France en 1998

Modes de traitement	Quantités d'ordures ménagères traitées	
	<i>en millions de tonnes</i>	<i>en %</i>
Recyclage des matériaux	2.2	8.0
Traitements biologiques	1.8	6.6
Incineration		
- sans valorisation énergétique	1.8	6.6
- avec valorisation énergétique	7.9	28.8
Mise en décharge avec un stockage de		
- moins de 3000 t/an	2.9	10.6
- plus de 3000 t/an	10.8	39.4
Total	27.4	100.0

En 1998, 85% des ordures ménagères ont été, soit mises en décharges, soit incinérées. Les traitements biologiques restent encore une voie marginale d'élimination. Le tableau I-IV nous permet de comparer les différentes voies d'élimination utilisées dans les autres pays.

Tableau I-IV : Comparaison des politiques nationales de traitement des déchets (juin 1997)
(Miquel *et al.*, 1999)

Etats	Recyclage	Incinération	Décharge Stockage
France	12% (<i>dont 6% de compost</i>)	40%	48%
Allemagne	18% (<i>dont 2% de compost</i>)	34%	48%
Suède	23% (<i>dont 5% de compost</i>)	40%	37%
Norvège	13% (<i>dont 1% de compost</i>)	18%	69%
Danemark	20%	60%	20%
Pays-Bas	43% (<i>dont 20% de compost</i>)	26%	31%
Belgique (Flandre, Wallonie)	35% - 11%	29% - 31%	36% - 58%
Italie	9% (<i>dont 2% de compost</i>)	6%	85%
Royaume-Uni	25%	5%	70%
Etats-Unis	24%	15%	61%
Japon	11% (<i>dont 2% divers</i>)	74%	15%
Canada	30%	4%	66%
Suisse	39%	47%	14%
Autriche	33% (<i>dont 17% de compost</i>)	12%	55%
Espagne	13% (<i>compost</i>)	4%	83%

Les différents modes de traitement sont, en réalité, complémentaires, adaptés à des situations locales, des contextes historiques ou géographiques particuliers. Il n'y a pas de solution unique, ni même privilégiée. Il n'y a que des solutions adaptées au cas par cas.

1.4 Le cas particulier de l'élimination des plastiques agricoles

Les films agricoles représentent un gisement important (180000 tonnes). Leur élimination par des filières classiques comporte plusieurs opérations préalables : une pré-collecte, une mise en balles et le transport, soit 100 €/t. Pour les raisons suivantes, leur élimination n'est pas aisée :

- Tout d'abord, la loi 92-646 interdit, au niveau national, la mise en décharge des déchets plastiques non ultime, à partir du 1^{er} juillet 2002, ainsi que le « brûlage » en bordure de champ.
- Ensuite, il n'existe pas de filière de récupération et recyclage des déchets plastiques agricoles, parce qu'il est difficile de mettre en place ce genre de système, du fait de la dispersion géographique des exploitations agricoles sur l'ensemble du territoire (ensilage en Bretagne, paillage dans les pays de Loire...) et la saisonnalité (bâches et films sont enlevés quasiment au même moment à la fin du printemps ou de l'automne). Le recyclage de matériaux plastiques souillés par la terre n'est pas simple, puisqu'il nécessite, outre la collecte manuelle, un lavage préliminaire, entraînant une dépense en main d'œuvre, en eau, et la formation de déchets qu'il faut récupérer (eau de lavage, terre...).
- Pour les films de paillage se présentant sous forme de longues bandes, cela nécessite également de sectionner les plastiques avant leur recyclage, induisant un coût supplémentaire de traitement.
- Aussi, les films exposés au soleil subissent une altération de leurs propriétés mécaniques, il faut donc les retirer à la main lors du recyclage et les mélanger à de la résine neuve.
- D'autre part, le recyclage a un coût, et les usines acceptent les déchets pour environ 100 €/t de déchets, et les agriculteurs ne sont pas prêts à payer.

Compte tenu de ces caractéristiques, l'utilisation de plastiques biodégradables pour remplacer les plastiques traditionnels dans les usages uniques en agriculture, semble une issue intéressante.

2 **D**EFINITIONS ET **M**ECHANISMES **D**E **D**EGRADATION

2.1 Définitions

Les définitions concernant la biodégradation ne sont pas claires. Elles vont dépendre, entre autres, du domaine d'application des biopolymères, principalement les domaines du biomédical et de l'environnement naturel. Dans cette thèse, nous nous intéressons aux plastiques utilisés en agriculture, nous discuterons donc seulement de la biodégradation en milieu naturel. De nombreuses définitions ont été officiellement adoptées. Elles dépendent des organismes de normalisation qui les ont écrites, ainsi que des techniques de mesures de la

biodégradabilité et du milieu dans lequel la biodégradation a lieu. Toutes ces définitions ont été répertoriées par Van der Zee (1997).

La distinction entre la dégradation et la biodégradation doit être faite. La dégradation est une modification irréversible dans la structure chimique du polymère impliquant des changements de ses propriétés (Van der Zee, 1997).

Les polymères peuvent être dégradés par cinq types des mécanismes pouvant interagir (Decriaud-Calmon *et al.*, 1998) :

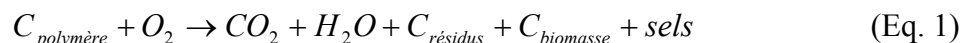
- photodégradation,
- dégradation chimique (hydrolyse, oxydation),
- dégradation thermique,
- dégradation mécanique, et
- biodégradation en présence de microorganismes.

Pour résumer, le terme de biodégradation peut être défini de la façon suivante : « il s'agit d'une fragmentation, par l'action des microorganismes, avec perte des propriétés mécaniques ou avec modification chimique ». La structure du matériau se simplifie pour finalement se convertir en H₂O, CO₂ et/ou CH₄, une nouvelle biomasse et éventuellement en résidus. La biodégradation est donc une dégradation catalysée par des microorganismes. Ces phénomènes de dégradation et biodégradation sont différents, mais il n'est pas aisé, au cours de la désintégration et de la disparition d'un matériau, de séparer la dégradation abiotique et biotique.

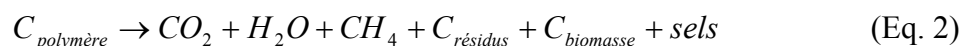
Par ailleurs, le concept d'un « polymère biodégradable acceptable pour l'environnement » a été introduit par Swift (1994). Par conséquent, la définition de la biodégradation doit introduire, en plus du degré de biodégradation, l'impact des produits de dégradation sur l'environnement.

Le processus biochimique est résumé par les équations suivantes (C représente le carbone) :

Conditions aérobies :



Conditions anaérobies :



Au cours de la dégradation d'un matériau, sa structure se simplifie progressivement.

La biodégradation peut donc avoir lieu en présence ou en absence d'oxygène, en milieu solide ou aqueux. Dans notre étude, nous nous focaliserons uniquement sur un de ces quatre environnements : la biodégradation aérobie en milieu solide.

Il existe trois éléments clés indispensables pour la biodégradation (Kaplan *et al.*, 1993; Van der Zee, 1997) :

1. Les microorganismes : la base de tout processus de biodégradation est l'existence de microorganismes capables de synthétiser les enzymes actives sur le polymère cible, afin d'initier le processus de fragmentation et de minéraliser les monomères et oligomères formés par ce processus.
2. L'environnement : certains facteurs sont indispensables au processus de biodégradation, comme la température, l'humidité, les sels minéraux, l'oxygène, l'élément le plus significatif étant l'humidité.
3. Le substrat : la structure du polymère influence le processus de biodégradation. Ces facteurs structuraux comprennent les liaisons chimiques, le degré et le type de ramification, le degré d'hydrophobicité, la stéréochimie, la distribution des masses moléculaires, la cristallinité et d'autres aspects morphologiques.

2.2 Les différentes étapes de la biodégradation

La biodégradation a lieu en deux étapes. : la dégradation primaire (ou partielle) et la dégradation totale. La première étape correspond à des ruptures de chaînes. Il y a fragmentation du polymère. Au cours de cette phase, la surface de contact entre le polymère et les microorganismes augmente. Ainsi, la décomposition des macromolécules en chaînes plus courtes peut avoir lieu (Vert, 1999). Cette étape a généralement lieu à l'extérieur des cellules des microorganismes en raison de la taille et de l'insolubilité de ces macromolécules. Les enzymes extracellulaires sont responsables de ces ruptures. Ce sont des endo-enzymes (clivage au hasard des liaisons internes des chaînes polymères) ou des exo-enzymes (clivage des unités monomères terminales de la chaîne principale) (Kaplan *et al.*, 1993; Van der Zee, 1997).

La deuxième étape correspond à la minéralisation. Lorsque les fragments oligomères formés sont suffisamment petits, ils sont transportés à l'intérieur des cellules où ils sont bioassimilés par les microorganismes, puis minéralisés. Il y a alors formation de gaz (CO_2 , CH_4 , N_2 , H_2), d'eau, de sels, de minéraux et d'une nouvelle biomasse.

Ces deux étapes sont représentées figure I-2.

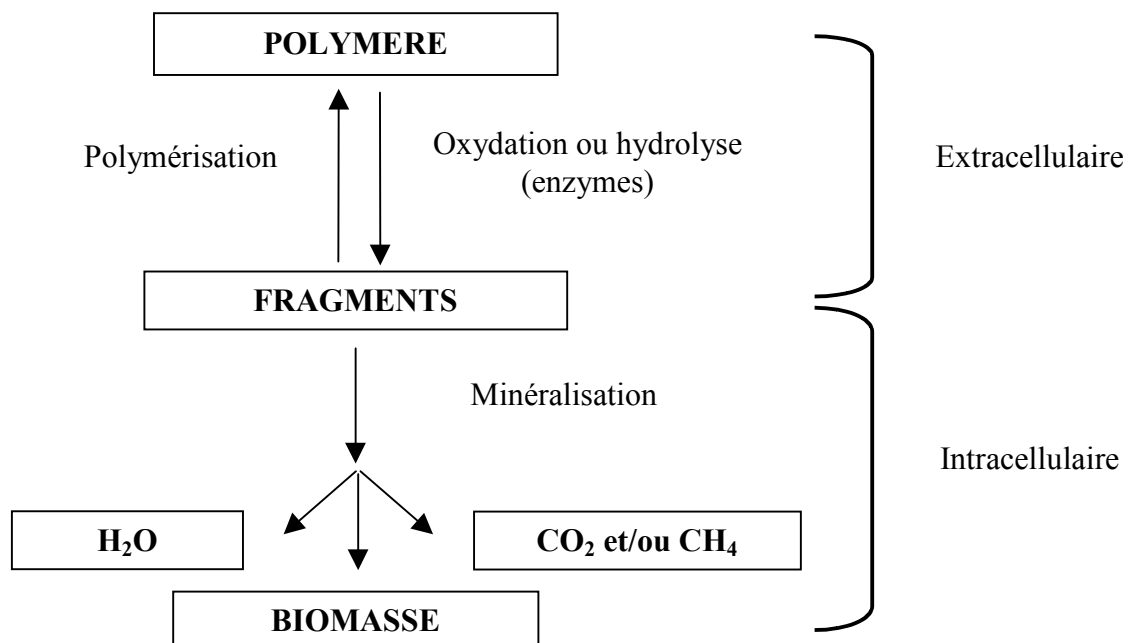


Figure I-2 : Les deux étapes clés du processus de biodégradation (Kaplan *et al.*, 1993; Van der Zee, 1997; Vert, 1999)

2.3 Les facteurs biologiques de la biodégradation

2.3.1 Les microorganismes

Le terme « microorganismes » couvre un groupe hétérogène d'êtres vivants de taille microscopique et pour la plupart, unicellulaires. Les microorganismes appartiennent à deux principaux groupes :

- les procaryotes qui n'ont pas de noyau. Ils comprennent les eubactéries et archéobactéries, et
- les eucaryotes dont l'ADN est contenu dans un noyau délimité par une double membrane. Ils comprennent les protozoaires, les algues unicellulaires et les champignons.

Les champignons et les bactéries ont évolué durant des millions d'années et ont développé la capacité à dégrader toutes sortes de composés chimiques après une période d'adaptation.

2.3.2 Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Elles induisent des augmentations très importantes des vitesses de réaction dans un environnement qui, sans elles, ne serait pas favorable à ces réactions biochimiques. Elles sont produites par les cellules (animales, végétales ou microbiennes).

D'un point de vue structural, toutes les enzymes sont des protéines spécialisées de structure tridimensionnelle et dont les masses moléculaires varient entre 10^3 et 10^6 Da.

L'activité enzymatique d'une enzyme est liée à la structure conformationnelle de ce dernier, qui présente certaines régions spécifiques à sa surface, formant ainsi un site actif. L'activité de l'enzyme disparaît avec la perte de sa conformation. L'interaction entre l'enzyme et le substrat a lieu sur ce site actif et conduit à la réaction chimique. Les sites actifs sont spécifiques pour un substrat donné ou une série de substrats.

Les enzymes sont classées en six groupes, selon leur activité : hydrolases, estérases, isomérasés, réductases, lyases et ligases (Durand *et al.*, 1982; Lenz, 1993). Elles donnent lieu

à différents mécanismes catalytiques. Pour la biodégradation des polymères, ces mécanismes sont typiquement l'hydrolyse et l'oxydation biologiques.

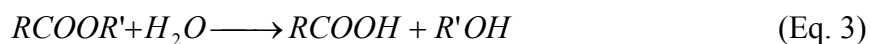
2.4 Les mécanismes de dégradation

L'hydrolyse et l'oxydation peuvent être initiées par des composés chimiques ou biologiques.

2.4.1 Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique est catalysée par un composé acide ou basique.

Dans le cas particulier des polyesters, la réaction est la suivante (Torres de Dominiguez, 1995) :



Le sous-produit RCOOH est un acide qui est capable d'accélérer l'hydrolyse par autocatalyse. D'un point de vue macroscopique, cette hydrolyse s'effectue en deux étapes. La première est une hydrolyse chimique au hasard de la chaîne, qui conduit à une diminution de la masse moléculaire. Au cours de la deuxième étape, les fragments moléculaires sont solubilisés et assimilés par un processus biologique. Cette dégradation a lieu préférentiellement dans la partie amorphe du polymère (Torres *et al.*, 1996).

2.4.2 Hydrolyse biologique

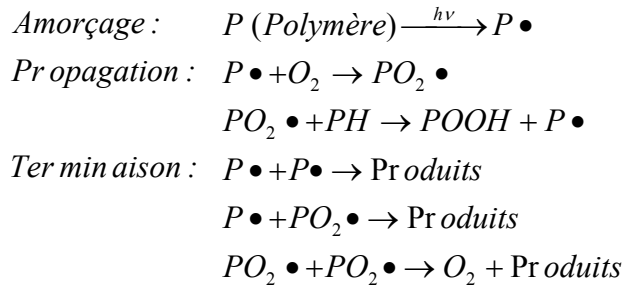
Contrairement à l'hydrolyse chimique, l'hydrolyse biologique est catalysée par des enzymes. Un nombre important d'enzymes est utilisé, dépendant du type de liaisons à hydrolyser. En général, ce sont des dépolymérase. Les liaisons glycosidiques, peptidiques et esters sont affectées par ce type de réaction (Van der Zee, 1997).

Les produits de dégradation d'un hydrolyse biologique ou chimique sont les mêmes. La différence réside dans le type de catalyse mise en œuvre.

A cause de la taille des enzymes, les réactions biologiques ont lieu à la surface du polymère. Ainsi, avec une hydrolyse enzymatique, la masse du polymère décroît, alors que sa masse molaire ne change pas. Le phénomène contraire est observé pour l'hydrolyse chimique.

2.4.3 Photo-oxydation

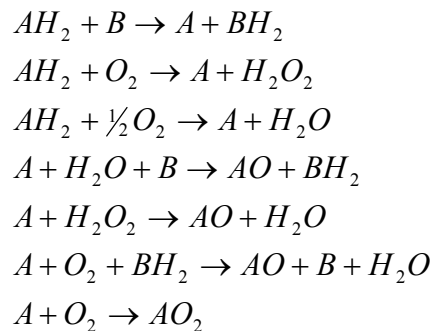
La photo-oxydation est un phénomène mis en œuvre dans les plastiques photo-dégradables. Elle peut être accélérée par l'ajout de réactifs oxydants (Scott, 2002) et est initiée par la lumière naturelle. L'oxydation des polymères passe par la formation d'hydroperoxydes (Philipart) :



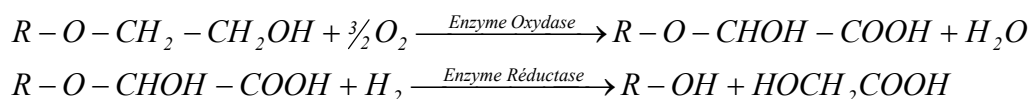
Dans le cas particulier de la dégradation du polypropylène, une voie d'oxydation conduit à la formation d'hydroperoxydes tertiaires associés. La décomposition des hydroperoxydes conduit principalement à la formation de produits de faibles poids moléculaires : acide acétique, acétone et méthanol (Commereuc *et al.*, 1997).

2.4.4 Oxydation biologique

L'oxydation biologique est catalysée par un large groupe d'enzymes appelées oxydoréductases. Les réactions pouvant être catalysées par ces enzymes sont les suivantes (Van der Zee, 1997) :



La biodégradation de polyéthylène glycols de faibles masses moléculaires est un exemple de dégradation par oxydation enzymatique.



3 ORIGINE ET CLASSIFICATION DES POLYMERES

BIODEGRADABLES

Les polymères issus de la pétrochimie sont considérés comme non biodégradables. Par exemple, plusieurs siècles sont nécessaires pour minéraliser totalement le polyéthylène. Cependant pour être utilisable, un matériau ne doit pas être seulement biodégradable, mais aussi avoir des propriétés mécaniques indispensables à son usage. Les matériaux biodégradables seront donc fabriqués soit à base de polymères naturels modifiés afin d'en améliorer les propriétés mécaniques, soit à base de polymères synthétiques susceptibles d'être attaqués par les microorganismes.

On peut diviser les biopolymères en trois familles distinctes : les polymères naturels, les polymères synthétiques et les polymères composites provenant de mélanges des polymères des deux autres familles.

3.1 Polymères naturels

Les biopolymères sont des polymères formés, dans la nature, au cours des cycles de croissance de tous les organismes. Ils sont considérés comme étant des polymères naturels. Leur synthèse est généralement catalysée par une enzyme (Chandra *et al.*, 1998).

Les polysaccharides représentent une famille caractéristique de ces polymères naturels, avec notamment la cellulose et l'amidon. Ces deux polymères sont formés par la répétition de la même unité glucopyranose, dans une conformation différente. Les enzymes responsables de l'hydrolyse de la liaison acétale (entre les unités monomères) ne seront donc pas les mêmes dans le cas des différents polysaccharides. La figure I-3 montre quelques exemples de structure de polysaccharides.

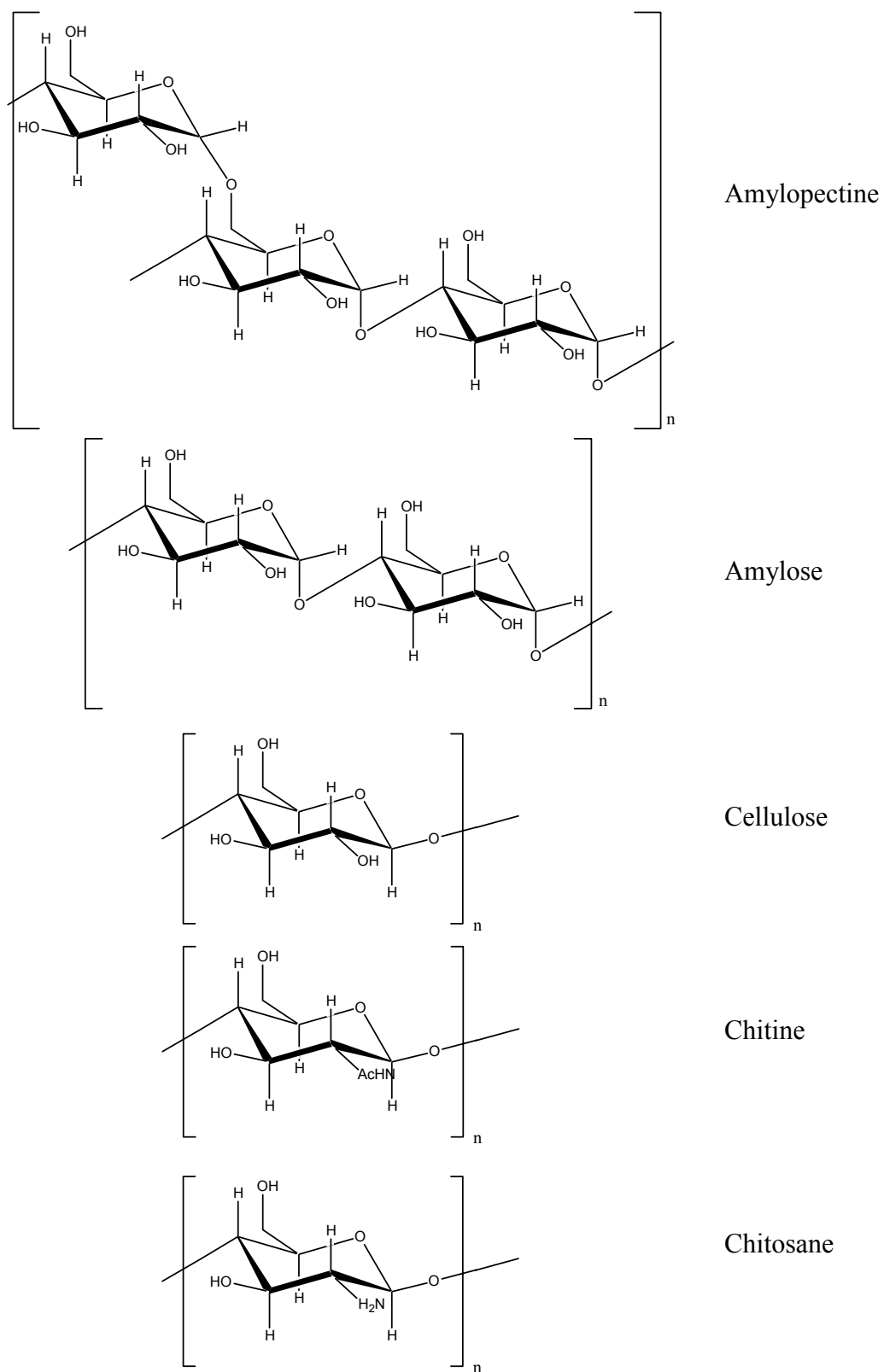
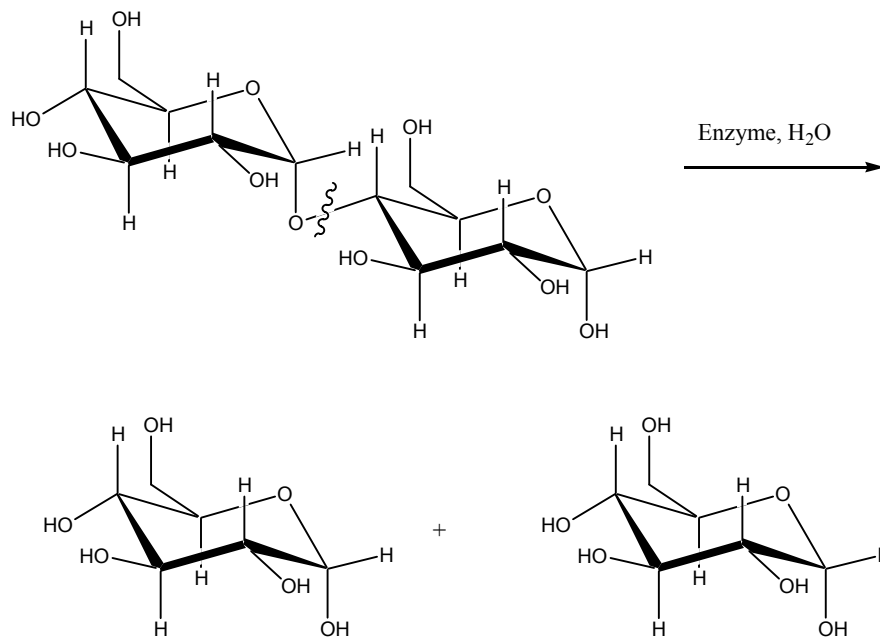


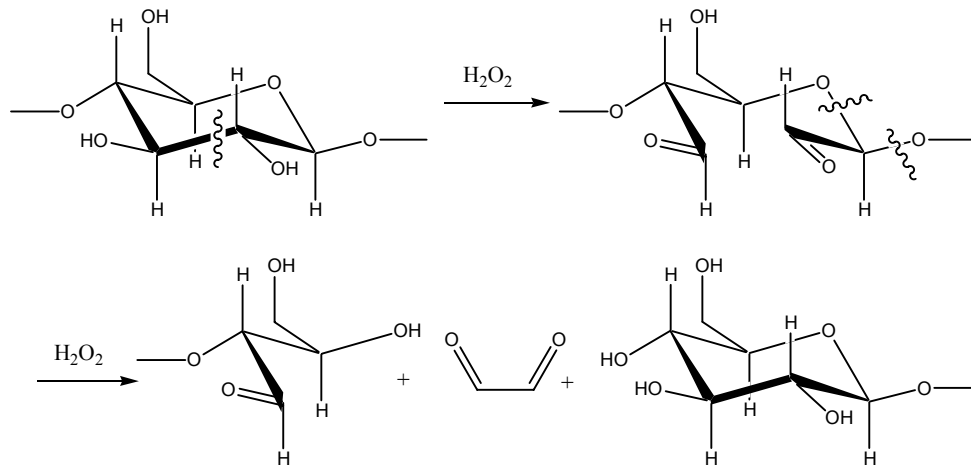
Figure I-3 : Structures de différents polysaccharides

L'amidon extrait principalement de la pomme de terre, du maïs, du blé et du riz, contient de l'amylose, polymère linéaire et cristallin ; et de l'amylopectine, polymère ramifié et amorphe. Selon la proportion d'amylose et d'amylopectine, les matériaux obtenus à partir d'amidon auront des propriétés mécaniques et de biodégradabilité différentes (Fredriksson *et al.*, 1998; Ratnayake *et al.*, 2001). La biodégradation de l'amidon est réalisée en présence d'amylase et de glucosidase (Chandra *et al.*, 1998; Yukata *et al.*, 1990) (Figure I-4a). Ses produits de dégradation ne sont pas toxiques. L'amidon a donc de fortes potentialités pour être utilisé comme matériau biodégradable.

La cellulose, principal constituant des parois cellulaires végétales, est un polymère linéaire très long qui consiste en la répétition d'une seule unité monomère. Elle est donc particulièrement cristalline et insoluble dans tous solvants. La biodégradation de la cellulose procède par oxydation. Une des enzymes nécessaire est la peroxydase (Figure I-4b). Comme pour l'amidon, ses produits de dégradation sont inoffensifs pour l'environnement.



a)



b)

Figures I-4 : Hydrolyse enzymatique de, a- l'amidon et b- la cellulose

La chitine est une macromolécule que l'on trouve dans les coquilles de crustacés et d'insectes. Elle peut être dégradée par la chitinase. Les fibres de chitine pourraient être utilisées, entre autres applications potentielles, pour fabriquer de la peau artificielle ou des fils de sutures absorbables. La chitine et la chitosane sont biocompatibles.

D'autres polymères naturels peuvent être utilisés pour produire des matériaux biodégradables comme les protéines (la gélatine, la caséine, la soie et la laine). Les protéines sont des copolymères constitués d'arrangements réguliers de différents acides α -aminés. Elles ne sont, généralement, pas solubles sans se dégrader. Elles sont alors utilisées à l'état natif. La gélatine, en revanche, est soluble dans l'eau et trouve de nombreuses applications industrielles, pharmaceutiques et biomédicales. La biosynthèse des protéines est un processus complexe qui fait intervenir différentes enzymes. En revanche, la biodégradation des protéines est beaucoup plus simple : les protéases hydrolysent la fonction amide (Chandra *et al.*, 1998).

Afin d'augmenter les propriétés mécaniques ou d'ajuster la vitesse de biodégradation de ces biopolymères, on les soumet à des modifications chimiques. L'amidon est généralement utilisé sous forme thermoplastique. Pour cela, l'amidon natif est mélangé à de l'eau et à un plastifiant, généralement le glycérol, et subit de fortes températures et pressions. Suivant les conditions, on peut obtenir un matériau de l'état vitreux à caoutchoutique (Averous *et al.*, 2001). Afin de modifier la cellulose, des esters de cellulose sont synthétisés,

comme par exemple l'acétate de cellulose obtenu par la réaction entre l'anhydride acétique et la cellulose. Il est possible de faire varier le degré de substitution. Les propriétés mécaniques et de biodégradation évoluent en sens inverse du degré de substitution (Gu *et al.*, 1993a; Gu *et al.*, 1993b). De même que pour les polysaccharides, il est possible de greffer des groupements sur les protéines afin d'ajuster la vitesse de dégradation (Chandra *et al.*, 1998).

De nouveaux polymères carbohydrates plus complexes ont été produits par les bactéries et les champignons. De même, les polyesters naturels produits par une grande variété de bactéries à partir de ressources renouvelables ont reçu un intérêt croissant ces dernières années. La majorité des études menées sur ces polymères portent sur les polyhydroxyalcanoates. Les constituants de cette famille de biopolymères thermoplastiques, dont la structure générale est indiquée en figure I-5, voient leurs propriétés mécaniques varier d'une structure cassante et rigide à une structure flexible, suivant la taille du groupement alkyle R (Chandra *et al.*, 1998; Lenz, 1993). Leur composition, leur masse moléculaire et le rendement de production dépendent de la source de carbone et des nutriments.

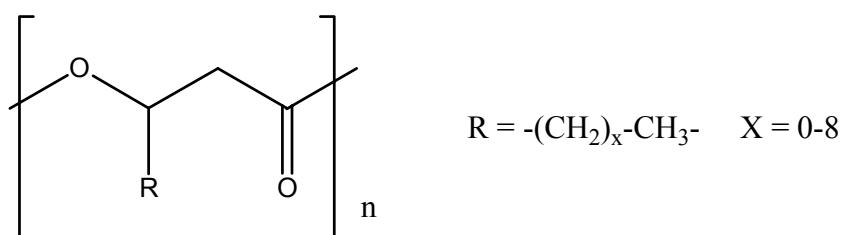


Figure I-5 : Structure générale des polyhydroxyalcanoates

Parmi ces polyhydroxyalcanoates, le plus couramment étudié est le copolymère de poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) PHBV (Figure I-6). Il est obtenu par fermentation de sucre par des bactéries *Alcaligènes eutrophus*. Après avoir connu un essor important dans les années 80, la fabrication a été abandonnée pour des raisons de coûts. Les techniques liées au génie génétique ayant évolué, il fait, à présent, de nouveau partie des matériaux les plus prometteurs.

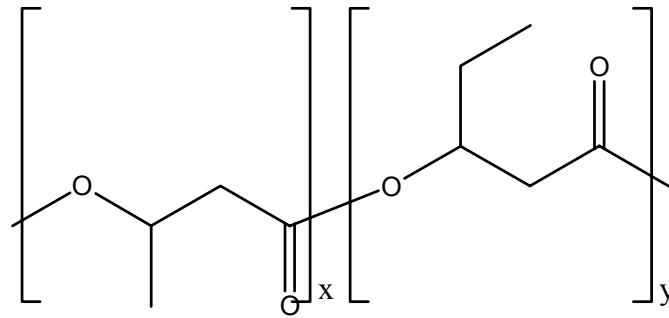


Figure I-6 : Structure du polyester naturel poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate)

La biodégradation de ces polymères s'effectue par décrochages successifs du groupement monomère terminal de la chaîne. Les enzymes entrant en jeu sont des estérases provenant de bactéries *Pseudomonas*.

3.2 Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques, issus de la pétrochimie, comme les polyoléfines, ne sont pas biodégradables. En revanche, les polymères renfermant des liaisons hydrolysables, comme les esters ou les amides, sont susceptibles d'être biodégradables dans certaines conditions.

Les premières recherches, concernant les polyesters, ont porté sur les polyesters aliphatiques comme les poly(acide glycolique), les poly(acide lactique) et le polycaprolactone (Figure I-7), ainsi que sur leurs mélanges. Ils trouvent principalement leurs applications dans le domaine médical (Vert *et al.*, 1997).

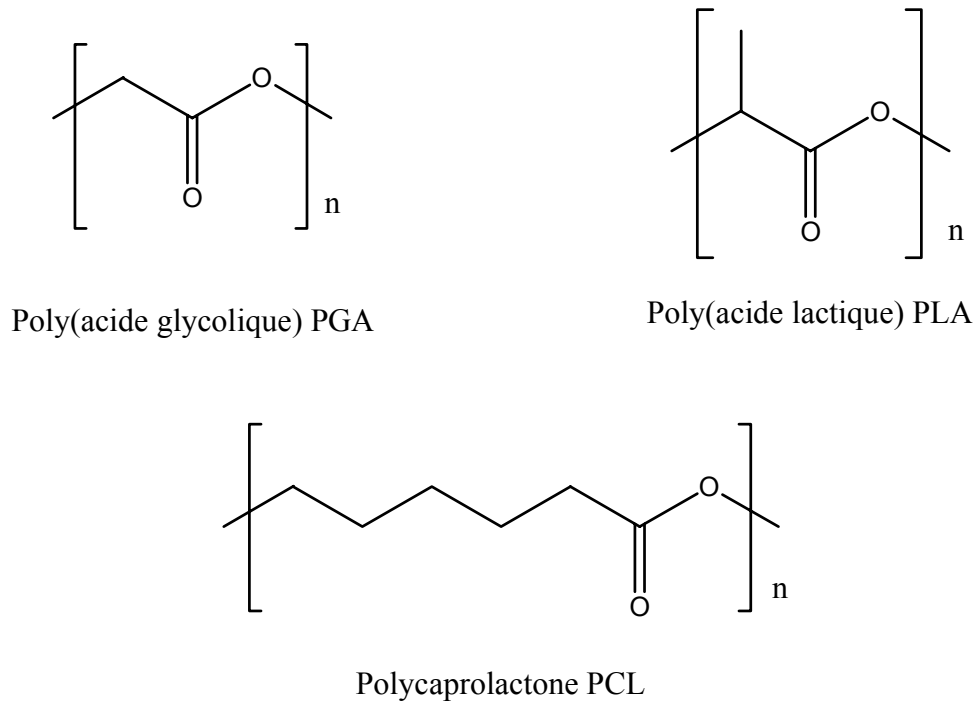


Figure I-7 : Structure de quelques polyesters aliphatiques biodégradables

Toute une gamme de polyesters et copolyesters aliphatiques d'unités monomères plus ou moins longues a été développée. Il a été montré que les polyesters dérivant d'unités monomères moyennes (C_6 - C_{12}) sont attaqués majoritairement par les champignons (*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*) (Chandra *et al.*, 1998). Malgré leur taille élevée, la flexibilité des chaînes aliphatiques permet aux liaisons esters d'être facilement attaquées par les enzymes.

Cependant les propriétés mécaniques de ces polyesters sont inférieures à celles des polymères non biodégradables. Pour les améliorer, aux unités répétitives aliphatiques ont été ajoutées des unités répétitives aromatiques. Shaik *et al.* (2001) présentent toute une gamme de copolyesters aliphatiques aromatiques de différentes tailles (Figure I-8).

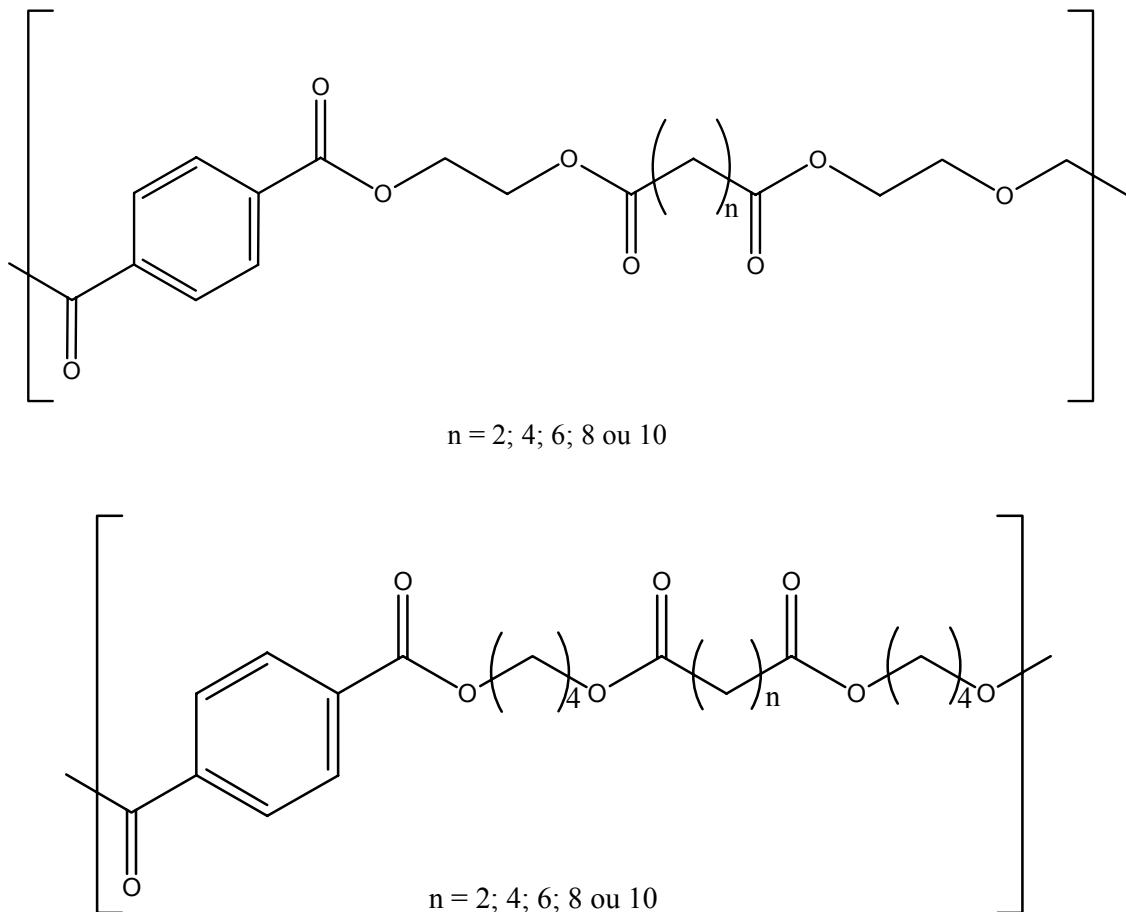


Figure I-8 : Structures de copolymères aliphatiques aromatiques

Actuellement, un de ces copolyesters est fréquemment étudié. Il s'agit du poly(butylène adipate-co-téréphtalate). Sa structure est celle du deuxième copolyester de la figure I-8, où $n=4$. Il est commercialisé par BASF sous le nom d'Ecoflex®. Witt *et al.* (1997) ont montré que ce copolyester présente de bonnes propriétés mécaniques et thermiques pour une concentration supérieure à 35% molaire en acide téréphtalique (par rapport à la quantité totale d'acide), mais que son taux de biodégradation diminue fortement pour une concentration supérieure à 55%. Il est donc important de choisir précautionneusement le rapport aliphatique sur aromatique lors de la synthèse. Pour une concentration en acide téréphtalique comprise entre 35 et 55% molaire, le copolyester présente un bon compromis entre la biodégradabilité et les propriétés d'utilisation.

D'autres polymères contenant des liaisons hydrolysables ont été développés comme :

- les polymères vinyliques, tel que le poly(alcool vinylique),
- les polyamides

- les polyuréthanes

Cependant, il est nécessaire d'étudier minutieusement la dégradation des polyamides et des polyuréthanes, car leurs produits de dégradation sont susceptibles d'être toxiques.

3.3 Polymères composites

Il est possible d'obtenir des matériaux biodégradables en mélangeant les différents polymères décrits dans les paragraphes précédents.

Les premiers matériaux, biofragmentables, ont été confectionnés en introduisant de l'amidon dans une matrice polyéthylène, non biodégradable. La dégradation de l'amidon provoquait une rupture des chaînes polymères et ainsi une fragmentation du matériau et une disparition visuelle. Cependant, le polyéthylène restait intact. Une autre technique pour dégrader les polyoléfines consiste à introduire dans la chaîne des agents oxydants qui vont réagir aux UV et donc induire une dégradation par photo-oxydation. La biodégradabilité de ce type de matériaux n'a toutefois jamais été prouvée de façon sérieuse.

Des matériaux composites biodégradables sont fabriqués à partir de polymères synthétiques biodégradables (Paragraphe 3.2) et de produits naturels comme l'amidon. Le Mater-Bi®, de Novamont, à base de polycaprolactone et d'amidon, en est un exemple. La présence d'amidon majoritaire permet d'accélérer la dégradation du PCL. D'autres polymères synthétiques de biodégradabilité plus lente peuvent être utilisés afin de faire varier la vitesse de biodégradation, en fonction de son usage.

4 MARCHE ET APPLICATIONS DES POLYMERES BIODÉGRADABLES

De nombreuses sociétés à travers le monde développent divers polymères biodégradables et récemment des produits thermoplastiques plus proches de l'environnement sont apparus sur le marché, comme le Mater-Bi® fabriqué par Novamont. Ces matériaux lorsqu'ils sont synthétisés à partir de ressources renouvelables (amidon, glucose...), sont à priori biodégradables.

Autobar Packaging est l'un des premiers à avoir lancé, en 1998, sur le marché allemand un produit d'emballage biodégradable. Il a, par la suite, été abandonné pour des raisons de coût.

Le tableau I-V rassemble quelques matériaux produits et leurs utilisations.

Tableau I-V : Les principaux matériaux sur le marché et leur utilisation

Matériau	Composition	Applications	Société
Mater Bi	Amidon + polyester	Sacs de collecte des déchets verts, films agricoles, couverts jetables...	Novamont (Italie)
Polynat	Farine de seigle (80%)	Couverts jetables, pots de fleurs	Roverc'h (France)
Ecofoam	Amidon	Emballages de calage	American Excelsior Company (USA)
Biopol	PHB/PHV	Rasoirs, bouteilles	Goodfellow (Grande Bretagne)
Eco-pla	PLA	Produits d'hygiène, vêtements de sport, conditionnement et emballage	Cargill Dow (USA)
Bio-D (non commercialisé)	Protéines issues de farines de graines de coton	Films agricoles (extrusion)	Cirad (France)
Ecoflex	Co-polyester	Films agricoles	BASF (Danemark)
Eastar Bio	Co-polyester	Films agricoles	Eastman (Grande Bretagne)
BAK 1095	Polyester amide	Couverts jetables, pots de fleurs	Bayer (Danemark)

La production mondiale de plastiques biodégradables était de 14000 t/an en 1996 et devrait avoisiner les 500000 t/an en 2005 (Bewa, 1999).

En Europe, Novamont devrait produire 20000 t/an de Mater-Bi courant 2002, le double de l'année passée. Bayer produisait, en 2000, 4000 t de BAK. Quant à BASF, sa capacité actuelle est de 8000 t d'Ecoflex, et devrait augmenter d'ici deux ans en fonction de la

demande. Eastman possède une unité de production européenne d'une capacité de 15000 t. Par conséquent, en Europe, la capacité annuelle est de 43000 t/an en 2002, soit la production estimée en 1996 au niveau mondial.

Aux USA, Cargill Dow produisait 140000 t/an de PLA fin 2001, pour un marché local de 35000 t, le reste étant destiné à l'exportation. On peut estimer la production mondiale pour 2002 à 180000 tonnes, soit un décuplement en 5 ans.

Ceci devrait contribuer à une diminution des prix des matières premières, principal frein au développement des matériaux biodégradables. L'autre frein, qui commence à apparaître et qui a justifié notre étude, est l'inquiétude croissante des utilisateurs sur la nature et le devenir des résidus du matériau après dégradation.

5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADEME 1998. Déchets municipaux : les chiffres clés 2e édition.

Averous, L., Fringant, C. 2001. Association between plasticized starch and polyesters : Processing and performance of injected biodegradable systems. *Polymer Engineering and Science*. **41**(5): p727-734.

Bewa, H. 1999. Enjeux, utilisation, élimination, avantages et inconvénients des matériaux biodégradables. *Matériaux biodégradables et Environnement*. Paris.

Chandra, R., Rustgi, R. 1998. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* **23**: p1273-1335.

Commereuc, S., Vaillant, D., Philipart, J.L., Lacoste, J., Lemaire, J., Carlsson, D.J. 1997. Photo and thermal decomposition of iPP hydroperoxides. *Polymer Degradation and Stability*. **57**(2): p175-182.

Decriaud-Calmon, A., Bellon-Maurel, V., Silvestre, F. 1998. Standard methods for testing the aerobic biodegradation of polymeric materials. Review and perspectives. *Advances in Polymer Science*. **135**: p307-226.

Durand, G., Monsan, P. 1982. Les enzymes. Productions et utilisations industrielles. Bordas, Paris.

- Fredriksson, H., Silverio, J., Andersson, R., Eliasson, A.C., Aman, P.** 1998. The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*. **35**: p119-134.
- Gu, J.D., Eberiel, D., McCarthy, S.P., Gross, R.A.** 1993a. Degradation and mineralisation of acetate de cellulose acetate in simulated thermophilic compost environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **1**(4): p281-291.
- Gu, J.D., Eberiel, D.T., MacCarty, Gross, R.A.** 1993b. Cellulose acetate biodegradability upon exposure to simulated aerobic composting and anaerobic bioreactor environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **1**(2): p143-153.
- Kaplan, D.L., Mayer, J.M., Ball, D., McCassie, J., Allen, A.L., Stenhouse, P.** 1993. Fundamentals of Biodegradable Polymers. in: C. Ching, D.L. Kaplan, E.L. Thomas (eds.), *Biodegradable Polymers and Packaging*. Technomic publishing, Inc., Lancaster, Pennsylvanie. p1-42.
- Lenz, R.W.** 1993. Biodegradable polymers. *Advances in Polymer Science*. **107**: p1-40.
- Miquel, G., Poignant, S.** 1999. Les techniques des recyclage et de valorisation des déchets ménagers et assimilés. *Assemblée Nationale N°1693, Sénat N°415*
- Philipart, J.L.** Eléments d'un modèle cinétique de photooxydation apparente du polypropylène. <http://www.philippart.free.fr/cinet.html>.
- Ratnayake, W.S., Hoover, R., Shahidi, F., Perera, C., Jane, J.** 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*pisum sativum L.*) cultivars. *Food Chemistry*. **74**: p189-202.
- Scott, G.** 2002. The scientific basis of standards for biodegradable plastics. *The Industrial Applications of Bioplastics 2002*. York, UK.
- Shaik, A.-A., Richter, M., Kricheldorf, H.R., Krüger, R.-P.** 2001. New polymer syntheses. CIX. Biodegradable, alternating, copolyesters of terephthalic acid, aliphatic dicarboxylic acids, and alkane diols. *Journal of Polymer Science : Part A : Polymer Chemistry*. **39**: p3371-3382.
- Swift, G.** 1994. Expectations for biodegradation testing methods. in: Y. Doi, K. Fukuda (eds.), *Biodegradable Plastics and Polymers*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Pays-Bas.
- Torres, A., Li, S., Roussos, S., Vert, M.** 1996. Poly(lactic acid) degradation in soil or under controlled conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. **62**(13): p2295-2302.

Torres de Dominiguez, A. 1995. Degradaation et biodegradation de polymères d'acide lactique. *Thèse à l'Université de Montpellier I*

Van der Zee, M. 1997. Structure-Biodegradability relationships of polymeric materials. *Thèse à l'Université de Twente. Pays-Bas.*

Vert, M. 1999. Intérêts et enjeux des matériaux biodégradables. *Matériaux biodégradables et environnement.* Paris.

Vert, M., Li, S., Garreau, H., Mauduit, J., Boustta, M., Schwach, G., Engel, R., Coudane, J. 1997. Complexity of the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters. *Angewandte Makromolekulare Chemie.* **247**: p239-253.

Witt, U., Muller, R.J., Deckwer, W.D. 1997. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *Journal of Environmental Polymer Degradation.* **5**(2): p81-89.

Yukata, T., Akira, I., Masatoshi, K. 1990. Development of biodegradable plastics containing polycaprolactone and/or starch. *Polymeric Materials Science and Engineering.* **63**: p742-749.

CHAPITRE 2 : MISE EN PLACE D'UN
PROTOCOLE DE TEST DE BIODEGRADATION
EN MILIEU SOLIDE LABORATOIRE

CHAPITRE 2 :	MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE DE TEST DE BIODEGRADATION EN	
MILIEU SOLIDE LABORATOIRE.....		36
1	INTRODUCTION	39
2	SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	40
2.1	<i>Nature du support et incidence sur l'inoculum.....</i>	<i>40</i>
2.1.1	Sol.....	40
2.1.2	Compost.....	42
2.1.3	Vermiculite	45
2.2	<i>Evaluation de la biodégradabilité.....</i>	<i>46</i>
2.2.1	Mesures courantes	46
2.2.2	Le cas particulier de la vermiculite	47
2.2.3	Critères de validité.....	48
2.3	<i>Rapport C/N.....</i>	<i>48</i>
2.4	<i>Le taux d'humidité.....</i>	<i>49</i>
2.4.1	Régulation du taux d'humidité	49
2.4.2	Sol.....	50
2.4.3	Compost.....	50
2.5	<i>La température.....</i>	<i>51</i>
2.5.1	Sol.....	51
2.5.2	Compost.....	51
2.5.3	Conclusion.....	52
2.6	<i>Mesure et influence du pH.....</i>	<i>52</i>
2.6.1	Sol.....	53
2.6.2	Compost.....	53
2.6.3	Conclusion.....	53
2.7	<i>Concentration des polymères dans le support.....</i>	<i>53</i>
2.7.1	Sol.....	54
2.7.2	Compost.....	54
2.7.3	Vermiculite	55
2.7.4	Conclusion.....	55
2.8	<i>Durée du test.....</i>	<i>55</i>
2.8.1	Sol.....	55
2.8.2	Compost et vermiculite.....	55
2.9	<i>Aération et débit.....</i>	<i>56</i>
2.10	<i>Autres conditions.....</i>	<i>56</i>
2.11	<i>Comparaison des dégradations en sol et en compost.....</i>	<i>57</i>
2.12	<i>Conclusion.....</i>	<i>58</i>
3	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	62
3.1	<i>Description générale de la manipulation.....</i>	<i>62</i>
3.1.1	Montage expérimental	62

3.1.2	Protocole de test	65
3.1.3	Préparation des extraits de sol	65
3.2	<i>Etude du support inerte</i>	65
3.3	<i>Etude de la phase d'activation</i>	67
3.3.1	Choix de la composition de la solution inoculum	67
3.3.2	Choix de la durée de la phase d'activation	70
3.3.3	Comparaison de deux protocoles d'activation	70
3.3.3.1	Activation individuelle	71
3.3.3.2	Activation commune	71
3.3.3.3	Biodégradation de la cellulose après activation	71
3.4	<i>Automatisation du banc « solide »</i>	72
4	RÉSULTATS ET DISCUSSION	74
4.1	<i>Etude du support inerte</i>	74
4.2	<i>Etude de la phase d'activation</i>	76
4.2.1	Choix de la composition de la solution d'inoculum	76
4.2.2	Choix de la durée de la phase d'activation	80
4.2.3	Comparaison de deux protocoles d'activation	81
4.3	<i>Automatisation du banc solide</i>	83
5	CONCLUSION	84
6	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85

1 INTRODUCTION

Notre objectif est de développer une méthode rapide (donc laboratoire), proche du milieu naturel (comme le sol ou le compost), nous permettant de récupérer et d'analyser les résidus générés et leur toxicité éventuelle afin d'étudier plus finement les mécanismes mis en jeu lors de la biodégradation de ces matériaux.

En milieu aqueux, les tests sont plus simples à mettre en œuvre et sont généralement plus reproductibles. Ils présentent, cependant, l'inconvénient majeur de ne pas être représentatifs des conditions réelles de biodégradation qui a lieu préférentiellement dans des milieux solides, sol ou compost. Les mécanismes peuvent être différents et donc conduire à des conclusions erronées comme le démontrent Pagga *et al.* (1995) et Tosin *et al.* (1998).

Les études concernant la biodégradation en sol naturel ou en compost sont relativement bien décrites dans la littérature. Cependant, l'extraction des résidus sur ces milieux complexes n'est pas aisée. Nous avons donc cherché à mettre en place une méthodologie d'étude de la biodégradation de films plastiques sur un milieu inerte en laboratoire.

La première étape de notre recherche a été de dresser l'état de l'art des méthodes d'étude de matériaux et produits biodégradables en milieu solide aussi bien en conditions réelles qu'en laboratoire, sur divers milieux comme le compost, le sol ou les supports inertes. Cette étude bibliographique avait pour but d'analyser les paramètres environnementaux qui influencent les cinétiques de biodégradation en milieux solides, de décrire les méthodes de mesure employées et d'étudier la potentialité d'utiliser un support inerte.

Outre les propriétés intrinsèques du polymère qui influencent le taux de biodégradabilité (structure, nature physico-chimique et morphologie), celui-ci peut également varier en fonction des paramètres propres à la fermentation en milieu solide.

En analysant l'influence de ces paramètres sur le degré de biodégradation, nous déduisons des conditions optimales pour une dégradation accélérée, représentative des phénomènes ayant lieu en milieu naturel, et facile à étudier par prélèvements.

2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Nature du support et incidence sur l'inoculum

D'après la bibliographie, il est possible de travailler sur trois supports différents : sol, compost et vermiculite (simulation de compost). La plupart des articles concernant la biodégradation en milieu solide, décrivent des manipulations menées sur compost. Celles sur sol sont généralement effectuées en conditions réelles. Le problème avec le sol réside dans la difficulté d'obtenir un inoculum correct et de faire survivre les microorganismes exogènes. La vermiculite est une alternative intéressante et l'inoculation, grâce à un inoculum provenant d'un compost, s'est avérée efficace. En revanche, aucun article ne s'est intéressé à l'inoculation de la vermiculite avec un extrait de sol.

2.1.1 Sol

Dans les expérimentations sur sol en laboratoire, on utilise généralement un sol « naturel » qui contient du sable (majoritaire), du limon et de l'argile, et de la matière organique (Keursten *et al.*, 1996; Yabannavar *et al.*, 1993). Ce sol est tamisé avant utilisation. Les particules doivent avoir une taille inférieure à 2mm. De même les plantes, pierres et autres matériaux inertes sont ôtés lors du tamisage (ISO, 1999b). En effet la granulométrie du sol est un facteur important. On utilisera un sol à granulométrie assez faible pour permettre une bonne répartition des composés et faciliter le passage de l'eau et l'aération, mais suffisamment élevée pour éviter un tassement du sol pouvant provoquer des conditions anaérobies.

Le sol utilisé est collecté à la surface des champs ou des forêts, dans la couche appelée rhizosphère (car le sol y subit l'influence des racines). La quantité et la diversité des microorganismes y sont alors importantes (Holden *et al.*, 1997). Mais l'inconvénient de cette couche est que la température, le pH, l'humidité et l'apport en oxygène suivent des cycles diurnes et saisonniers. Leurs valeurs sont beaucoup moins stables que celles rencontrées pour les sols sous-surfaciques.

En conditions réelles, les matériaux sont enfouis à une faible profondeur, entre 10 et 20 cm, (Akahori *et al.*, 1994; Angehrn *et al.*, 1999; Sawada, 1994). Comme en laboratoire, on se place dans des conditions où les microorganismes sont les plus nombreux et les plus variés.

Nishioka *et al.* (1994) ont étudié la dégradation de différents types de Bionolle (polyester synthétique composé de différents α,ω -diols aliphatiques et acides dicarboxyliques) dans différents sols (cendres volcaniques, « gley », « red-yellow » et sable) : le degré de biodégradabilité dépend du type et des ratios de populations de microorganismes présents dans le sol et donc du type de sol.

D'autres études effectuées à la même époque confirment cette constatation (Eya *et al.*, 1994; Sawada, 1994). Les pertes de poids mesurées par Eya *et al.* (1994) peuvent avoir des différences allant jusqu'à un rapport 7 entre les différents sols. Les mesures effectuées au microscope électronique à balayage confirment cette influence du sol. De plus, ces chercheurs pensent que l'utilisation d'un seul sol invalide le test et qu'il est préférable de travailler avec un mélange de sols pour augmenter la diversité microbienne.

Ceci est en contradiction avec les premiers résultats obtenus par Goheen *et al.* (1991) qui ont étudié l'influence de la nature du sol, et ainsi de la quantité de matière organique sur le taux de biodégradabilité. Trois types de sol, le limon, l'argile et le sable, préalablement tamisés, sont testés. Les matériaux testés sont des mélanges d'amidon et de polyéthylène (PE) majoritaire. La nature du sol ne semble pas avoir d'influence, mais les conclusions de Goheen *et al.* (1991) proviennent du fait que les polymères sont majoritairement à base de polyéthylène et se dégradent très peu. Ces matériaux ne sont plus considérés, aujourd'hui, comme biodégradables, mais biofragmentables.

Pour obtenir une meilleure reproductibilité et comparer plus facilement les résultats, il est possible d'utiliser un sol « standard ». Il n'est pourtant pas évident de définir un sol standard étant donné que sa composition n'est pas toujours constante suivant les auteurs. Södergard *et al.* (1996) et Witt *et al.* (1996) suivent les indications de la norme allemande DIN 53739D pour l'enfouissement en sol. Södergard *et al.* (1996) utilisent le sol ED 73 dont la composition n'est pas précisée. Witt *et al.* (1996) se servent d'un sol fabriqué par une société allemande qui contient 25% d'argile, 60% de tourbe et 15% d'humus d'écorce.

Devant la difficulté à définir un sol standard, il est préférable, pour l'instant, de définir l'inoculum « sol » par son origine et les prétraitements éventuellement subis.

2.1.2 Compost

Le compost est obtenu par fermentation d'un mélange principalement constitué de résidus végétaux et souvent d'autres matières organiques. Sa teneur en minéraux est limitée. Les composts utilisés pour les tests de biodégradation et de désintégration sont des composts matures, c'est à dire âgés d'environ 4 mois et ayant un indice de Rottegrad de V (température comprise entre 20 et 30°C).

Les composts commerciaux, c'est-à-dire fabriqués à l'échelle industrielle, sont généralement issus de déchets végétaux (Day *et al.*, 1998; Gilmore *et al.*, 1992; Vikman *et al.*, 1995). Ces déchets, mis en andains, sont régulièrement retournés pour homogénéiser la matière et éviter l'anaérobiose. La dimension des andains est variable : 3m de haut, 2m de large et 30m de long dans le cas de Gilmore *et al.* (1992) et 80m de long et 2 m² de section pour Day *et al.* (1998).

Gu *et al.* (1994) et Tosin *et al.* (1996) ont étudié l'influence de la composition du compost sur le taux de biodégradation. D'après Gu *et al.* (1994), les différences sur la perte de poids du film ne sont pas dues aux différents ratios C/N mais plutôt à la forme physique et aux contenus nutritionnels du compost. En effet, celle-ci aura une influence sur la porosité et sur le pH qui sont des facteurs de la biodégradation. Ainsi, le taux de biodégradabilité dépend de la formulation du compost.

Tosin *et al.* (1996) ont étudié l'influence de la nature du compost sur la biodégradation des matériaux en comparant la perte de poids des échantillons introduits dans un compost mature et dans un compost synthétique composé de déchets frais. Les matériaux utilisés sont le Mater-Bi ZI01U (mélange d'amidon, de polycaprolactone (PCL) et de plastifiants naturels) et du papier. Pour le papier, en début de test (<7 j), la perte de poids est supérieure en compost mature. A partir du 14^{ème} jour elle devient supérieure pour le compost synthétique. Au bout de 25 jours la dégradation est totale dans les deux cas. Pour le Mater-Bi, l'évolution est la même. La dégradation est totale au bout de 25 jours pour le compost synthétique et de 45 jours pour le compost mature. Les mécanismes de dégradation sont les mêmes dans les deux supports.

Ces résultats montrent que la nature du support a une influence sur la vitesse de biodégradation du Mater-Bi. Les nutriments, conditions nécessaires pour sa dégradation, semblent plus accessibles dans le compost synthétique. De plus l'apport en azote est mieux

réparti. En revanche, pour les mesures de dégagement de CO₂, les déchets solides frais ne sont pas adaptés car ils dégagent trop de CO₂, masquant le gaz dégagé par le matériau testé.

Kim *et al.* (1998) confirment cette dernière observation. Ils préconisent l'utilisation d'un compost « pré-digéré » pour éviter un bruit de fond trop important sur la mesure de CO₂. Pour cela, le compost est incubé à 50°C pendant 45 jours.

Afin de standardiser les tests, le projet de norme CEN (1998b) impose certaines conditions pour le compost mature :

- Le compost provient d'une installation de compostage de la fraction organique des déchets solides municipaux
- Il est âgé de 2 à 4 mois
- Son pH est situé entre 7 et 9
- Sa quantité totale de solides secs est entre 50 et 55% du poids humide
- Sa quantité de solides volatils est supérieure à 30% du poids sec
- Sa masse volumique est suffisamment élevée (400 kg/m³)

L'utilisation d'un compost synthétique permet d'améliorer la reproductibilité (projet de norme ISO (2000)). Une composition a été proposée par Kim *et al.* (1998). Il s'agit d'un mélange de 45% de feuilles déchiquetées, 19.8% de papier journaux déchiquetés et de papier d'ordinateur avec un ratio 1/1, 2.5% de sciure de bois, 11.2% de déchets de viande et 21.5% de déchets alimentaires (en poids). Le rapport C/N ainsi obtenu est de 40. On retrouve dans les travaux de Gu *et al.* (1994) et Yue *et al.* (1996) des composts synthétiques mettant en œuvre des composants similaires mais avec des quantités différentes.

Day *et al.* (1998) et Yue *et al.* (1996) ont étudié l'activité microbienne au cours du compostage. Day *et al.* (1998) prélèvent toutes les semaines 12kg de compost commercial en cours de compostage et en introduisent une fraction dans un compost simulé en laboratoire. Différentes mesures sont effectuées en continu : température grâce à trois thermocouples, concentrations en CO₂, O₂ et CH₄ dans les gaz de sortie, odeur (obtention du seuil de détection) et composition des gaz de compost par GC/MS. Une série de tests est effectuée avant et après la période de compostage en laboratoire pour caractériser le compost, en particulier la densité, le pourcentage de vide, l'homogénéisation, le pH, ...

Ces différentes analyses permettent de montrer que l'activité du compost est intense pendant les 28 premiers jours, après 5 semaines elle est significativement réduite. Après 49 jours le compostage a cessé et le matériel peut servir de compost mature.

Yue *et al.* (1996) exposent leurs échantillons de deux façons différentes à une température de 55°C et une humidité de 54% de la capacité totale de rétention d'eau. Pour le groupe 1, les échantillons sont exposés en continu à la biomasse et des prélèvements sont effectués tous les trois jours. Pour le groupe 2, les échantillons sont exposés pendant trois jours, suivant le cycle de compostage (c'est-à-dire, entre les jours 1 et 3, puis entre les jours 4 et 6, etc.), puis prélevés. Ceci permet de suivre l'activité du compost.

Les résultats de la perte de poids montrent que dans le groupe 2 la biodégradation augmente entre les jours 10 et 15. Le nombre de microorganismes augmente, se stabilise puis diminue parallèlement à la consommation des déchets synthétiques solides municipaux et des nutriments. La perte de poids cumulée est beaucoup plus importante pour le groupe 1 que pour le groupe 2. L'adhésion des microorganismes à la surface du matériau joue visiblement un rôle important, particulièrement à la fin du test où la population microbienne diminue. Il est donc préférable de travailler en continu pour permettre aux microorganismes de coloniser la surface des films sur une durée plus longue. De plus, nous pouvons constater que l'activité des microorganismes n'est pas constante au cours du compostage. Il existe un pic puis un déclin d'activité.

Donc, d'une part, la biodégradation varie en fonction du compost et, d'autre part, pour une composition donnée, elle n'est pas constante mais est liée à l'activité bactérienne.

Le pH, la température, l'humidité et l'évolution de l'O₂ et du CO₂ sont contrôlés afin de vérifier que le processus de compostage se produit correctement. Le pH initial de 5 augmente jusqu'à 8 la première semaine. Après l'étape thermophile de compostage, il diminue lentement jusqu'à atteindre un palier à 6. La température augmente rapidement de 20°C à 60°C, puis on observe une diminution graduelle vers 20°C. Ces courbes de pH et de température sont typiques du compostage naturel (Vikman *et al.*, 1995). Ces variations de température correspondent aux évolutions de l'O₂ et du CO₂ (Day *et al.*, 1998). Par ailleurs, il y a une diminution de l'humidité.

2.1.3 Vermiculite

Degli-Innocenti et son équipe ont étudié le remplacement du compost mature par un lit de vermiculite activée (Bellia *et al.*, 1999; CEN, 1999; Degli-Innocenti, 1998; Degli-Innocenti *et al.*, 1998b; Tosin *et al.*, 1998). La vermiculite est un minéral argileux ((Mg,Fe,Al)₃(Al,Si)₄O₁₀(OH)₂, 4H₂O). Elle est utilisée sous forme expansée, en flocons. Ce milieu est propice à la survie et à l'activité des bactéries. Il peut être employé pour étudier la dégradation et la formation de métabolites en fermentation en milieu solide.

La vermiculite doit être inoculée avec une population microbienne appropriée. Pour cela il est nécessaire de procéder à une pré-fermentation. La vermiculite est d'abord lavée plusieurs fois et séchée, puis tamisée au dessus de 8 mm. Elle est ensuite mélangée avec des sels minéraux et des nutriments organiques et est inoculée avec un lixiviat de compost. Le rapport vermiculite/inoculum est de 1/3 (poids/volume). Elle est ensuite incubée à 50°C pendant 3 ou 4 jours pour permettre aux microorganismes de se développer.

Les différents essais menés sur ce nouveau lit minéral ont montré que les taux de biodégradation du Mater-Bi et de la cellulose sont identiques à ceux obtenus avec un compost mature. La vermiculite activée produit moins de CO₂ que le compost mature. En effet, celle-ci ne contient pas de carbone organique disponible. Le bruit de fond est donc réduit. En fin de réaction, on obtient des degrés de dégradation similaires à ceux observés en compost (Bellia *et al.*, 1999).

La vermiculite permet de collecter facilement les produits de dégradation (non gazeux) et les résidus de polymères en fin de réaction par simple centrifugation. Cette récupération est impossible avec un compost mature, sa structure est trop hétérogène et complexe (Tosin *et al.*, 1998). On peut ainsi établir un bilan carbone, mais aussi déceler d'éventuels produits toxiques et étudier les différentes étapes de la biodégradation.

De plus, la vermiculite évite l'effet d'induction que l'on peut observer sur le compost contrôlé. Le glucose et ses polymères peuvent stimuler la minéralisation des matrices organiques, conduisant ainsi à une surestimation de la biodégradabilité. Ce support permet d'obtenir ainsi une meilleure reproductibilité.

La vermiculite possède néanmoins un inconvénient du fait de sa nature ionique. Sa surface est riche en charges négatives et les produits de dégradation chargés positivement

peuvent interagir par liaisons ioniques. L'extraction devra alors être réalisée à l'aide de solutions de force ionique élevée.

2.2 Evaluation de la biodégradabilité

2.2.1 Mesures courantes

En laboratoire, les méthodes d'évaluation de la biodégradabilité sont identiques en sol et en compost. Elles s'effectuent principalement par la mesure de la perte de poids (tests de désintégration), de la consommation d'oxygène (DBO), de la quantité de carbone organique dissous (COD) ou par détermination de la quantité de CO₂ dégagée (tests respirométrique). Des analyses complémentaires peuvent être effectuées comme les spectrométries infrarouge (IR), ultraviolet (UV)-visible, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie d'exclusion stérique (qui permet de déterminer la distribution des masses moléculaires), les propriétés mécaniques, et l'analyse de la surface du matériau par microscope électronique (Püchner *et al.*, 1995).

En respirométrie, le choix des paramètres analytiques à mesurer peut influencer la valeur du degré de biodégradabilité (Pagga, 1997). Dans le cas, par exemple, des mesures de COD, il n'est pas toujours possible de distinguer le processus biologique de biodégradation du processus abiotique d'élimination (adsorption par l'inoculum ou élimination par passage de l'air). Il est donc nécessaire de préciser la méthode de mesure utilisée. Les mesures de CO₂ dégagé sont utilisées préférentiellement. Elles donnent les informations les plus précises et sont souvent plus simples à mettre en œuvre.

L'utilisation de composés marqués par des atomes radioactifs est la méthode la plus précise pour la mesure du dégagement de CO₂. Elle permet de différencier le CO₂ émis exclusivement par le matériau de celui émis, par exemple, par le support solide (Sharabi *et al.*, 1993). Mais la difficulté réside dans l'obtention d'un matériel marqué. Cette technique est donc difficile à mettre en œuvre et coûteuse.

En conditions réelles, il est impossible d'effectuer des mesures de DBO, COD ou de dégagement de CO₂. Mais les mesures de perte de poids (Wendt *et al.*, 1970), l'étude des masses moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique (Akahori *et al.*, 1994) et l'analyse IR (Goheen *et al.*, 1991) servent à évaluer la dégradabilité en milieu réel. Toutefois,

les conditions rendent les mesures plus difficiles à faire qu'en laboratoire. La détermination de la biodégradabilité sera moins reproductible mais elle représente les conditions réelles. Pour les tests de désintégration, Decriaud-Calmon (1998) présente une nouvelle méthode basée sur l'analyse d'images. La surface éliminée par biodégradation est quantifiée. Cependant cette méthode est difficile à appliquer au cas des enfouissements en compost, car les échantillons sont déformés à cause des températures élevées.

2.2.2 Le cas particulier de la vermiculite

Dans le cas de la vermiculite, en plus de la détermination du degré de biodégradabilité par respirométrie, il est possible de récupérer les produits de dégradation en fin de réaction. Tosin *et al.* (1998) ont étudié plus précisément ce point en cherchant les moyens d'extraire ces produits. Pour cela ils ont dégradé deux matériaux :

- Mater-Bi ZI01U : mélange d'amidon, de PCL et en quantité minimale des plastifiants naturels
- 2030/489 : même matériau que précédemment dans lequel 18% de PCL sont substitués par de l'Estane (mélange de 4,4' diphényl méthane diisocyanate (MDI) (polyuréthane) et de poly(ϵ -caprolactone)). Le 4,4' diamino diphényl méthane (MDA), un sous produit toxique, est formé durant sa biodégradation.

$(-\text{CO}-\text{NH}-\phi-\text{CH}_2-\phi-\text{NH}-\text{CO})$: unité MDI

$\text{NH}_2-\phi-\text{CH}_2-\phi-\text{NH}_2$: molécule de MDA

Ces deux matériaux se dégradent à des vitesses différentes mais ont totalement disparu au bout de 30 jours. On ne retrouve des produits que dans les extraits du 2030/489. L'extraction à l'eau permet de récupérer du MDA identifié par HPLC. L'extraction au DMSO (solvant de l'Estane) permet de récupérer des résidus de l'Estane. Une précipitation avec de l'acide sulfurique de cet extrait permet ensuite de récupérer un résidu de dégradation de l'Estane dans lequel la fraction PCL s'est partiellement dégradée. Ces extractions permettent de noter un enrichissement relatif du groupement $-\text{NH}-$ (MDI) par rapport au groupement $-\text{CH}_2-$ (PCL) dans le précipité, dû à la dégradation.

2.2.3 Critères de validité

Pour la biodégradation en compost il existe trois critères de validité (CEN, 1998b) :

- Le pourcentage de minéralisation de la substance de référence doit être supérieur à 70% au bout de 45 jours.
- La déviation du pourcentage de biodégradation pour la substance de référence dans les différents bioréacteurs doit être inférieure à 20% à la fin du test.
- Dans les bioréacteurs de contrôle, le compost doit produire, après 10 jours d'incubation entre 50 et 150 mg de CO₂ par gramme de solides volatiles.

Pour la biodégradation sur vermiculite, les critères de validité sont les mêmes que pour le compost avec la différence qu'il n'y a pas de contrainte sur la quantité de CO₂ dégagé par le support solide (CEN, 1999). Pour la dégradation sur support inerte, le critère de validité est donc que les réacteurs de référence produisent suffisamment de CO₂ (70% de minéralisation), et de façon reproductible (déviations entre les réacteurs inférieures à 20%).

Pour la biodégradation en sol les critères sont moins stricts. Une seule condition doit être satisfaite : le dégagement de CO₂ par les "blancs", c'est à dire du sol seul, doit être inférieur à 20% de la valeur moyenne de CO₂ dégagé par les autres échantillons (ISO, 1999b).

2.3 Rapport C/N

Ce rapport dépend beaucoup de la nature du support. Contrairement aux tests en milieu liquide, sa composition n'est pas définie. Le sol ou le compost sont généralement utilisés tel quels avec éventuellement quelques ajouts.

Ce rapport est assez variable, il doit être compris entre 10/1 et 40/1 (ISO, 1999b). S'il est supérieur à 40/1, il est possible de le diminuer en ajoutant une solution de chlorure d'ammonium ou de l'urée. Le manque d'azote peut être un facteur limitant pour le développement des microorganismes qui en ont besoin pour les synthèses protéiques.

On observe une exception : Yabannavar *et al.* (1993, 1994) utilisent un ratio de 100/1. Ils ajoutent du (NH₄)₂HPO₄ comme fertilisant.

2.4 Le taux d'humidité

L'eau est le plus important moyen de transport et de distribution des microorganismes et des nutriments. Elle est donc absolument nécessaire à la biodégradation en milieu solide. Les différences observées entre les dégradations en milieu aqueux et en milieu solide proviennent essentiellement de la faible accessibilité en eau dans ce dernier (Pagga, 1997). La disponibilité en eau est donc un facteur critique pour le développement microbien et l'activité métabolique. Elle ne doit pas être trop faible, ni trop élevée. Un manque d'eau entraîne un ralentissement du métabolisme et du développement des micro-organismes. Mais l'excès d'eau provoque le tassement du support et l'instauration de conditions anaérobies.

2.4.1 Régulation du taux d'humidité

Il existe deux façons de réguler la quantité d'humidité dans le support ; d'une part, en contrôlant l'humidité relative de l'air au dessus du support, et d'autre part, en contrôlant la teneur en eau de l'échantillon même.

Dans le premier cas, c'est la teneur en eau dans le gaz au dessus du support qui est imposée. Une valeur optimale de 60 à 70% est obtenue grâce à une solution saturée de nitrate d'ammonium dans le cas du sol (Okada *et al.*, 1994).

Dans le second cas, il faut travailler avec la capacité totale de rétention d'eau de l'échantillon. Elle correspond à la teneur en eau résiduelle, en fin de drainage, après un apport massif d'eau. Elle est déterminée en séchant un échantillon de support pendant 24h à 110°C. Dans ce cas, c'est la teneur en eau à l'intérieur du support qui est imposée.

Il existe différentes méthodes pour imposer la quantité désirée d'humidité :

- Le passage de l'air dans des erlenmeyers contenant de l'eau distillée permet d'obtenir une quantité constante d'humidité (ASTM, 1992; Day *et al.*, 1998; De Baere *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1993a; Nishioka *et al.*, 1994; Spence *et al.*, 1996; Yue *et al.*, 1996).
- Afin de conserver une teneur en humidité constante dans le sol après ajout d'une quantité d'eau déterminée par pesée, l'échantillon est placé dans un dessiccateur contenant de l'eau dans son fond (Garcia-Valcarcel *et al.*, 1999). Cette méthode évite au sol de sécher pendant la période d'incubation.

- D'autres auteurs (Nishioka *et al.*, 1994; Pagga *et al.*, 1995; Tosin *et al.*, 1996; Yabannavar *et al.*, 1993; Yabannavar *et al.*, 1994) ajustent la quantité d'humidité en début de réaction par rapport à la capacité totale de rétention. Puis pour conserver cette quantité d'humidité, les récipients sont ensuite pesés une à deux fois par semaine. La perte de poids est alors compensée par un ajout d'eau distillée. Cette méthode ne permet pas d'obtenir un niveau constant d'humidité relative, puisque la perte de poids n'est pas exclusivement due à une déshydratation mais également à la perte du matériau, mais de maintenir une quantité élevée d'eau dans le milieu.

Cette méthode est, pour l'instant, employée pour les tests sur vermiculite. La quantité initiale d'eau correspond à 70% de la capacité totale de rétention.

2.4.2 Sol

Garcia-Valcarcel *et al.* (1999) ont étudié l'influence de l'humidité du sol sur la biodégradation. Travaillant avec des sols contenant 20, 50 et 90% de la capacité de rétention d'eau, ils ont constaté que la vitesse de dégradation augmente avec l'humidité. D'autre part, ils ont comparé les dégradations avec incubation à humidité constante (50%) ou par cycle d'évaporation-réhumidification. Dans le dernier cas le sol est humidifié jusqu'à contenir une teneur en eau de 90%, il est ensuite séché dans un dessiccateur contenant du gel de silice jusqu'à obtenir une teneur en eau de 20%. Une certaine quantité d'eau est ajoutée pour obtenir à nouveau 90% d'humidité. Cette deuxième méthode diminue la vitesse de dégradation qui est alors inférieure à celle obtenue pour une humidification constante à 50%. Cette étude montre qu'il est donc préférable de travailler avec un taux d'humidité constant et suffisamment élevé.

2.4.3 Compost

Gu *et al.* (1994) ont étudié l'influence de la teneur en humidité sur la vitesse de biodégradabilité. Pour des taux d'humidité de 60, 50 et 40%, le temps nécessaire pour la disparition totale des films d'acétate de cellulose, de degré de substitution 1.7, est, respectivement, de 6, 16 et 30 jours. Il apparaît de façon évidente que la cinétique de perte de poids est très sensible au taux d'humidité dans le compost et qu'une augmentation de celui-ci permet d'améliorer la dégradation. D'autre part, Suler *et al.* (1997) ont montré qu'il ne doit pas dépasser 70%.

2.5 La température

La régulation de la température se fait de façon identique en sol et en compost. La température du bioréacteur est régulée par une aération thermostatée (CEN, 1998a; Nishioka *et al.*, 1994; Yabannavar *et al.*, 1994)] ou dans un bain-marie (ASTM, 1992; De Baere *et al.*, 1994; Pagga *et al.*, 1995; Spence *et al.*, 1996). En revanche, les valeurs optimales pour la dégradation ne seront pas similaires, les écotypes étant différents.

2.5.1 Sol

Il est important de se trouver dans les conditions habituelles propices au développement des microorganismes présents dans le sol. Pour cela on se place à température constante, entre 25 et 27°C. Pour les sols provenant des régions tempérées, une température située entre 10 et 25°C est appropriée et plus représentative des conditions naturelles.

2.5.2 Compost

Les microorganismes étant thermophiles, la température optimale est plus élevée que dans le cas de l'enfouissement en sol. Le projet CEN (1998b) préconise une température de 58°C. D'autres auteurs ont travaillé avec des températures un peu plus faibles, proche de 53°C (Gu *et al.*, 1993a; Gu *et al.*, 1993b; Gu *et al.*, 1994; Yue *et al.*, 1996). Il est néanmoins recommandé de travailler à une température inférieure à 65°C. En effet, au delà de cette valeur, de nombreuses formes microbiennes meurent, limitant ainsi le taux de décomposition. Ces températures élevées permettent d'accélérer la rupture des protéines, des graisses et des sucres complexes comme la cellulose et les hémicelluloses.

Agarwal *et al.* (1998) ont étudié les conditions optimales de dégradation en compost des poly(acide lactique) (PLA). Pour cela ils ont comparé l'influence de la température en travaillant à 40, 50 et 60°C. Dans le cadre de leur étude, une augmentation de température a pour conséquence la dégradation des chaînes polymères et donc une diminution des masses moléculaires.

Day *et al.* (1998) imposent une température extérieure de 35°C et contrôlent la température du compost grâce à trois thermocouples situés à l'intérieur du bioréacteur. Ils observent une courbe typique de température en compost : un rapide réchauffement jusqu'à

50°C en quelques heures, puis un refroidissement jusqu'à 46°C. Le matériau subit un deuxième réchauffement et conserve une température supérieure à 60°C pendant quelques jours. La température diminue ensuite lentement.

De nombreux auteurs ont voulu se placer dans les mêmes conditions qu'un compost commercial en imposant un profil de température simulant ces variations (ASTM, 1992; De Baere *et al.*, 1994; Pagga *et al.*, 1995). Le profil de température utilisé est le suivant. La température de départ est de 35°C pendant 1 jour, puis 58°C pendant 4 jours, 50°C jusqu'au 28^{ième} jour et enfin 35°C jusqu'à la fin du test. Ces différentes valeurs de température sont obtenues par l'utilisation de bains-marie.

Pagga *et al.* (1995) ont comparé la méthode précédente (avec profil de température) à celle utilisant une température constante fixée à 58°C. Le taux de biodégradabilité atteint en fin de test est le même, mais le temps nécessaire pour y parvenir est plus court dans le cas d'une température constante à 58°C. Dans le cas de la dégradation du papier, le pourcentage de biodégradabilité est, au bout de 30 jours, de 93% pour une incubation à température constante, et de 88% avec un profil de température.

2.5.3 Conclusion

En compost, si on cherche à accélérer le test il sera donc préférable de travailler à température constante. Si on cherche à se rapprocher le plus possible des conditions réelles, on utilisera le profil de température décrit plus haut.

En sol, aucune étude similaire n'a été faite. La simulation de la dégradation en sol à différentes températures, comprises entre 10 et 30°C pourrait permettre d'accélérer le processus.

2.6 Mesure et influence du pH

Pour ces différents supports, le pH doit être neutre ou faiblement basique (ASTM, 1992; CEN, 1998b; Day *et al.*, 1998; De Baere *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1993b; Pagga *et al.*, 1995; Tosin *et al.*, 1996; Yue *et al.*, 1996). Pour mesurer ce pH, 10 g de support sont prélevés et ajoutés à 500 ml d'eau distillée. Ils sont homogénéisés durant 5 min à l'aide d'un agitateur magnétique. Après décantation du mélange, le pH est mesuré dans le surnageant (Day *et al.*,

1998). Cette méthode n'est pas universelle, la quantité d'eau distillée à ajouter va dépendre du degré d'humidité de l'échantillon.

2.6.1 Sol

Son pH se situe entre 5,5 et 6,5. Dans le cas des hydrocarbures, il a été ajusté par ajout de CaCO_3 (Yabannavar *et al.*, 1993) afin d'obtenir un pH de 7.5 propice à la dégradation de ces produits (Sharabi *et al.*, 1993).

2.6.2 Compost

On observe au cours du processus de compostage une augmentation normale du pH, due à la dégradation des produits azotés. Il est important de contrôler régulièrement la valeur du pH car c'est un paramètre important de la biodégradation. On observe, en début de réaction, une faible diminution du pH due à la formation d'acides carboxyliques lors de la dégradation. Plus tard, si sa valeur est inférieure à 7.0 la biodégradation a pu être inhibée par l'acidification du compost et la disparition des microorganismes. Dans ce cas il est recommandé de mesurer la quantité d'acides gras volatils. Si celle-ci est supérieure à 2 g par kg de solide sec, le test doit être considéré comme non valide.

2.6.3 Conclusion

La valeur du pH est un paramètre clé pour la survie et l'activité des microorganismes. Cependant, le pH varie selon les métabolites. Maintenir le pH à une valeur neutre ou faiblement basique est alors assez délicat.

2.7 Concentration des polymères dans le support

La concentration optimale du matériau à tester est différente suivant le support. Cependant pour chacun d'entre eux il a été montré que la dégradation des films plastiques se fait par un mécanisme d'érosion surfacique. Il est donc important de travailler avec un rapport surface sur volume maximum (Ratajska *et al.*, 1998; 1999; Sawada, 1994). Dans l'absolu, les échantillons sous forme de poudre se dégraderont donc plus facilement.

2.7.1 Sol

La quantité de matériau à tester doit être suffisante pour que le dégagement de CO₂ ne soit pas masqué par celui du support. Sharabi *et al.* (1993) ont montré qu'en dessous du rapport « 0.5 mg d'échantillon par gramme de sol » (c'est à dire un ratio de 0.5/1000), il était difficile de distinguer le dégagement de CO₂ du bruit de fond.

En pratique, 200 mg de matériau à tester sont mélangés avec 200 g de sol (ISO, 1999b) ce qui donne un rapport 1/1000. Si les matériaux sont connus pour ne pas se dégrader ou trop bien se dégrader ce rapport pourra être augmenté ou diminué (Nishioka *et al.*, 1994; Yabannavar *et al.*, 1993).

Ce rapport polymère/sol a été étudié par Keursten *et al.* (1996) à travers la dégradation du caoutchouc dans le sol. Différentes quantités de caoutchouc ont été introduites. La production de CO₂ est modélisée par une cinétique du premier ordre : $Y=Y_{max}*(1-\exp(-\alpha t))$, où Y est la concentration cumulée de CO₂ dans le bioréacteur, Y_{max} la production maximale de CO₂ et α le paramètre de biodégradation. Lorsque la quantité de caoutchouc introduit augmente, Y_{max} augmente et α diminue. On observe ainsi l'effet du degré de contact entre le sol et le caoutchouc sur ce paramètre de dégradation. Pour une quantité de caoutchouc, d'environ 10%, le contact entre les particules de caoutchouc et le sol est optimal et donne la plus grande valeur possible pour α et la plus petite valeur pour le temps de demi-vie. Ce temps de demi-vie correspond au temps nécessaire pour que la moitié du poids initial du matériau se soit dégradée.

2.7.2 Compost

En étudiant la dégradation de différentes proportions d'amidon dans le compost, Degli-Innocenti *et al.* (1998a) ont montré que l'exactitude des mesures est proportionnelle à la concentration des matériaux dans le compost. En revanche, ils n'ont pas étudié la durée de dégradation comme Keursten *et al.* (1996).

D'après le projet de norme CEN (1998b), 600 g de compost et 100 g de matériau à tester (en poids sec) sont introduits dans les bioréacteurs de volume minimum de 3 litres. Le ratio matériau/compost de 1/6 est donc élevé.

2.7.3 Vermiculite

Pour la dégradation sur vermiculite, la quantité de matériau par rapport au support est encore supérieure. En effet, le projet de norme CEN (1999) préconise de travailler avec un ratio de 1/4 pour le rapport matériau/vermiculite en poids sec. Cette valeur très élevée peut être expliquée par la faible masse volumique de la vermiculite.

2.7.4 Conclusion

La concentration des échantillons à tester a une influence sur la durée de dégradation et sur la précision de la mesure. Une concentration élevée conduit à une meilleure précision (le bruit de fond est plus faible), mais une concentration plus faible, par une augmentation de la quantité de microorganismes par rapport au substrat, accélère le processus.

2.8 Durée du test

2.8.1 Sol

La durée du test est assez variable, elle peut aller de 45 jours (Eya *et al.*, 1994) à 6 mois (Akahori *et al.*, 1994). Sur les tests courts les mesures s'effectueront toutes les semaines et sur les tests plus longs les échantillons seront récupérés tous les mois lorsqu'il ne s'agit pas de tests respirométriques. Pour les tests en conditions réelles, il n'est pas possible d'imposer des valeurs précises aux paramètres environnementaux. Les durées sont alors beaucoup plus longues. Les matériaux sont récupérés au bout de 3, 6, 9, 12, 24 et 36 mois (Decriaud-Calmon, 1998; Sawada, 1994).

2.8.2 Compost et vermiculite

Le compost a l'avantage, par rapport au sol, de dégrader les matériaux de façon beaucoup plus rapide. La durée nécessaire pour atteindre le taux de dégradation maximale diffère suivant les conditions expérimentales et les matériaux testés. Elle est déterminée par les caractéristiques inhérentes au matériau mais aussi par la taille des particules. La norme ASTM, (1992) et le projet de norme CEN (1998b) préconisent une durée de 45 jours. Elle peut être prolongée, mais ne doit pas dépasser 6 mois.

2.9 Aération et débit

L'aération du milieu est nécessaire puisqu'on veut se trouver en milieu aérobie. Elle se fait grâce à un air dépourvu de CO₂ et de produits toxiques pour les microorganismes pouvant entraver le processus de biodégradation. Mais cette aération a tendance à dessécher le sol.

Le niveau d'aération doit être bien défini. Il ne doit pas être trop faible car il ralentirait la fermentation, ni trop élevé car il en résulterait un dessèchement et un refroidissement de la masse. Pour un compost, le débit d'air balayant les bioréacteurs est généralement compris entre 100 et 150 ml/min (Day *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1993a; Gu *et al.*, 1993b; Gu *et al.*, 1994; Pagga *et al.*, 1995; Yue *et al.*, 1996). Pour le sol il sera un peu plus faible. La quantité d'oxygène, à la sortie, doit être contrôlée régulièrement afin de vérifier qu'elle est bien supérieure à 6% (ASTM, 1992). Elle peut être mesurée grâce à des capteurs spécifiques (analyseur paramagnétique) ou par chromatographie gazeuse.

Il est nécessaire d'agiter manuellement les bioréacteurs afin d'homogénéiser le milieu et d'éviter la formation de chemins préférentiels. Il est possible d'introduire des matériaux inertes pour améliorer la porosité et faciliter ainsi l'aération dans le cas du compost (Pagga *et al.*, 1995).

En sol, Spence *et al.* (1996) ont montré que l'aération par le bas des récipients est bénéfique. En effet, elle limite la déshydratation du milieu. Sous sa forme actuelle, le projet de norme ISO 17556 (1999b), qui régleme la biodégradation en sol, impose une aération dans l'espace de tête. Celle-ci semble très néfaste puisque des mesures effectuées par ces auteurs ont montré qu'il y avait un risque d'avoir un « court-circuit » (partie basse non aérée) et un gradient de concentration de gaz qui peuvent affecter les essais de biodégradation.

2.10 Autres conditions

Pour faciliter leur récupération, les échantillons sont placés, dans certains cas, dans des filets de nylon et de polyéthylène (Decriaud-Calmon, 1998) ou dans des "tasses" (Goheen *et al.*, 1991). L'incubation peut avoir lieu dans l'obscurité (Nishioka *et al.*, 1994) ou sous lumière diffuse (Yabannavar *et al.*, 1993). Cela ne semble pas être un paramètre important sur la biodégradabilité.

L'influence des traitements agricoles a été étudiée uniquement sur la biorémediation de l'huile dans le sol (Angehrn *et al.*, 1999). Un sol contaminé est étendu sur un site d'enfouissement des déchets puis le domaine est séparé en quatre parcelles (labourée, avec herbe, avec trèfles et blanc). Il semblerait qu'il n'y ait pas de différence de biodégradation entre les parcelles recouvertes de végétation et celles non-recouvertes. Mais ces résultats ne sont pas en accord avec ceux décrits par Reilley *et al.* (1996) et Shimp *et al.* (1993). La présence de plantes sur un sol est donc plus vraisemblablement bénéfique pour la biodégradation.

Dans le cas du compost, pour les mesures de désintégration (récupération des fragments d'une taille supérieure à 2 mm), une taille particulière des bioréacteurs est aussi recommandée : ce sont des boîtes de polypropylène de dimensions 30*19.5*9.5 cm³ (ce qui équivaut à un volume d'environ 5.6 l). Ils sont percés de deux trous pour faciliter les échanges gazeux (Tosin *et al.*, 1996). De nombreux tests sont néanmoins réalisés avec d'autres types de bioréacteurs.

2.11 Comparaison des dégradations en sol et en compost

De nombreux auteurs (Agarwal *et al.*, 1998; Eya *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998; Witt *et al.*, 1995; Witt *et al.*, 1996) comparent les vitesses de dégradation en sol et en compost. Ils observent tous une dégradation plus rapide dans le cas du compost. Les tests en compost semblent plus performants et donc plus favorables. Il faut, néanmoins, utiliser ces informations avec précaution. L'utilisation du compost pour les tests de biodégradation peut induire deux types d'erreur.

D'une part, le processus de dégradation en compost peut être une hydrolyse chimique ou thermique et non pas une biodégradation. Les températures en compost sont plus élevées qu'en sol, il est alors possible qu'une hydrolyse acide complète la biodégradation. Cette hydrolyse est catalysée par certaines substances déjà présentes dans le compost ou autocatalysée par les produits de dégradation, comme les acides provenant des polyesters.

Cette hydrolyse chimique permet de pallier aux problèmes de solubilité des oligomères. Witt *et al.* (1995, 1996) ont montré que des oligoesters de degré de polymérisation 5-6 pouvaient être dégradés en compost alors qu'en sol seuls les dimères et les monomères sont assimilés par les microorganismes. Witt *et al.* (1995, 1996) proposent des

mécanismes de dégradation des oligoesters aromatiques et aliphatiques : (a) solubilisation des mono- et dimères et métabolisation par les microorganismes et (b) hydrolyse lente des longs oligomères suivie par la métabolisation évoquée en (a).

En effet, Agarwal *et al.* (1998) qui ont étudié la dégradation des polyacides lactiques en compost et dans un système abiotique, n'ont pas observé de changement de comportement lorsque les films se trouvaient en absence ou en présence de microorganismes. Ces résultats avaient déjà été observés par Torres de Dominiguez (1995) qui a montré que la dégradation des polyacides lactiques se fait uniquement par un processus chimique d'hydrolyse.

D'autre part, une mesure de perte de poids ou de dégagement de CO₂, en compost, ne signifie pas qu'il y ait biodégradation. Elle peut provenir de la dégradation du support lui-même. De plus, la présence de glucose ou de ses polymères stimule la dégradation (Degli-Innocenti *et al.*, 1998a; Sharabi *et al.*, 1993) et augmente ainsi le dégagement de CO₂ lié au support solide.

2.12 Conclusion

Cette synthèse bibliographique nous a permis de trouver de nombreux articles concernant la simulation d'un compost en laboratoire. Les dernières recherches sur le compost et sur les résidus après compostage mettent en œuvre les supports inertes.

Pour le sol, les articles sont moins nombreux. Certains traitent de la simulation d'un sol, en laboratoire, mais rien n'a encore été trouvé sur la substitution du sol par un support inerte. Cependant, la simulation d'un sol serait particulièrement nécessaire pour les applications agricoles, par exemple, pour prédire l'évolution des résidus de dégradation après plusieurs années d'utilisation de paillage en champs.

L'optimisation de ces conditions opératoires permet d'accélérer la vitesse de biodégradation des échantillons et donc de réduire la durée des tests. De même, les études effectuées sur support inerte nous permettent de donner les principales lignes directrices pour une simulation de sol :

- Le support doit être proche du support réel. La difficulté rencontrée avec le sol réside dans la survie des microorganismes exogènes hors de leur milieu naturel. La vermiculite offre une alternative intéressante. Son inoculation par un extrait de compost donne des résultats

satisfaisants. Mais, il n'existe pas d'article traitant de l'inoculation de la vermiculite avec un extrait de sol.

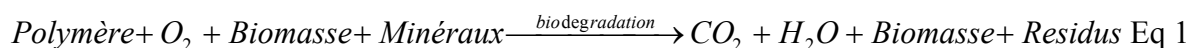
- La durée des manipulations varie de 45 à 180 jours.
- L'évaluation de la biodégradabilité est effectuée, préférentiellement, par des mesures respirométriques. La quantité de CO₂ dégagé par la matrice ne gêne pas la mesure de la quantité de CO₂ dégagé par le matériau, dans le cas de la vermiculite. Une technique destructive, comme la mesure de la perte de poids, nécessiterait un nombre important de manipulations. La vermiculite a l'avantage de permettre, en plus des mesures respirométriques, de procéder à des extractions chimiques.
- Le ratio C/N doit être fixé entre 10/1 et 40/1.
- La quantité d'humidité doit être contrôlée afin de se situer entre 40 et 70% de la capacité de rétention en eau du support (Nishioka *et al.*, 1994; Yabannavar *et al.*, 1993; Yabannavar *et al.*, 1994). Ce contrôle est effectué, principalement, par un bullage de l'air dans l'eau, et par une pesée hebdomadaire et la réhumidification des réacteurs.
- La température doit être celle rencontrée en conditions réelles (Goheen *et al.*, 1991; Nishioka *et al.*, 1994; Spence *et al.*, 1996; Yabannavar *et al.*, 1993; Yabannavar *et al.*, 1994). En compost, l'influence de la température et d'un profil de température sur la vitesse de réaction a été déterminée. En revanche, aucune étude similaire n'a été menée, en sol. Une simulation de la dégradation en sol, à différentes températures, comprises entre 10 et 30°C, serait utile pour trouver un moyen d'accélérer le processus.
- Le pH doit être neutre ou faiblement basique (Bartha *et al.*, 1965).
- La concentration en matériau (par rapport au support, en poids sec), varie entre 1/1000 et 1/6 selon la nature du support.
- Broyer le film accélère le processus de dégradation.
- Une aération est nécessaire, avec un débit proche de 30 ml/min par litre de matériau.

Il faut néanmoins prendre certaines précautions. Les nombreuses études ont permis de définir la valeur optimale de chacun des paramètres pris indépendamment. Mais la contribution de ces différentes valeurs peut être perturbée par la synergie des facteurs. L'utilisation d'un plan d'expérience serait plus appropriée pour la détermination de la

combinaison optimale des paramètres. De plus les résultats obtenus en laboratoire ne sont pas toujours une retranscription exacte du comportement *in situ* (Holden *et al.*, 1997).

D'autre part, les lignes directrices énoncées ne sont pas exploitables sans y ajouter des précisions. La transposition de méthodes développées pour le compost sur support inerte, au sol n'est pas simple. Grâce à notre recherche bibliographique, nous avons dégagé certains points qui nous ont semblé imprécis lorsqu'on cherche à transposer un protocole de test sur support inerte inoculé par lixiviat de compost à une inoculation par lixiviat de sol. Ces points, approfondis pour le développement d'un protocole de test de biodégradabilité sur support inerte, en simulation de sol, sont les suivants :

1. *Mesure de la production de CO₂* : Pour simuler la dégradation dans la couche supérieure d'un sol, les conditions doivent être aérobie (Equation 1). La méthode de test est basée sur la production nette de CO₂, c'est à dire, la production de CO₂ dégagé pour le réacteur contenant le matériau à tester, diminuée de la production de CO₂ dégagé par le réacteur blanc.



La quantité de CO₂ est mesurée par un analyseur Infrarouge. La quantité de CO₂ produite, et donc la taille du réacteur, doivent être adaptés au domaine d'application du détecteur.

Dans la méthode décrite par Bellia *et al.* (1999, 2000), les mesures de CO₂ sont faites de façon instantanée. Lorsque la production de CO₂ n'est pas mesurée le réacteur est laissé à l'air libre. La production de CO₂ entre deux mesures successives est extrapolée, ce qui peut conduire à des erreurs. Nous avons automatisé le système pour obtenir des mesures avec une plus grande fréquence.

2. *Choix du support inerte* : Le support inerte le plus utilisé pour la simulation de compost est exclusivement la vermiculite (CEN, 1999; ISO, 1999a). Les raisons de ce choix ont été décrites plus haut : pas de production additionnelle de CO₂, pas d'effet d'induction, extraction chimique simplifiée. La valeur élevée de capacité totale de rétention d'eau (300%) de la vermiculite correspond mieux à celle du compost (de 110% pour le compost à 290% pour

la tourbe rouge) (Hanlon, 2000) qu'à celle du sol (typiquement comprise entre 28% et 45% pour un sol sablonneux à un sol argileux). Il est donc nécessaire de rechercher un support inerte qui corresponde mieux au sol en terme de capacité totale de rétention d'eau. Ces supports devront aussi éviter les liaisons ioniques qui peuvent se créer à la surface de la vermiculite. D'autres supports inertes provenant de l'horticulture, comme les billes d'argile expansées (aussi chargées négativement), la perlite© et la pouzzolane ont été testés.

3. *Mise au point de la phase d'activation* : La biodégradation sur un support inerte nécessite une phase d'activation pour permettre aux microorganismes de se multiplier et de s'adapter au support.

La concentration de l'inoculum recommandée pour la phase d'activation lors des études de simulation de compost est très élevée (10^8 UFC/ml) (UFC : unités formant colonies), à cause de la densité en microorganismes dans un compost. En revanche, en sol, la concentration après extraction est plus faible (entre 10^5 et 10^6 UFC/ml). La concentration exigée par le projet de norme ISO (1999a), ne peut donc pas être atteinte, à moins que la durée de la phase d'activation soit optimisée. Nous avons recherché cette durée optimale.

Le contrôle de la valeur du pH durant la phase d'activation est aussi un facteur de réussite. Durant le processus de compostage, les microorganismes sont soumis à des variations de pH, principalement une augmentation ($\text{pH} > 8$). En simulation de compost, la seule condition est donc que le pH reste neutre ou basique, sans avoir besoin d'un contrôle plus précis de la valeur. En revanche, en sol, la valeur de pH est déterminée par une combinaison de divers facteurs comme son origine géologique, la végétation, etc. Par conséquent, comme le pH du sol est stable, les microorganismes extraits du sol sont très sensibles aux variations de pH. En simulation de sol, la valeur du pH doit donc être maintenue de façon précise. L'urée est un des nutriments recommandés pour l'activation avant l'inoculation de la vermiculite (Bellia *et al.*, 1999). Mais sa dégradation conduit à une augmentation de pH qui peut inhiber les microorganismes. Lors de notre étude, nous avons remplacé l'urée par une autre source d'azote moins basique.

Enfin, deux protocoles ont été comparés pour la phase d'activation : d'une part, le support inerte est individuellement inoculé dans chaque réacteur, et d'autre part, le support est activé de façon commune dans un grand bac. Après la phase d'activation, chaque réacteur est rempli.

Nous avons ainsi développé une nouvelle méthode de test de simulation de sol, sur support inerte qui nous permet d'être proche des conditions réelles en milieu solide et de mesurer de façon pointue les taux de biodégradation. La suite de ce chapitre est consacré à sa présentation.

3 **M**A T E R I E L S E T M E T H O D E S

3.1 Description générale de la manipulation

3.1.1 Montage expérimental

Le montage est représenté sur la figure II-1. Les tests ont lieu dans des réacteurs en verre de 500 ml. La température de la pièce est fixée à $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. La pression de l'air comprimé est réduite à 1bar par un régulateur de pression. Le débit d'air est divisé en 16 lignes, correspondant aux 15 bioréacteurs (3 blancs, 3 références positives et 3*3 matériaux à tester) et à l'air entrant. Pour chaque ligne, le débit d'air est fixé par un régulateur de débit (Brooks PC 8902). L'air est humidifié par barbotage dans de l'eau, puis transféré au réacteur par un tube opaque et épais en caoutchouc. Il traverse de bas en haut le réacteur, qui est placé la tête en bas. La tête du réacteur contient de la laine de verre pour éviter que le contenu du réacteur ne s'échappe dans le tube. L'air doit être séché avant la mesure du CO_2 afin d'éviter d'endommager le matériel de mesure. Pour cela, les vapeurs d'eau contenues dans l'air sortant du réacteur sont condensées par le passage à travers un réfrigérant avant la phase de mesure. Le débit d'air traversant chaque réacteur est mesuré grâce à un régulateur de débit de précision (Brooks TR 5850). La concentration du CO_2 dégagé durant la biodégradation est mesurée de façon instantanée, plusieurs fois par jour, dans les réacteurs blanc et du matériau, et dans l'air entrant, par un analyseur IR Binos 1004.

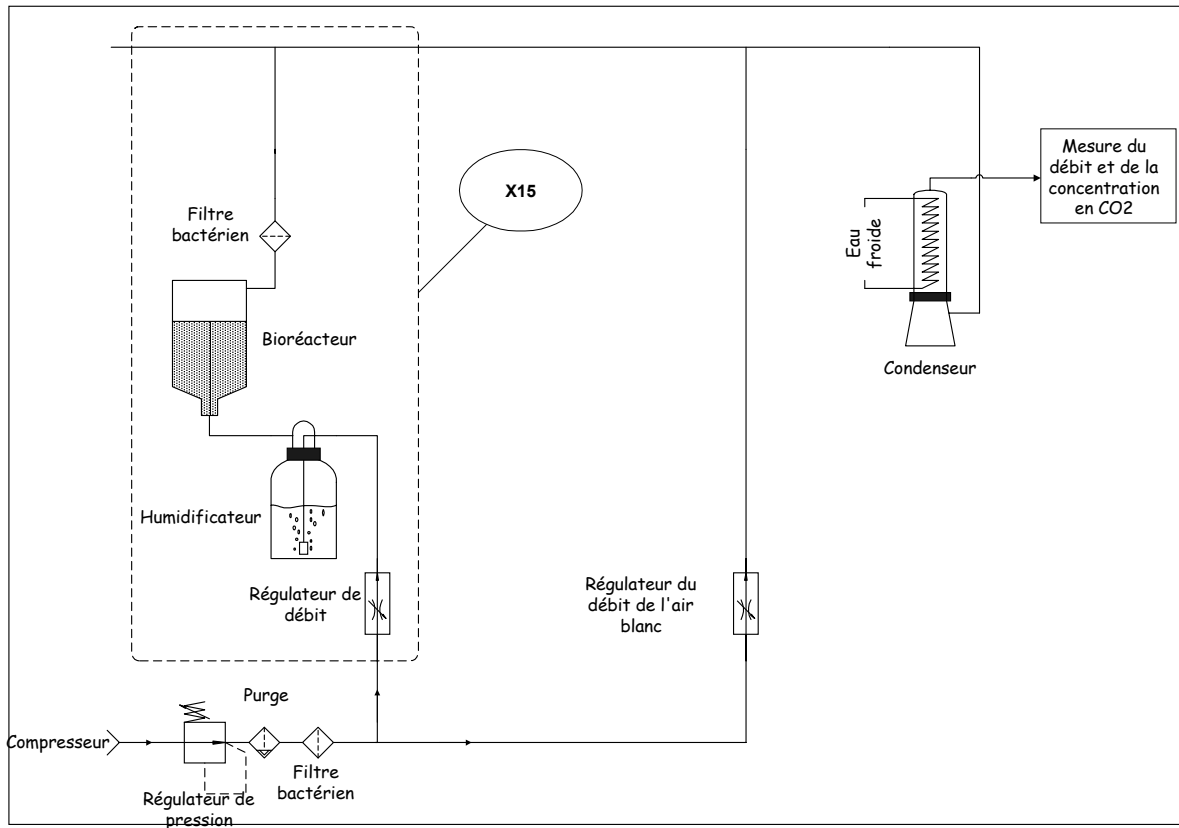


Figure II-1 : Banc de biodégradation en milieu solide

La production instantanée de CO₂ est donnée par l'équation suivante (Equation 2) :

$$M_{CO_2} (g/h) = \frac{ppm_{CO_2_1} + ppm_{CO_2_2}}{2 * RT} * \frac{MM_{CO_2}}{10^6} * D(l/h) * P \quad \text{Eq (2)}$$

Ces valeurs sont intégrées afin de déterminer la production de CO₂ nette cumulée. L'équation suivante (Equation 3) donne la quantité de CO₂ dégagé entre deux mesures :

$$M_{CO_2} (g) = \frac{ppm_{CO_2_1} + ppm_{CO_2_2}}{2 * RT} * \frac{MM_{CO_2}}{10^6} * D(l/h) * \Delta t(h) * P \quad \text{Eq (3)}$$

ppm_{CO21} et ppm_{CO22} représentent deux valeurs successives de la concentration en CO₂ moins la concentration en CO₂ de l'air (non privé de CO₂) entrant dans les réacteurs.

D est le débit d'air dans les conditions normales de température et de pression (l/h)

Δt est l'intervalle de temps entre deux mesures (h)

MM_{CO_2} est la masse molaire du CO_2 (44 g/mol)

R est la constante des gaz parfaits (0.08206 l*atm/(mol*K))

T est la température normale (273.15 K)

P est la pression normale (1 atm)

Cette valeur est ajoutée à celle précédemment obtenue pour calculer la production de CO_2 cumulée (Equation (4)) :

$$M_{CO_2} (total) = \sum_{i=1}^{n-1} M_{CO_2} i + M_{CO_2} n \quad \text{Eq (4)}$$

Le pourcentage de biodégradation est le rapport entre le CO_2 produit par le matériau sur la quantité maximale de CO_2 qui pourrait théoriquement être produit par la minéralisation totale du matériau (Equation (5)).

$$\% \text{ bio degradation} = \frac{M_{CO_2} (test) - M_{CO_2} (blanc)}{MTh_{CO_2}} * 100 \quad \text{Eq (5)}$$

$M_{CO_2}(test)$ est la quantité de CO_2 produit pendant la réaction par le matériau à tester

$M_{CO_2}(blanc)$ est la quantité de CO_2 produit pendant la réaction par le blanc

MTh_{CO_2} est la quantité maximale théorique de CO_2 produit par le matériau à tester (pourcentage massique de carbone dans le matériau*44/12)

Le taux de conversion correspond au pourcentage de matériau carboné converti en CO_2 , lorsque les mesures de blanc n'ont pas été effectuées (Equation (6)).

$$\% \text{ conversion} = \frac{M_{CO_2} (test)}{MTh_{CO_2}} * 100 \quad \text{Eq (6)}$$

3.1.2 Protocole de test

La biodégradation a lieu sur un support minéral inerte additionné d'un milieu minéral, d'extrait de sol et de nutriments. Les support utilisés sont décrits au paragraphe 3.2.

Les essais pour tester la biodégradation s'effectuent en deux étapes.

1. La phase d'activation du support inerte : Le support (400 ml) est mélangé avec une solution inoculum composée de nutriments et d'extrait de sol, pour permettre aux microorganismes de se développer (Paragraphe 3.3.1). Le volume de cette solution représente 70% de la capacité de rétention en eau du support. Le mélange est incubé à 25°C.
2. La phase de biodégradation du matériau à tester : à la fin de la phase d'activation, le matériau à tester est introduit dans les réacteurs (6.7 g de carbone par litre de solution inoculum), sauf pour les réacteurs blanc. Le matériau utilisé pour mettre au point la méthode est la cellulose (CF1 Whatmann 4021-050) avec une teneur en carbone de 41.86%. La quantité de matériau à ajouter aux réacteurs est de 40 g/l de solution inoculum.

3.1.3 Préparation des extraits de sol

Les tests de biodégradation sont effectués avec des microorganismes issus du sol. Les échantillons de sol sont prélevés en forêt (Montpellier), dans la couche supérieure du sol, à 5 cm de profondeur. Les extraits de sol sont préparés en mélangeant 1000 g de sol avec 1000 ml d'eau déminéralisée pendant 15 min. Puis le mélange est décanté. Le surnageant est récupéré à travers une passoire et centrifugé à 4000 G pendant 4 min. Les extraits de sol et les nutriments organiques et minéraux sont mélangés pour composer la solution inoculum utilisée pour activer le milieu inerte. Les différentes solutions inoculum testées sont décrites au paragraphe 3.3.1.

3.2 Etude du support inerte

Afin de déterminer le support le mieux adapté pour une simulation de biodégradation en sol, nous avons comparé, grâce à deux expériences, divers supports : pouzzolane, billes d'argile expansées, vermiculite et sol (Tableau II-I).

Tableau II-I : Les supports utilisés dans les différentes expériences

Nature du support	Capacité de rétention en eau (%)	Caractéristiques	Utilisé dans l'expérience
Pouzzolane	33	Tamisée au dessus de 3 mm	1-2
Billes d'argile expansées	17	Cassées pour augmenter la surface spécifique, tamisées au dessus de 3 mm	1-2
Vermiculite 1	300	Tamisée entre 3 et 5 mm	1-2
Vermiculite 2	300	Tamisée au dessus de 5 mm	1
Sol	42	Prélevé en forêt (Montpellier)	2

Tous les supports sont lavés à l'eau déminéralisée et séchés à l'étuve. Comme il a été décrit au paragraphe 3.1.2, 400 ml de support sont mélangés avec la solution inoculum dont le volume représente 70% de la capacité totale de rétention en eau. Donc, 50 g de vermiculite sont mélangés avec 105 ml de solution inoculum, 380 g de pouzzolane avec 45 ml d'inoculum et 150 g de billes d'argile avec 35 ml d'inoculum. Comme les microorganismes sont naturellement présents dans le sol, celui-ci n'est pas inoculé. Les compositions des différentes solutions inoculum testées sont rassemblées dans le tableau II-II.

Tableau II-II : Composition des solutions inoculum (1 l) utilisées pour la comparaison des supports

Constituants	Expérience 1	Expérience 2
Cellulose (g)	Introduit directement dans le réacteur	
Amidon de maïs (g)	20	10
Bouillon nutritif (g)	13	6.5
Urée (g)	5.8	0.145
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	0	6.08
KH ₂ PO ₄ (g)	1	0.625
K ₂ HPO ₄ (g)	0	0.8
CaCl ₂ (ml)	1	0.25
NaCl (ml)	1	0.25
MgSO ₄ (g)	0.5	0.125
Solution trace (ml) (cf. Tab. II-III)	1	0.25
Extrait de sol (ml)	500	500

Tableau II-III : Composition de la solution trace (1 l)

Constituants	Quantité (mg)
H ₃ BO ₃	50
KI	100
FeCl ₃	200
MnSO ₄	400
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	200
FeSO ₄	400

La cellulose, constituant de la solution inoculum, est directement introduite dans les bioréacteurs. Pour l'expérience 1, 20 g de cellulose par litre de solution inoculum sont ajoutés dans les bioréacteurs. Pour l'expérience 2, 10 g de cellulose par litre de solution inoculum sont ajoutés dans les bioréacteurs. Trois bioréacteurs sont préparés pour chaque support.

La production de CO₂ a été suivie pendant 12 et 22 jours, pour les expériences 1 et 2, respectivement. Le choix du support le plus approprié est déterminé durant la phase d'activation. Les critères de comparaison sont la production de CO₂ et la reproductibilité (évaluée par les valeurs d'écart-type).

3.3 Etude de la phase d'activation

Une procédure d'activation a été décrite par Bellia *et al.* (1999), mais elle correspond plus à une simulation de compost qu'à une simulation de sol. Cette procédure a donc été modifiée pour être applicable à notre cas.

3.3.1 Choix de la composition de la solution inoculum

Comme nous l'avons expliqué en conclusion de la synthèse bibliographique, le pH est un facteur clé pour la biodégradation en sol. Il doit être stable et proche de 7 pour permettre aux microorganismes du sol de survivre et de se développer. Le but des manipulations que nous décrivons dans ce paragraphe est de trouver la composition de la solution inoculum permettant de stabiliser le pH à 7.

En raison des difficultés rencontrées pour la mesure du pH dans un milieu solide, les bioréacteurs sont remplis avec la solution inoculum uniquement, sans support inerte. Pour chaque expérience, le pH et la production de CO₂ sont mesurés.

Quatre expériences (numérotées 3 à 6) sont effectuées avec différentes compositions de la solution inoculum décrites dans le tableau II-IV.

Tout d'abord, la solution décrite par Bellia *et al.* (1999), pour la simulation de compost, a été testée pour montrer ses limites dans notre test (Expérience 3). Ensuite, pour éviter une augmentation du pH, deux méthodes ont été testées. Tout d'abord, une solution tampon a été ajoutée directement dans la solution inoculum avant la phase d'activation (Expérience 4). Puis, l'urée a été partiellement remplacée par une autre source d'azote moins basique (Expériences 5 et 6).

Lors de l'expérience 4, la quantité de KH₂PO₄ est augmentée. KH₂PO₄ est une espèce tampon, et est déjà présente dans la solution inoculum. Mais la quantité nécessaire pour neutraliser les molécules de NH₃ relarguées par la dégradation de l'urée, est 100 fois supérieure à la quantité présente dans la solution. L'expérience 4 compare différentes quantités de KH₂PO₄ comprises entre celle présente dans la solution initiale et celle 100 fois supérieure.

Lors de l'expérience 5, l'urée est progressivement remplacée par le sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄. Pour cette expérience, l'azote provient de deux sources : l'urée et le sulfate d'ammonium. Le paramètre (R), correspondant à la quantité d'azote provenant de l'urée par rapport à celle provenant du sulfate d'ammonium, est progressivement réduit de 100% à 0% par pas de 25%, tandis que la quantité d'azote provenant du sulfate d'ammonium augmente inversement de 0% à 100%.

L'expérience 6 concerne un réglage plus fin des paramètres étudiés au cours de l'expérience précédente.

Tableau II-IV : Composition des solutions inoculum (1 l) utilisées pour l'optimisation du pH

Constituants	Expérience 3	Expérience 4						Expérience 5					Expérience 6			
Cellulose (g)	2/réacteur	2/réacteur						1/réacteur					1/réacteur			
Amidon de maïs (g)	20	20						10					10			
Bouillon nutritif (g)	13	13						6.5					6.5			
Urée (g)	5.8	5.8						2.9	2.175	1.45	0.725	0	0.696	0.464	0.232	0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	0	0						0	1.6	3.2	4.8	6.4	4.864	5.375	5.887	6.4
KH ₂ PO ₄ (g)	1	1	20	40	60	80	100	0.25					0.625			
K ₂ HPO ₄ (g)	0	0						0					0.8			
CaCl ₂ (ml)	1	1						0.25					0.25			
NaCl (ml)	1	1						0.25					0.25			
MgSO ₄ (g)	0.5	0.5						0.125					0.125			
Solution trace (ml) (cf. Tab. II-III)	1	1						0.25					0.25			
Extrait de sol (ml)	500	500						500					500			

3.3.2 Choix de la durée de la phase d'activation

En simulation de compost, sur support inerte, l'activation a classiquement lieu à 58°C et dure trois jours. L'activation avec des extraits de sol est effectuée à 25°C. Comme les cinétiques sont plus lentes, la durée d'activation doit être augmentée.

Le support inerte est activé comme décrit dans le paragraphe 3.3.1, expérience 6. La vitesse de production instantanée de CO₂ est suivie. On considère que la phase d'activation est achevée lorsque la production instantanée est constante, montrant que la multiplication des microorganismes a cessé.

3.3.3 Comparaison de deux protocoles d'activation

Deux méthodes d'activation ont été testées : une activation individuelle et une activation commune. Dans le premier cas, le processus a lieu, individuellement, dans chaque bioréacteur. Dans le deuxième cas, la solution inoculum est mélangée avec le support inerte dans un bac. Ce mélange est ensuite séparé et réparti dans les bioréacteurs, à la fin de la phase d'activation.

Ces deux processus d'activation individuelle ou commune ont des avantages et des inconvénients. Avec l'activation individuelle, la production de CO₂, durant la phase d'activation peut être suivie par analyseur IR. L'activation commune permet de gagner du temps, car elle est réalisée en temps masqué, mais elle ne peut pas être contrôlée par respirométrie.

La composition de la solution inoculum a été optimisée lors de l'étape précédente, et est la même pour les deux activations. Elle est décrite dans le tableau II-V.

Tableau II-V : Composition de la solution inoculum (1 l) utilisée pour la comparaison de des méthode d'activation

Constituants	Activation individuelle	Activation commune
Cellulose (g)	0.45/réacteur	10
Amidon de maïs (g)		10
Bouillon nutritif (g)		6.5
Urée (g)		0.145
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)		6.08
KH ₂ PO ₄ (g)		0.625
K ₂ HPO ₄ (g)		0.8
CaCl ₂ (ml)		0.25
NaCl (ml)		0.25
MgSO ₄ (g)		0.125
Solution trace (ml) (Cf. Tab. II-III)		0.25
Extrait de sol (ml)		500

3.3.3.1 Activation individuelle

L'activation individuelle a lieu dans les bioréacteurs. Huit des bioréacteurs sont remplis avec 380 g de pouzzolane et 45 ml de solution inoculum, puis agités. Tous les jours, les réacteurs sont agités, pesés, et la perte de poids est compensée par de l'eau déminéralisée.

3.3.3.2 Activation commune

L'activation a lieu dans un bac de 10 l. Une quantité de 3380 g de pouzzolane est inoculée avec 400 ml de solution inoculum. Après la phase d'activation, huit bioréacteurs sont remplis avec 425 g de pouzzolane activée.

3.3.3.3 Biodégradation de la cellulose après activation

Pour étudier l'influence du protocole d'activation sur le processus de biodégradation, la biodégradation de la cellulose est entreprise sur la pouzzolane activée.

Pour les deux activations, 1.8 g de cellulose sont ajoutés dans six des huit bioréacteurs. Les deux bioréacteurs restants sont utilisés pour les blancs. Trois fois par jour, la production

de CO₂ est mesurée pour déterminer la biodégradation de la cellulose. Tous les jours, les bioréacteurs sont agités, pesés, et la perte de poids est compensée par de l'eau déminéralisée.

Les critères de comparaison entre les deux méthodes sont la production nette de CO₂ et la reproductibilité évaluée par les écart-type entre les six essais. Plus l'écart-type est élevé, plus la reproductibilité est faible.

3.4 Automatisation du banc « solide »

Jusqu'à présent les mesures de dégagement instantané de CO₂ étaient effectuées manuellement trois fois par jour. Pour déterminer la quantité cumulée de CO₂ dégagé, nous supposons ensuite que l'évolution de la concentration en CO₂, entre deux mesures, était linéaire. Ce type de mesure peut induire des erreurs, car nous perdons des informations, notamment la nuit. Nous avons donc décidé d'automatiser le banc pour obtenir un nombre de mesures plus important, et minimiser notre erreur. Afin de mettre en évidence l'efficacité de cette automatisation, nous avons comparé des résultats de taux de conversion et de production instantanée de CO₂ obtenus de façon manuelle et automatique. Ces comparaisons ont été effectuées lors de la recherche de la composition de la solution inoculum (Expériences non-décrites). Sur un réacteur, la mesure a été prise en parallèle de façon automatique et manuelle.

Après avoir vérifié l'amélioration des mesures par automatisme, nous avons automatisé tout le banc (c'est à dire les 15 bioréacteurs et l'air entrant).

Une schématisation de ce banc est représenté figure II-2.

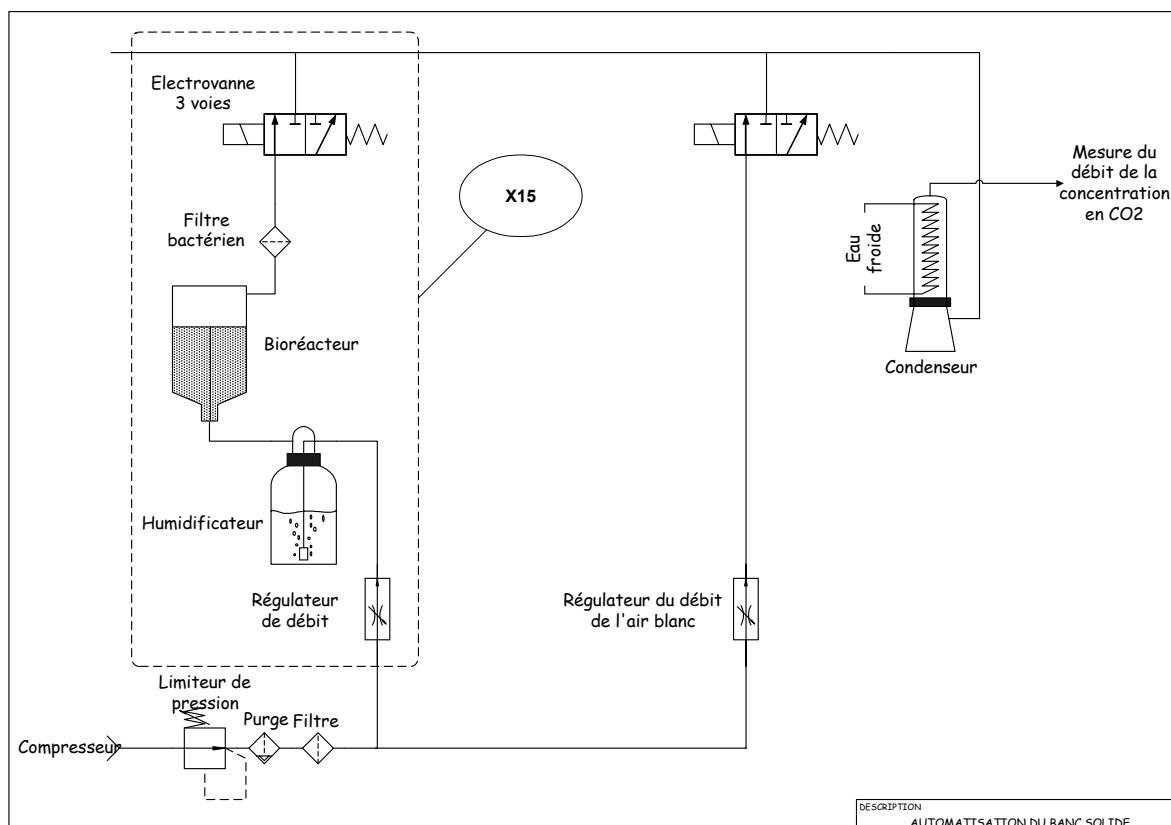


Figure II-2 : Banc de biodégradation automatisé en milieu solide

L'arrivée et la séparation du flux d'air sur le banc s'effectuent de la même façon que pour les mesures manuelles. Puis, pour chaque réacteur, après avoir traversé le lit minéral, l'air sort par une électrovanne trois voies à pincement de tubes. Lorsque l'électrovanne est au repos, l'air sortant est dégagé dans le laboratoire. Au moment de l'analyse, l'électrovanne commute et l'air sortant est envoyé vers un débitmètre massique et l'analyseur IR. Cette période d'analyse dure 3 minutes. Au bout des 3 minutes, les valeurs du débit et de la concentration en CO_2 en ppm dégagés sont enregistrées. Puis l'électrovanne retourne en position de repos et celle du réacteur suivant est activée. Lorsque les mesures de dégagement de CO_2 des 15 réacteurs sont terminées, l'électrovanne 16 est activée pour mesurer la teneur en CO_2 dans l'air ambiant. L'ordinateur de commande repart ensuite pour un nouveau cycle de mesure.

4 RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Etude du support inerte

Les vitesses de conversion du carbone présent dans la solution inoculum sur différents supports sont représentées figures II-3 et II-4. Les écart-types sont calculés pour trois réacteurs et représentés sous forme de barres.

La première expérience montre que le plus haut taux de conversion est obtenu avec la pouzzolane. Les écart-types sont faibles pour tous les supports. Pour cette expérience, la différence de reproductibilité n'est pas assez significative pour être un critère de choix entre les différents supports. Nous ne voyons pas de différence entre les deux types de vermiculite. La vermiculite 2 ne sera donc pas testée dans l'expérience 2.

La deuxième expérience confirme les résultats obtenus avec l'expérience précédente. Le taux de conversion est plus élevé pour la pouzzolane que pour les autres supports, et les écart-types sont équivalents pour tous. L'utilisation du sol n'améliore pas la biodégradation. Il montre, au contraire, le plus faible taux de conversion.

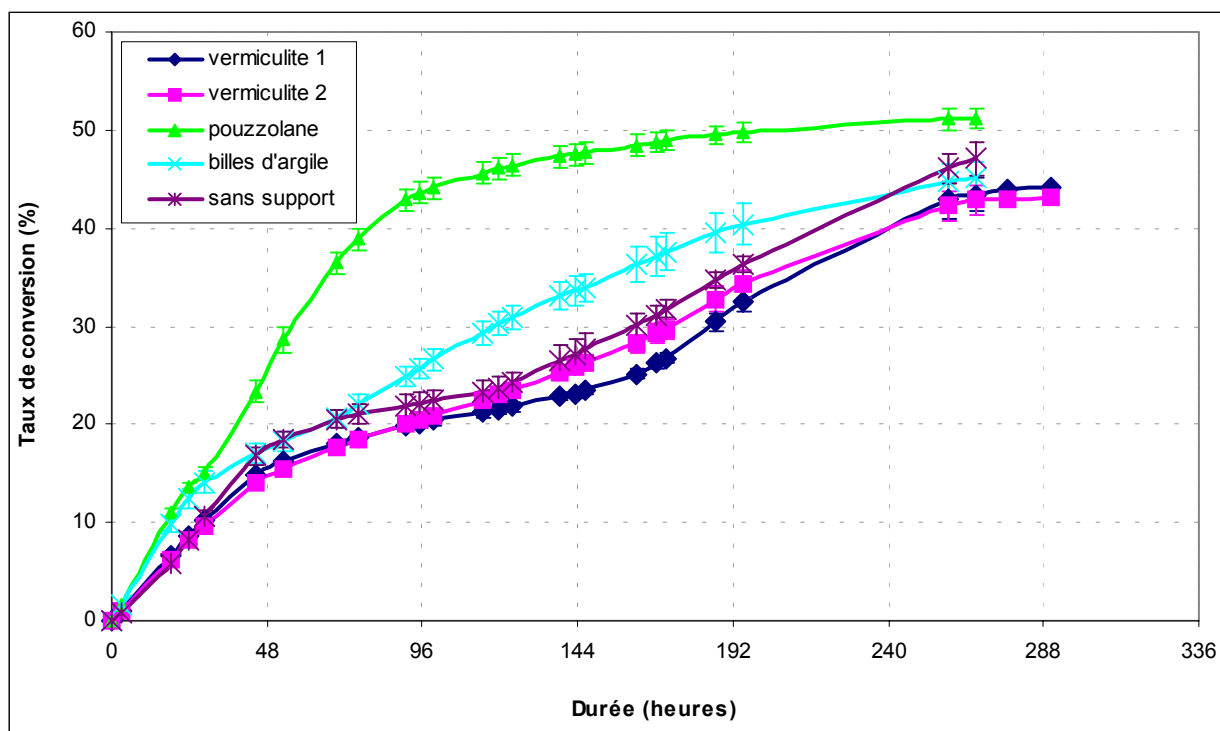


Figure II-3 : Taux de conversion du carbone durant la phase d'activation sur différents supports inertes (Expérience 1)

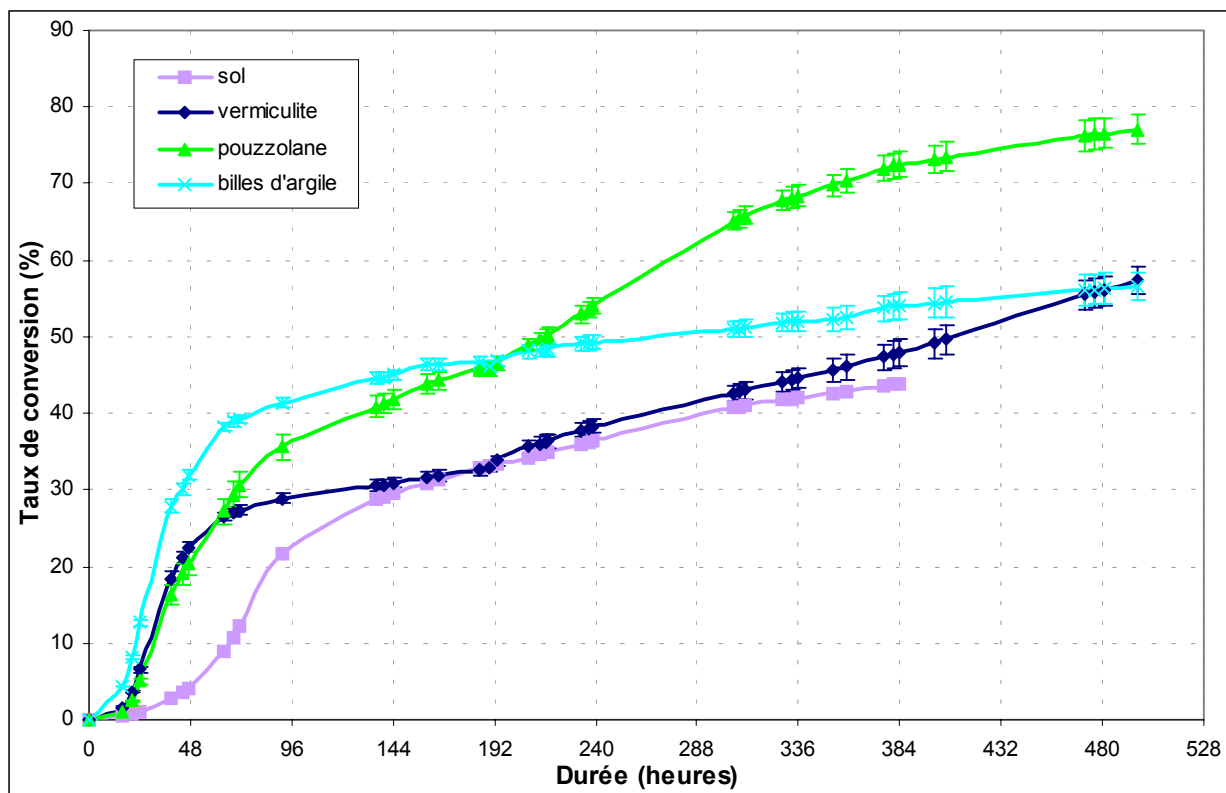


Figure II-4 : Taux de conversion du carbone durant la phase d'activation sur différents supports inertes (Expérience 2)

Comme nous l'énoncions en conclusion de la synthèse bibliographique, la capacité de rétention en eau de la vermiculite correspond plus à celle du compost qu'à celle du sol. En revanche, la capacité de rétention en eau de la pouzzolane se rapproche de celle du sol. Les microorganismes extraits du sol se reproduiront, donc, plus facilement sur la pouzzolane que sur la vermiculite.

De plus, la vermiculite et les billes d'argile expansées sont chargées négativement. Elles créent des liaisons ioniques avec les nutriments et les microorganismes qui pourront entraver les interactions entre eux. La pouzzolane n'est pas chargée et évite, donc, ce phénomène.

D'après ces résultats, nous avons décidé d'effectuer les tests de biodégradation sur la pouzzolane.

4.2 Etude de la phase d'activation

4.2.1 Choix de la composition de la solution d'inoculum

Les taux de conversion et les écart-types obtenus pour l'expérience 3 sont représentés sur la figure II-5. Après cinq jours, le taux de conversion commence à atteindre un plateau, alors que seulement 20% du carbone a été biodégradé. Au cinquième jour, la valeur du pH mesurée dans le liquide est de 9. Les microorganismes du sol sont très sensibles aux variations de pH et meurent à pH basique. Au sixième jour (144 h), une solution tampon (KH_2PO_4 4.10^{-3} mol/l et K_2HPO_4 4.10^{-3} mol/l) à pH=7 a été ajoutée au milieu, ce qui permet au processus de biodégradation de redémarrer.

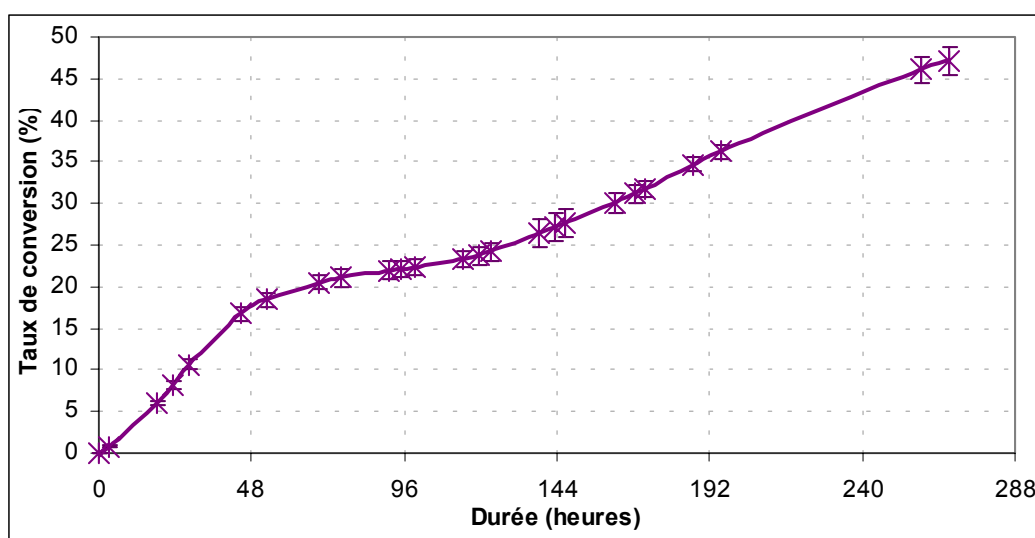


Figure II-5 : Taux de conversion du carbone durant la phase d'activation avec la solution inoculum classiquement utilisée pour une simulation de compost (Expérience 3)

Pour stabiliser le pH à 7, en évitant d'avoir à ajouter cette solution tampon au cours de la biodégradation, la solution inoculum doit être adaptée aux caractéristiques des microorganismes.

En simulation de compost, la solution inoculum contient de l'urée. Au cours de sa biodégradation, des molécules de NH_3 sont relarguées, et par conséquent le pH augmente.

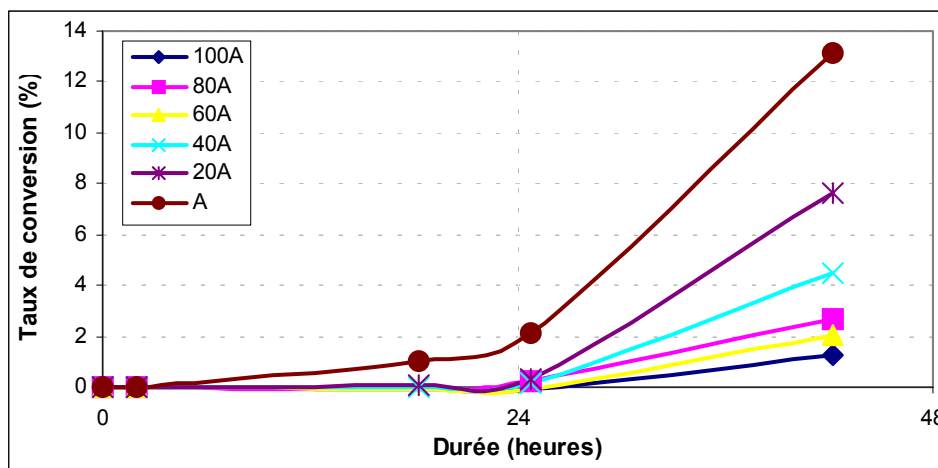


Figure II-6 : Taux de conversion du carbone durant la phase d'activation – Comparaison de différentes concentrations en KH_2PO_4 , A est la quantité initiale en KH_2PO_4 et les concentrations utilisées sont multiples de A (Expérience 4)

Les courbes des taux de conversion obtenus pour l'expérience 4 sont représentées figure II-6. Plus la concentration en KH_2PO_4 est élevée, plus le taux de conversion est faible. Nous nous attendions à observer un phénomène inverse. Le pH a été mesuré en début de test. Pour la concentration initiale A en KH_2PO_4 , le pH est de 7. La valeur du pH diminue lorsque la concentration en KH_2PO_4 augmente. La valeur la plus faible, obtenue pour la concentration de 100A, est de 5.5. Le plus faible taux de conversion est donc obtenu pour la concentration la plus élevée en KH_2PO_4 , car le pH acide inhibe les microorganismes. Par conséquent, augmenter la concentration en KH_2PO_4 dans la solution inoculum ne permet pas de stabiliser le pH de la solution.

Lors de l'expérience 5, l'urée est progressivement remplacée par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Les courbes de taux de conversion (Figure II-7) ne montrent pas de différences significatives, sauf pour une concentration en urée de 0%. La valeur de pH est mesurée au cours de la phase d'activation (Figure II-8). Le pH initial est de 6.5. Au cours, du processus de dégradation, il varie entre 5.5 et 9. Plus le paramètre R est élevé (donc la concentration en urée), plus le pH est haut. Donc, pour obtenir une valeur de pH proche de 7, R doit être choisi entre 0 et 25%.

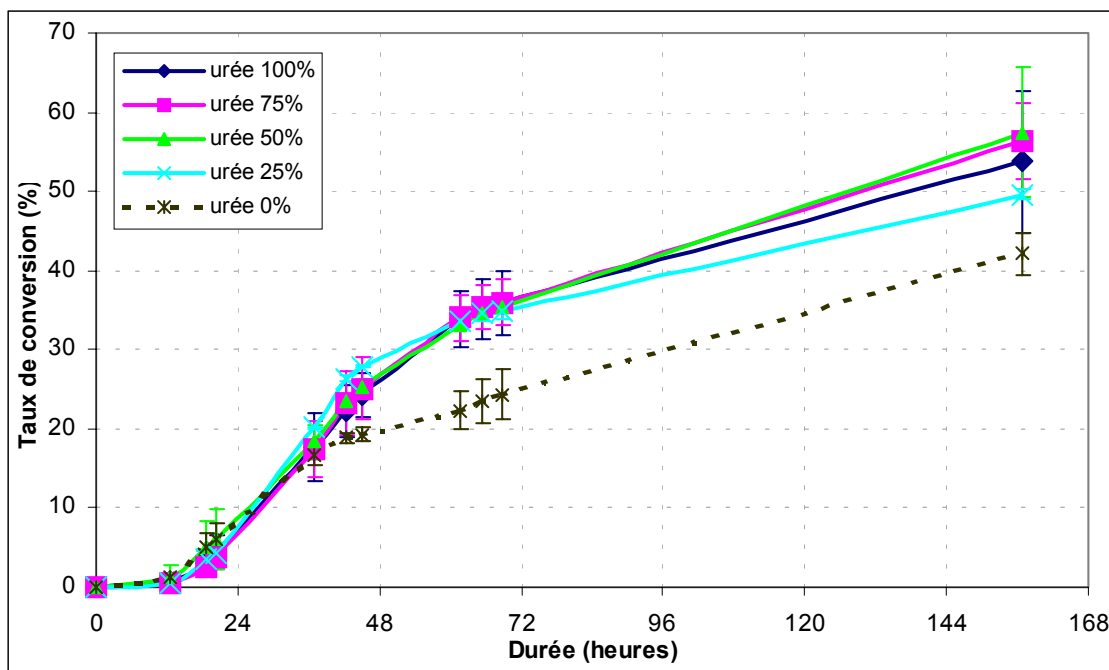


Figure II-7 : Taux de conversion du carbone durant la phase d'activation – Remplacement progressif de l'urée par le sulfate d'ammonium (Expérience 5)

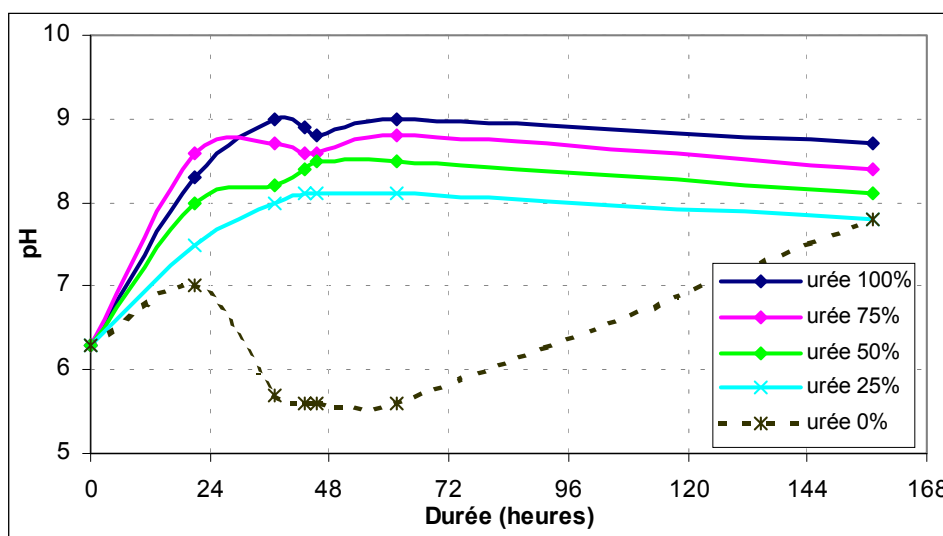


Figure II-8 : Valeurs de pH durant la phase d'activation – Remplacement progressif de l'urée par le sulfate d'ammonium (Expérience 5)

Lors de l'expérience 6, d'après les résultats précédents, les valeurs du paramètre R sont fixées à 0%, 8%, 16% et 24%. (Tableau II-IV). De plus, K_2HPO_4 , la base conjuguée de KH_2PO_4 (pH=7), est ajoutée à la solution en concentration molaire équivalente. Les deux formes conjuguées du couple acido-basique sont présentes dans la solution, ce qui augmente

le pouvoir tampon. Les taux de conversion sont équivalents pour toutes ces concentrations (Figure II-9). Les valeurs des écart-types et de pH vont nous permettre de déterminer la valeur de R la plus appropriée. Les valeurs de pH se situent entre 6 et 8 (Figure II-10). Le pH est le plus proche de 7 pour R compris entre 0% et 8%. Pour les tests suivants, la valeur de R est fixée à 5%.

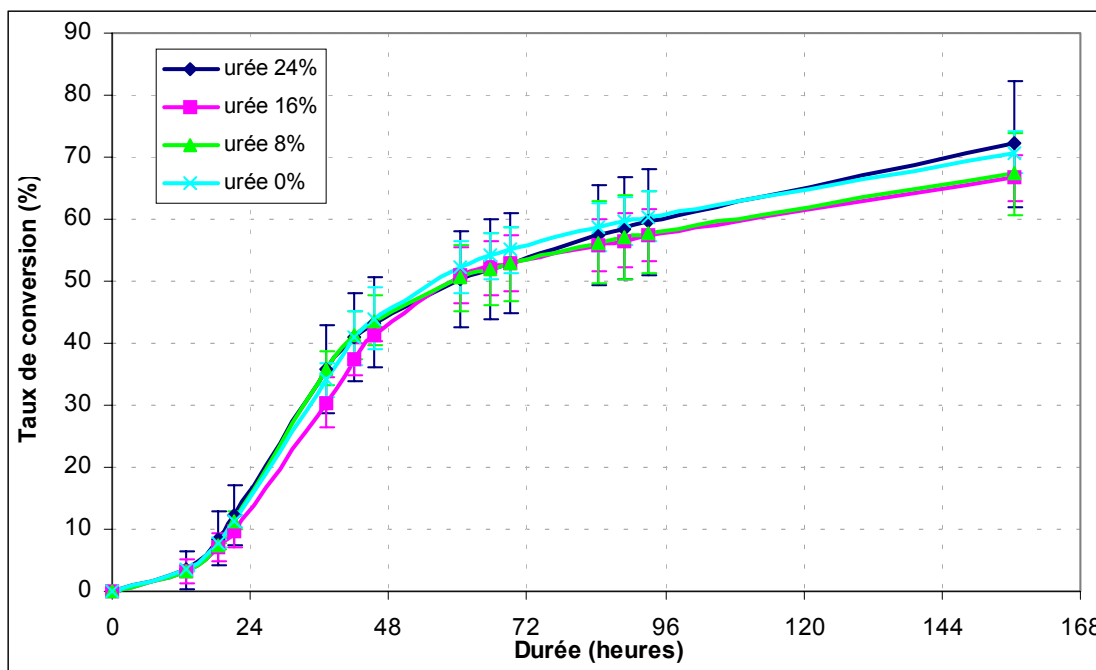


Figure II-9 : Taux de conversion du carbone durant la phase d'activation – Remplacement progressif de l'urée par le sulfate d'ammonium (Expérience 6)

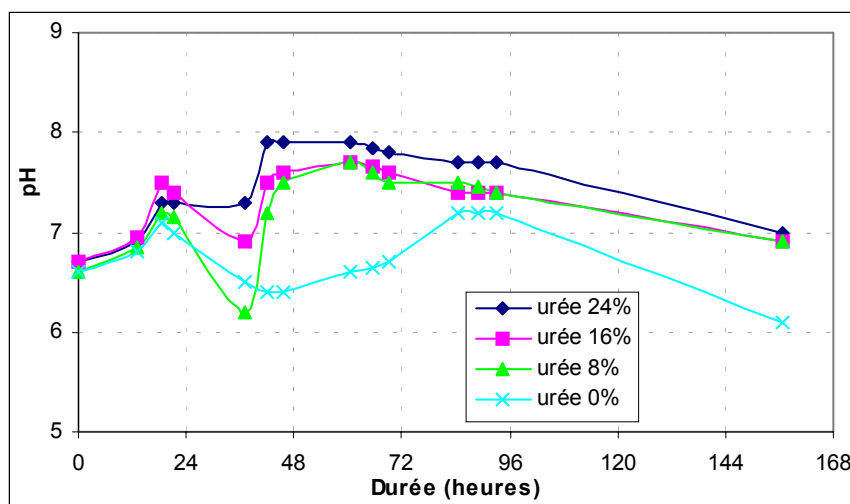


Figure II-10 : Valeurs de pH durant la phase d'activation – Remplacement progressif de l'urée par le sulfate d'ammonium (Expérience 6)

Au cours de ces quatre expériences, nous n'avons pas fait varier seulement les concentrations en azote, mais aussi celles en produits carbonés (cellulose, amidon, bouillon nutritif). Comme il est décrit dans le tableau II-IV, les concentrations utilisées pour les expériences 5 et 6 sont divisées par deux par rapport à celles utilisées pour les expériences 3 et 4. Ceci permet une augmentation du taux de conversion final. En effet, nous obtenons 26%, 55% et 65%, respectivement, pour les expériences 3, 5 et 6. Les microorganismes du sol sont moins actifs que ceux du compost, ils n'ont donc pas besoin d'une grande quantité de carbone. Pour les tests suivants, la concentration en carbone est divisée par deux, par rapport à celle décrite dans la procédure de Bellia *et al.* (1999).

4.2.2 Choix de la durée de la phase d'activation

La durée de la phase d'activation a été déterminée lors de l'expérience 2. La production instantanée de CO₂, pour trois supports, est représentée figure II-11. Cette production est importante durant les cinq premiers jours puis décroît. Après dix jours d'activation, le carbone introduit n'est pas encore totalement minéralisé, mais la quantité de CO₂ dégagé est stable. Nous avons donc décidé d'utiliser une phase d'activation de dix jours.

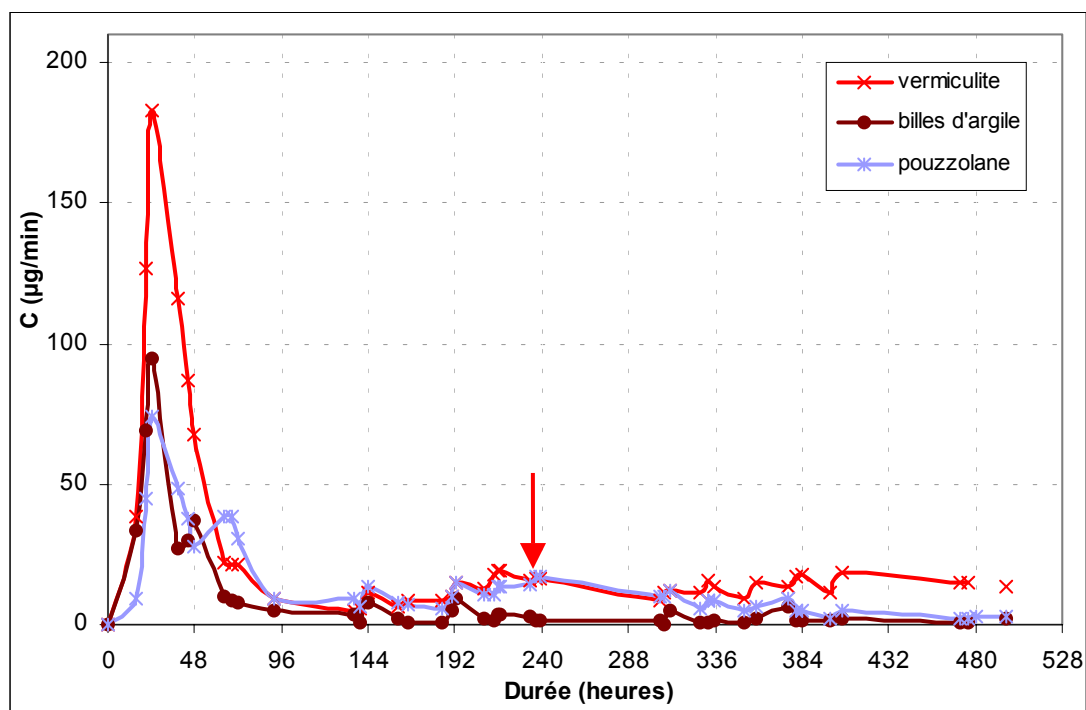


Figure II-11 : Production instantanée de CO₂ durant la phase d'activation – détermination de la durée de l'activation

Lors de nombreuses expériences, que nous ne décrivons pas ici, le nombre d'unités formant colonies (UFC) est mesuré avant et après l'activation. Dans chacun des cas, le nombre d'UFC est proche de 10^5 /ml avant activation, et autour de 10^8 /ml après activation. Une activation de dix jours permet donc d'augmenter la concentration des microorganismes sur les supports inertes d'un facteur 10^3 .

4.2.3 Comparaison de deux protocoles d'activation

Les critères de comparaison entre ces deux protocoles sont la production nette de CO_2 et la reproductibilité. Ces comparaisons sont faites sur la production instantanée de CO_2 , à partir des courbes de biodégradation de la cellulose après activation (Figures II-12 et II-13).

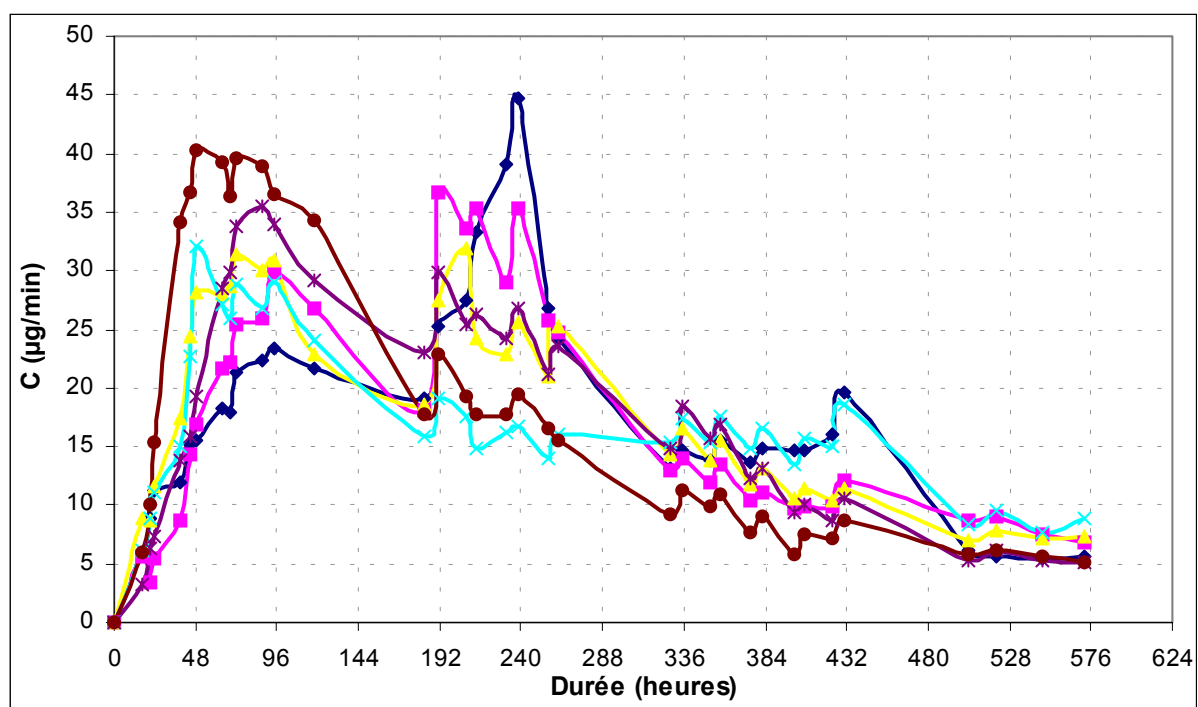


Figure II-12 : Production instantanée de CO_2 durant la biodégradation de la cellulose après activation individuelle

Une grande disparité des résultats est obtenue pour l'activation individuelle, lors des dix premiers jours (Figure II-12). Les valeurs maximales des écart-types, entre les bioréacteurs, durant cette période sont de 10.39 et 3.73, respectivement, pour l'activation individuelle et pour l'activation commune (Figure II-13).

Les taux de biodégradation moyens, obtenus pour ces deux méthodes, ne sont pas significativement différents (Figure II-14). Le plateau est atteint après une même durée.

Considérant ces différents résultats, nous avons choisi d'utiliser l'activation commune pour les prochains tests.

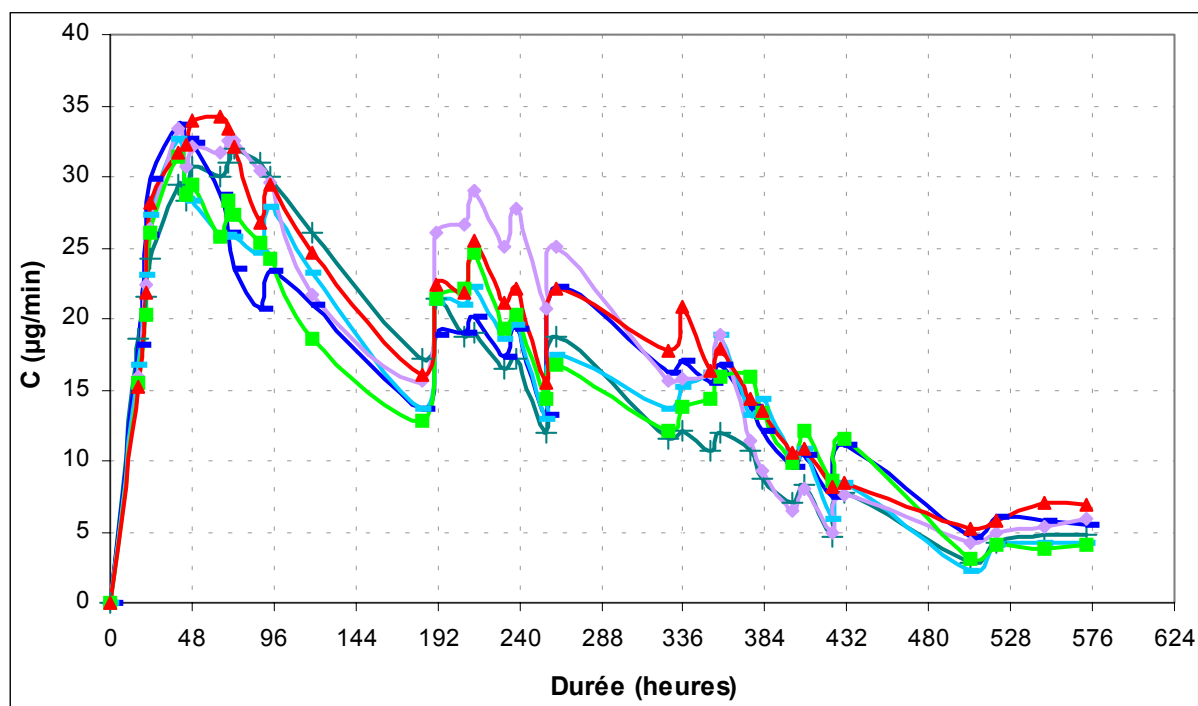


Figure II-13 : Production instantanée de CO₂ durant la biodégradation de la cellulose après activation commune

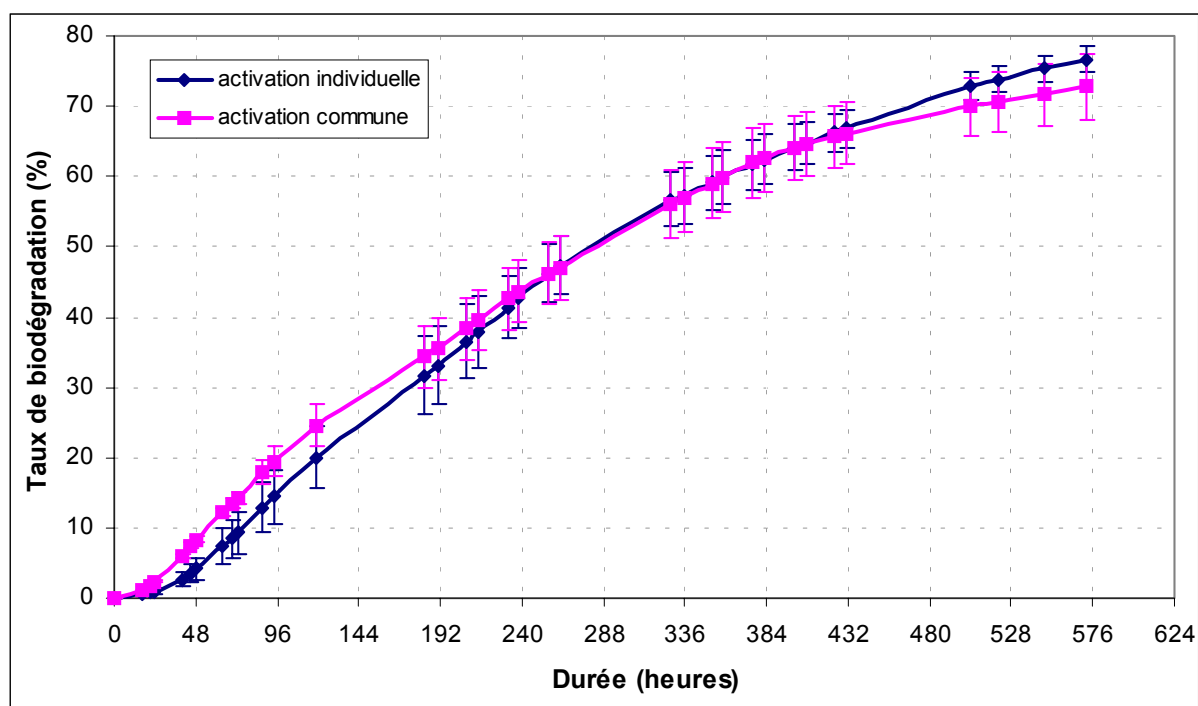


Figure II-14 : Taux de biodégradation de la cellulose, comparaison des protocoles d'activation

Avec l'activation commune, les valeurs des écart-types sont plus faibles, en particulier en début de test, lorsque la production en CO₂ est la plus importante. Le taux de biodégradation atteint, avec cette méthode, est de 72.8% avec un écart-type de 4.6, en 24 jours. De plus, contrairement à l'activation individuelle, nous pouvons procéder à une activation commune alors qu'une autre expérience est encore en cours sur le banc de biodégradation. Dix jours peuvent être ainsi gagnés sur la durée d'une expérimentation.

4.3 Automatisation du banc solide

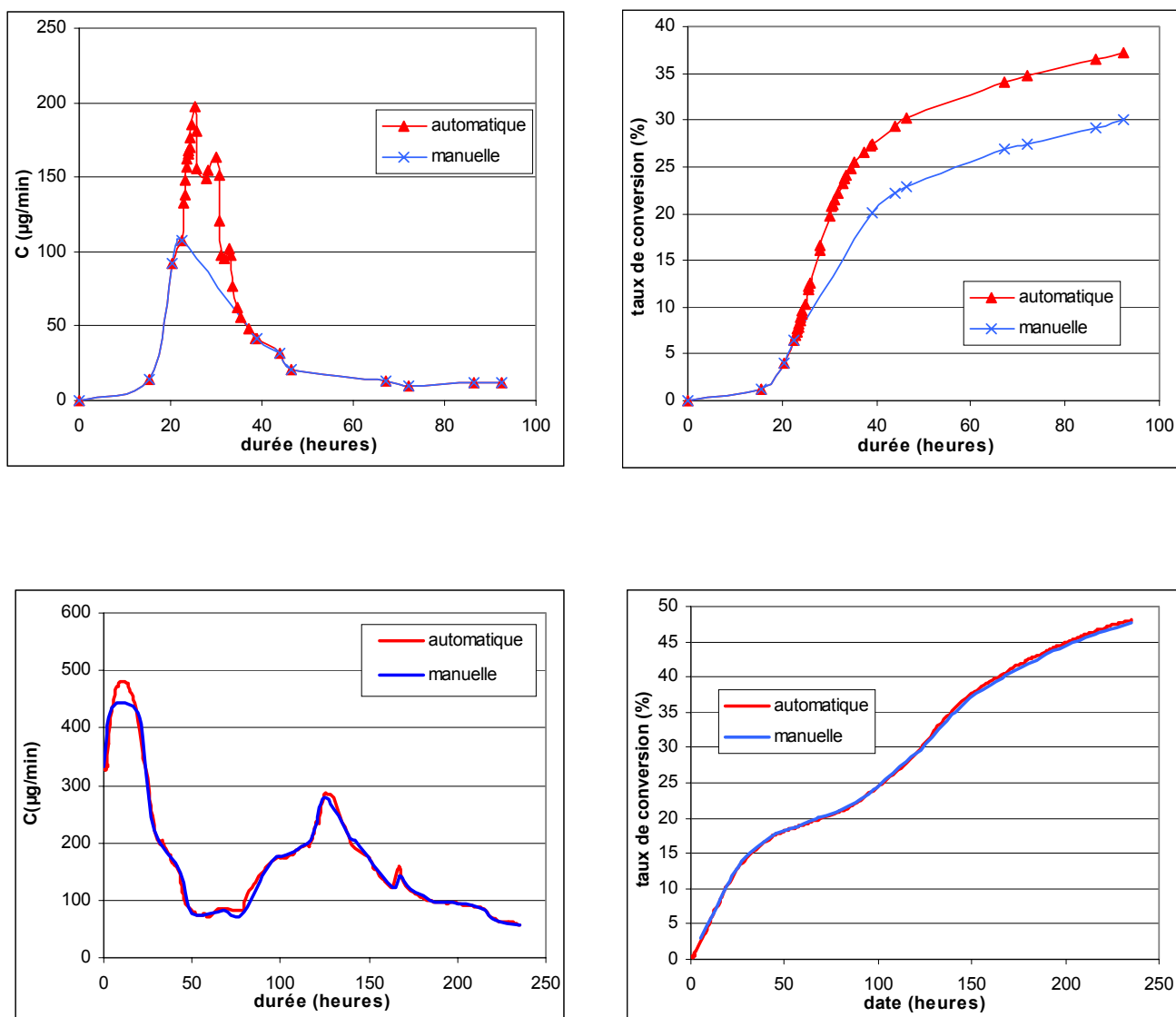


Figure II-15 : Vitesses de production du CO₂ et taux de conversion mesurés de façon manuelle et automatique

Nous avons comparé les taux de conversion et les vitesses de production de CO₂ mesurés de façon manuelle et automatique. Les résultats se trouvent figure II-15. Nous

constatons que la différence obtenue entre ces deux méthodes de mesure est plus ou moins importante en fonction du déroulement de l'expérience. Dans le premier cas, le pic de dégradation se produit pendant la nuit, ce qui se traduit par une différence sur le taux de conversion de 8%. Lors du deuxième essai, les différences sont moins significatives. Cependant ces essais nous montrent l'importance de l'automatisation sur la pertinence de la mesure. Les expériences que nous décrivons ensuite (Chapitre 3) ont été réalisées sur le banc automatisé.

5 **C**ONCLUSION

A partir d'une étude bibliographique sur les différents tests de biodégradation en milieu solide, nous avons pu déterminer une procédure de base pour la dégradation sur support inerte et nous avons mis en évidence les paramètres à étudier afin de mettre au point un protocole de test de simulation de sol. Le protocole de test ainsi que le matériel ad'hoc (un banc de dégradation en milieu solide) ont été développés sur cette base.

Les taux de biodégradation de la cellulose obtenu à l'aide de ce nouveau test ont été comparés à ceux du test de Sturm (Sturm, 1973). Le test de Sturm est un test en milieu liquide, mais c'est un test normalisé communément utilisé dans les laboratoires pour une évaluation rapide de la biodégradabilité. La figure II-16 montre les courbes de taux de biodégradation obtenus pour ces deux méthodes. Un taux de biodégradation de 80% en 28 jours est obtenu pour notre test et pour le test de Sturm, ce qui confirme l'intérêt de notre protocole.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent qu'il est possible d'effectuer un test de simulation de sol sur support inerte. Nous avons mis au point et validé une nouvelle méthode. Nous avons alors déterminé et proposé des conditions optimales de test, à savoir :

- Le support inerte est constitué de pouzzolane et l'inoculum d'un lixiviat de sol.
- La composition de la solution inoculum est décrite dans les tableaux II-V et II-III.
- Une phase d'activation commune de dix jours est réalisée à 25°C afin d'acclimater les microorganismes aux conditions du test.

Grâce à ce protocole, le processus de biodégradation est moins dépendant de la composition du sol (humidité, matière organique, température, ratio C/N, etc.). La

biodégradation en sol peut donc, sous certaines conditions, être standardisée. C'est à partir de ce support et de ce protocole de test que nous allons ensuite pouvoir étudier la dégradation de plusieurs matériaux. C'est l'objet du prochain chapitre.

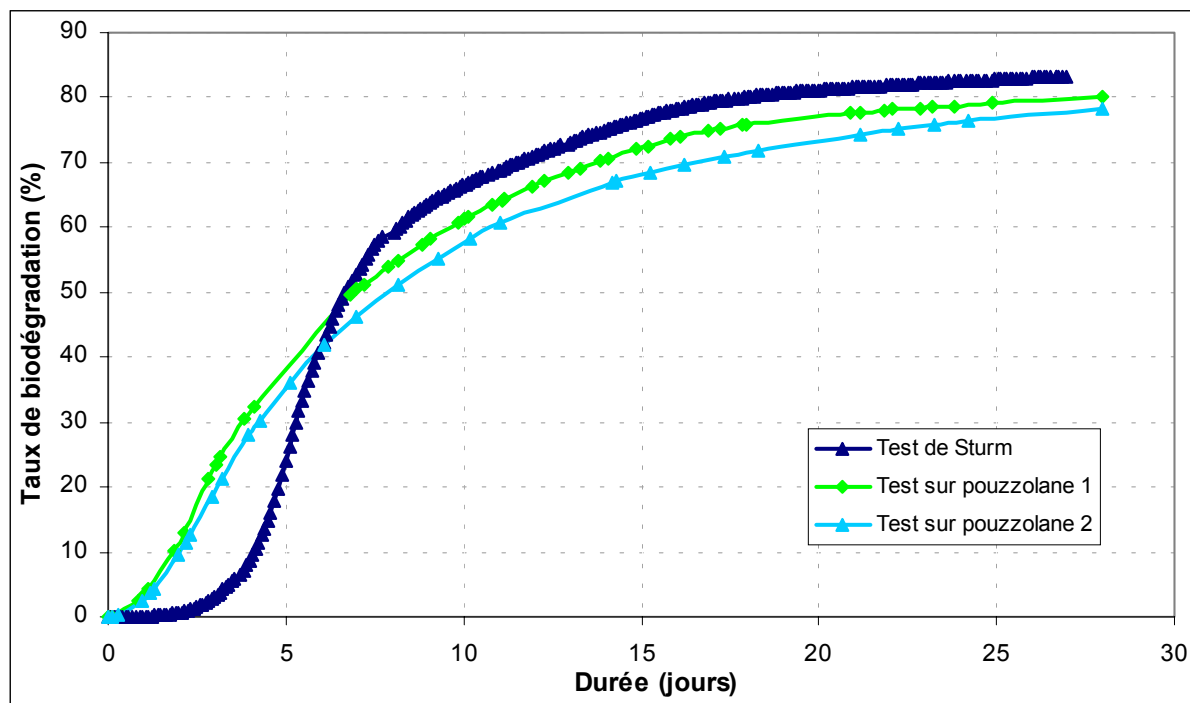


Figure II-16 : Taux de biodégradation de la cellulose déterminé par test de Sturm (boues activées) et par test sur pouzzolane (extrait de sol)

6 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agarwal, M., Koelling, K.W., Chalmers, J.J. 1998. Characterization of the degradation of polylactic acid polymer in a solid substrate environment. *Biotechnology Progress*. **14**(3): p517-526.

Akahori, S., Osawa, Z. 1994. Preparation and biodegradation of polycaprolactone-paper composites. *Polymer Degradation and Stability*. **45**: p261-265.

Angehrn, D., Schluep, M., Gälli, R., Zeyer, J. 1999. Movement and fate of residual mineral oil contaminants in bioremediated soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **18**(10): p2225-2231.

ASTM 1992. D5338-92 Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions.

Bartha, R., Pramer, D. 1965. Features of flask and method for measuring the persistence of pesticides in soil. *Soil Biol. Sci.* **100**: p68-70.

Bellia, G., Tosin, M., Degli-Innocenti, F. 2000. The test method of composting in vermiculite is unaffected by the priming effect. *Polymer Degradation and Stability.* **69**(1): p113-120.

Bellia, G., Tosin, M., Floridi, G., Degli-Innocenti, F. 1999. Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions. *Polymer Degradation and Stability.* **66**: p65-79.

CEN 1998a. Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of packing materials under aqueous medium-method by analysis of released carbon dioxide.

CEN 1999. Plastics-Evaluation of the aerobic biodegradability of plastic materials in a mineral solid medium.

CEN 1998b. Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of packaging materials under controlled composting conditions - Method by analysis of released carbon dioxide.

Day, M., Krzymien, M., Shaw, K., Zaremba, L., Wilson, W.R., Botden, C., Thomas, B. 1998. An investigation of the chemical and physical changes occurring during commercial composting. *Compost Science and Utilization.* **6**(2): p44-66.

De Baere, L.A., De Wilde, B., Tillinger, R. 1994. Standard test methods for polymer degradation in solid waste treatment system. in: Y. Doi, K. Fukuda (eds.), *Biodegradable Plastics and Polymers.* Elsevier Science BV, Amsterdam, Pays-Bas. p323-330.

Decriaud-Calmon, A. 1998. Evaluation objective de la biodégradabilité des matériaux polymères : mise au point d'une méthode et d'un dispositif expérimental. *Thèse à l'Institut National Polytechnique de Toulouse*

Degli-Innocenti, F. 1998. A degradation test method for polymers in a defined solid matrix (the vermiculite test method). *International Biodeterioration Research Group.* Chester, UK.

Degli-Innocenti, F., Tosin, M., Bastioli, C. 1998a. Evaluation of the biodegradation of starch and cellulose under controlled composting conditions. *Journal of Environmental Polymer Degradation.* **6**(4): p197-202.

Degli-Innocenti, F., Tosin, M., Bellia, G., Bastioli, C. 1998b. A test method for measuring biodegradation of plastic materials under composting conditions based on mineral bed. *Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers Symposium "How polymers made, modified by biological systems ?"*. Münster, Germany.

Eya, H., Iwaki, N., Otsuji, Y. 1994. A study of methods of testing biodegradable plastics in soil : aerobic and anaerobic gas evolution test ; Petri dish test in various soils. in: Y. Doi, K. Fukuda (eds.), *Biodegradable Polymers and Plastics*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Pays-Bas. p337-344.

Garcia-Valcarcel, A.I., Tadeo, J.L. 1999. Influence of soil moisture on sorption and degradation of hexazinone and simazine in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: p3895-3900.

Gilmore, D.F., Antoun, S., Lenz, R.W., Goodwin, S., Austin, R., Fuller, R.C. 1992. The fate of the biodegradable plastics in municipal leaf compost. *Journal of Industrial Microbiology*. **10**: p199-206.

Goheen, S.M., Wool, R.P. 1991. Degradation of polyethylene-starch blends in soil. *Journal of Applied Polymer Science*. **42**: p2691-2701.

Gu, J.D., Eberiel, D., McCarthy, S.P., Gross, R.A. 1993a. Degradation and mineralisation of acetate de cellulose acetate in simulated thermophilic compost environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **1**(4): p281-291.

Gu, J.D., Eberiel, D.T., MacCarty, Gross, R.A. 1993b. Cellulose acetate biodegradability upon exposure to simulated aerobic composting and anaerobic bioreactor environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **1**(2): p143-153.

Gu, J.D., Yang, S., Welton, R., Eberiel, D., McCarthy, S.P. 1994. Effects of environmental parameters on the degradability of polymer films in laboratory-scale composting reactors. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **2**(2): p129-135.

Hanlon, G. 2000. Grass and Leaf Compost Testing Program and Use Guide. <http://www.ci.lincoln.ne.us/city/pworks/waste/recycle/index.htm>.

Holden, P.A., Firestone, M.K. 1997. Soil microorganisms in soil cleanup : how can we improve our understanding ? *Journal of Environmental Quality*. **26**(1): p32-40.

ISO 1999a. Determination of the ultimate aerobic biodegradation of plastic materials under simulated composting conditions in an inert, carbon-free fixed bed - Method by analysis of evolved carbon dioxide.

ISO 1999b. Plastics - Determination of the ultimate aerobic biodegradability in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide released.

ISO 2000. Plastics-Method of composting of plastic materials in laboratory conditions for determining the disintegration percentage.

Keursten, G.T.G., Groenevelt, P.H. 1996. Biodegradation of rubber particles in soil. *Biodegradation*. **7**: p329-333.

Kim, Y.D., Kim, S.C. 1998. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*. **62**: p343-352.

Nishioka, M., Tuzuki, T., Wanajyo, T., Oonami, H., Horiuchi, T. 1994. Biodegradation of BIONOLLE. in: Y. Doi, K. Fukuda (eds.), *Biodegradable Plastics and Polymers*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Pays-Bas. p584-590.

Okada, M., Ito, S., Aoi, K., Atsumi, M. 1994. Biodegradability of polyesters having tetrahydropyran rings in their backbones. *Journal of Applied Polymer Science*. **51**: p1045-1051.

Pagga, U. 1997. Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere*. **35**(12): p2953-2972.

Pagga, U., Beimborn, D.B., Boelens, J., De Wilde, B. 1995. Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in a laboratory controlled composting test. *Chemosphere*. **31**(11/12): p4475-4487.

Püchner, P., Müller, W.R., Bardtke, D. 1995. Assessing the biodegradation potential of polymers in screening- and long term systems. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **3**(3): p133-143.

Ratajska, M., Boryniec, S. 1998. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reactive and Functional Polymers*. **38**: p35-49.

Ratajska, M., Boryniec, S. 1999. Biodegradation of some natural polymers in blends with polyolefines. *Polymers for Advanced Technologies*. **10**: p625-633.

- Reilley, K.A., Banks, M.K., Shwab, A.P.** 1996. Organic chemicals in the environment- Dissipation of PAHs in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*. **25**: p212-219.
- Sawada, H.** 1994. Field testing of biodegradable plastics. in: Y. Doi, K. Fukuda (eds.), *Biodegradable Plastics and Polymers*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Pays-Bas. p298-312.
- Sharabi, N.E., Bartha, R.** 1993. Testing some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(4): p1201-1205.
- Shimp, K.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W., Erickson, L.E.** 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **23**: p41-77.
- Södergard, A., Selin, J.F., Pantke, M.** 1996. Environmental degradation of peroxide modified Poly(L-lactide). *International Biodeterioration and Biodegradation*.: p101-106.
- Spence, K.E., Allen, A.L., Wang, S., Jane, J.** 1996. Soil and marine Biodegradation of protein-starch Plastics. in: R.M. Ottenbrite, S.J. Huang, K. Park, *Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications*. ASC, Washington DC, Etats-Unis. p149-158.
- Sturm, R.N.** 1973. Biodegradability of nonionic surfactants : screening test for predicting rate and ultimate degradation. *Journal of Oil Chemistry Society*. **50**: p159-167.
- Suler, D.J., Finstein, M.S.** 1997. Effects of temperature, aeration and moisture on CO₂ formation in bench-scale, continuously thermophilic composting of solid waste. *Applied and Environmental Microbiology*. **33**: p345-350.
- Torres de Dominiguez, A.** 1995. Degradation et biodegradation de polymères d'acide lactique. *Thèse de l'Université de Montpellier I*
- Tosin, M., Degli Innocenti, F., Bastioli, C.** 1996. Effect of the composting substrate on biodegradation of solid materials under controlled composting conditions. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **4**(1): p55-63.
- Tosin, M., Degli-Innocenti, F., Bastioli, C.** 1998. Detection of toxic by-product released by a polyurethane-containing film using a composting test method based on mineral bed. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **6**(2): p79-90.

- Vikman, M., Itävaara, M., Poutanen, K.** 1995. Measurement of the biodegradation of starch-based materials by enzymatic methods and composting. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **3**(1): p23-29.
- Wendt, T.M., Kaplan, A.M., Greenberger, M.** 1970. Weight loss as a method for estimating the microbial deterioration of PVC film in soil burial. *International Biodeterioration Bulletin*. **6**(4): p139-143.
- Witt, U., Müller, R.J., Deckwecker, W.D.** 1995. New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **3**(4): p215-223.
- Witt, U., Müller, R.J., Deckwer, W.D.** 1996. Evaluation of the biodegradability of copolyesters containing aromatic compounds by investigations of model oligomers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **4**(1): p9-20.
- Yabannavar, A., Bartha, R.** 1993. Biodegradability of some food packaging materials in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **25**(11): p1469-1475.
- Yabannavar, A.V., Bartha, R.** 1994. Methods of assessment of biodegradability of plastics films in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(10): p3608-3614.
- Yue, C.L., Gross, R.A., McCarthy, S.P.** 1996. Composting studies of poly(hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate). *Polymer Degradation and Stability*. **51**: p205-210.

CHAPITRE 3 : EVALUATION DU TAUX DE
BIODEGRADATION DES MATERIAUX TEST

CHAPITRE 3 :EVALUATION DU TAUX DE BIODÉGRADATION DES MATÉRIAUX TEST

92

1	CHOIX DES MATÉRIAUX.....	95
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	96
2.1	<i>Test sur pouzzolane en simulation de sol</i>	96
2.1.1	Préparation de l'inoculum.....	96
2.1.2	Préparation du lixiviat.....	97
2.1.3	Activation de la pouzzolane.....	97
2.1.4	Préparation des matériaux test.....	97
2.1.5	Analyse comparative des trois matériaux.....	97
2.1.6	Suivi de la dégradation du matériau C.....	100
2.2	<i>Test sur vermiculite en simulation de compost</i>	101
2.2.1	Préparation de l'inoculum.....	101
2.2.2	Préparation du lixiviat.....	101
2.2.3	Activation de la vermiculite.....	101
2.2.4	Préparation des échantillons.....	102
2.2.5	Mise en place du test.....	102
2.3	<i>Tests en milieu réel</i>	102
2.3.1	Préparation des échantillons.....	103
2.3.2	Conditions d'enfouissement.....	104
2.3.3	Mesure de la biodégradation.....	105
2.3.3.1	Analyse d'images.....	105
2.3.3.2	Perte de poids.....	106
2.4	<i>Test sur sol en laboratoire</i>	106
2.5	<i>Test de Sturm</i>	106
2.5.1	Montage.....	107
2.5.1.1	Piégeage du CO ₂ en entrée du banc.....	108
2.5.1.2	Réacteurs.....	108
2.5.1.3	Mesure du CO ₂	108
2.5.2	Mode opératoire.....	109
2.5.2.1	Préparation du milieu minéral.....	109
2.5.2.2	Préparation des réacteurs.....	110
2.5.2.3	Préparation de l'inoculum.....	110
2.5.3	Calcul de la quantité de CO ₂ dégagé.....	111
3	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	111
3.1	<i>Tests sur pouzzolane en simulation de sol</i>	111
3.2	<i>Test sur vermiculite en simulation de compost</i>	117
3.3	<i>Tests en milieu réel</i>	118
3.3.1	Observation visuelle des matériaux.....	118
3.3.2	Biodégradation évaluée par perte de poids.....	120
3.3.3	Biodégradation évaluée par analyse d'image.....	121
3.4	<i>Test sur sol en laboratoire (en terrine)</i>	122

3.5	<i>Test de Sturm</i>	123
4	CONCLUSION	124
5	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126

Dans ce chapitre, nous allons évaluer le taux de biodégradation de trois matériaux test. Nous procéderons à une analyse comparative de la dégradation de ces trois matériaux selon différentes méthodes de tests en milieu solide et le test de Sturm en milieu liquide. Ceci nous permettra de connaître le comportement des matériaux vis-à-vis de la dégradation et de valider le test que nous avons mis au point au chapitre précédent.

Les tests en milieu solide nous permettront de collecter les produits et résidus de dégradation que nous étudierons au cours des chapitres suivants. Ces analyses sont, en effet, indispensables pour acquérir une meilleure connaissance des mécanismes de biodégradation.

1 CHOIX DES MATERIAUX

Afin de réaliser une analyse approfondie des matériaux et de leur dégradation, nous avons choisi un nombre restreint de matériaux. Nous allons analyser trois matériaux polymères. Pour des raisons de confidentialité ces matériaux seront nommés par les lettres A, B et C.

Deux d'entre eux sont représentatifs des matériaux que l'on peut trouver sur le marché. Leur biodégradation est donc logiquement vérifiée. L'un deux est un mélange et l'autre ne contient qu'une seule espèce chimique.

Le troisième matériau a été préparé spécialement pour ce type d'étude afin qu'une molécule toxique se libère au cours de sa dégradation. Il est utilisé comme référence négative. Il doit nous permettre, d'une part, de mettre en évidence l'apparition d'une toxicité dans le milieu et donc une éventuelle inhibition de la biodégradation, et d'autre part, de déceler par analyse chimique la ou les molécules toxiques relarguées.

Nous possédons quelques informations concernant la composition de ces trois matériaux qui vont nous permettre de cibler notre recherche bibliographique sur les techniques analytiques les plus appropriées pour les identifier. Nous savons que le matériau A est composé de polyesters, le matériau B est à priori un mélange d'amidon et de polyesters, et le matériau C est un mélange d'amidon, de polycaprolactone et d'Estane®, l'Estane® étant un mélange de polycaprolactone et de polyuréthane.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Test sur pouzzolane en simulation de sol

Le protocole utilisé est celui mis au point lors du chapitre 2.

Les réacteurs sont maintenus dans une pièce régulée à $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.1.1 Préparation de l'inoculum

Un volume de 800 ml d'inoculum constitué de 400 ml de lixiviat et 400 ml de milieu nutritif est préparé. La composition de cette solution est décrite dans le tableau III-I.

Tableau III-I : Composition de l'inoculum (préparation pour 800 ml)

Constituant	Quantité
Amidon de maïs (g)	8
Bouillon nutritif (g)	5.2
Urée (g)	0.116
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	4.864
KH_2PO_4 (g)	0.5
K_2HPO_4 (g)	0.64
CaCl_2 (μl)	200
NaCl (μl)	200
MgSO_4 (g)	0.1
Solution trace (μl) cf. Tab. III-II	200
Lixiviat (ml)	400

Tableau III-II : Composition de la solution trace (préparation pour 1 l)

Constituant	Quantité (mg)
H_3BO_3	500
KI	100
FeCl_3	200
MnSO_4	400
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	200
FeSO_4	400

2.1.2 Préparation du lixiviat

Le lixiviat est préparé à partir d'un sol forestier (Montpellier), prélevé à une profondeur comprise entre 5 et 15 cm. Il est ensuite tamisé (5 mm).

Un extrait de 1300 g de sol est mis en suspension dans 1300 g d'eau déminéralisée. Ce mélange est agité manuellement pendant 15 min, puis décanté pendant 2 h. Le surnageant est ensuite récupéré et centrifugé à 4000 G pendant 4 min. Il est alors utilisé comme lixiviat.

2.1.3 Activation de la pouzzolane

Dans un bac de 50 l en polyéthylène (PEHD), nous préparons une quantité de pouzzolane suffisante pour remplir 15 réacteurs. Pour cela, nous mélangeons :

- 6756 g de pouzzolane lavée et séchée (équivalent à 17,8 réacteurs)
- 8 g de cellulose
- 800 ml d'inoculum

La phase d'activation dure 10 jours, le bac est placé dans une pièce thermostatée à 25°C. Le bac est pesé tous les jours ; la perte de masse est compensée par l'ajout d'eau déminéralisée. La pouzzolane est agitée manuellement afin d'homogénéiser l'activation.

2.1.4 Préparation des matériaux à tester

Avant l'introduction dans les réacteurs, les trois matériaux à tester A, B et C sont broyés.

Pour cela, ils sont préalablement découpés en carrés de 5*5 cm², puis congelés dans de l'azote liquide et broyés à l'aide d'un moulin à café. Cette opération est renouvelée plusieurs fois, jusqu'à l'obtention de fragments de films inférieurs à 1mm².

2.1.5 Analyse comparative des trois matériaux

L'objectif est de valider la méthode présentée au chapitre 2 et de comparer les cinétiques de dégradation des trois matériaux. Pour cela, des triplicats sont préparés pour chaque matériau, pour la cellulose (référence positive) et pour le blanc (respiration endogène).

Après 10 jours d'activation, 15 réacteurs de 500 ml sont préparés. Une quantité connue de matériau est mélangée à 425 g de pouzzolane activée (Tableau III-III).

Tableau III-III : Mise en place du test

Réacteur N°	Matériau Test	Quantité de matériau (g)
1	Matériau A	1.25
2	Matériau A	1.25
3	Matériau A	1.25
4	Matériau B	1.31
5	Matériau B	1.31
6	Matériau B	1.31
7	Matériau C	1.30
8	Matériau C	1.30
9	Matériau C	1.30
10	Cellulose	1.80
11	Cellulose	1.80
12	Cellulose	1.80
13	Blanc	0
14	Blanc	0
15	Blanc	0

Les réacteurs sont agités tous les jours pour éviter la formation de chemins préférentiels ou l'instauration de conditions anaérobies. Pour les matériaux se dégradant rapidement et au cours du démarrage du test, cette agitation est plus fréquente. De même, les réacteurs sont pesés quotidiennement pour évaluer la perte d'eau et la compenser par l'ajout d'eau déminéralisée.

La méthode de mesure du CO₂ dégagé et le calcul du taux de biodégradation ont été décrits au chapitre 2 (paragraphe 3.1.1).

Lorsque la dégradation semble s'achever alors que le taux de minéralisation reste faible, une réactivation par ajout de milieu nutritif ou d'inoculum est envisagée.

Une vue d'ensemble du banc de biodégradation sur pouzzolane est représentée sur la figure III-1.



Vue d'ensemble



Bioréacteurs



Analyseur IR



Electrovannes

Figure III-1 : Vue d'ensemble du banc de biodégradation sur pouzzolane

2.1.6 Suivi de la dégradation du matériau C

Le suivi de la dégradation, la préparation de l'inoculum ainsi que la phase d'activation sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. Dix réacteurs contiennent le matériau C, deux la cellulose et trois le blanc (Tableau III-IV).

Tableau III-IV : Mise en place du test pour le suivi de la dégradation du matériau C

Réacteur N°	Matériau Test	Quantité de matériau (g)
1	Matériau C	1.50
2	Matériau C	1.50
3	Matériau C	1.50
4	Matériau C	1.50
5	Matériau C	1.50
6	Matériau C	1.50
7	Matériau C	1.50
8	Matériau C	1.50
9	Matériau C	1.50
10	Matériau C	1.50
11	Cellulose	1.80
12	Cellulose	1.80
13	Blanc	0
14	Blanc	0
15	Blanc	0

Le dégagement de CO₂ est mesuré et le taux de biodégradation de chacun des réacteurs est calculé. Lorsque les deux premiers réacteurs atteignent 12% de biodégradation, la fermentation est stoppée, le bullage de l'air entrant dans l'eau est arrêté et l'air arrive directement dans les réacteurs, les desséchant ainsi rapidement. L'activité des microorganismes est alors arrêtée et le contenu des deux réacteurs est prélevé. Il en est de même lorsque les deux suivants arrivent à 24%, puis 36%, 48% et enfin 60%.

Ces échantillons seront ensuite soumis à l'analyse (Chapitre 5) pour étudier les mécanismes de dégradation.

2.2 Test sur vermiculite en simulation de compost

Cette expérimentation réalisée par les chercheurs du laboratoire de la société Novamont (Italie), dans le cadre d'une collaboration, a pour objectif l'obtention de produits de dégradation à analyser (chapitre 5).

Le protocole utilisé est celui décrit par Bellia *et al.* (1999) et présenté ci-dessous.

2.2.1 Préparation de l'inoculum

Le tableau III-V décrit la composition de l'inoculum.

Tableau III-V : Composition de l'inoculum (préparation pour 1 l)

Constituant	Quantité
Cellulose	20
Amidon de maïs (g)	20
Bouillon nutritif (g)	13
Urée (g)	5.8
KH ₂ PO ₄ (g)	0.5
CaCl ₂ (10%) (ml)	0.5
NaCl (10%) (ml)	0.5
MgSO ₄ (g)	0.25
Solution trace (ml) cf. Tab. III-II	0.5
Lixiviat (ml)	500

2.2.2 Préparation du lixiviat

Le lixiviat est préparé en mettant 200 g de compost mature en suspension dans 1000 g d'eau déminéralisée. Ce mélange est agité pendant 30 min. Le mélange est filtré à travers un tamis. Le surnageant est ensuite récupéré et centrifugé à 1200 tours par minute pendant 15 min. Il est utilisé comme lixiviat.

2.2.3 Activation de la vermiculite

La vermiculite est activée en mélangeant 1200 g de vermiculite lavée et séchée et 3600 ml d'inoculum dans un bac en polypropylène. Le bac est pesé tous les jours, la perte de

masse est compensée par l'ajout d'eau déminéralisée. La vermiculite est agitée manuellement afin d'homogénéiser l'activation. La phase d'activation dure 3 jours, le bac étant placé dans une étuve thermostatée à 50°C.

2.2.4 Préparation des échantillons

Afin d'accélérer la dégradation, le matériau, initialement sous forme de granules, est broyé (cf. Paragraphe 2.1.4).

2.2.5 Mise en place du test

Les réacteurs sont des bacs en polypropylène 30*19.5*9.5 cm³ (L*P*H) munis d'un couvercle et percés de deux trous sur les côtés pour permettre à l'air de circuler. Le bac test renferme 2400 g de vermiculite activée et 75 g de matériau, le blanc ne contenant que la vermiculite.

Les bacs sont agités tous les jours pour éviter la formation de chemins préférentiels ou l'instauration de conditions anaérobies. De même, ils sont pesés chaque jour pour évaluer la perte d'eau et la compenser par de l'eau déminéralisée.

Trois prélèvements ont été faits au cours de la dégradation sur les deux réacteurs : à t=0 jour, t=40 jours et à t=90 jours.

L'objectif de cette expérimentation étant de dégrader le matériau B en conditions de compost afin d'analyser ses produits de dégradation, le dégagement de CO₂ n'est pas mesuré lors de cette manipulation. Cependant, la dégradation de ce matériau a déjà été de nombreuses fois étudiée et une valeur relative du taux de biodégradation au moment des prélèvements peut être donnée : elle est de l'ordre de 60% pour 40 jours de test et de 90% pour 90 jours.

2.3 Tests en milieu réel

L'objectif du test en milieu réel est de comparer les vitesses et les produits de dégradation obtenus en conditions réelles avec ceux obtenus en simulation de sol sur pouzzolane.

Le protocole de test en milieu réel a été mis au point par Decriaud-Calmon (1998).

2.3.1 Préparation des échantillons

Les tests d'enfouissement ont été menés sur les 3 matériaux test et sur le polyéthylène choisi comme référence négative pour sa capacité à résister à la dégradation. Les films sont découpés aux dimensions de 5*20 cm². Chaque bandelette est séchée au dessiccateur pendant 48 h puis pesée. Les films sont placés entre deux filets non biodégradables. L'ensemble est serti dans un cadre.

Trois séries de tests en milieu réel ont été effectuées. Sur les deux premières, le filet enserrant les films est formé de polyéthylène de mailles 1*1 mm². Sur la troisième, il est formé de polypropylène de mailles 0.3*0.3 mm². La répartition des bandelettes dans les filets est représentée sur les figures III-2 et III-3.

Pour ces deux premières séries, une bande de chaque matériau a été exposée à la lumière solaire pendant 55 jours avant l'enfouissement, soit à une radiation solaire de 1450,6 MJ, dont 19.5 MJ de radiation UV. Les échantillons numérotés 1 correspondent aux échantillons non-exposés et ceux numérotés 2 à ceux exposés.

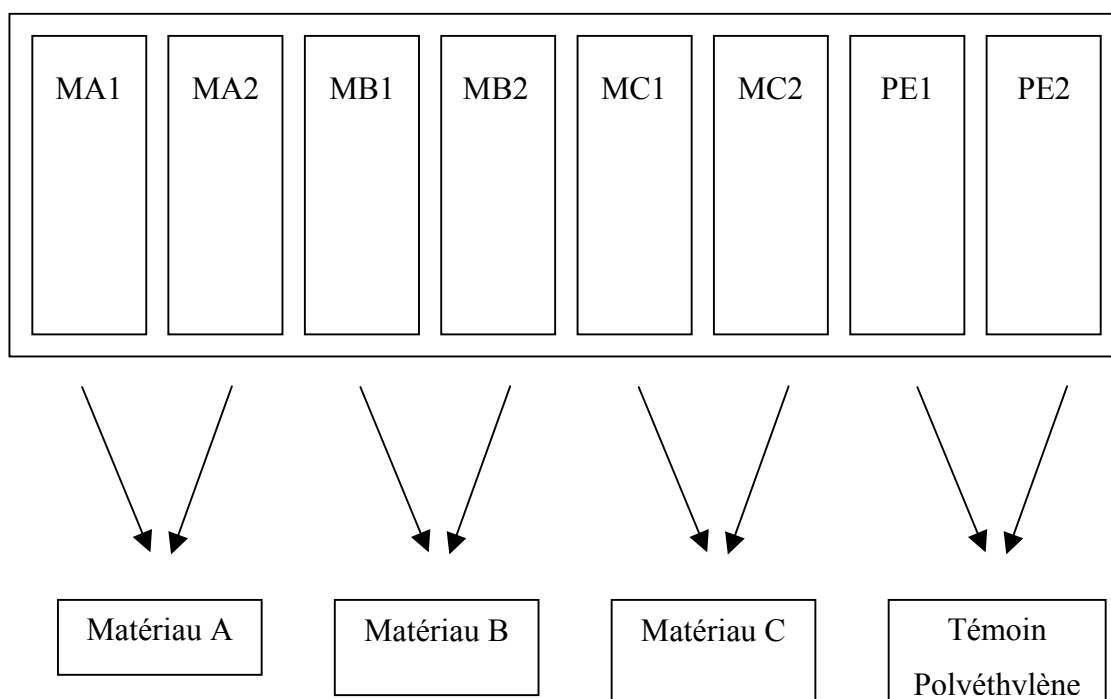


Figure III-2 : Répartition des bandelettes dans les cadres des deux premières séries

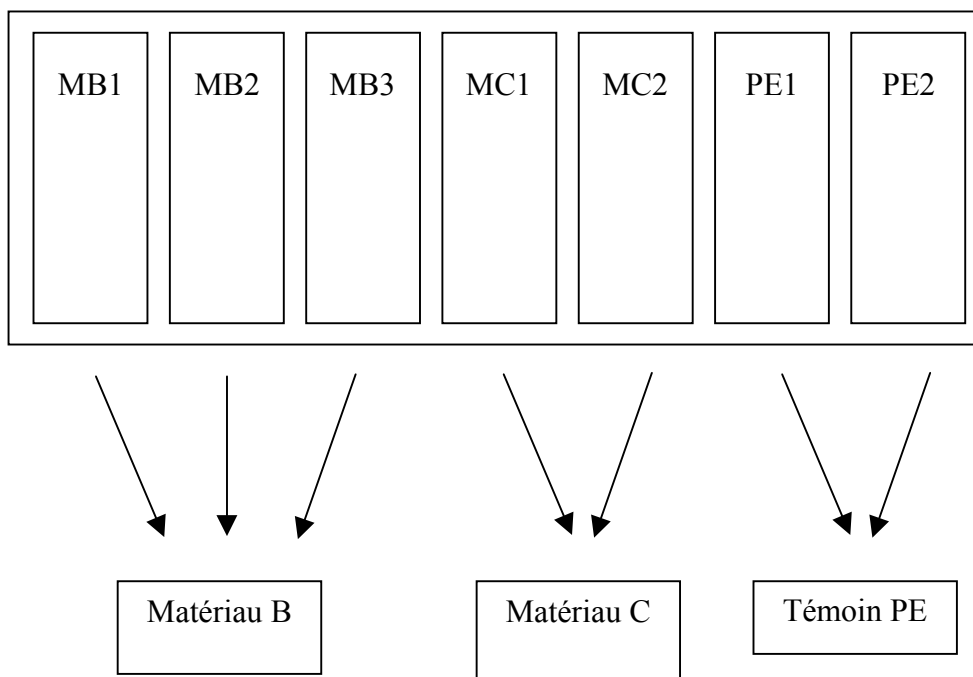


Figure III-3 : Répartition des bandelettes dans les cadres de la troisième série

Cette troisième série a été effectuée après obtention des résultats de biodégradation sur les différents tests. Nous avons donc décidé de ne pas analyser à nouveau le matériau A.

2.3.2 Conditions d'enfouissement

Les trois séries de tests ont été enfouies sur trois sites différents :

- Cemagref de Montpellier (34)
- CTIFL de Balandran (30)
- INRA d'Auzeville (31)

Les deux premières séries ont été enfouies en parallèle : six cadres au Cemagref et quatre cadres au CTIFL. Un an plus tard, pour la troisième série, quatre cadres ont été enfouis à l'INRA.

Les cadres sont enfouis sur des parcelles ayant précédemment accueilli des cultures. Elles ont été labourées sur environ 30 cm. Le haut du cadre se trouve à environ 5 cm de la surface du sol pour éviter les variations d'humidité et donc de population microbienne. Le cadre a une inclinaison de 45°. Les cadres sont ensuite recouverts de terre.

Après un temps d'exposition déterminé (Tableau III-VI), chaque cadre est méticuleusement retiré. Au laboratoire, le cadre est ouvert. Les échantillons sont d'abord nettoyés de la terre et de la biomasse tout en gardant leur forme originelle. La dégradation de la surface est évaluée par analyse d'images. Les échantillons sont ensuite minutieusement nettoyés à l'eau distillée au dessus d'un tamis de pores 1mm, puis séchés au dessiccateur. La mesure de perte de poids permet de donner une deuxième valeur de la biodégradation.

Tableau III-VI : Durée d'exposition au moment des prélèvements (en jours)

	Cemagref	CTIFL	INRA
1 ^{er} prélèvement	83	54	85
2 ^{ème} prélèvement	120	75	127
3 ^{ème} prélèvement	150	93	156
4 ^{ème} prélèvement	223	163	196
5 ^{ème} prélèvement	363	-	-
6 ^{ème} prélèvement	408	-	-

2.3.3 Mesure de la biodégradation

2.3.3.1 Analyse d'images

Cette technique a été mise au point par Decriaud-Calmon (1998). Les matériaux clairs sont placés sur une feuille foncée et les matériaux foncés sur une feuille blanche pour différencier le matériau résiduel de ce qui a disparu. L'image est d'abord numérisée, puis elle est analysée par un logiciel développé au Cemagref. Il donne pour chaque échantillon le pourcentage de surface dégradée.

$$\% \text{ de surface dégradée} = \frac{\text{Surface disparue}}{\text{Surface initiale}} * 100$$

2.3.3.2 Perte de poids

L'échantillon est débarrassé de toutes les souillures par lavage à l'eau. Le pourcentage de perte de poids est déterminée par la formule suivante :

$$\% \text{ de perte de poids} = \frac{M_i - M}{M_i} * 100$$

M_i et M représentent la masse initiale et la masse au moment du prélèvement de l'échantillon.

2.4 Test sur sol en laboratoire

Parallèlement aux tests d'enfouissement, des tests de dégradation sur sol ont été menés en laboratoire.

Les films sont préparés de la même façon que pour les tests d'enfouissement, mais n'ont pas été exposés aux UV. Deux bandelettes de chaque film sont serties dans un filet de maille de 1*1 mm². Au fond de terrines en polypropylène, sont placés 1.4 kg de terre prélevée au CTIFL de Balandran. Le filet est déposé dans la terrine puis recouvert à nouveau de 1.4 kg de terre. Pour les trois matériaux, trois terrines sont préparées. De plus, une terrine est préparée avec deux échantillons de polyéthylène. Les terrines sont placées dans une étuve ventilée à 30°C, à l'abri de la lumière pendant 230 jours. Régulièrement, les terrines sont pesées et la perte d'eau est compensée.

En fin de test, le contenu des terrines est séché. Les filets sont ensuite délicatement retirés. La biodégradation est évaluée par perte de masse comme dans les tests d'enfouissement (Paragraphe 2.3.3.2).

2.5 Test de Sturm

Ce test constitue le test normalisé le plus couramment utilisé pour déterminer la biodégradation d'un composé. Il s'appuie sur la norme ISO 14852 (1999). Depuis sa mise au point par son auteur (Sturm, 1973), ce test a été utilisé par de nombreux chercheurs à l'échelle internationale. Il s'agit donc d'un test de référence. Nous l'avons utilisé afin de comparer les résultats obtenus avec ceux sur pouzzolane. L'objectif visé est de vérifier la cohérence de nos

résultats sur pouzzolane et de mettre en évidence l'intérêt de ce nouveau test pour une simulation de sol.

2.5.1 Montage

Le schéma du montage est représenté sur la figure III-4. Le banc comporte neuf réacteurs, permettant d'analyser deux matériaux en triplicat ou trois matériaux en réplicat (Figure III-5).

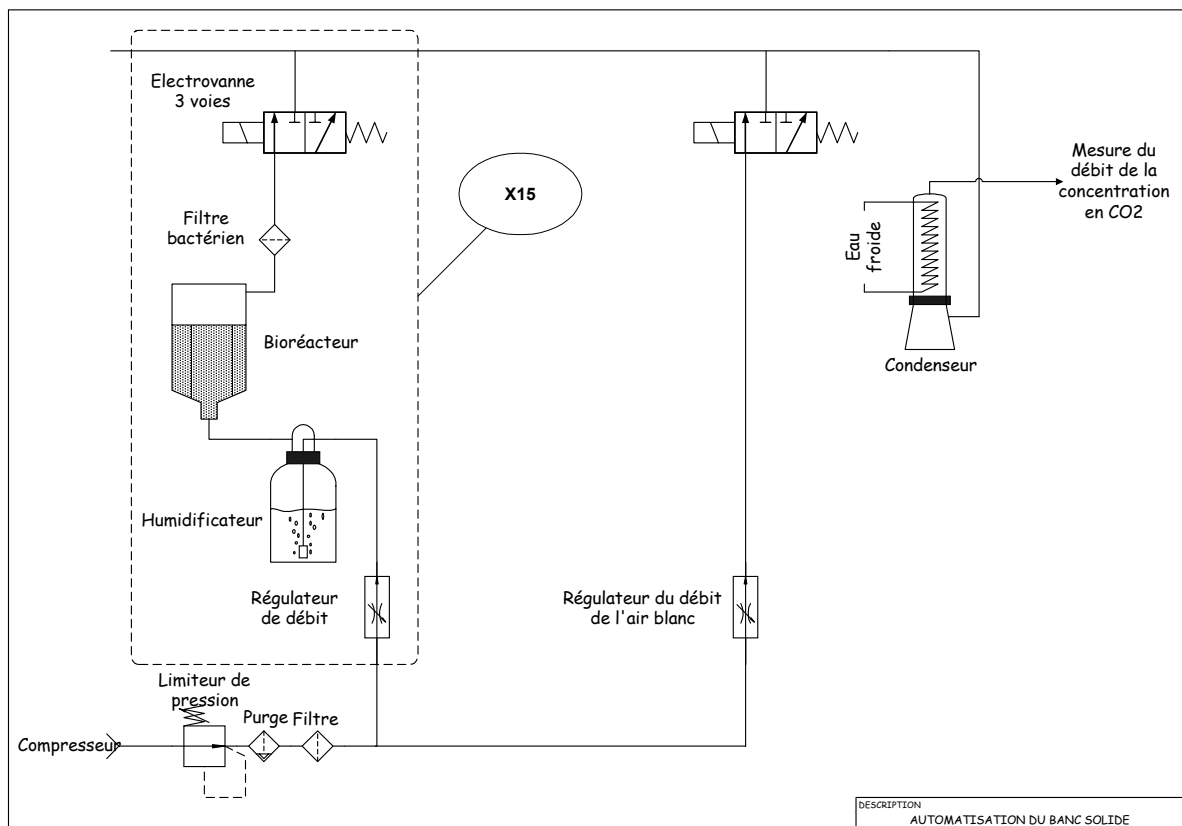


Figure III-4 : Schéma du banc liquide



Figure III-5 : Vue d'ensemble du banc de mesure de la biodégradabilité par test de Sturm

2.5.1.1 Piégeage du CO₂ en entrée du banc

Le CO₂ de l'air est piégé par bullage dans deux flacons laveurs contenant 700 ml de KOH (5 mol/l) et un flacon témoin contenant 700 ml de Ba(OH)₂ (0.0125 mol/l).

Le débit de l'air est ajusté à 0.75 l/min grâce à un régulateur de débit.

2.5.1.2 Réacteurs

Les réacteurs sont alimentés en air par le haut grâce à un tube en verre immergé dans le liquide. Ils sont agités magnétiquement et thermostatés à 25°C. Le haut du réacteur est occupé par un serpentin en inox dans lequel circule de l'eau à 5°C pour éviter la condensation.

2.5.1.3 Mesure du CO₂

La quantité de CO₂ dégagé est mesurée grâce à un analyseur IR (Binos 1004). Les mesures sont effectuées automatiquement toutes les deux heures en début de test. Puis, au fur et à mesure que le dégagement de CO₂ diminue, les intervalles de mesures s'espacent pour passer à 3 h, 6 h et 12 h en fin de test. En dehors des séquences de mesure, l'air ne circule pas dans les réacteurs et le CO₂ dégagé s'y concentre. Au moment de la mesure, l'air présent dans

l'espace de tête est purgé et envoyé vers l'analyseur IR qui comptabilise la quantité de CO₂ en ppm contenu dans le réacteur.

2.5.2 Mode opératoire

Chaque réacteur est constitué d'un mélange de milieu minéral, matériau et inoculum. Le matériau est introduit sous forme de film, découpé en morceau de 5*5 mm².

2.5.2.1 Préparation du milieu minéral

Six solutions (A à F) sont préparées (Tableau III-VII).

Tableau III-VII : Composition des solutions constituant le milieu minéral (préparation pour 1 l) (ISO 14852 (1999))

N°	Réactif	Quantité
A	KH ₂ PO ₄ (g)	8.50
	K ₂ HPO ₄ (g)	27.75
	Na ₂ HPO ₄ (g)	67.20
	NH ₄ Cl (g)	2.50
B	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	40.00
C	MgSO ₄ (g)	22.50
D	CaCl ₂ (g)	36.40
E	FeCl ₃ (g)	0.25
F	MnSO ₄ (mg)	30.20
	H ₃ BO ₃ (mg)	57.20
	ZnSO ₄ (mg)	42.80
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (mg)	38.80
	EDTA (mg)	100.00
	FeCl ₃ (mg)	44.50

Chaque solution est complétée à 1000 ml avec de l'eau déminéralisée.

Deux litres de milieu minéral comprenant 100 ml de la solution A, 10 ml de la solution B, 10 ml de la solution C, 10 ml de la solution D, 10 ml de la solution E et 10 ml de la solution F, et complétés avec de l'eau déminéralisée sont alors confectionnés. Ce milieu sera dilué cinq fois avant utilisation

2.5.2.2 Préparation des réacteurs

Le milieu minéral (1 l), puis les échantillons de matériaux sont introduits dans chaque réacteur. On teste les trois échantillons en duplicat, on réserve deux réacteurs pour le blanc et un dernier pour la référence positive (la cellulose) (Tableau III-VIII). Le système de traitement de l'air est connecté aux réacteurs. L'air exempt de CO₂ balaye les réacteurs pendant 24 h afin de purger le système.

Tableau III-VIII : Mise en place du test de Sturm

Réacteur N°	Matériau à tester	Quantité de matériau (mg)
1	Aucun (blanc)	0
2	Aucun (blanc)	0
3	Cellulose (référence positive)	238.89
4	Matériau A	165.89
5	Matériau A	165.89
6	Matériau B	174.28
7	Matériau B	174.28
8	Matériau C	192.27
9	Matériau C	192.27

2.5.2.3 Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir de boues activées prélevées dans le bassin de traitement des effluents secondaires de la station d'épuration de St Clément de Rivière.

Le mélange composé d'eau et de boues est agité à l'air libre pendant 4 h. Il est ensuite décanté durant 30 à 60 min. Le surnageant sert d'inoculum. Pour démarrer le test, 10 ml de surnageant sont introduits dans chaque réacteur. Le programme de mesure automatique du CO₂ est alors mis en route.

2.5.3 Calcul de la quantité de CO₂ dégagé

La quantité de CO₂ dégagé est donnée par la formule suivante :

$$M_{CO_2}(g) = \frac{ppm_{CO_2}}{22.415} * \frac{44}{10^6} * D(l/s) * \Delta t(s)$$

- ppm_{CO₂} est la valeur de la concentration en CO₂ en ppm du réacteur
- D est le débit à la sortie du réacteur (l/s)
- Δt est l'intervalle de temps entre ces deux mesures successives (ici, Δt = 1s)
- 44 correspond à la masse molaire du CO₂ (g/mol)
- 22.263 correspond au rapport entre la pression normale (1 atm) et le produit de la constante des gaz parfaits (R = 0.08206 l*atm/(mol*K)) et de la température normale (273.15 K)

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Tests sur pouzzolane en simulation de sol

Les cinétiques et les taux de biodégradation moyens (sur chaque triplicat) des trois matériaux étudiés sont représentés sur la figure III-6.

Les courbes en pointillés délimitent l'intervalle de confiance. Elles sont obtenues en ajoutant et soustrayant à la valeur moyenne du taux de biodégradation la valeur de l'écart-type.

Les courbes obtenues montrent que le plateau de minéralisation est atteint en 1440h soit 60 jours. On obtient alors un taux moyen de biodégradation de 80% pour la cellulose, 52% pour le matériau C, 15% pour le matériau B et 2% pour le matériau A.

Le taux de biodégradation élevé de la cellulose nous permet de vérifier l'activité des microorganismes.

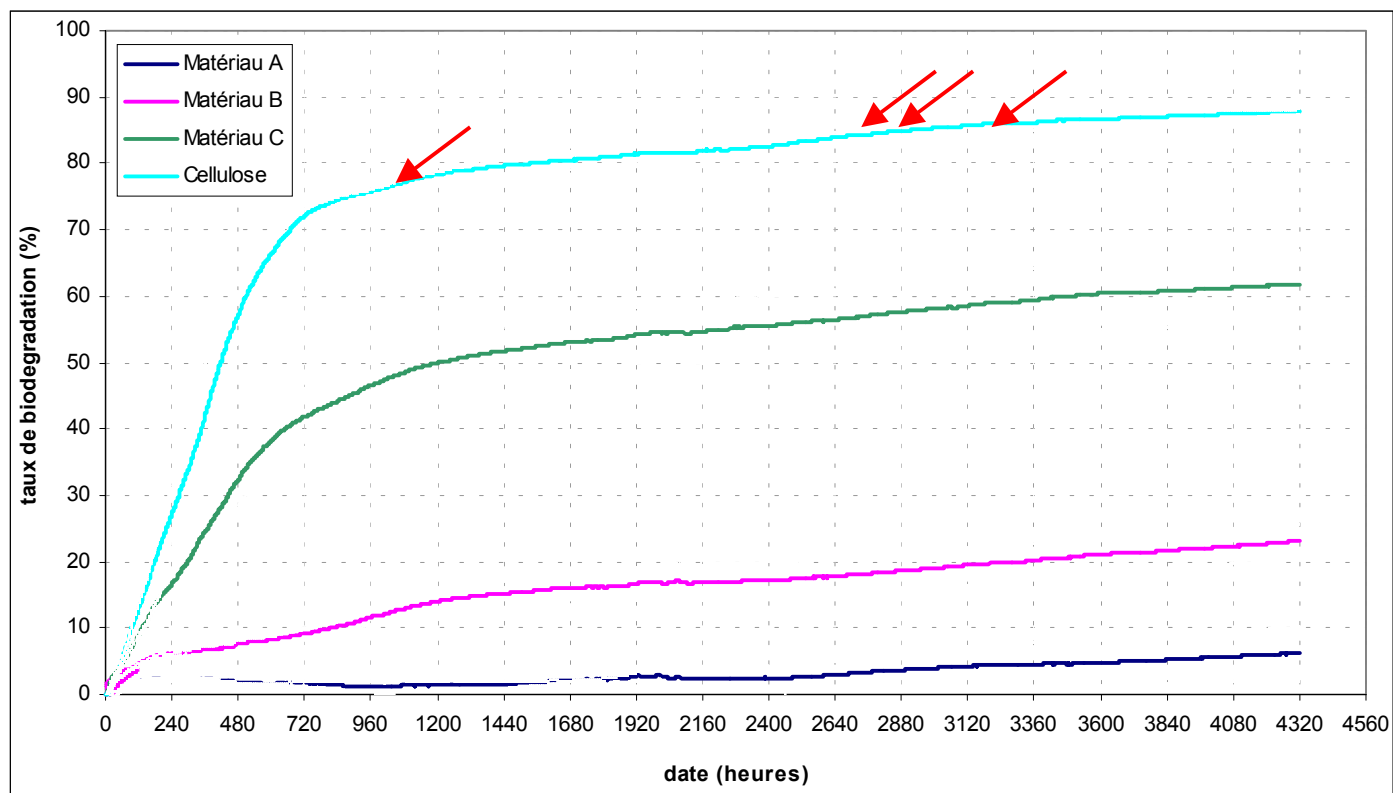


Figure III-6 : Taux de biodégradation moyen des matériaux sur pouzzolane (les flèches représentent les différents ajouts de milieu nutritif ou d'inoculum en cours de réaction).

Contrairement à ce que nous attendions le matériau B ne s'est que faiblement dégradé. Nous supposons que la dégradation correspond à l'amidon contenu dans ce film. Cette supposition sera vérifiée par les analyses ultérieures (Chapitre 5). En paillage, ce matériau a une durée de vie d'au moins quatre mois, nous avons donc décidé de poursuivre le test encore deux mois, jusqu'à obtenir la dégradation totale attendue de ce film.

Au terme de ces deux mois supplémentaires, la respiration endogène des microorganismes, mesurée dans les réacteurs blancs, a considérablement diminué et est à peine discernable du bruit de fond (Figure III-7).

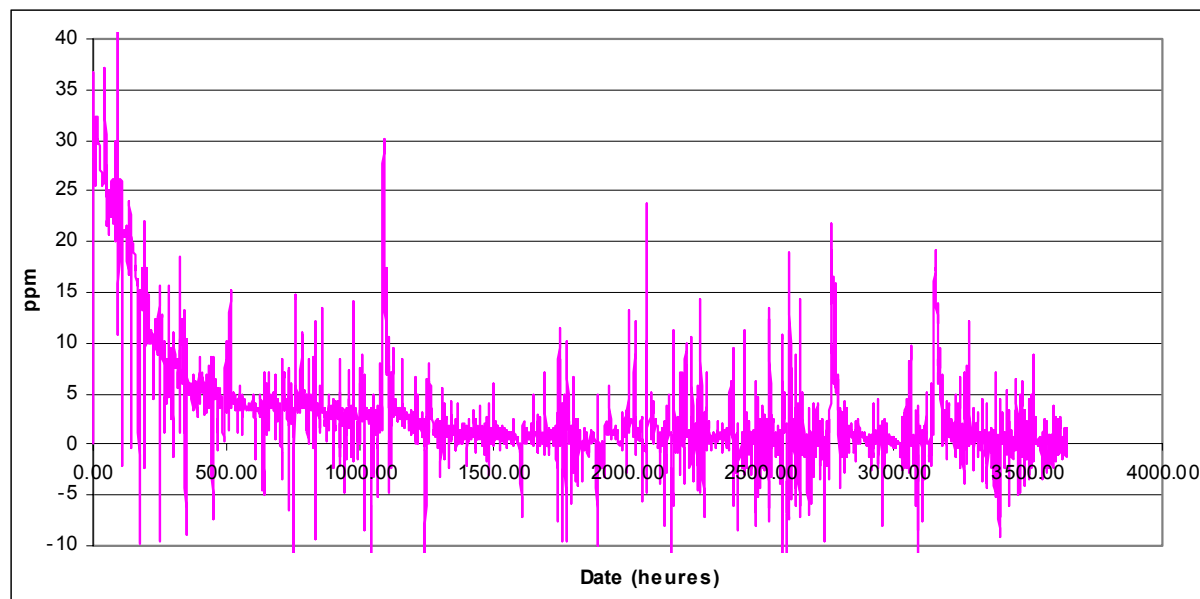


Figure III-7 : Concentration moyenne (ppm) en CO₂ dégagé par les réacteurs blanc sur pouzzolane

Pour vérifier l'activité des microorganismes, ainsi que pour la relancer, 4.5 ml de bouillon nutritif (6.5 g/l) ont été ajoutés à tous les réacteurs à 2762 h. On observe une consommation rapide de cet apport en carbone pour tous les réacteurs. Mais la durée nécessaire pour consommer la totalité du carbone introduit (11.624 mg) est différente selon la nature du matériau étudié (Tableau III-IX).

Tableau III-IX : Influence de la nature du matériau sur la vitesse de dégradation du bouillon nutritif.

Matériau	MA	MB	MC	Cellulose	Blanc
Durée _{moy} (heures)	221.5	114.4	109.8	108.4	366.0

On observe une corrélation entre le taux de biodégradation du matériau et la vitesse de consommation du bouillon nutritif. Plus le taux de biodégradation est élevé, plus la vitesse est rapide. Ce phénomène est très net pour le matériau A, faiblement dégradé et pour le blanc qui n'est pas le siège de la dégradation. En revanche, pour les matériaux B et C, et la cellulose, où une dégradation se produit, il n'y a pas de différence significative entre eux. Ce phénomène peut s'expliquer de différentes façons. D'une part, le carbone des matériaux consommé par les microorganismes a permis leur multiplication. D'autre part, dans le cas de matériaux faiblement dégradables, les microorganismes, n'ayant pas de nutriments accessibles pour se multiplier et se développer, sont entrés en dormance. Il leur a fallu alors plus de temps

pour assimiler ce nouvel apport de carbone. Ce phénomène est encore plus net pour les réacteurs blanc.

Néanmoins, la capacité des microorganismes à dégrader cette nouvelle source de carbone prouve leur présence malgré une plus faible respiration.

De plus, la dégradation rapide du bouillon nutritif dans les réacteurs contenant le Matériau C montre que celui-ci n'a pas dégagé de métabolites toxiques pour les microorganismes et n'a donc pas d'effet inhibiteur.

Pour augmenter la concentration en microorganismes et accélérer le processus de biodégradation, 5 ml de lixiviat de sol, préparés selon le même protocole que pour l'inoculation, ont été ajoutés dans chaque réacteur à 2855 h. Après introduction, on observe une légère augmentation du nombre de ppm de CO₂ dégagé par seconde, peut-être due à la consommation de la matière organique présente dans le lixiviat. Mais on n'observe pas le redémarrage de la réaction attendu, notamment dans le cas du matériau B (Figure III-6).

Après un délai de 15 jours, on n'observe toujours aucun changement dans l'allure des courbes. A 3150 h, 4.5 ml d'un mélange de bouillon nutritif et de lixiviat sont ajoutés à chaque réacteur. Ce mélange est préparé par dissolution de 6.5 g de bouillon nutritif dans 1 l de lixiviat.

La durée nécessaire pour consommer tout le carbone s'avère plus longue que précédemment (Tableau III-X), traduisant un ralentissement de l'activité microbienne. On observe cependant toujours une dichotomie entre le groupe Matériau A, blanc, où il n'y a pas eu de dégradation et le groupe Matériaux B, C et cellulose, siège de dégradation.

Tableau III-X : Influence de la nature du matériau sur la vitesse de dégradation du bouillon nutritif.

Matériau	MA	MB	MC	Cellulose	Blanc
Durée _{moy} (heures)	291.6	139.9	145.7	145.3	341.9

La durée nécessaire pour consommer le carbone dans les réacteurs contenant le matériau B est devenue inférieure à celle des réacteurs de matériau C et de cellulose. On peut alors supposer une accélération de la réaction dans les réacteurs de matériau B par rapport aux autres réacteurs. Mais les différences ne sont pas suffisamment significatives pour pouvoir

affirmer qu'il y a un redémarrage de la dégradation du matériau B. Nous décidons alors d'arrêter la manipulation au bout de 4323 heures, soit 180 jours.

Les taux de biodégradation, alors obtenus, sont résumés dans le tableau III-XI.

Tableau III-XI : Taux de biodégradation obtenus au bout de 180 jours sur pouzzolane

Matériaux	Taux de biodégradation (%)
Matériau A	6
Matériau B	23
Matériau C	62
Cellulose	88

Nous pouvons classer chacun des matériaux dans une catégorie : le matériau C est « facilement biodégradable », le matériau B de « biodégradabilité intermédiaire » et le matériau A « non biodégradable » (Décridaud-Calmon, 1998).

Nous connaissons la composition du matériau A (Chapitre 5). Elle se rapproche de celle de l'Ecoflex® (BASF AG). Ce matériau a été étudié et sa biodégradabilité longuement décrite dans la littérature, notamment par l'institut de recherche GBF (Allemagne) (Müller *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 1996; 1997) et par Ki *et al.* (2001). Elles montrent que l'Ecoflex® et les autres matériaux à base de copolymères aromatique-aliphatiques se dégradent peu en sol, mais bien en compost.

Ki *et al.* (2001) dégradent ce type de copolymères sur un compost simulé de déchets municipaux à 55°C, suivant la norme ASTM D6003-96. Ils l'ont, d'autre part, hydrolysé à pH 4, 7 et 10. La perte de poids est significative uniquement pour pH=10. Cette valeur de pH est proche de celle que l'on peut rencontrer en compost. En revanche, pour pH=7, pH caractéristique du sol, la perte de poids est nulle.

Müller *et al.* (2001) et Witt *et al.* (1996, 1997, 2001) ont recherché les colonies responsables de la dégradation de l'Ecoflex®. *Thermomonospora fusca* a été identifiée parmi des différents microorganismes extraits de compost comme étant la bactérie permettant la biodégradation de l'Ecoflex®. Il est alors dégradé à 99.9% en 21 jours. Cette bactérie fait partie de la famille des actinomycètes thermophiles. Elle ne peut donc être active qu'à haute température (entre 50 et 60°C). En sol, la température est comprise entre 5 et 30°C, suivant

les saisons, et le pH est de 7. On ne peut donc pas trouver de *Thermomonospora fusca* en sol, la dégradation n'a donc pas lieu.

D'autre part, Müller *et al.* (2001) et Witt *et al.* (1996, 1997, 2001) ont testé la dégradation de l'Ecoflex® en sol et ont montré qu'aucune perte de poids n'était observée en 3 mois.

Le test sur pouzzolane, que nous avons mis au point, simule les conditions du sol. Il ne sera donc pas possible d'obtenir un taux de biodégradation élevé pour le matériau A et en partie pour le B pour lesquels des conditions élevées de température et de pH sont nécessaires.

Afin de procéder, malgré tout, aux analyses sur les produits de dégradation du matériau B, nous avons donc décidé de le dégrader en simulation de compost sur vermiculite, selon les méthodes développées par Bellia *et al.* (1999). Ces essais ne seront plus représentatifs des phénomènes présents dans le sol, mais permettront de mettre en évidence les métabolites obtenus au cours du processus de biodégradation sur compost.

Le matériau C étant facilement biodégradable, nous avons donc décidé de suivre sa biodégradation en simulation de sol sur pouzzolane. Pour cela un nouveau test a été lancé avec prélèvement de deux réacteurs tous les 12% de biodégradation. L'expérimentation a été conduite durant 2640 heures soit 110 jours (3.6 mois). Les courbes de dégradation sont présentées sur la figure III-8.

Tout d'abord, ces courbes confirment la répétabilité de la méthode sur pouzzolane. Les taux de biodégradation obtenus pour la cellulose et le matériau C sont un peu plus faibles que précédemment. Ce test a débuté en hiver, les microorganismes extraits du sol étaient moins actifs.

Lorsque la valeur désirée du taux de biodégradation est atteinte, les réacteurs concernés sont retirés du banc de mesure. La courbe du taux de biodégradation montre alors une brusque variation de pente et se poursuit par une ligne horizontale.

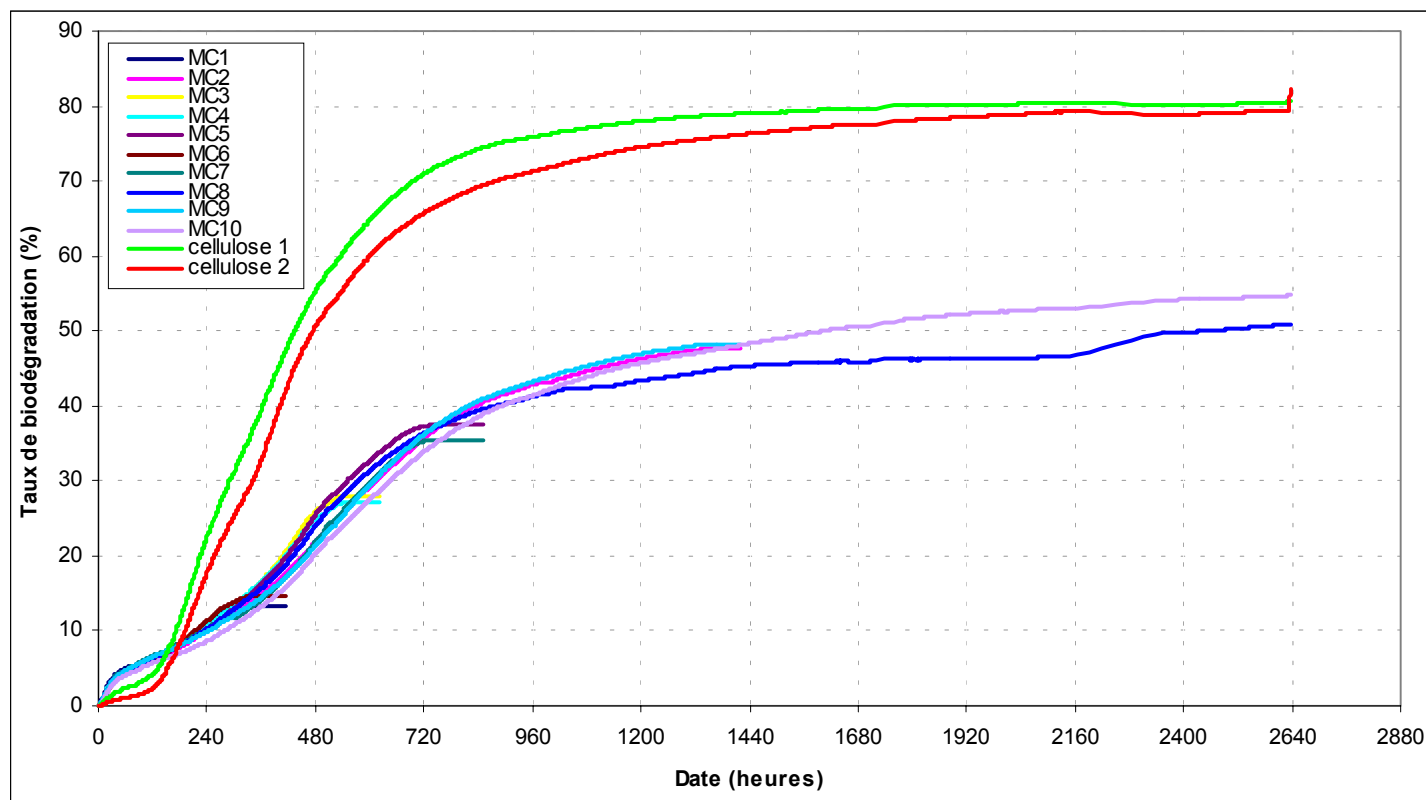


Figure III-8 : Taux de biodégradation du matériau C – Suivi sur pouzzolane

3.2 Test sur vermiculite en simulation de compost

Le CO₂ dégagé lors de la biodégradation du matériau B n'a pas été mesuré. Cependant, la dégradabilité de ce matériau en simulation de compost est connue et on peut donner un intervalle de valeurs, entre lesquelles le taux de biodégradation se situe, au moment des prélèvements. Comme, il a été décrit dans la littérature, les polyesters se dégradent parfaitement en conditions de compost. La minéralisation du matériau est pratiquement totale au bout de 90 jours. Le taux de biodégradation du matériau B se trouve entre les deux courbes représentée sur la figure III-9. Ces valeurs nous ont été fournies par Novamont qui a effectué ce test.

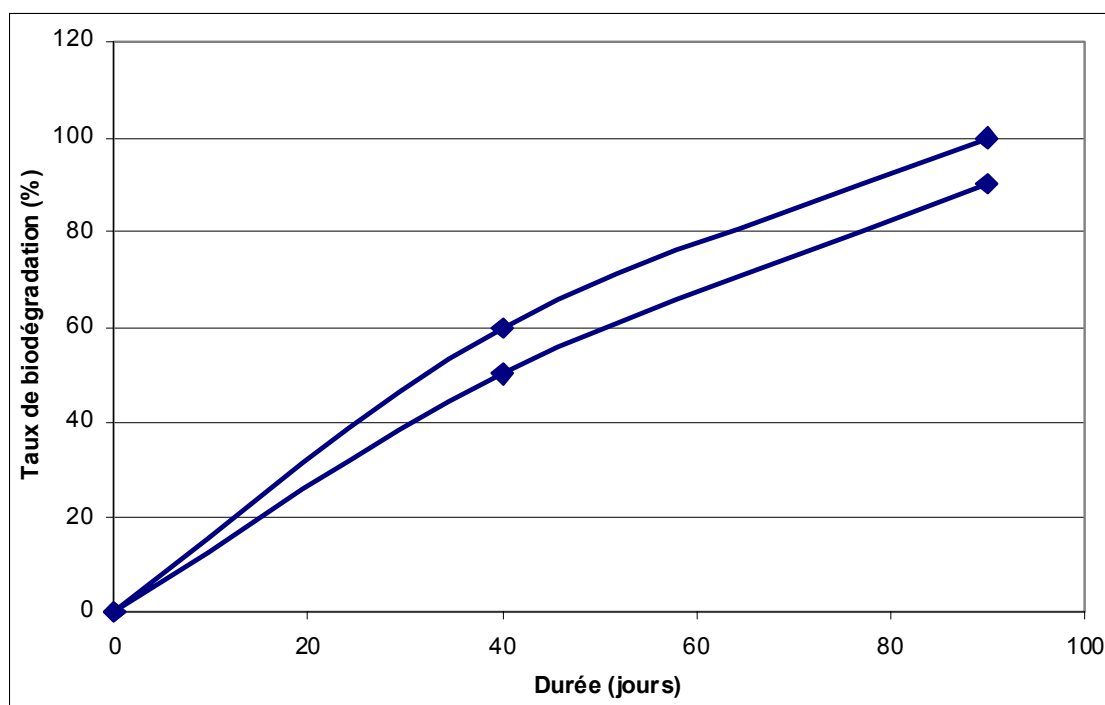


Figure III-9 : Encadrement du taux de biodégradation du matériau B sur vermiculite en fonction du temps

3.3 Tests en milieu réel

3.3.1 Observation visuelle des matériaux

Au bout de plusieurs mois d'enfouissement, les matériaux montrent certaines modifications. Le matériau C, initialement translucide est devenu blanc. On note aussi l'apparition de piqûres noires (probablement des champignons). Il est devenu cassant. Mouillé, il se déchire comme du papier. Le matériau B se dégrade moins vite. Il ne change pas de couleur. Son épaisseur diminue. Il est devenu très fragile et prend une apparence de dentelle. Le matériau A se comporte comme le matériau B, mais une durée d'enfouissement supérieure est nécessaire pour obtenir les mêmes modifications. Le polyéthylène ne change pas d'aspect.

Pour le matériau C, le changement de couleur semble montrer que la dégradation passe par une colonisation de la surface. Pour les matériaux A et B, la dégradation procède par érosion de la surface du film jusqu'à faire disparaître des morceaux entiers.

Des photos obtenues lors des quatre prélèvements à l'INRA sont présentées sur la figure III-10.



a) Premier prélèvement (85 jours)



b) Deuxième prélèvement (127 jours)



c) Troisième prélèvement (156 jours)

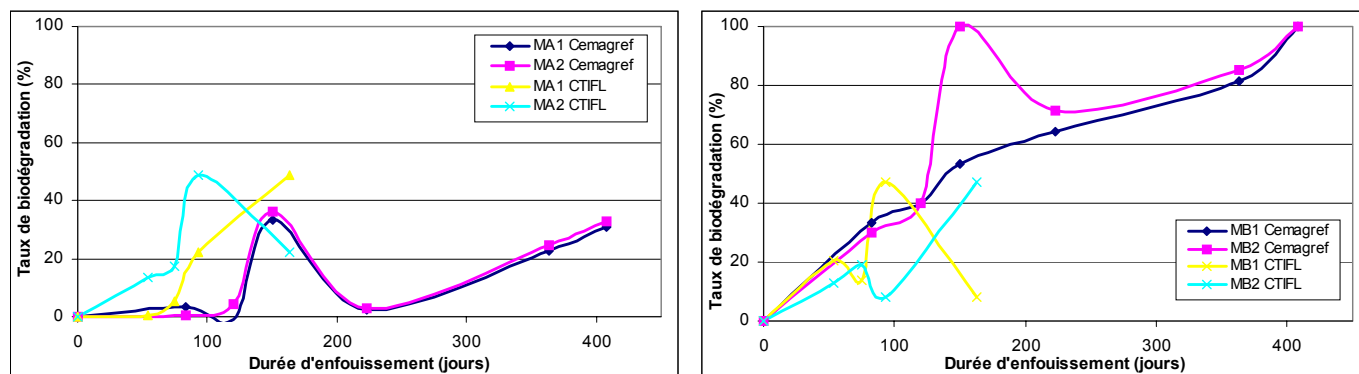


d) Quatrième prélèvement (196 jours)

Figure III-10 : Matériaux B (noir) et C (blanc) après enfouissement à l'INRA

3.3.2 Biodégradation évaluée par perte de poids

Les résultats obtenus pour les cadres enfouis au Cemagref et au CTIFL sont représentés sur les figures III-11 à III-13.



Figures III-11 et II-12 : Taux de biodégradation obtenus pour les matériaux A et B, par enfouissement en sol, au Cemagref et au CTIFL – détermination par perte de poids

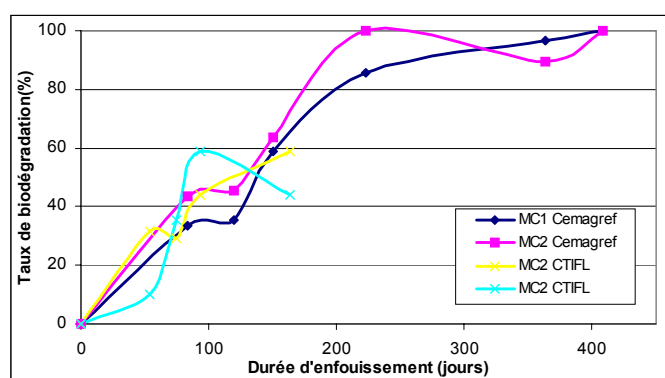


Figure III-13 : Taux de biodégradation obtenus pour le matériau C, par enfouissement en sol, au Cemagref et au CTIFL – détermination par perte de poids

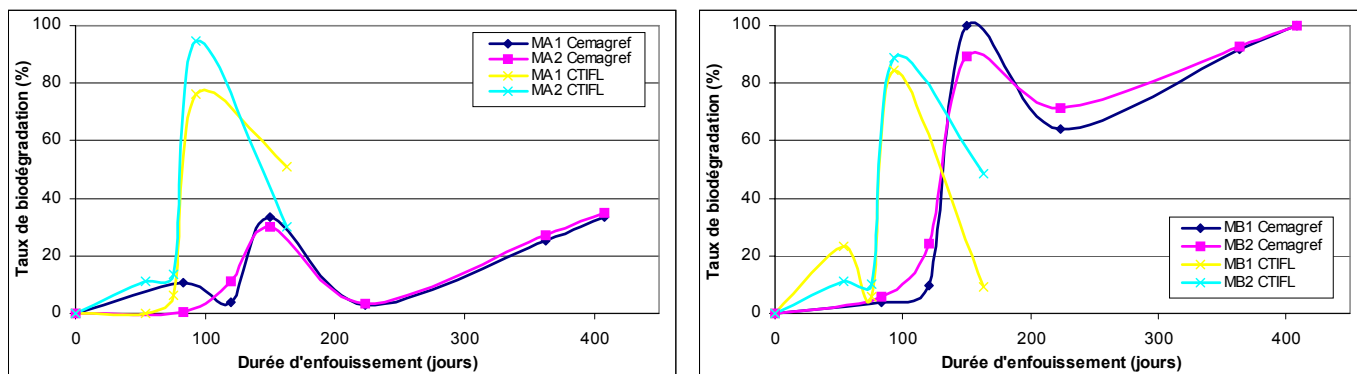
Les résultats obtenus ne sont pas très cohérents. En effet, nous n’obtenons pas toujours un taux de biodégradation croissant avec le temps d’enfouissement.

Les mesures de perte de masse s’avèrent assez délicates et de nombreuses erreurs peuvent être faites. En effet, lors de l’extraction du filet, puis lors de la phase de lavage, une partie de l’échantillon peut être perdue. Au moment de l’extraction du filet, des morceaux de matériau sont collés à la terre à travers les mailles et restent sur le site. De même, au moment du lavage, les morceaux de films plus petits que les pores du tamis passent à travers. On aurait alors tendance à surestimer la valeur de la biodégradation. A l’opposé, les microorganismes et

la terre sont difficiles à décrocher de l'échantillon. La valeur de la biodégradation est alors sous-estimée. Ceci peut expliquer les résultats étonnants que nous obtenons.

3.3.3 Biodégradation évaluée par analyse d'image

Les résultats obtenus pour les cadres enfouis au Cemagref et au CTIFL sont représentés sur les figures III-14 à III-16.



Figures III-14 et III-15 : Taux de biodégradation obtenus pour les matériaux A et B, par enfouissement en sol, au Cemagref et au CTIFL – détermination par analyse d'image

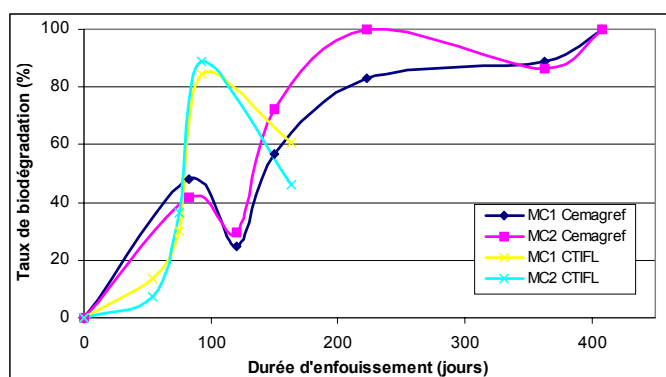


Figure III-16 : Taux de biodégradation obtenus pour le matériau C, par enfouissement en sol, au Cemagref et au CTIFL – détermination par analyse d'image

Nous obtenons ici encore des résultats surprenants bien que le traitement des films ne nécessite pas autant de précision que pour la mesure de perte de masse. Cependant, les valeurs déterminées par perte de masse et par analyse d'image évoluent de façon parallèle. Afin d'obtenir des résultats plus cohérents, nous avons donc décidé d'enfouir de nouveaux cadres.

Les taux de dégradation obtenus pour les cadres enfouis à l'INRA sont représentés sur la figure III-17.

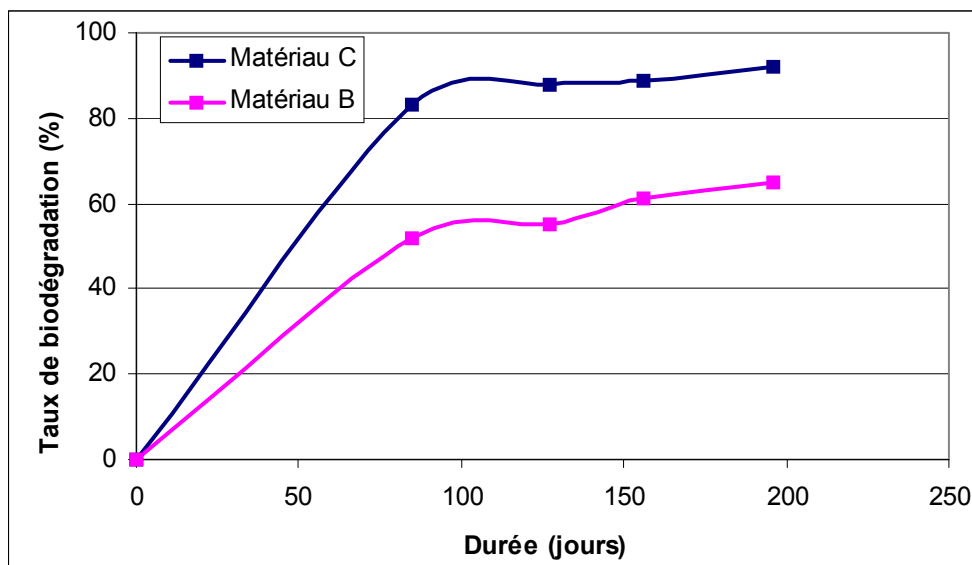


Figure III-17 : Taux de biodégradation obtenus pour les matériaux B et C, par enfouissement en sol, à l'INRA – détermination par perte de poids

La biodégradation du matériau C reste plus rapide que celle du matériau B. Au bout de 6 mois, 35% du matériau B persistent encore dans le cadre. Les résultats obtenus sur le sol sont délicats à interpréter du fait de leur manque de cohérence. Nous pouvons tout de même noter une tendance identique sur tous les essais. Le matériau A ne se dégrade que faiblement malgré une durée d'enfouissement de 13 mois. En revanche, nous observons une très bonne dégradation du matériau C, mais également du matériau B. Celui-ci a totalement disparu des cadres en 13 mois.

3.4 Test sur sol en laboratoire (en terrine)

Les taux de biodégradation obtenus après 230 jours d'enfouissement sont résumés dans le tableau III-XII.

Tableau III-XII : Taux de biodégradation obtenus en sol laboratoire – détermination par perte de poids

Matériau	Taux de biodégradation (%)	Ecart-Type (%)
Polyéthylène	0	0
Matériau A	10	17
Matériau B	51	22
Matériau C	58	19

Les taux de biodégradation obtenus vont dans le même sens que pour les autres méthodes d'évaluation. Mais les écart-types ne sont pas très satisfaisants. Le même phénomène a été observé pour les trois matériaux. Les trois terrines d'un même matériau ont un taux de biodégradation assez différent. L'aération de l'étuve pourrait expliquer ces différences. Selon l'emplacement de la terrine dans l'étuve, la terre se dessèche plus ou moins rapidement. Pour un dessèchement plus important, la dégradation sera plus lente, les microorganismes ayant besoin d'eau pour se développer. De plus, les mêmes problèmes de mesures de perte de masse que ceux décrits au paragraphe 3.3.2, sont rencontrés et mènent à des imprécisions sur l'évaluation de la dégradation.

Cette technique permet d'obtenir une estimation du taux de biodégradation, si une moyenne sur plusieurs terrines est réalisée. Mais elle devra être affinée, si on envisageait de l'utiliser comme un test standard d'évaluation de la biodégradation en sol laboratoire.

3.5 Test de Sturm

Les résultats observés vont dans le même sens que ceux obtenus sur pouzzolane (Figure III-18), mais les taux de biodégradation des trois matériaux sont nettement inférieurs. Les valeurs obtenues après 154 jours de test sont présentées dans le tableau III-XIII.

Tableau III-XIII : Taux de biodégradation obtenus après de 154 jours sur test de Sturm

Matériaux	Taux de biodégradation (%)
Matériau A	1
Matériau B	8
Matériau C	27
Cellulose	93

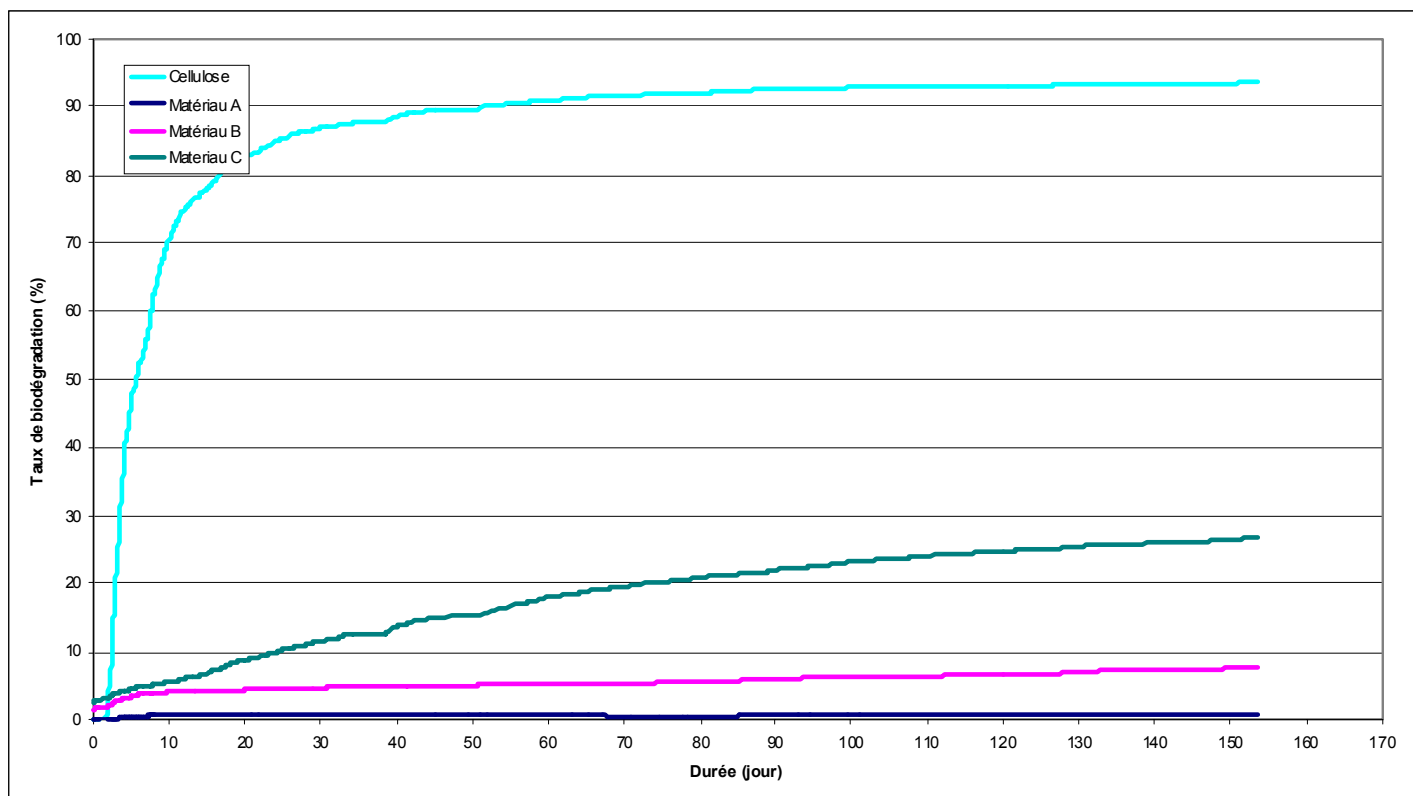


Figure III-18 : Taux de biodégradation des matériaux obtenus par test de Sturm

4 CONCLUSIONS

Si nous comparons les résultats des taux de biodégradation obtenus pour les trois matériaux selon les différentes méthodes mises en œuvre (Tableau III-XIV), nous pouvons observer une très grande dispersion dans les pourcentages de biodégradabilité selon les tests, mais une même évolution pour les trois matériaux. Bien que la durée soit différente selon le test, le plateau est atteint. Il est donc possible d'effectuer la comparaison des taux de biodégradation. Nous pouvons alors noter que le matériau C se dégrade mieux que le B, lui-même mieux que le A. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III-XIV.

Tableau III-XIV : Taux de biodégradation (en %) obtenus pour les matériaux à tester par différentes méthodes

Test	Pouzzolane/ Sol	Vermiculite/ Compost	Enfouissement en sol	En sol laboratoire	Test de Sturm
Durée (jours)	180	90	408	230	154
Matériau A	7	ND	32	10	1
Matériau B	23	90-100	100	51	8
Matériau C	62	ND	100	58	27

En laboratoire, en sol ou simulation de sol, ou en test de Sturm, les matériaux A et B ne se dégradent que faiblement, même en augmentant la durée du test. La nature des microorganismes mais plus encore les conditions du milieu ne sont pas favorables aux polymères que l'on cherche à dégrader. En effet, les polyesters doivent subir une hydrolyse chimique pour réduire la taille de leurs polymères constitutifs afin qu'ils puissent être bioassimilés et minéralisés par les microorganismes. Cette étape d'hydrolyse, favorisée par des pH et des températures élevés, ne peut donc pas avoir lieu en milieu liquide ou en sol laboratoire. Toutefois, nous pouvons mettre en évidence une accélération du processus de biodégradation lors du test sur pouzzolane par rapport au test de Sturm. Et, bien que les taux de minéralisation des matériaux A et B restent faibles, ces résultats en simulation de sol ne préfigurent pas de la dégradation en conditions réelles car d'autres paramètres physico-chimiques favorisent également la dégradation tels que l'influence des UV, des racines, des vers de terre, ...

Un point important demeure en faveur de ces méthodes laboratoires en simulation de sol (pouzzolane). Elles permettent l'extraction et l'analyse des produits de dégradation et par là même l'acquisition de connaissances sur les mécanismes de biodégradation. C'est ce que nous allons aborder dans les deux prochains chapitres.

5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bellia, G., Tosin, M., Floridi, G., Degli-Innocenti, F. 1999. Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*. **66**: p65-79.

Decriaud-Calmon, A. 1998. Evaluation objective de la biodégradabilité des matériaux polymères : mise au point d'une méthode et d'un dispositif expérimental. *Thèse à l'Institut National Polytechnique de Toulouse*

ISO 1999. Evaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des matériaux plastiques en milieu aqueux - Méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré.

Ki, H.C., Park, O.O. 2001. Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyesters. *Polymer*. **42**: p1849-1861.

Müller, R.J., Kleeberg, I., Deckwer, W.D. 2001. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology*. **86**: p87-95.

Sturm, R.N. 1973. Biodegradability of nonionic surfactants : screening test for predicting rate and ultimate degradation. *Journal of Oil Chemistry Society*. **50**: p159-167.

Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W.D., Müller, R.J. 2001. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters : evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*. **44**: p289-299.

Witt, U., Muller, R.J., Deckwer, W.D. 1996. Studies on sequence distribution of aliphatic/aromatic copolyesters by high-resolution ¹³C NMR spectroscopy for evaluation of biodegradability. *Macromolecular Chemistry and Physics*. **197**: p1525-1535.

Witt, U., Muller, R.J., Deckwer, W.D. 1997. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **5**(2): p81-89.

CHAPITRE 4 : MISE AU POINT DES
METHODES D'EXTRACTION DES PRODUITS
ET RESIDUS DE DEGRADATION SUR
POUZZOLANE ET VERMICULITE

CHAPITRE 4 :MISE AU POINT DES MÉTHODES D'EXTRACTION DES PRODUITS ET RÉSIDUS DE DÉGRADATION SUR POUZZOLANE ET VERMICULITE..... 125

1	SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	131
1.1	<i>Ultrasons</i>	131
1.2	<i>Micro-Ondes</i>	132
1.2.1	Principe.....	132
1.2.2	Les conditions opératoires optimales.....	133
1.2.3	Avantages et inconvénients de ces méthodes.....	134
1.3	<i>Extraction par fluide supercritique (SFE)</i>	136
1.3.1	Principe.....	136
1.3.2	Les conditions opératoires optimales.....	136
1.3.3	Avantages et inconvénients.....	138
1.4	<i>Extraction par solvant accélérée (ASE)</i>	139
1.4.1	Principe.....	139
1.4.2	Les conditions opératoires optimales.....	139
1.5	<i>Choix de la méthode : comparaison des principales méthodes d'extraction</i>	140
1.5.1	Ultrasons et soxhlet.....	140
1.5.2	Micro-ondes et méthodes traditionnelles.....	141
1.5.3	Fluide super-critique (SFE) et méthodes traditionnelles.....	141
1.5.4	Fluide sous-critique (SSE) et méthodes traditionnelles.....	142
1.5.5	Extraction accélérée par solvant et méthodes traditionnelles (soxhlet et extraction par solvant).....	142
1.5.6	Micro-ondes et fluide supercritique.....	143
1.5.7	Micro-ondes et extraction accélérée par solvant.....	143
1.5.8	Extraction accélérée par solvant et fluide supercritique.....	143
1.5.9	Extraction à l'eau sous-critique et fluide supercritique.....	143
1.5.10	Comparaison statistique.....	143
1.6	<i>Conclusion</i>	144
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	146
2.1	<i>Les solvants</i>	146
2.2	<i>Pré-traitement des matériaux</i>	146
2.3	<i>Préparation des échantillons témoins</i>	146
2.4	<i>Choix des solvants d'extraction</i>	146
2.4.1	Recherche d'un solvant pour le matériau B.....	146
2.4.2	Recherche d'un solvant pour le matériau C.....	147
2.5	<i>Solubilité du matériau B</i>	148
2.5.1	Limite de solubilité.....	148
2.5.2	Protocole de solubilisation.....	148
2.6	<i>Méthode d'extraction des matériaux</i>	149
2.6.1	Recherche des conditions d'extraction par agitation magnétique.....	149
2.6.2	Recherche des conditions d'extraction par ultrasons.....	149
2.7	<i>Analyse par chromatographie par perméation de gel (GPC)</i>	151
3	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	152

3.1	<i>Choix des solvants d'extraction</i>	152
3.1.1	Recherche d'un solvant pour le Matériau B.....	152
3.1.2	Recherche d'un solvant pour le Matériau C.....	153
3.2	<i>Solubilité du matériau B</i>	155
3.2.1	Limite de solubilité.....	155
3.2.2	Protocole de solubilisation.....	155
3.3	<i>Méthode d'extraction des matériaux</i>	156
3.3.1	Détermination de la méthode d'extraction du matériau B de la pouzzolane.....	156
3.3.2	Détermination de la méthode d'extraction du matériau B de la vermiculite.....	160
3.3.3	Détermination de la méthode d'extraction du matériau C de la pouzzolane.....	161
4	CONCLUSION	165
5	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

Dans ce chapitre nous nous intéressons aux procédures d'extraction. En effet, afin de pouvoir analyser les produits et résidus de dégradation, il est nécessaire de les extraire des mélanges pouzzolane/inoculum ou vermiculite/inoculum.

Pour cela, nous présenterons, en première partie, une étude bibliographique sur les méthodes d'extraction de composés à partir de matrices solides. Nous comparerons notamment, les nouvelles techniques, telles que les micro-ondes ou l'extraction par fluide supercritique, avec les techniques plus conventionnelles que sont le soxhlet et les ultrasons.

Les résultats de biodégradation, en simulation de sol, sur pouzzolane, nous conduisent à étudier uniquement les matériaux B et C. Nous chercherons donc, dans un deuxième temps, un solvant permettant de solubiliser ces produits. Et enfin, dans une troisième partie, nous déterminerons la technique d'extraction la plus appropriée sur pouzzolane et vermiculite pour le matériau B et sur pouzzolane pour le matériau C.

1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La technique d'extraction des composés organiques à partir de matrices solides, la plus utilisée jusqu'à présent, a été mise au point par F. Soxhlet en 1879. Cette méthode procède par percolation itérative de l'échantillon par les vapeurs recondensées du solvant. Elle permet l'extraction d'une quantité importante de matrice solide et l'appareillage est peu coûteux. Mais elle nécessite des quantités importantes de solvant et la durée d'extraction peut varier entre 8 h et 48 h. Avec les avancées techniques des systèmes analytiques, les procédures d'extraction se doivent d'être plus rapides et plus performantes.

1.1 Ultrasons

Les ultrasons, par leurs effets mécaniques et physiques, trouvent leurs applications dans les industries chimiques, biologiques, dans la fabrication de semi-conducteurs, dans les technologies alimentaires. Ils sont aussi utilisés pour sécher des matériaux, dégazer les liquides, accélérer les processus d'extraction et de diffusion et dégrader les contaminants chimiques de l'eau. Enfin, ils peuvent accélérer les réactions chimiques, dégrader les polymères ou, au contraire, favoriser la polymérisation (Masselin *et al.*, 2001).

Les radiations acoustiques à haute intensité provoquent de nombreuses modifications lorsqu'elles se propagent à travers un milieu (Masselin *et al.*, 2001). On peut observer notamment :

- un accroissement de la température du milieu par l'absorption des ondes acoustiques,
- des modifications des propriétés telles que la viscosité du milieu par l'agitation dynamique et les contraintes de cisaillement produites,
- des compressions rapides et successives dans la matière pouvant entraîner leur fracture,
- des turbulences aux interfaces,
- ainsi que des phénomènes de cavitation pouvant briser des liaisons chimiques à l'intérieur des chaînes polymères.

Les extractions en présence d'ultrasons fonctionnent principalement par agitation de la solution et production d'une cavitation dans le liquide. Cela se traduit par une augmentation du taux de transfert à l'interface polymère-liquide, alors que la diffusion des molécules au sein du polymère ne semble pas affectée (Vandenburg *et al.*, 1997).

Les ultrasons sont à la fois capables d'améliorer les rendements d'extractions et de détruire des liaisons chimiques. Cette méthode sera donc à considérer avec précaution dans le cas de l'extraction de polymères et résidus de polymères en vue de leur identification.

1.2 Micro-Ondes

1.2.1 Principe

Pour modéliser le processus d'extraction, la matrice peut être comparée à un grain constitué d'un cœur imperméable recouvert d'une couche organique poreuse. Les composés fixés à la surface sont extraits en plusieurs étapes : désorption de la matrice, diffusion à travers la couche poreuse et solubilisation dans le solvant (Letellier *et al.*, 1999a).

Le principe du chauffage par micro-ondes a été particulièrement bien décrit par Letellier *et al.* (1999a) et Camel (2000). Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques constituées de deux champs oscillants perpendiculaires : le champ électrique et le champ magnétique. La matière absorbe une partie de l'énergie électromagnétique et la transforme en

chaleur. La composante électrique génère une agitation désorganisée des molécules polaires qui produit la chaleur. La transformation de l'énergie électromagnétique en énergie calorifique se produit suivant deux mécanismes : la conduction ionique et la rotation des dipôles.

Deux principes d'extraction sous micro-ondes existent :

- Chauffage direct de la matrice qui absorbe les micro-ondes et relargue les analytes dans un solvant froid et transparent aux micro-ondes (extraction à pression atmosphérique : monomode).
- Chauffage du solvant polaire pour atteindre le point d'ébullition et extraire les composés avec un solvant chaud (extraction en réacteur fermé : multimode).

Outre l'extraction, les micro-ondes sont également utilisées dans de nombreux procédés tels que la digestion acide, la distillation, les hydrolyses acides et basiques ainsi que pour la réalisation de synthèses de composés organiques et inorganiques (LeBlanc, 1999).

1.2.2 Les conditions opératoires optimales

Parmi les nombreux travaux réalisés, les paramètres fréquemment étudiés sont (Camel, 2000; Chee *et al.*, 1996; Dupeyron *et al.*, 1999; LeBlanc, 1999; Letellier *et al.*, 1999a; Letellier *et al.*, 2000; Letellier *et al.*, 1999b; Punt *et al.*, 1999; Zuloaga *et al.*, 1999) :

- la nature du solvant,
- la durée de l'extraction,
- la puissance des micro-ondes,
- la pression dans le cas d'un réacteur fermé ou la température,
- et la teneur en eau dans la matrice.

Selon la nature de la matrice et des composés à extraire, ces paramètres auront une influence plus ou moins significative sur le taux de récupération.

Les solvants utilisés sont les mêmes que pour les méthodes conventionnelles. Letellier *et al.* (1999b) qui utilisent le chauffage indirect préconisent des solvants suffisamment polaires pour qu'ils puissent être activés par les micro-ondes. Dupeyron *et al.* (1999) et LeBlanc (1999), au contraire, utilisent le chauffage direct et conseillent des solvants

faiblement polaires comme l'hexane ou le toluène. Les solutés sont alors libérés dans un solvant froid. Cette technique sera privilégiée dans le cas des composés thermolabiles. Il est alors nécessaire que les composés à extraire soient des absorbeurs de micro-ondes, c'est-à-dire polaire ou contenant de l'eau. L'addition de Weflon® (matériau inerte), bon absorbant, permet aussi de chauffer la matrice (Camel, 2000). De façon générale, la polarité du solvant va dépendre de l'analyte à solubiliser. On utilisera donc, le plus souvent des mélanges de solvants afin d'obtenir les caractéristiques de solvation nécessaire (Dupeyron *et al.*, 1999 ; Punt *et al.*, 1999).

Une augmentation de la durée d'extraction permet généralement d'obtenir de meilleurs rendements de récupération. Au delà d'une certaine limite cet accroissement n'aura plus d'impact (Camel, 2000).

Selon la nature des composés à extraire, l'influence de la puissance d'irradiation varie considérablement. De façon générale, ce paramètre est optimisé afin d'éviter la dégradation des analytes (Camel, 2000 ; Letellier *et al.*, 1999b).

L'accroissement de la température induit une augmentation de la diffusivité et de la désorption des composés des sites actifs, donc de l'efficacité de l'extraction (Camel, 2000; LeBlanc, 1999). Le contrôle de la température est donc important pour optimiser l'efficacité de l'extraction, prévenir la dégradation thermique des analytes et avoir des conditions opératoires reproductibles (LeBlanc, 1999).

La présence d'eau dans la matrice augmente le rendement de récupération dans la majorité des cas, du fait d'un chauffage plus rapide (Chee *et al.*, 1996). Toutefois, un pourcentage d'eau trop élevé inhibe la diffusion du solvant et des analytes. Cette teneur en eau doit être stable afin d'obtenir des résultats reproductibles.

L'utilisation de plans d'expérience permet d'optimiser les valeurs des différents paramètres et ainsi augmenter les rendements de récupération.

1.2.3 Avantages et inconvénients de ces méthodes

Les deux méthodes d'extraction par micro-ondes sont plus rapides et nécessitent moins de solvants que les méthodes traditionnelles (Soxhlet et ultrasons) et ce grâce à l'activation des molécules, et la température élevée. Dans un réacteur fermé, il est possible d'extraire

simultanément plusieurs échantillons. Toutefois, une étape ultérieure de purification, nécessitant généralement un volume important de solvant, est indispensable (Cresswell *et al.*, 1999; LeBlanc, 1999).

L'efficacité et la reproductibilité de ces deux méthodes sont satisfaisantes pour différentes matrices et différents contaminants organiques. Elles permettent d'obtenir des extraits plus purs que par extraction traditionnelle. Elles semblent donc être une bonne alternative à l'extraction par soxhlet. De plus ces avantages sont obtenus sans compromis sur la sécurité. L'exposition aux solvants est réduite et les quantités de déchets à traiter moindres (Camel, 2000; Letellier *et al.*, 1999a).

Néanmoins, en raison des températures élevées les composés volatils peuvent se disperser au moment de l'ouverture des réacteurs.

D'autre part, les micro-ondes sont souvent utilisées pour leur capacité à activer les molécules, en synthèse organique. De nombreux articles décrivent ces phénomènes, nous en donnerons quelques exemples. Lidström *et al.* (2001) ont effectué un état de l'art de toutes les réactions de synthèse organique assistées par micro-ondes, publiées entre 1994 et 2000. Parmi 400 réactions étudiées (600 références), ils décrivent 20 réactions d'estérification et de transestérification. Nedelmann *et al.* (1999) arrivent à greffer de l'acide acrylique à la surface d'une membrane de polyéthylène téréphtalate grâce aux micro-ondes. Des réactions de polymérisation sont également décrites. Porto *et al.* (2002) réalisent une réaction de polyaddition, à 196W pendant 20 minutes. Ils arrivent à convertir 97% de styrène en présence d'un initiateur. La réaction est beaucoup plus rapide qu'une polyaddition classique. Des réactions de polycondensation ont également été décrites (Imai, 1996; Imai *et al.*, 1996).

Tous ces exemples mettent en évidence l'activation par micro-ondes. Cette méthode d'extraction peut donc induire une recombinaison des produits à extraire.

Par ailleurs, le support inerte que nous utilisons est constitué de roche volcanique (pouzzolane). Il contient donc des éléments métalliques (fer), très réactifs aux Micro-ondes. De plus, les matériaux étudiés sont polaires. La température atteinte dans le réacteur sera alors très élevée, et les produits et résidus de dégradation peuvent se détériorer sous l'effet de la chaleur.

1.3 Extraction par fluide supercritique (SFE)

1.3.1 Principe

Pour obtenir un fluide sous sa forme supercritique, il est nécessaire de se placer au delà du point critique, c'est à dire au dessus de la température et de la pression critiques. Les propriétés du fluide supercritique sont alors intermédiaires entre celles du gaz et celles du liquide. Elles dépendront de la pression, de la température (donc de la densité) et de la composition du fluide (Camel, 1997).

D'un point de vue cinétique, leur viscosité est entre 5 et 20 fois plus faible que les autres liquides, les coefficients de diffusion des solutés sont alors plus importants. Sur un plan thermodynamique, leur densité est entre 100 et 1000 fois plus élevée que les autres gaz, ce qui donne un pouvoir de solvation plus proche de celui des liquides. Le fluide aura alors le pouvoir solvant de la forme liquide et le pouvoir de diffusion de la forme gazeuse.

L'extraction et la récupération peuvent être considérés comme un processus à quatre étapes : 1) désorption du composé des sites actifs de la matrice et diffusion à l'intérieur de la matrice elle-même, 2) solubilisation de l'analyte dans le fluide supercritique, 3) balayage de la cellule d'extraction par le fluide et 4) récupération des solutés extraits par un système de piégeage. Pour les applications pratiques environnementales, la première étape est généralement une étape limitante (Camel, 1997).

1.3.2 Les conditions opératoires optimales

Comme pour l'extraction par Micro-ondes de nombreux travaux ont permis d'étudier les paramètres ayant une influence significative sur l'efficacité de l'extraction (Bakiamoh *et al.*, 1999; Barnabas *et al.*, 1994; Bautista *et al.*, 1999; Berglöf *et al.*, 1999; Björkund *et al.*, 1999; Bowadt *et al.*, 1995; Camel, 1997; Camel *et al.*, 1993; Dupeyron *et al.*, 1999; Lopez-Capel *et al.*, 2000; McNally, 1995; Morselli *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 1999; Schantz *et al.*, 1998; Stuart *et al.*, 1996; Vandenburg *et al.*, 1997). Ces paramètres sont les suivants :

- la nature du fluide supercritique,
- sa température, sa pression et sa densité,
- son débit

- la nature et la concentration d'un agent modificateur (solvant organique),
- et le taux d'humidité

Le dioxyde de carbone est le fluide le plus fréquemment utilisé pour sa facilité de mise en oeuvre, ses paramètres critiques facilement accessibles (72.8 bars et 31.1°C) et sa sécurité (Camel, 1997). De plus, à pression atmosphérique, le CO₂ est gazeux, ce qui simplifie la séparation des extraits. Son principal défaut est, néanmoins, sa non-polarité. D'autres fluides peuvent être alors utilisés comme l'oxyde d'azote, N₂O, particulièrement adapté pour l'extraction des composés polaires, SF₆, les composés fluorochlorocarbonés (Fréons) (Bowadt *et al.*, 1995) et NH₃ (Stuart *et al.*, 1996). L'eau supercritique a aussi été utilisée, mais sa température et sa pression critiques sont très élevées (T>374°C et P>221 bars).

La température, la pression et la densité du fluide supercritique sont étroitement liées. Elles influencent de façon significative l'extraction. L'augmentation de l'un de ces paramètres, les deux autres restant constants, accroît les coefficients de diffusion et la solubilité de l'analyte dans le fluide et donc son extraction (Berglöf *et al.*, 1999 ; Björkund *et al.*, 1999 ; Bowadt *et al.*, 1995; Schantz *et al.*, 1998 ; Vandenburg *et al.*, 1997). Une augmentation de la densité augmente la polarité du CO₂ supercritique. Les effets observés sont alors similaires aux mélanges de solvants de polarités différentes dans le cas de l'extraction par Soxhlet (Bautista *et al.*, 1999). La possibilité de faire varier la densité permet d'extraire sélectivement les analytes. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de matrices complexes et évite les co-extractions (Stuart *et al.*, 1996).

Le débit ne doit pas excéder 2 à 3 ml/min pour assurer une collecte efficace des solutés extraits (Camel, 1997 ; Vandenburg *et al.*, 1997). Un débit suffisamment faible permet une bonne pénétration du fluide dans la matrice, et donc une extraction plus efficace.

L'ajout d'un modificateur permet d'extraire les analytes qui resteraient dans la matrice, tels que les composés polaires avec une extraction au CO₂ pur. Cet agent modificateur est un solvant organique polaire, le plus couramment utilisé est le méthanol. L'ajout d'un modificateur organique augmente la polarité du fluide supercritique (Berglöf *et al.*, 1999 ; Camel, 1997), mais il diminue la récupération des composés non-polaires. Son effet est fonction de son volume. Le rendement de récupération croît avec le volume jusqu'à atteindre un plateau à partir duquel toute augmentation supplémentaire est inefficace (Berglöf *et al.*, 1999).

En fonction de la nature du soluté, la présence d'eau va affecter l'efficacité de l'extraction. Elle peut agir comme agent modificateur pour augmenter la récupération de la plupart des analytes polaires (McNally, 1995). Elle peut aussi entraver leur extraction. Pour l'heure, les effets de l'eau, particulièrement en grande quantité dans certains échantillons environnementaux ne sont pas encore clairs.

En effet, les recherches des conditions optimales d'extraction ont généralement été faites sur des échantillons « enrichis » en composés à extraire. Elles ne sont pas directement transposables pour les échantillons contaminés naturellement avec les mêmes composés. Leur taux de récupération reste faible en raison des fortes interactions qui existent entre l'analyte et la matrice.

1.3.3 Avantages et inconvénients

Elle permet d'obtenir un rendement de récupération élevé, une bonne sélectivité, de réaliser une extraction rapide (30 min) et l'utilisation d'une faible quantité de solvant, de plus non toxique (Berglöf *et al.*, 1999; Camel, 1997). La sélectivité est due à la capacité de modifier le pouvoir de solvation du fluide en faisant varier la densité ou la température. Elle permet d'éviter une étape de concentration et de lavage, et d'obtenir des extraits propres, qui peuvent être analysés directement (Camel, 1997 ; Schantz *et al.*, 1998).

Cette technique est particulièrement avantageuse pour l'extraction d'analytes à partir d'échantillons environnementaux pour lesquels les matrices sont généralement complexes. La SFE permet alors d'obtenir des extraits plus propres (Barnabas *et al.*, 1994).

La SFE est une technique performante pour les échantillons « enrichis », mais son potentiel est encore limité pour les échantillons réels. En effet, la présence d'eau ou de composés organiques au sein de la matrice peut fortement réduire les rendements d'extraction.

De plus, l'équipement associé est coûteux et son fonctionnement reste délicat.

1.4 Extraction par solvant accélérée (ASE)

1.4.1 Principe

Lors de l'extraction de matières organiques du sol, les objectifs recherchés résident dans l'obtention de forts rendements tout en récupérant des composés chimiquement inaltérés. Ces deux buts sont souvent contradictoires. L'eau, composant naturel du sol, est, de fait, très utilisé.

A la différence du soxhlet, l'ASE met en œuvre des températures et des pressions élevées. Le volume des réacteurs est réduit (<50 ml) et les durées d'extraction plus courtes (<20 min). Des études préliminaires ont montré que les solvants chauds, sous pression, amélioreraient la récupération des biphényles polychlorés (PCBs) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) du sol (Gan *et al.*, 1999). La pression est élevée pour maintenir le solvant sous forme liquide au delà de son point d'ébullition (Gan *et al.*, 1999; Schwesig *et al.*, 1999). L'ASE a été décrite pour de nombreux échantillons environnementaux ; les principales applications concernent les contaminants d'origine industrielle.

1.4.2 Les conditions opératoires optimales

Les paramètres influençant l'extraction accélérée par solvant, les plus fréquemment étudiés sont (Gan *et al.*, 1999; Schwesig *et al.*, 1999; Vandenburg *et al.*, 1999) :

- la température et la pression,
- la nature du solvant,
- et la durée d'extraction

La solubilité des matières organiques du sol dépend de la diffusion, de la désorption et des équilibres chimiques. Une augmentation de la température permet d'améliorer la thermodynamique et la cinétique de ces phénomènes. Cependant, une température trop élevée induit une co-extraction et/ou la formation de nouveaux composés.

Les solvants non-polaires ne sont pas recommandés. Les solvants utilisés doivent être de bons agents gonflants. L'étape la plus difficile de l'optimisation de l'ASE réside dans le

choix du solvant possédant la bonne solubilité à hautes températures (Vandenburg *et al.*, 1997). En effet, les solvants, utilisés à pression atmosphérique pour l'extraction par soxhlet, ne sont pas toujours adaptés pour l'ASE. Vandenburg *et al.* (1999) proposent d'utiliser le paramètre d'Hildebrand, défini comme étant la racine carré de l'énergie interne de vaporisation divisée par le volume molaire, pour déterminer le solvant optimal.

La durée d'extraction sera généralement de 10 minutes. Au delà, le rendement n'est pas amélioré (Schwesig *et al.*, 1999).

1.5 Choix de la méthode : comparaison des principales méthodes d'extraction

Pour choisir la méthode optimale, différents paramètres quantitatifs et techniques sont à prendre en compte (Dupeyron *et al.*, 1999) :

- le rendement de récupération des produits
- la reproductibilité de la méthode
- la durée d'extraction qui doit être la plus courte possible
- la quantité de solvant utilisée (en terme de sécurité et de traitement des déchets)
- la possibilité d'automatisation pour permettre le traitement d'un grand nombre d'échantillons en un minimum de temps
- et le coût opératoire pour l'équipement et l'opérateur

Ces paramètres vont donc être comparés au sein des différentes méthodes.

1.5.1 Ultrasons et soxhlet

Les ultrasons permettent d'obtenir une meilleure récupération des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) de hauts poids moléculaires que le soxhlet tout en présentant une déviation standard relative (RSD) plus faible (Dupeyron *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 1998). En outre, l'extraction par ultrasons est plus rapide et moins consommatrice en solvant.

1.5.2 Micro-ondes et méthodes traditionnelles

Les ultrasons donnent des taux de récupération proches de ceux obtenus par micro-ondes pour un investissement moindre. Toutefois les micro-ondes permettent le plus souvent d'augmenter la reproductibilité des extractions (Camel, 2000; Dupeyron *et al.*, 1999).

Les micro-ondes présentent également de meilleures performances en terme de rendement d'extraction et de reproductibilité par rapport au soxhlet (Zuloaga *et al.*, 1999). Toutefois, cette méthode est plus économique (Vandenburg *et al.*, 1997).

Lors de l'extraction de 16 phénols, à partir de sols enrichis en ces composés, Lopez-Avila *et al.* (1995) obtiennent 71% de récupération par micro-ondes, 52% par soxhlet et 57% par ultrasons. En revanche, Contat-Rodrigo *et al.* (2001) obtiennent des résultats différents pour l'extraction des produits de dégradation de polyoléfines dans le sol. En effet, les extractions sont plus reproductibles par ultrasons que par micro-ondes.

Une alternative intéressante a été proposée par Garcia-Ayuso *et al.* (1998) qui ont couplé le soxhlet aux micro-ondes. Le soxhlet est introduit dans la cavité du four micro-ondes. Des pompes accélèrent le passage du solvant dans le soxhlet. Cette technique couple les avantages des deux méthodes en diminuant la durée et en permettant une extraction plus complète. Ce système a été testé sur trois groupes d'analytes de polarité différente. Après optimisation des paramètres, ce couplage permet d'obtenir des rendements de récupération supérieurs tout en réduisant la RSD.

1.5.3 Fluide super-critique (SFE) et méthodes traditionnelles

Les taux de récupération observés par SFE, pour l'extraction des PAHs du sol, sont similaires à ceux obtenus par Soxhlet mais avec une reproductibilité supérieure. Toutefois, pour les PAHs de faibles masses moléculaires, le rendement est plus faible par ultrasons que par SFE. En revanche, il est supérieur dans le cas des PAHs de masses moléculaires élevées. De façon globale, la SFE permet de récupérer 96.7% des produits initialement introduits, alors que les ultrasons permettent d'obtenir un rendement de 100%. La technique de SFE présente une RSD plus faible que les deux méthodes conventionnelles (Dupeyron *et al.*, 1999).

Schantz *et al.* (1998) ont comparé l'extraction des biphényles polychlorés (PCBs) par SFE et par soxhlet et n'observent pas de différences significatives entre les taux de

récupération et les écart-types obtenus pour ces deux méthodes. Les avantages de la SFE se situent au niveau de l'absence d'étape de lavage de l'échantillon, la réduction du temps d'analyse et de la quantité de solvant utilisé.

Cependant, Bowadt *et al.* (1995) attirent l'attention sur le fait que les études sur l'extraction par fluide supercritique, sont faites sur des échantillons enrichis en composés à extraire. Les taux de récupération obtenus sur échantillons réels sont nettement moins élevés en raison des interactions entre la matrice et les composés. Ces échantillons enrichis ne devraient pas être utilisés pour déterminer l'efficacité d'un procédé d'extraction. D'autre part, les méthodes par SFE sont optimisées avant d'être comparées aux méthodes traditionnelles. Afin d'effectuer une comparaison rigoureuse, il serait aussi nécessaire d'optimiser ces méthodes. Par exemple, par soxhlet, généralement un seul solvant est utilisé, alors qu'un mélange azéotropique pourrait augmenter l'efficacité de l'extraction.

1.5.4 Fluide sous-critique (SSE) et méthodes traditionnelles

La SSE est moins efficace pour l'extraction des PAHs de forts poids moléculaires mais plus exploitable pour les PAHs de faibles masses moléculaires que l'extraction au soxhlet ou par ultrasons. Les valeurs de RSD sont beaucoup plus faibles que pour les deux méthodes traditionnelles (Dupeyron *et al.*, 1999).

1.5.5 Extraction accélérée par solvant et méthodes traditionnelles (soxhlet et extraction par solvant)

Il n'existe pas de différences significatives entre ces différentes techniques d'extraction pour les produits faiblement liés au sol, c'est-à-dire après une période d'incubation courte. Une extraction par solvant est même plus favorable car les conditions sont plus douces et évitent ainsi une dégradation ou volatilisation des analytes. En revanche, pour des composés fortement liés à la matrice, l'ASE est alors plus efficace que l'extraction par soxhlet, elle-même plus efficace que l'extraction par solvant (Schwesig *et al.*, 1999). Pour des pesticides, on obtient respectivement pour le soxhlet et l'extraction par solvant 84% et 67% de la récupération obtenue par l'ASE (Gan *et al.*, 1999).

L'ASE présente d'autres avantages par rapport à ces deux méthodes traditionnelles. Il n'est pas nécessaire de procéder à des étapes de post-extraction et les quantités de solvant

utilisés sont plus faibles. De plus, grâce à son mode de fonctionnement et son haut degré d'automatisation, l'ASE permet d'extraire jusqu'à 48 échantillons par jour (Gan *et al.*, 1999).

1.5.6 Micro-ondes et fluide supercritique

Il n'existe pas de différences significatives de récupération et selon les cas, on peut observer une faible amélioration pour l'une ou l'autre de ces deux méthodes. En raison de son manque de sélectivité par rapport à la SFE, on peut observer dans le cas des micro-ondes une co-extraction de la matrice (Camel, 2000).

1.5.7 Micro-ondes et extraction accélérée par solvant

Les taux de récupération sont pratiquement identiques pour ces deux méthodes. En revanche, l'ASE est moins dépendante de la matrice que l'extraction par micro-ondes, de plus les extraits sont plus propres (Camel, 2000).

1.5.8 Extraction accélérée par solvant et fluide supercritique

L'utilisation de l'ASE par rapport à la SFE est particulièrement avantageuse dans le cas de l'extraction de composés ayant une faible solubilité dans le CO₂ (Vandenburg *et al.*, 1997).

1.5.9 Extraction à l'eau sous-critique et fluide supercritique

Le CO₂ supercritique est toujours apolaire. Il est donc impossible d'extraire des composés polaires. En revanche, l'eau est polaire à faible température et apolaire lorsqu'on augmente sa température au delà de la température critique (Hawthorne *et al.*, 2000), ce qui lui confère une meilleure sélectivité que le CO₂ (Di Corcia *et al.*, 1999).

1.5.10 Comparaison statistique

Dupeyron *et al.* (1999) ont effectué une comparaison statistique de quatre méthodes d'extraction (Ultrasons, Micro-ondes, SFE et SSE) par rapport au soxhlet. Pour cela, les valeurs de répétabilité et de différences de récupération par rapport au soxhlet pour chaque méthode d'extraction sont classées par ordre croissant. Cette technique de comparaison permet

de distinguer trois groupes : les méthodes classiques qui donnent les résultats les moins satisfaisants, les techniques d'extraction par micro-ondes et par fluide supercritique et enfin la méthode d'extraction par fluide sous-critique. Il faut néanmoins noter que les cinq méthodes permettent d'obtenir des taux de récupération supérieurs à 96%.

1.6 Conclusion

Les différents avantages et inconvénients des méthodes étudiées sont résumés dans le tableau IV-I.

Tableau IV-I : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différentes méthodes d'extraction (Dupeyron *et al.*, 1999; Vandenburg *et al.*, 1997)

Paramètre	Soxhlet	Ultrasons	Micro-ondes	SFE	SSE	ASE
<i>Solvant</i>	Quelconque	Quelconque	Quelconque (absorbeur MO)	CO ₂	Quelconque	Quelconque
<i>Volume de solvant</i>	50-100 ml	30-50 ml	30 ml	10 ml	10 ml	30-50 ml
<i>Durée d'analyse</i>	6-24 h	30-60 min	30-60 min	20 min-2 h	30-60 min	15 min
<i>Nb d'échantillons</i>	6	8	12	4	24	12
<i>Automatisation</i>	Non	Non	Semi-automatique	Automatique	Automatique	Automatique
<i>Durée pour opérateur</i>	Elevée	Faible	Moyenne	Moyenne	Faible	moyenne
<i>Compétences de l'opérateur</i>	Faible	Faible	Moyenne	Elevée	Faible	Moyenne
<i>Coût</i>	Faible	Très faible	Moyenne	Elevée	Très élevée	Elevée

En résumé, même si l'extraction par micro-ondes, la SFE et l'ASE donnent des résultats comparables, ces deux dernières techniques nécessitent un investissement beaucoup

plus important. De plus des phénomènes de co-extractions peuvent être observés à cause de la présence d'eau dans les échantillons.

L'optimisation de l'extraction par micro-ondes est plus simple que celle de la SFE car le nombre de paramètres est inférieur. D'un autre côté, la faible sélectivité des micro-ondes impose parfois une procédure de nettoyage avant une analyse chromatographique (Camel, 2000).

Le soxhlet et particulièrement les ultrasons restent des techniques très intéressantes pour l'extraction de composés à partir de matrices solides. Elles sont simples à mettre en œuvre et moins coûteuses.

D'après les résultats de cette étude bibliographique sur les méthodes d'extraction, nous avons décidé de comparer les extractions par :

- micro-ondes
- soxhlet
- ultrasons
- et agitation

Toutefois, la pouzzolane riche en éléments métalliques tel que le fer nous interdit l'utilisation des micro-ondes. Par ailleurs, ce mode d'extraction pourrait engendrer une recondensation des produits de dégradation. Nous avons donc décidé de ne pas l'utiliser pour la suite de nos travaux.

De même, l'utilisation d'un solvant tel que la N-Méthylpyrrolidone (NMP) à haut point d'ébullition (203°C) à pression atmosphérique facilite la recombinaison ou la dégradation des oligomères formés si l'extraction était réalisée par soxhlet.

Nous réaliserons donc nos extractions sous ultrasons ou par agitation magnétique et nous comparerons ces deux méthodes entre elles.

2 **M**ATERIELS ET METHODES

2.1 Les solvants

Les solvants testés sont le dichlorométhane, le trichlorométhane, l'acétone, l'éthanol, les xylènes, la N-Méthylpyrrolidone (Riedel de Haën), le tétrahydrofurane, le 2-propanol, le diéthyle éther (Scharlau), le diméthyle formaldéhyde, le n-hexane (SDS), le diméthyle sulfoxyde, le ter-butyl-méthyl éther, le trichloroéthylène, le carbonate d'éthylène, le butyrate de méthyle (Acros Organics), l'acétate d'éthyle, le cyclohexane, le chlorobenzène, le nitrobenzène, le 1,4-dioxane (Sigma Aldrich), le toluène (Fluka), le tetrachlorométhane et le m-crésol (Prolabo). Ces solvants ont tous été utilisés sans purification supplémentaire.

2.2 Pré-traitement des matériaux

Nous travaillons sur le précurseur du matériau B sous forme de granules avant filmage et avant ajout du colorant noir. En effet, ce colorant pourrait rester fixé sur les colonnes chromatographiques que nous allons utiliser dans la suite de l'étude, et les détériorer. Les granules sont broyées avec un broyeur IKA® Werke (MF 10 basic) à travers une grille de 3 mm. Pour éviter la surchauffe de l'appareil qui entraînerait la fusion du matériau, de l'azote liquide est utilisé pour refroidir le système.

2.3 Préparation des échantillons témoins

0.1 g de matériau sont placés dans 10 ml de N-Méthylpyrrolidone. Ils sont ensuite laissés au repos pendant 24 h, puis traités aux ultrasons pendant 15 min.

2.4 Choix des solvants d'extraction

2.4.1 Recherche d'un solvant pour le matériau B

Dans un pilulier de 100 ml sont introduits 0.05 g de granules broyées de matériau B et 5 ml de solvant. L'observation visuelle du contenu des piluliers est effectuée au bout de 24 h.

Deux séries de solvants ont été testés. Ils sont rassemblés dans le tableau IV-II.

Après observation visuelle au bout de 24 h, les piluliers de la série 1 sont chauffés au bain-marie entre 50-60°C ; les piluliers de la série 2 sont placés dans une cuve à ultrasons (Appareil Elma Transsonic T460). Une nouvelle observation visuelle est alors effectuée au bout de quelques minutes.

Tableau IV-II : Solvants testés pour la solubilité du matériau B

Série 1	Série 2
Trichlorométhane (CHCl ₃)	m-crésol
Dichlorométhane	N-Méthylpyrrolidone (NMP)
Tétrahydrofurane (THF)	Chlorobenzène
Acétone	Nitrobenzène
Diméthyle formaldéhyde (DMF)	1,4-dioxane
Diméthyle sulfoxyde (DMSO)	CHCl ₃ /n-hexane (2/1)
Diéthyle éther	Trichloréthylène
Acétate d'éthyle	Cyclohexane
Ter-Bu-Me-éther	Carbonate d'éthyle
n-hexane	Butyrate de méthyle
Ethanol	Tétrachlorométhane
2-propanol	
Toluène	
Xylènes	
Eau	

2.4.2 Recherche d'un solvant pour le matériau C

Nous avons prévu d'analyser en priorité le Matériau B. Cependant pour effectuer quelques analyses sur le Matériau C concernant ces caractéristiques et sa structure, il est nécessaire de connaître certains de ses solvants.

Dans un pilulier de 100 ml sont introduits 0.05 g de granules broyées de matériau C et 5 ml de solvant. L'observation visuelle du contenu des piluliers est effectuée au bout de 24 h. Les piluliers sont ensuite chauffés entre 50-60°C, puis traités aux ultrasons.

Les solvants étudiés sont :

- Le diméthyle sulfoxyde
- La N-Méthylpyrrolidone
- Le chloroforme
- L'acétone
- Le tétrahydrofurane
- L'acétonitrile
- Le n-hexane
- L'acétate d'éthyle
- Le diéthyle éther
- Les xylènes
- Le toluène

2.5 Solubilité du matériau B

2.5.1 Limite de solubilité

Dans 10 ml de NMP, ont été introduites différentes quantités de matériau B en granules broyées : 0.0530 g, 0.0612 g, 0.1126 g, 0.2010 g, 0.4954 g et 1.0045 g. La dissolution étant très lente, les résultats sont observés au bout de 24 h. Les deux derniers échantillons plus difficiles à solubiliser sont ensuite placés dans une cuve à ultrasons pendant 30 min.

2.5.2 Protocole de solubilisation

Cinq méthodes de solubilisation ont été comparées. Pour cela, cinq échantillons sont préparés à partir de 0.1 g de matériau B introduit dans 10 ml de NMP. Chaque échantillon est soumis à un des protocoles de solubilisation suivants :

- Sans agitation, ni chauffage

- Avec agitation par ultrasons
- Avec agitation magnétique
- Avec agitation par ultrasons et chauffage à 40°C
- Avec agitation magnétique et chauffage à 50°C

La durée nécessaire pour avoir une solubilisation complète du matériau dans le solvant est enregistrée.

2.6 Méthode d'extraction des matériaux

2.6.1 Recherche des conditions d'extraction par agitation magnétique

Dans des piluliers de 100 ml sont introduits successivement 15.2 g de pouzzolane, 0.05 g de matériau et 10 g de N-Méthylpyrrolidone. Les mélanges sont alors soumis à une agitation magnétique.

Trois piluliers sont préparés pour chaque matériau, correspondant aux différentes durées d'extraction : 2, 4 et 6 heures pour le matériau B et 4, 6 et 8 heures pour le matériau C.

2.6.2 Recherche des conditions d'extraction par ultrasons

2.6.2.1 Extraction du matériau B

Extraction de la pouzzolane

Deux séries d'essais ont été effectuées. Pour chacune des séries, trois piluliers sont préparés correspondant chacun à une durée d'extraction.

Pour la première série, dans des piluliers de 100 ml sont introduits successivement 45.6 g de pouzzolane, 0.15 g de matériau et 30 g de N-Méthylpyrrolidone. Les piluliers sont ensuite placés dans une cuve à ultrasons pour des durées d'extraction de 2, 4 et 6 heures.

Nous avons alors procédé à une deuxième série d'extraction afin, d'une part, de déterminer la durée minimale nécessaire pour extraire la totalité du polymère et de ses oligomères et, d'autre part, de déterminer l'influence du contact prolongé entre le polymère et la pouzzolane. Pour cette série, dans des piluliers de 100 ml sont introduits successivement

45.6 g de pouzzolane, 0.15 g de matériau, 0.075 g d'acide adipique et 0.075 g d'acide téréphtalique. Le mélange est laissé au repos pendant 13 jours. 30 g de N-Méthylpyrrolidone sont alors introduits. L'ajout des acides sert à simuler des résidus, le matériau B contenant ces deux acides.

Extraction de la vermiculite

Dans des piluliers de 100 ml sont introduits 1.02 g de vermiculite, 0.25 g de matériau et 32 g de N-Méthylpyrrolidone. Les mélanges sont laissés au repos pendant 24 h puis placés dans une cuve à ultrasons.

Deux piluliers sont préparés, correspondant à deux durées d'extraction : 30 et 60 min.

2.6.2.2 Extraction du matériau C

Dans des piluliers de 100 ml sont introduits 45.6 g de pouzzolane, 0.15 g de matériau et 30 g de N-Méthylpyrrolidone. Après un temps de repos, les piluliers sont placés dans une cuve à ultrasons.

Plusieurs essais ont été effectués. Dans chacun des cas, des piluliers sont préparés correspondant aux différentes durées d'extraction. Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau IV-III.

Pour l'essai 2, la N-Méthylpyrrolidone n'est ajoutée qu'après 13 jours de repos.

Tableau IV-III : Conditions d'extraction du matériau C de la pouzzolane par ultrasons

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
Durée d'extraction	2 h	20 min	30 min	20 min
	4 h	40 min	40 min	40 min
	6 h	60 min	50 min	60 min
Durée de repos	0 jour	0 jour	12 jours	7 jours

2.6.2.3 Extraction des supports solides

Afin de vérifier qu'ils ne relarguent pas de produits lors de l'extraction, les deux supports inertes seuls, pouzzolane et vermiculite, sont extraits avec la N-Méthylpyrrolidone, aux ultrasons dans les mêmes conditions que les matériaux.

Les conditions sont résumées dans le tableau IV-IV.

Tableau IV-IV : Conditions d'extraction des supports inertes

	Pouzzolane	Vermiculite
Masse de support (g)	45.6	0.1
Masse de NMP (g)	30	32
Durée	2 h	30 min
	4 h	60 min
	6 h	

Ces essais conduisent à des témoins appelés « blanc ».

2.7 Analyse par chromatographie par perméation de gel (GPC)

Après extraction, les mélanges sont tout d'abord filtrés sur un verre fritté puis sur filtre Acrodisc® CR PTFE 0.45µm (Gelman) avant d'être injectés en chromatographie.

L'appareillage de chromatographie est constitué d'une pompe Dionex P580 et d'un injecteur automatique Dionex ASI-100. Le détecteur est un réfractomètre, Iota 2, Precision Instruments. Ils sont gérés par le logiciel d'exploitation Chromeleon© Dionex.

La séparation a lieu sur deux colonnes PLgel 10µm Mixte-C, précédées d'une pré-colonne PLgel 5µm Guard (Polymer laboratories). Elle sont chauffées à 70°C dans un four Croco-cil®.

Le volume d'injection est de 200 µl et le débit de 1 ml/min. Les échantillons sont injectés deux fois.

Les colonnes sont étalonnées avec un kit de standards polystyrène (580-3065000 Da).

Les chromatogrammes sont retraités à l'aide du logiciel SECential®. Les chromatogrammes obtenus pour les extraits sont comparés avec ceux obtenus pour les témoins afin de déterminer l'efficacité de l'extraction et vérifier l'absence de détérioration des matériaux.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Choix des solvants d'extraction

Dans l'objectif d'extraire et d'analyser le polymère résiduel ou les oligomères formés lors de la dégradation, il est nécessaire de disposer de solvants permettant leur totale solubilisation.

3.1.1 Recherche d'un solvant pour le Matériau B

Les résultats des essais de solubilisation du matériau B dans les différents solvants de la série 1, à froid et à chaud, sont indiqués dans le tableau IV-V.

Tableau IV-V : Solubilité du matériau B dans les solvants de la série 1

Solvant	Solubilité à froid	Solubilité à chaud (50-60°C)
Trichlorométhane	Obtention d'une sol° trouble	Obtention d'une sol° trouble
Dichlorométhane	Obtention d'une sol° trouble	Obtention d'une sol° trouble
THF	Fragmentation	Fragmentation
Acétone	Négative	Négative
DMF	Négative	Négative
DMSO	Négative	Négative
Diéthyle éther	Négative	Négative
Acétate d'éthyle	Négative	Négative
Ter-Bu-Me-éther	Négative	Négative
n-hexane	Négative	Négative
Ethanol	Négative	Négative
2-propanol	Négative	Négative
Toluène	Négative	Négative
Xylènes	Négative	Négative
Eau	Négative	Négative

Aucun des solvants testés ne donne de résultat satisfaisant. Seuls les solvants chlorés permettent une dispersion du polymère. Une deuxième série de solvants a alors été étudiée. Les résultats sont résumés dans le tableau IV-VI.

Tableau IV-VI : Solubilité du matériau B dans les solvants de la série 2

Solvant	Solubilité à froid	Solubilité sous US
m-crésol	Positive	Positive
N-Méthylpyrrolidone (NMP)	Positive	Positive
Chlorobenzène	Fragmentation	Positive
Nitrobenzène	Négative	Obtention d'une sol° trouble
1,4-dioxane	Obtention d'une sol° trouble	Obtention d'une sol° trouble
CHCl ₃ /n-hexane (2/1)	Obtention d'une sol° trouble	Obtention d'une sol° trouble
Trichloroéthylène	Fragmentation	Obtention d'une sol° trouble
Cyclohexane	Négative	Négative
Carbonate d'éthyle	Négative	Négative
Butyrate de méthyle	Négative	Négative
Tétrachlorométhane	Négative	Négative

Ce deuxième essai met en évidence trois solvants permettant de solubiliser le polymère initial : le m-crésol, la N-Méthylpyrrolidone et le chlorobenzène. Les crésols font partis de la classe de risque T – Toxique, le chlorobenzène des classes Xn – Nocif et N – Dangereux pour l'environnement, et la N-Méthylpyrrolidone de la classe Xi – Irritant. Ce dernier est donc le solvant le moins dangereux pour l'homme et pour l'environnement.

De plus, nous savons que le matériau B est composé, entre autres, de copolyesters résultants de la polycondensation du 1,4-butanediol, de l'acide adipique et de l'acide téréphtalique (Chapitre 5). Nous avons testé la solubilité de ces trois réactifs dans la NMP. Elle s'est avérée positive. On peut alors supposer que les oligomères intermédiaires formés lors de la dégradation de ce matériau seront aussi solubles et donc extraits dans la NMP.

Nous décidons donc de poursuivre nos études en utilisant la N-Méthylpyrrolidone comme solvant pour le Matériau B

3.1.2 Recherche d'un solvant pour le Matériau C

Des essais similaires de solubilisation ont également été réalisés pour le matériau C. Les résultats sont donnés dans le tableau IV-VII.

Tableau IV-VII : Solubilité du Matériau C dans différents solvants

Solvant	Solubilité à froid	Solubilité à chaud (50-60°C)
DMSO	Obtention d'une sol° trouble	Positive
NMP	Obtention d'une sol° trouble	Obtention d'une sol° trouble
Chloroforme	Obtention d'une sol° trouble	Obtention d'une sol° trouble
Acétone	Négative	Fragmentation
THF	Négative	Négative
Acétonitrile	Négative	Négative
n-Hexane	Négative	Négative
Acétate d'éthyle	Négative	Négative
Diéthyle éther	Négative	Négative
Xylènes	Négative	Négative
Toluène	Négative	Négative

L'utilisation des ultrasons permet d'accélérer le phénomène, mais ne modifie pas les résultats observés.

Le seul solvant permettant la solubilisation totale du matériau C est le DMSO à 60°C. Or, les analyses thermiques (Chapitre 5) montrent que ce matériau fond à 60°C. Ceci remet en cause l'utilisation de ce solvant pour l'extraction et l'analyse chromatographique des extraits. Cependant, nous l'utiliserons pour effectuer les analyses structurales de ce matériau.

Afin de simplifier les analyses en chromatographie par perméation de gel, les échantillons destinés à cette technique seront solubilisés dans la NMP, même si la solubilisation est moins satisfaisante. Si le matériau C est solubilisé à une concentration de 1% dans la NMP, il donne une solution trouble et il reste des particules encore visibles, qu'il soit utilisé sous forme granule ou film. La diminution de la concentration et le broyage plus fin des granules améliorent la solubilisation.

3.2 Solubilité du matériau B

3.2.1 Limite de solubilité

Les résultats des essais de solubilisation à différentes concentrations du matériau B dans la NMP sont résumés dans le tableau IV-VIII.

Tableau IV-VIII : Etude de la limite de solubilité du MB dans la NMP

Quantité de MBN introduite (g)	Résultats
0.0530	Soluble
0.0612	Soluble
0.1126	Soluble
0.2010	Partiellement soluble
0.4954	Partiellement soluble (solution visqueuse)
1.0045	Partiellement soluble (solution très visqueuse)

La limite de solubilité se trouve donc entre 1 et 2% en masse du polymère dans le solvant. Lors des extractions, nous ne travaillerons pas avec une concentration en matériau B dans la NMP supérieure à 1%, il n'est donc pas nécessaire d'affiner les résultats.

3.2.2 Protocole de solubilisation

Environ 24 h ont été nécessaires pour solubiliser le matériau B dans la NMP lors de notre recherche de solvant. Nous avons donc cherché un moyen d'accélérer ce processus. Cinq méthodes de solubilisation ont été comparées. Les résultats sont représentés dans le tableau IV-IX.

Tableau IV-IX : Comparaison des méthodes de solubilisation

Méthodes de solubilisation	Résultats
Sans agitation, sans chauffage	Après 22h30, solubilité partielle
Avec agitation par US, sans chauffage	Après de 15 min, solubilité totale
Avec agitation magnétique, sans chauffage	Après de 5 h, solubilité totale
Avec agitation par US, avec chauffage à 40°C	Après de 15 min, solubilité totale
Avec agitation magnétique, avec chauffage à 50°C	Après de 2 h, solubilité totale

Les ultrasons chauffent l'eau du bain à 30°C, il est donc difficile de différencier une solubilisation par ultrasons avec ou sans chauffage.

Au regard de ces résultats, nous utiliserons les ultrasons, sans chauffage supplémentaire pour solubiliser le matériau B, sous réserve qu'ils ne modifient pas les produits à solubiliser, dans la suite des expériences. Ce paramètre sera étudié dans le paragraphe suivant.

3.3 Méthode d'extraction des matériaux

Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 1.6, nous avons choisi de comparer les extractions en présence d'ultrasons et par agitation magnétique pour les deux matériaux. La détermination de la méthode d'extraction la plus adaptée est faite en fonction du rendement de récupération du matériau et des masses moléculaires obtenues.

Ces valeurs sont comparées aux valeurs témoins obtenues par la solubilisation sans agitation et sans chauffage des matériaux B et C dans la NMP dans les mêmes concentrations.

3.3.1 Détermination de la méthode d'extraction du matériau B de la pouzzolane

Tout d'abord, nous avons comparé les résultats des extractions par ultrasons et par agitation magnétique à différentes durées.

Les chromatogrammes obtenus pour les extractions par ultrasons et par agitation magnétiques sont représentés sur les figures IV-1 et IV-2. De façon générale, nous constatons l'apparition d'un pic supplémentaire, par rapport aux chromatogrammes de référence, de façon plus ou moins rapide selon la méthode d'extraction. Ce phénomène traduit une certaine dégradation du matériau au cours de l'extraction.

L'agitation magnétique semble plus dégradante que les ultrasons. En effet, le matériau B commence à se dégrader à partir de 4 h d'extraction, alors que 6 h sont nécessaires en présence d'ultrasons. Un échauffement plus important du milieu dans le cas de l'agitation magnétique ne permet pas d'expliquer ce phénomène. En effet, la température maximale

atteinte dans le pilulier soumis aux ultrasons est de 45°C alors qu'elle n'est que de 25°C dans le cas de l'agitation magnétique.

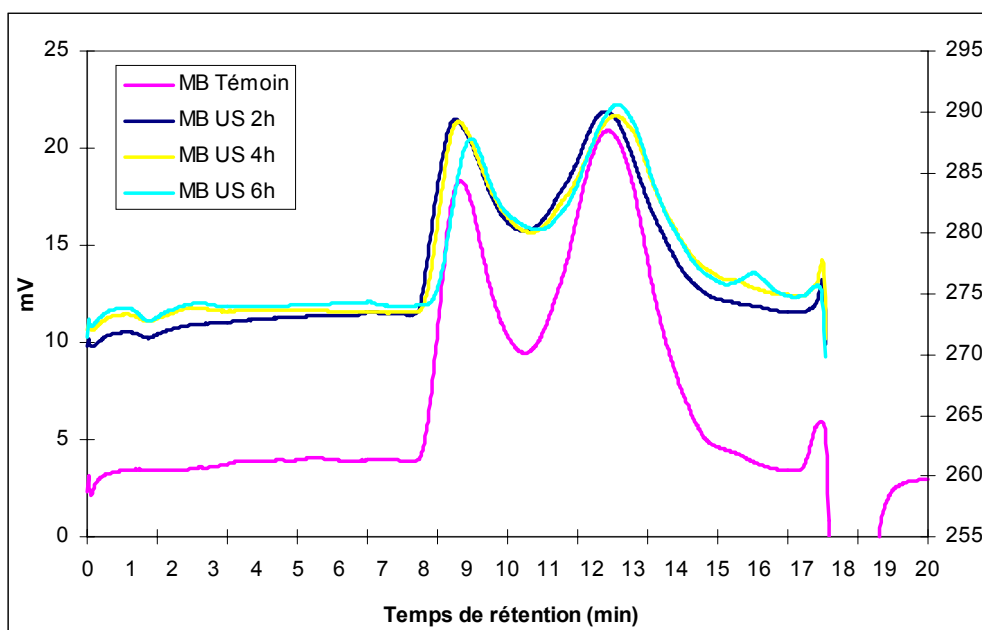


Figure IV-1 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau B de la pouzzolane dans la NMP par ultrasons (essai 1)

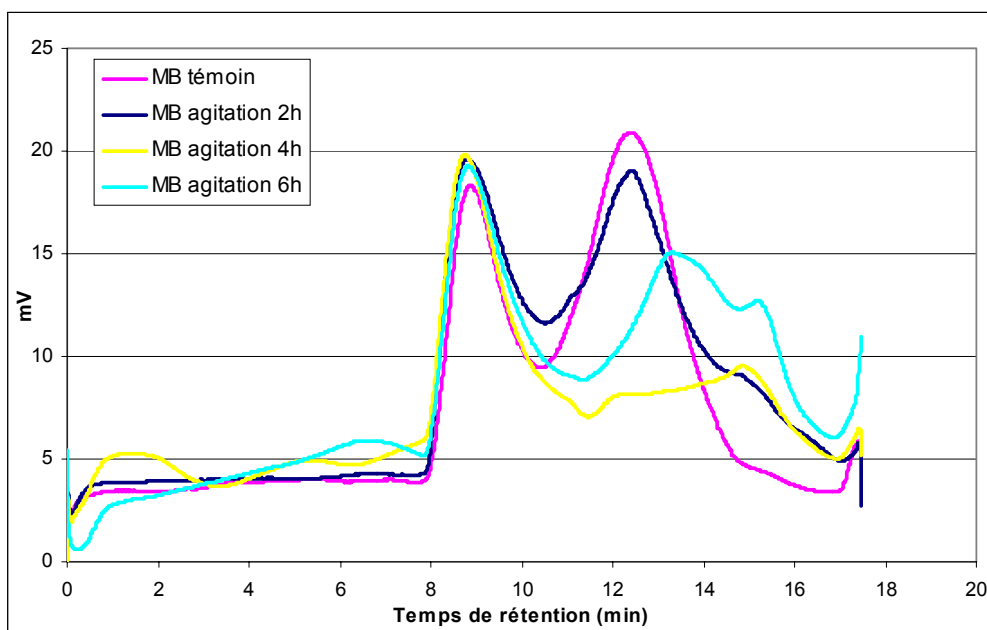


Figure IV-2 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau B de la pouzzolane dans la NMP par agitation magnétique

Il sera donc préférable de travailler avec les ultrasons pour éviter de détériorer le matériau. Par ailleurs, les ultrasons permettent d'accélérer la dissolution du matériau dans le solvant et donc son extraction.

De plus, les surfaces des différents pics, pour une extraction aux ultrasons, sont similaires à celles obtenues pour le témoin. Les ultrasons permettent donc d'extraire de façon quantitative le matériau B de la pouzzolane à l'aide de NMP, sans le dégrader, à condition de procéder à une extraction inférieure à 2 h.

Dans le deuxième essai, le matériau et les acides le constituant sont mis en présence de pouzzolane et ce 13 jours avant l'ajout de NMP, et la durée de l'extraction par ultrasons est réduite. Les extractions après dégradation auront lieu après de nombreux jours de contact entre la pouzzolane et les produits. Nous avons donc étudié l'influence de ce contact sur l'extraction. Les résultats sont représentés figure IV-3. Les résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment, donc la mise en présence de réactifs avec la pouzzolane plusieurs jours avant n'influence pas l'extraction.

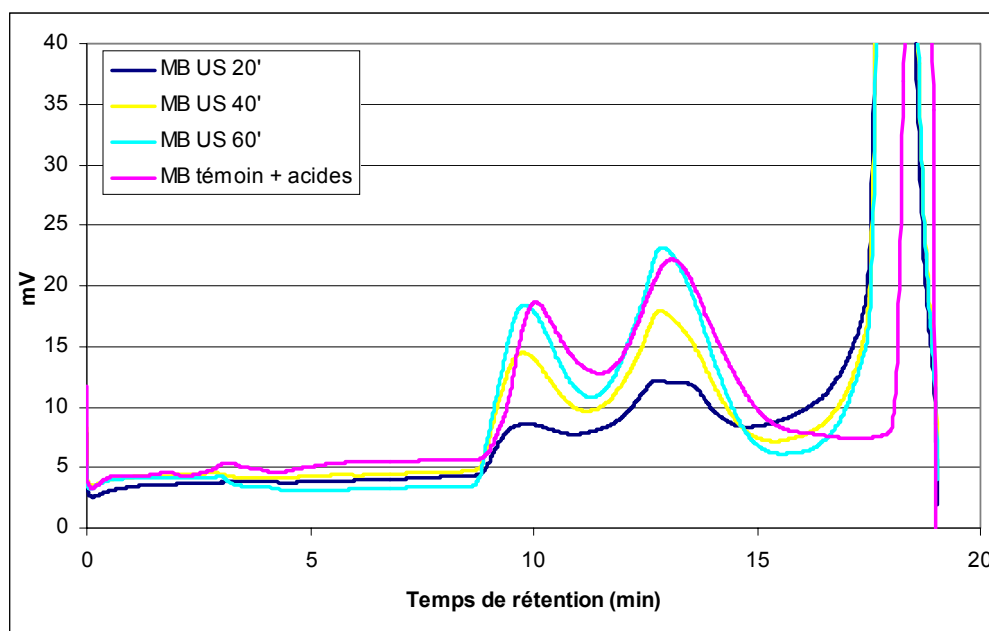


Figure IV-3 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau B de la pouzzolane dans la NMP par ultrasons (essai 2)

Par ailleurs, en considérant les aires des deux premiers pics des chromatogrammes, nous avons calculé le rendement de récupération du matériau B en fonction de la durée

d'extraction. Celui-ci est calculé à l'aide de la formule suivante et les résultats sont représentés figure IV-4.

$$\text{Rendement de récupération} = \frac{\text{Aire du pic extrait}}{\text{Aire du pic témoin}} * 100$$

Quelle que soit sa durée, l'extraction n'engendre pas de dégradation du matériau. Les calculs des rendements de récupération montrent que plus l'extraction est longue, plus le matériau est quantitativement extrait : le rendement de récupération passe de 20% à plus de 80% en augmentant la durée d'extraction de 20 à 60 minutes.

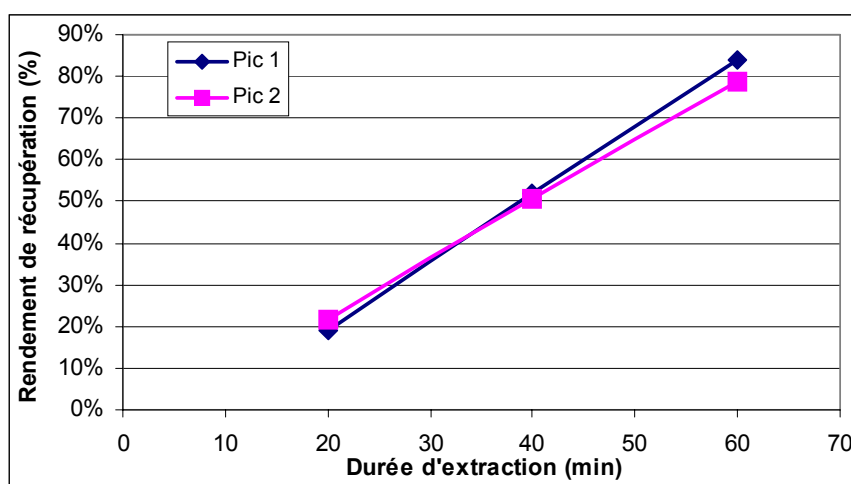


Figure IV-4 : Rendement de récupération du matériau B par analyse des pics du chromatogramme après extraction par ultrasons dans la NMP, par rapport à une solution témoin

Parallèlement à ces essais, nous avons voulu vérifier que la pouzzolane ne relarguait pas de composés lors de l'extraction. Pour cela, nous avons mélangé la pouzzolane et la NMP et nous avons soumis ce mélange aux ultrasons dans les mêmes conditions que celles mises en œuvre pour le matériau. Les chromatogrammes obtenus pour les trois durées d'extraction sont représentés figure IV-5. Les éventuels produits contenus dans la pouzzolane, ne sont pas discernables du bruit de fond. Nous pouvons donc considérer que les pics obtenus après l'extraction du mélange pouzzolane/matériau ne sont dus qu'au matériau lui-même.

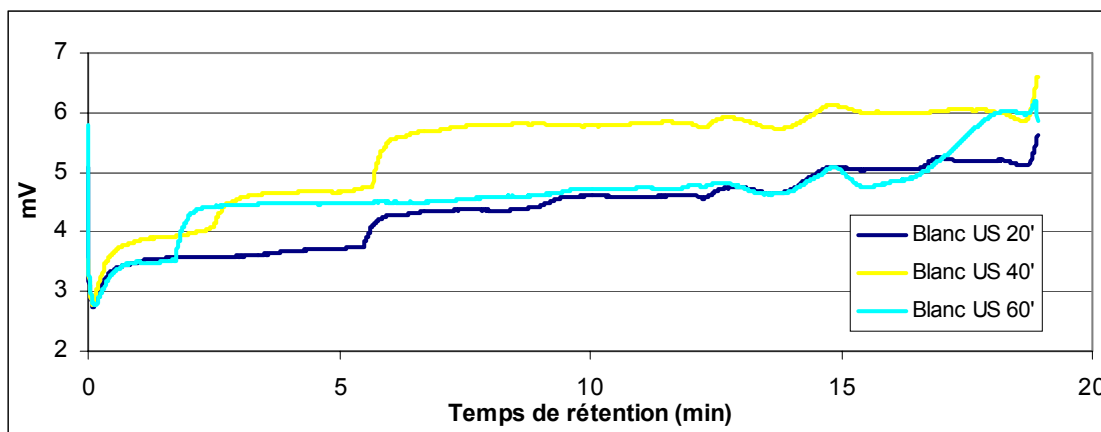


Figure IV-5 : Chromatogrammes des produits d'extraction de la pouzzolane seule dans la NMP aux ultrasons

Une extraction de 60 minutes aux ultrasons nous permettra donc de récupérer le matériau B dans sa totalité, sans le dégrader. Nous utiliserons donc cette méthode dans la suite de notre étude.

3.3.2 Détermination de la méthode d'extraction du matériau B de la vermiculite

Dans le cas des extractions de la vermiculite, nous avons cherché à vérifier si le protocole défini dans le paragraphe précédent, pour la pouzzolane, s'applique à ce support.

Pour cela, deux durées d'extraction par ultrasons ont été testées sur la vermiculite avec et sans matériau. Les résultats sont représentés figure IV-6. Tout d'abord, nous pouvons constater que la vermiculite, tout comme la pouzzolane, ne relargue aucun composé lors de l'extraction. Ce sont bien des supports inertes vis-à-vis de cette opération. La durée d'extraction n'a pas d'influence sur la récupération du matériau : celui-ci est entièrement extrait en 30 minutes. Cette différence par rapport aux phénomènes observés sur pouzzolane peut s'expliquer par le fait que l'extraction a lieu un jour après la confection du mélange vermiculite/matériau/NMP. La solubilisation du matériau a alors pu commencer avant la phase d'extraction.

Par souci d'homogénéité avec la pouzzolane et parce qu'une durée plus longue ne dégrade pas le matériau, les extractions dans la vermiculite se feront en présence d'ultrasons pendant 60 minutes.

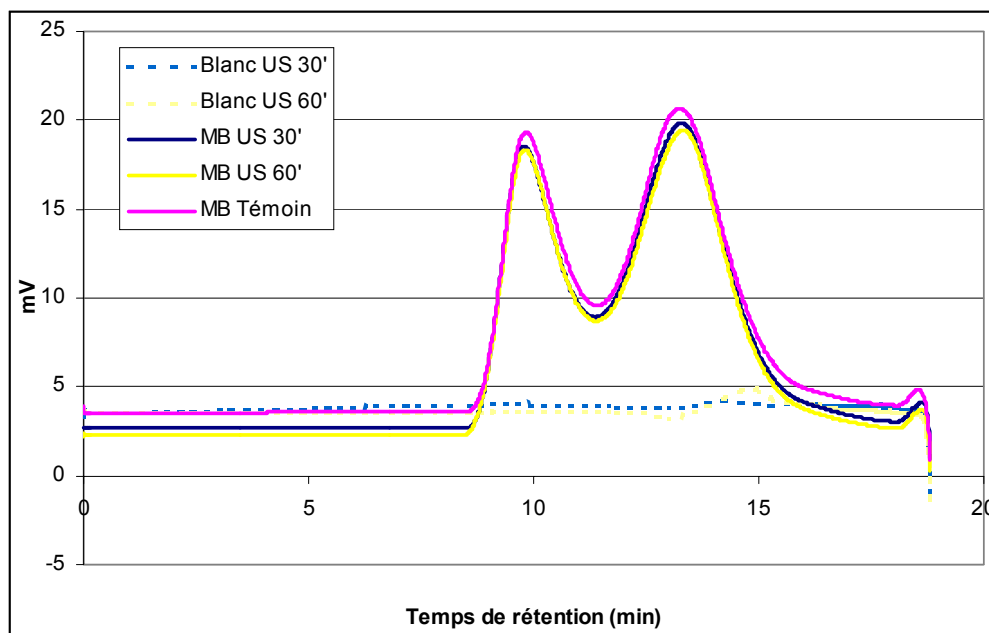


Figure IV-6 : Chromatogrammes des produits d'extraction de la vermiculite avec et sans matériau B dans la NMP par ultrasons

3.3.3 Détermination de la méthode d'extraction du matériau C de la pouzzolane

Nous avons conservé la même méthodologie expérimentale pour l'étude de ce matériau. Nous avons donc comparé les extractions par ultrasons et par agitation magnétique pour différentes durées. Les chromatogrammes obtenus sont rassemblés figures IV-7 et IV-8. Les résultats font apparaître que ces deux méthodes d'extraction ont une action dégradante sur le matériau. Après 4 h d'extraction de nouveaux produits apparaissent.

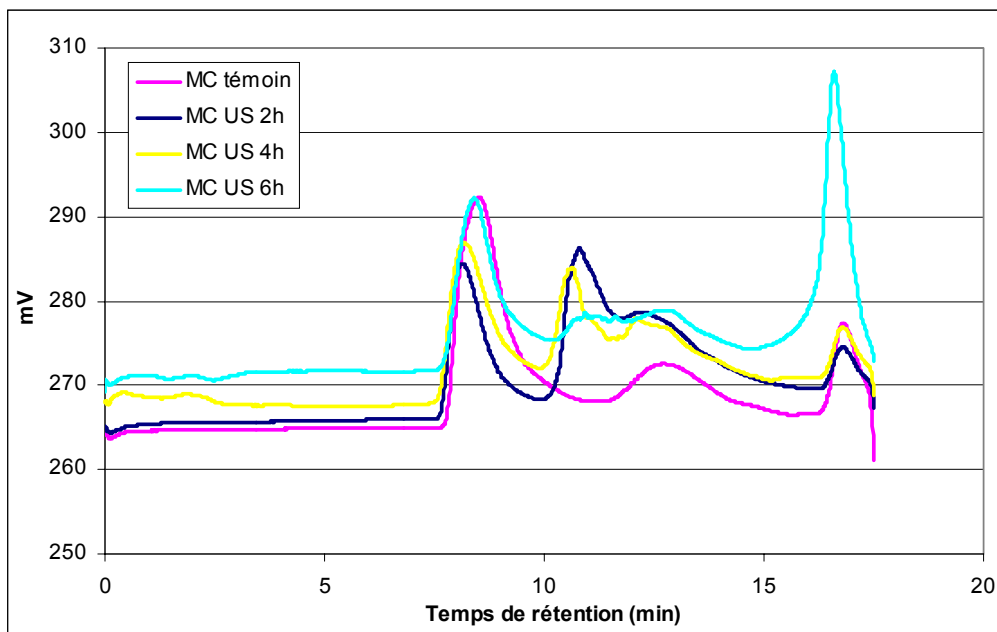


Figure IV-7 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau C de la pouzzolane dans la NMP par ultrasons (essai 1)

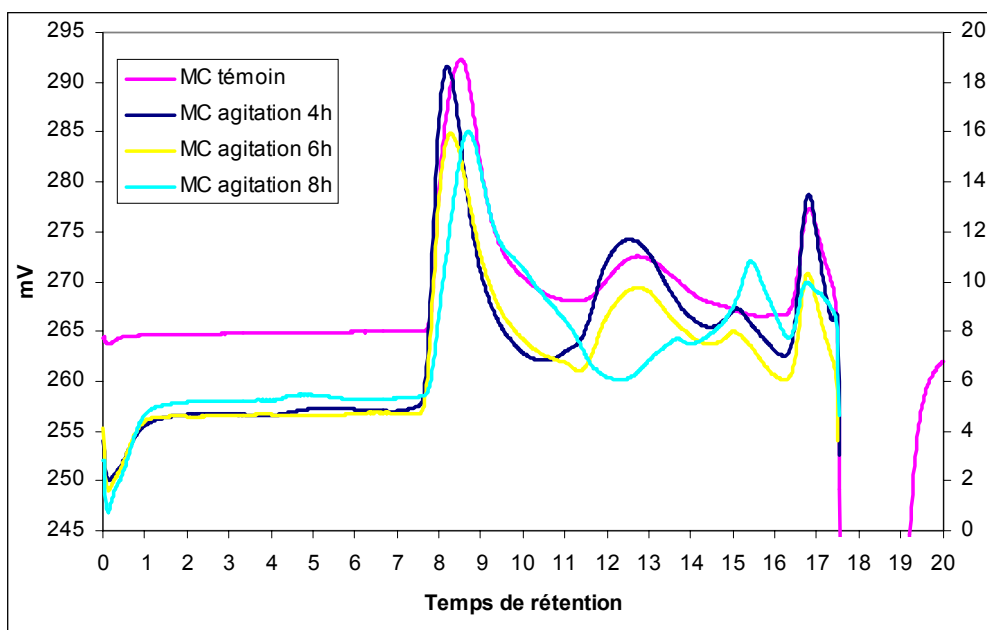


Figure IV-8 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau C de la pouzzolane dans la NMP par agitation magnétique

Afin d'éviter cette dégradation, des extractions plus courtes ont été réalisées avec (essais 3 et 4) et sans (essai 2) immersion préalable des échantillons dans le solvant. Les résultats sont présentés sur les figures IV-9 à IV-11.

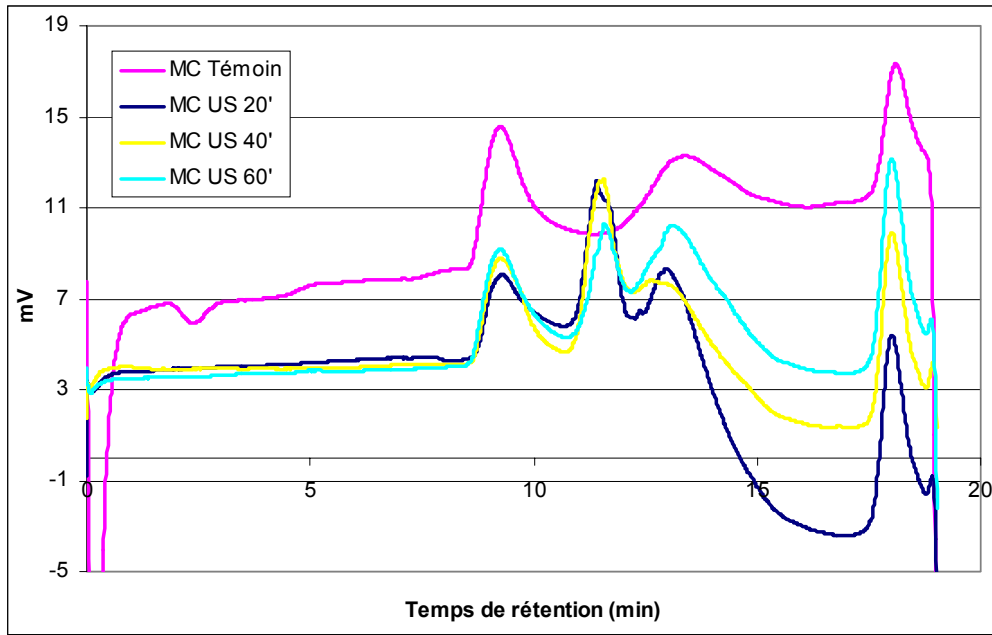


Figure IV-9 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau C de la pouzzolane dans la NMP par ultrasons (essai 2)

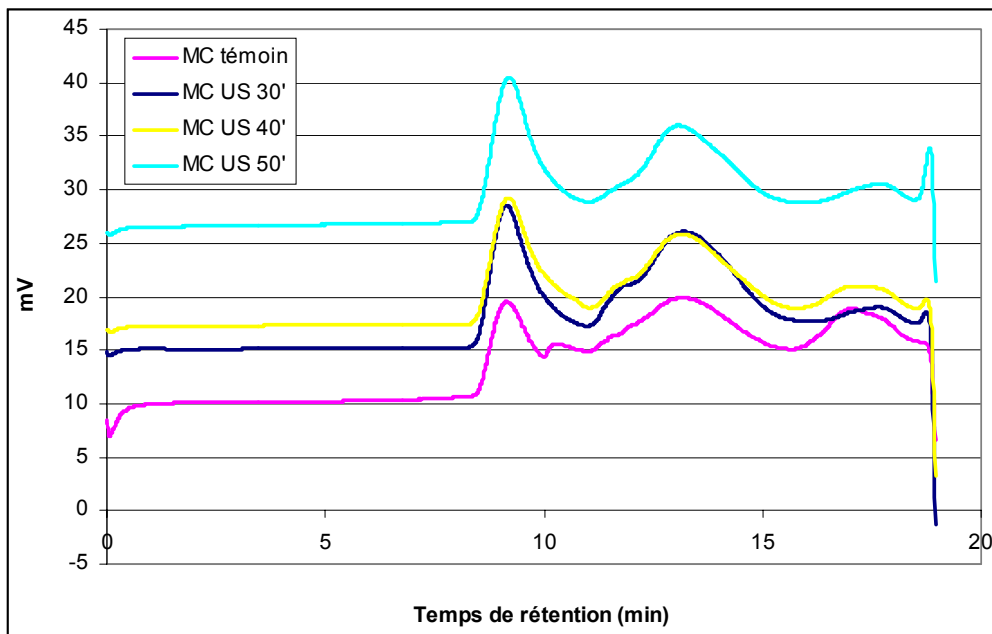


Figure IV-10 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau C de la pouzzolane dans la NMP par ultrasons (essai 3)

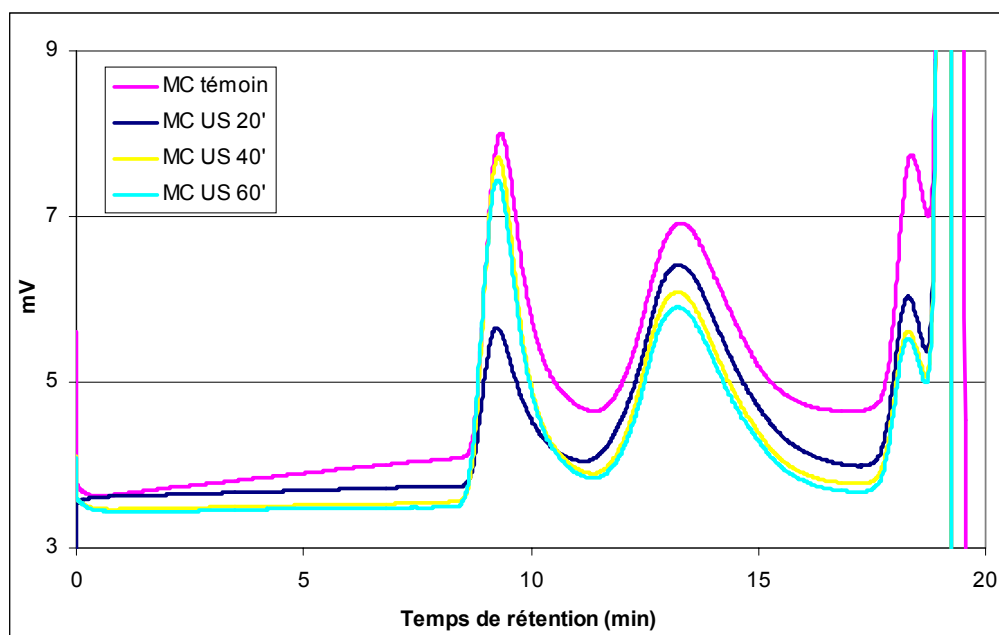


Figure IV-11 : Chromatogrammes des produits d'extraction du matériau C de la pouzzolane dans la NMP par ultrasons sur Mixte-C et Mixte-E (essai 4)

Une solubilisation du matériau, en amont de son extraction, favorise la mise en solution des polymères le constituant. Il en résulte une meilleure reproductibilité des extractions et donc des courbes similaires au matériau témoin, quelle que soit la durée d'extraction. En revanche, les courbes obtenues sans solubilisation préalable, tendent à montrer que certains polymères ne se seraient pas totalement solubilisés (cas de ceux présents à 13.1 min de temps de rétention, troisième pic) faussant ainsi l'allure des courbes et la proportion des polymères entre eux. Une autre hypothèse pourrait concerner l'inhomogénéité des échantillons et des proportions différentes de chaque polymère selon l'échantillonnage réalisé. Enfin, nous ne pouvons pas occulter la possibilité d'une détérioration des échantillons en présence d'ultrasons.

D'après les résultats représentés sur les figures IV-10 et IV-11, la durée de l'extraction est fixée à 40 minutes. Elle permet d'extraire quantitativement le matériau et limite l'apparition de nouveaux pics.

4 CONCLUSION

Nous avons pu trouver un solvant solubilisant les deux matériaux que nous souhaitons étudier, la N-Méthylpyrrolidone (NMP). Le matériau C est plus soluble dans le DMSO, mais il est nécessaire de le chauffer. A température ambiante, le produit s'y reprecipite. Pour des raisons pratiques, il ne sera pas possible d'utiliser le DMSO pour les analyses GPC car seules les colonnes peuvent être chauffées.

Nous utiliserons donc la N-Méthylpyrrolidone pour les analyses par chromatographie par perméation de gel des deux matériaux B et C. Toutefois, en raison de son spectre d'absorption en spectroscopie IR et de l'impossibilité de le trouver sous forme deutéré, nous utiliserons le DMSO-d6 pour les analyses RMN du matériau C et le chloroforme pour les analyses IR et RMN du matériau B.

Enfin, l'extraction des matériaux à partir des différents supports inertes s'est avérée quantitative grâce aux ultrasons. Après étude des conditions d'extraction, nous avons donc choisi d'extraire ces deux matériaux en présence d'ultrasons et ce à des durées respectives de 60 min pour le matériau B et 40 min pour le C.

5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bakiamoh, S.B., Maimait, R., McGowin, A.E.** 1999. Supercritical fluid extraction of chloropyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol from garden compost. *Journal of Chromatography A*. **862**: p105-112.
- Barnabas, I.J., Dean, J.R.** 1994. Supercritical fluid extraction of analytes from environmental samples. *Analyst*. **119**: p2381-2394.
- Bautista, J.M., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., Del Rio, J.C., Gutierrez, A., Verdejo, T., Gustavo Gonzalez, A.** 1999. Supercritical-carbon-dioxide extraction of lipids from a contaminated soil. *Journal of Chromatography A*. **A845**: p365-371.
- Berglöf, T., Jonsäll, G., Markides, K.E.** 1999. Selectivity in supercritical fluid extraction : recovery of pesticides from model matrices. *Journal of Chromatographic Science*. **37**: p400-406.

- Björkund, E., Bowadt, S., Mathiasson, L., Hawthorne, S.B.** 1999. Determining PCB sorption/desorption behavior on sediments using selective supercritical fluid extraction. . 1. Desorption from historically contaminated samples. *Environmental Science and Technology*. **33**(13): p2193-2203.
- Bowadt, S., Hawthorne, S.B.** 1995. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. **703**: p549-571.
- Camel, V.** 1997. The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. **16**(6): p351-369.
- Camel, V.** 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. **19**(4): p229-248.
- Camel, V., Tambuté, A., Caude, M.** 1993. Analytical-scale supercritical fluid extraction : a promising technique for the determination of pollutants in environmental matrices. *Journal of Chromatography*. **642**: p236-281.
- Chee, K.K., Wong, M.K., Lee, H.K.** 1996. Microwave extraction of phtalate esters from marine sediment and soil. *Chromatographia*. **42**(7/8): p378-384.
- Contat-Rodrigo, L., Haider, N., Ribes-Greus, A., Karlsson, S.** 2001. Ultrasonication and microwave assisted extraction of degradation products from degradable polyolefin blends aged in soil. *Journal of Applied Polymer Science*. **79**(6): p1101-1112.
- Cresswell, S.L., Haswell, S.J.** 1999. Evaluation of on-line methodology for microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from sediment samples. *The Analyst*. **124**: p1361-1366.
- Di Corcia, A., Caracciolo, A.B., Crescenzi, C., Giuliano, G., Murtas, S., Samperi, R.** 1999. Subcritical water extraction followed by LC/MS for determining terbutylazine and its metabolites in aged and incubated soils. *Environmental Science and Technology*. **33**(18): p3271-3277.
- Dupeyron, S., Dudermel, P.M., Couturier, D., Guarini, P., Delattre, J.M.** 1999. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils : a comparison between focused microwave assisted extraction, supercritical fluid extraction, subcritical solvent extraction, sonication and soxhlet techniques. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **73**(3): p191-210.

- Gan, J., Papiernick, S.K., Koskinen, W.C., Yates, S.R.** 1999. Evaluation of accelerated solvent extraction (ASE) for analysis of pesticide residues in soil. *Environmental Science and Technology*. **33**(18): p3249-3253.
- Garcia-Ayuso, L.E., Sanchez, M., Fernandez de Alba, A., Luque de Castro, M.D.** 1998. Focused Microwave-assisted soxhlet : an advantageous tool for sample extraction. *Analytical Chemistry*. **70**(77): p2426-2431.
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Martin, E., Miller, D.J.** 2000. Comparisons of soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids : recovery, selectivity, and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*. **892**: p421-433.
- Imai, Y.** 1996. Recent advances in synthesis of high-temperature aromatic polymers. *Reactive and Functional Polymers*. **30**: p3-15.
- Imai, Y., Nemoto, H., Watanabe, S., Kakimoto, M.** 1996. A new facile and rapid synthesis of aliphatic polyamides by microwave-assisted polycondensation of omega-amino acids and nylon salts. *Polymer Journal*. **28**(3): p256.
- LeBlanc, G.** 1999. Microwave-accelerated techniques for solid sample extraction. *LC-GC Current Trends and Developments in Sample Preparation*. **17**(6S): pS30-37.
- Letellier, M., Budzinski, H.** 1999a. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analusis*. **27**: p259-271.
- Letellier, M., Budzinski, H., Bellocq, J., Connan, J.** 2000. Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic Geochemistry*. **30**: p1353-1365.
- Letellier, M., Budzinski, H., Charrier, L., Capes, S., Dorthe, A.M.** 1999b. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marin sediment. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **364**: p228-237.
- Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., Westman, J.** 2001. Microwave assisted organic synthesis - a review. *Tetrahedron*. **57**: p9225-9283.

- Lopez-Avila, V., Young, R., Kim, R., Beckert, W.F.** 1995. Accelerated extraction of organic pollutants using microwave energy. *Journal of Chromatographic Science*. **33**: p481-484.
- Lopez-Capel, E., Wilkins, R.M.** 2000. Extraction of procymidone from alkaline soils. *XI Symposium Pesticide Chemistry*.
- Masselin, I., Chasseray, X., Durand-Bourlier, L., Lainé, J.M., Syzaret, P.Y., Lemordant, D.** 2001. Effect of sonication on polymeric membranes. *Journal of Membrane Science*. **181**: p213-220.
- McNally, M.E.** 1995. Advances in environmental SFE. *Analytical Chemistry*. **67**(9): p308A-315A.
- Morselli, L., Setti, L., Iannuccilli, A., Maly, S., Dinelli, G., Quattroni, G.** 1999. Supercritical fluid extraction for the determination of petroleum hydrocarbons in soil. *Journal of Chromatography A*. **A845**: p357-363.
- Nedelmann, H., Weigel, T., Hicke, H.G., Müller, J., Paul, D.** 1999. Microwave plasma polymerization of acrylic acid on poly(ethylene terephthalate) track-etched membranes. *Surface and Coating Technology*. **116-119**: p973-980.
- Palma, M., Taylor, L.T.** 1999. Statistical design for optimisation of extraction of polyphenols from an inert matrix using carbon dioxide-based fluids. *Analytica Chimica Acta*. **391**: p321-329.
- Porto, A.F., Sadicoff, B.L., Amorim, M.C.V., de Mattos, M.C.S.** 2002. Micro-assisted free radical bulk-polyaddition reactions in a domestic microwave oven. *Polymer Testing*. **21**: p145-148.
- Punt, M.M., Raghavan, G.S.V., Bélanger, J.M.R., Paré, J.R.J.** 1999. Microwave-assisted process (MAP) for the extraction of contaminants from soil. *Journal of Soil Contamination*. **8**(5): p577-592.
- Schantz, M.M., Bowadt, S., Benner Jr, B.A., Wise, S.A., Hawthorne, S.B.** 1998. Comparison of supercritical fluid extraction and soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials. *Journal of Chromatography A*. **816**: p213-220.

Schwesig, D., Göttlein, A., Haumaier, L., Blasek, R., Ilgen, G. 1999. Soil organic matter extraction using water at high temperature and elevated pressure (ASE) as compared to conventional methods. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **73**(4): p253-268.

Stuart, I.A., MacLachlan, J., McNaughtan 1996. Compounds of agricultural significance using environmental analytical supercritical fluid extraction. *Analyst*. **121**: p11R-28R.

Sun, F., Littlejohn, D., Gibson, M.D. 1998. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Analytica Chimica Acta*. **364**(1-3): p1-11.

Vandenburg, H.J., Clifford, A.A., Bartle, K.D., Carlson, R.E., Carroll, J., Newton, I.D. 1999. A simple solvent selection method for accelerated solvent extraction of additives from polymers. *Analyst*. **124**: p1707-1710.

Vandenburg, H.J., Clifford, A.A., Bartle, K.D., Carroll, J., Newton, I., Garden, L.M., Dean, J.R., Costley, C.T. 1997. Analytical Extraction of Additives from polymers. *Analyst*. **122**: p101R-115R.

Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernandez, L.A., Madariaga, J.M. 1999. Optimisation and comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta*. **50**: p345-357.

CHAPITRE 5 : ANALYSE DES MATERIAUX
SELECTIONNES AVANT, EN COURS ET APRES
DEGRADATION

CHAPITRE 5 :ANALYSE DES MATÉRIAUX SÉLECTIONNÉS AVANT, EN COURS ET APRÈS DÉGRADATION	174
1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	177
1.1 <i>Analyses spectroscopiques</i>	177
1.1.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	177
1.1.2 Spectroscopie Infra-Rouge	179
1.2 <i>Analyse enthalpique différentielle (DSC)</i>	180
1.3 <i>Microscope Electronique à Balayage (MEB)</i>	184
1.4 <i>Analyses chromatographiques</i>	185
1.4.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	185
1.4.2 Chromatographie par perméation de gel (GPC).....	187
2 ANALYSE DES MATÉRIAUX AVANT DÉGRADATION – MISE AU POINT DES MÉTHODES ANALYTIQUES.....	189
2.1 <i>Matériels et méthodes</i>	189
2.1.1 Analyses classiques	189
2.1.1.1 Analyse élémentaire	189
2.1.1.2 Mesure de l'épaisseur	189
2.1.1.3 Mesure de l'angle de contact.....	190
2.1.2 Résonance magnétique nucléaire (¹ H-RMN).....	190
2.1.3 Spectroscopie Infra-Rouge (IR).....	190
2.1.4 Analyse enthalpique différentielle (DSC).....	191
2.1.5 Chromatographie par perméation de gel (GPC).....	192
2.1.5.1 Appareillage	192
2.1.5.2 Recherche des conditions d'analyse en GPC sur les matériaux B et C.....	193
2.2 <i>Résultats et discussion</i>	195
2.2.1 Analyses classiques	195
2.2.1.1 Analyse élémentaire	195
2.2.1.2 Mesure de l'épaisseur.....	195
2.2.1.3 Mesure de l'angle de contact.....	196
2.2.2 Résonance magnétique nucléaire (¹ H-RMN).....	197
2.2.2.1 Matériaux A et B.....	197
2.2.2.2 Matériau C.....	199
2.2.3 Spectrométrie Infra-Rouge (IR).....	200
2.2.3.1 Matériau A	200
2.2.3.2 Matériau B.....	200
2.2.3.3 Matériau C.....	201
2.2.4 Analyse enthalpique différentielle (DSC).....	201
2.2.4.1 Matériaux A et B.....	201
2.2.4.2 Matériau C.....	204
2.2.5 Chromatographie par perméation de gel (GPC).....	206
2.2.5.1 Analyses dans le chloroforme avec les colonnes PLgel 10µm 10 ⁴ Å, 10µm 10 ³ Å et 3µm Mixte-E	206
2.2.5.2 Analyses dans le NMP avec les colonnes PLgel 10µm 10 ⁴ Å et 3µm Mixte-E.....	207

2.2.5.3	Analyses dans la NMP avec deux colonnes PLgel Mixte-C.....	210
2.2.5.4	Analyses dans la NMP avec deux colonnes PLgel Mixte-C et une colonne Mixte-E.....	212
3	ANALYSE DES MATÉRIAUX EN COURS ET APRÈS DÉGRADATION	213
3.1	<i>Matériels et méthodes</i>	213
3.1.1	Résonance magnétique nucléaire (¹ H-RMN).....	213
3.1.2	Spectrométrie Infra-Rouge (IR).....	214
3.1.3	Analyse enthalpique différentielle (DSC).....	214
3.1.4	Chromatographie par perméation de gel (GPC).....	214
3.1.4.1	Test sur pouzzolane en simulation de sol – matériaux B et C.....	214
3.1.4.2	Test sur vermiculite en simulation de compost - Matériau B	218
3.1.4.3	Test en milieu réel – Matériau B	220
3.1.5	Microscope électronique à balayage (MEB).....	220
3.1.6	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) – détecteur Ultra-Violet	220
3.1.6.1	Conditions d’injection	220
3.1.6.2	Préparation des échantillons	221
3.2	<i>Résultats et discussion</i>	221
3.2.1	Tests sur pouzzolane en simulation de sol après 180 j - Analyses sur les produits et résidus de dégradation des matériaux B et C	221
3.2.1.1	Matériau B.....	221
3.2.1.2	Matériau C.....	226
3.2.2	Tests sur vermiculite en simulation de compost - Analyses sur les produits et résidus de dégradation du matériau B	233
3.2.3	Tests en milieu réel - Analyses sur les produits et résidus de dégradation du matériau B	237
4	CONCLUSION	246
5	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	247

Dans ce chapitre, nous développons des techniques analytiques, avant et pendant leur dégradation, pour les matériaux biodégradables afin de mieux les connaître.

Pour cela, dans un premier temps, nous avons mis au point les techniques analytiques sur les matériaux avant dégradation. Dans un deuxième temps, nous avons appliqué les méthodes analytiques retenues aux produits de dégradation obtenus en cours et en fin de dégradation. Nous utilisons les produits obtenus par les méthodes décrites au chapitre 3 ; c'est à dire les matériaux B et C en simulation de sol sur pouzzolane, le matériau B en simulation de compost sur vermiculite et en milieu réel. Les techniques analytiques ne sont pas toutes adaptées pour ces produits, ils n'ont donc pas tous subi les mêmes analyses.

1 **S**YNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le but de notre étude est d'analyser les matériaux sélectionnés et leurs produits de dégradation. Pour cela, nous avons réalisé une synthèse bibliographique sur les principales techniques permettant l'identification et l'analyse structurale des polymères. Toutefois, bien que cela ne soit que peu décrit, elles sont aussi applicables à l'analyse des polymères en cours et en fin de dégradation. Nous présenterons des exemples d'utilisation des méthodes spectroscopiques, d'analyse thermique par analyse enthalpique différentielle (appelée Differential Scanning Calorimetry en anglais, DSC), d'analyse de surface par microscope électronique à balayage (MEB) et enfin d'analyses chromatographiques.

1.1 Analyses spectroscopiques

1.1.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN est un outil indispensable, non seulement pour le suivi cinétique des réactions de polymérisation (Ahn *et al.*, 2001) et pour la détermination structurale des polymères synthétisés (Kang *et al.*, 1999; Ki *et al.*, 2001; Montaudo *et al.*, 2000; Nikolic *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Shaik *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 1996a), mais également pour évaluer le degré de polymérisation, la composition et la distribution de oligomères au sein des copolymères (nous prenons, ici, l'exemple des copolyesters) (Ahn *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1999; Kasperczyk, 2001; Ki *et al.*, 2001; Montaudo *et al.*, 2000 ; Nikolic *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 1996a). La RMN du proton,

^1H -RMN, et du carbone 13, ^{13}C -RMN, sont étudiées à des fréquences comprises entre 200 et 600MHz. Les échantillons sont solubilisés dans le chloroforme deutéré (Ahn *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 1999; Ki *et al.*, 2001; Montaudo *et al.*, 2000; Nikolic *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Shaik *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 1996a), ou dans des mélanges de $\text{CDCl}_3/\text{TFA-d}$ (acide trifluoroacétique deutéré) 70/30 (Kang *et al.*, 1999). Kang *et al.*, (1999), Kasperczyk (2001) et Witt *et al.* (1996a) utilisent la RMN pour calculer les longueurs des chaînes, le degré de « hasard », la probabilité de trouver une unité constituante dans la chaîne, et donnent des informations sur le rôle de la transestérification dans la synthèse de copolyesters. Pour effectuer ces calculs, ces auteurs s'appuient sur les travaux de Yamadera *et al.* (1967). Witt *et al.* (1996a) synthétisent des polymères à base de 1,4-butanediol, d'acide adipique (A) et d'acide téréphtalique (T), qu'ils étudient en RMN du carbone. Quatre groupes carbonés sont utilisés : -T-C-C-C-C-T- groupe a, -T-C-C-C-C-A- groupe b, -A-C-C-C-C-T- groupe c et -A-C-C-C-C-A- abrégé d (a, b, c et d correspondent aux intensités des pics correspondants). Les fractions molaires des parties téréphtalate (M_T) et apidate (M_A) sont obtenues grâce aux formules suivantes :

$$\%M_T = \left[\frac{c + d}{a + b + c + d} \right] * 100 \qquad \%M_A = \left[\frac{a + b}{a + b + c + d} \right] * 100$$

Les longueurs moyennes en nombre des séquences des parties aromatiques (SL_T) et aliphatiques (SL_A) sont données par les formules suivantes :

$$SL_T = \frac{a}{b} + 1 \qquad SL_A = \frac{d}{c} + 1$$

Le degré de hasard est déterminé par la formule :

$$R = \frac{1}{SL_T} + \frac{1}{SL_A}$$

La spectroscopie RMN est donc un outil très intéressant, applicable aux polymères, pour déterminer la structure et la composition d'un copolyester. Nous l'utiliserons donc pour identifier la structure de nos matériaux.

1.1.2 Spectroscopie Infra-Rouge

La spectroscopie Infra-Rouge est applicable à tous types de composés (solide, poudre, liquide). Cette technique est plus souvent utilisée pour vérifier la structure d'un produit que pour l'identifier. A l'exception des molécules chirales à l'état cristallin, chaque espèce moléculaire a un spectre d'absorption infrarouge unique.

De même, la spectroscopie IR permet de faire la distinction entre deux composés renfermant les mêmes groupements fonctionnels, mais d'enchaînements différents. C'est ce qu'ont observé Qian *et al.* (2000) en synthétisant un copolymère « bloc » ABA, à partir d'acide lactique et d'un prépolymère d' ϵ -caprolactone. L'analyse IR a permis de mettre en évidence la présence de deux fonctions esters distinctes provenant du poly(acide lactique) et du poly(caprolactone) pour un copolymère « bloc ». Ils ont comparé ce spectre à celui obtenu pour un copolymère alterné. Une seule bande caractéristique des fonctions esters est alors visible.

Il est également possible d'analyser des produits de dégradation. En effet, Pamula *et al.* (2001) ont analysé les produits de dégradation de polyesters aliphatiques par infrarouge à transformée de Fourier par mode de réflexion totale atténuée. Les spectres de poly(acide lactique) (PLA) et de poly(acide lactique *co* glycolique) (PLGA) avant et après dégradation hydrolytique, ainsi que les composés récupérés dans le milieu de dégradation ont été étudiés. Ces analyses montrent que le PLA ne se dégrade pas dans ces conditions contrairement au PLGA, et que les produits de dégradation sont un mélange d'acides lactique et glycolique.

Par ailleurs, Gordon *et al.* (2000) ont mis au point un programme informatique, à partir des données des spectres IR, permettant de déterminer la dégradation individuelle des composés d'un copolymère. Lorsque le nombre de composés du copolymère et les spectres IR de différents mélanges sont connus, il est possible de calculer la concentration relative des composants d'un mélange à l'aide la loi de Beer-Lambert, représentée par un système d'équations linéaires à plusieurs variables :

$$\sum k_{\nu n} C_{nm} = A_{\nu m}$$

k représente le coefficient d'absorption pour chacun des composés, C est la concentration de chaque composé, dans un mélange ayant l'absorbance A . v , n , m sont les indices, respectivement, de la longueur d'onde, du composé et du mélange.

En prenant l'exemple d'un polymère biodégradable à trois composés, les absorbances à trois longueurs d'onde différentes sont définies par la loi de Beer-Lambert de la façon suivante :

Avant dégradation	Après dégradation
$k_{11} C_{11} + k_{12} C_{21} + k_{13} C_{31} = A_{11}$	$k_{11} C_{12} + k_{12} C_{22} + k_{13} C_{32} = A_{12}$
$k_{21} C_{11} + k_{22} C_{21} + k_{23} C_{31} = A_{21}$	$k_{21} C_{12} + k_{22} C_{22} + k_{23} C_{32} = A_{22}$
$k_{31} C_{11} + k_{32} C_{21} + k_{33} C_{31} = A_{31}$	$k_{31} C_{12} + k_{32} C_{22} + k_{33} C_{32} = A_{32}$

C_{11} , C_{21} et C_{31} sont les concentrations connues du matériau initial, C_{12} , C_{22} et C_{32} sont les concentrations que l'on cherche à calculer après dégradation. En considérant que $C_{11} + C_{21} + C_{31} = 1$ et $C_{12} + C_{22} + C_{32} = 1$, il est possible de résoudre le système d'équations et de déterminer C_{12} , C_{22} et C_{32} . De même, en connaissant la perte de masse totale, la masse de chacun des composants peut être calculée. Le choix des longueurs d'onde pour lesquelles seront effectués les calculs est primordial. Celles qui sont choisies sont celles qui présentent peu de recouvrement avec la bande voisine. Lorsque plus de longueurs d'onde que nécessaires sont disponibles pour résoudre le système, il est utile de mettre au point un programme informatique intégrant toutes les combinaisons possibles. Pour un système à deux composés, l'erreur sur le calcul de la concentration était environ de 1%, pour un trois composés, elle était de 8%.

1.2 Analyse enthalpique différentielle (DSC)

La DSC permet d'étudier le comportement thermique des polymères. Il est possible de déterminer les températures de transition vitreuse, de fusion et de cristallisation, ainsi que le pourcentage de cristallinité, d'un polymère semi-cristallin.

En accord avec les matériaux que nous étudions, nous avons ciblé notre recherche bibliographique sur les polyesters et sur l'amidon. Ces études portent généralement sur la

caractérisation de mélanges de polymères et peu sur le changement de comportement thermique après dégradation.

Ahn *et al.* (2001) et Nikolic *et al.* (2001) ont étudié les poly(butylène succinate-co-butylène adipate). Ils ont tout d'abord mesuré, les températures de transition vitreuse (T_g) et de fusion (T_m) pour chaque homopolymère. Pour Ahn *et al.* (2001), les T_g et T_m du polybutylène succinate (PBS) sont de -33° et 114°C , et de -60° et 60°C pour le polybutylène adipate (PBA). Pour Nikolic *et al.* (2001), elles sont respectivement de -36° et 114°C pour le PBS, et de -76° et 58°C pour le PBA. D'après ces deux articles, les courbes DSC des copolymères montrent deux pics endothermiques, alors que celles des homopolymères n'en montrent qu'un. La température de fusion (calculée sur le pic le plus intense) diminue, jusqu'à 32°C , lorsque la proportion d'unités adipates augmente jusqu'à 62%. Au delà de 62%, la T_m augmente à nouveau, et le double pic de fusion n'apparaît plus. Les deux unités cristallines participent à la fusion du copolymère. En revanche, elles ne cocrystallisent pas. De même, la température de transition vitreuse est modifiée par le mélange des unités. Elle décroît lorsque la proportion en unités adipates augmente. Cette décroissance linéaire est caractéristique du comportement d'un copolymère alterné.

En effet, pour un copolymère alterné, la valeur de la T_g est intermédiaire entre les valeurs des T_g des deux homopolymères, indiquant ainsi une phase amorphe continue. Pour les copolymères « bloc », deux valeurs de T_g sont observées, montrant l'existence de deux domaines amorphes distincts (Qian *et al.*, 2000). Kang *et al.* (1999) ont aussi étudié les copolymères « bloc », à partir de poly(butylène adipate-co-succinate)/poly(butylène téréphthalate). Ils ont montré qu'une longueur de chaîne minimale est nécessaire pour qu'un cristal puisse se former. Cette longueur est environ de quatre unités dans ce type de polymère.

Ces copolymères aliphatiques sont, généralement, amorphes, ce qui limite leur utilisation. En revanche, les polyesters aromatiques sont cristallins et ont une température de fusion plus élevée. De nombreux chercheurs ont étudié leurs mélanges afin d'améliorer les propriétés mécaniques du copolymère, grâce à la partie aromatique, tout en préservant la capacité à se biodégrader des polyesters aliphatiques (Ki *et al.*, 2001; Shaik *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 1996b). Shaik *et al.* (2001) ont décrit le comportement thermique de ce type de copolyesters synthétisés à partir d'acide téréphthalique, de diacides aliphatiques, et d'alcanes diols. Ils ont étudié deux séries de copolyesters : l'une constituée à partir d'acides téréphthalique et succinique, et de différents alcanes diols et l'autre d'acides téréphthalique et

adipique et des mêmes alcanes diols. La série 1 ne montre pas de pics de cristallisation, celle-ci étant trop lente pour être visible. Ces résultats sont assez étonnants car les chaînes aliphatiques sont assez longues pour qu'une bonne mobilité des segments permette une cristallisation rapide. En revanche, de nombreux pics de fusion sont visibles. Ceci permet de mettre en évidence une différence de qualité entre les zones cristallines. Les zones plus cristallines sont plus stables et fondent à température plus élevée. Les résultats sont différents pour la série 2. La cristallisation est toujours visible, même pour des vitesses de refroidissement de l'échantillon rapides. Il semble donc que la vitesse de cristallisation ne dépende pas de la longueur des chaînes aliphatiques entre les unités téréphtaliques, mais plutôt des conformations locales et de la mobilité autour de ces unités. Pour ces deux séries, l'apport de la partie aromatique ne semble pas augmenter la valeur des températures de fusion correspondant à la partie aliphatique. Pourtant le poly(butylène téréphtalate) (PBT) est très cristallin et sa température de fusion est de 223°C. L'introduction de chaîne aliphatique dans sa matrice induit la destruction de zones cristallines et donc la diminution de sa T_m (Lotti *et al.*, 2001; Ou, 2000).

Comme nous avons pu l'observer à travers ces quelques exemples, la relation entre le comportement thermique et la composition d'un copolymère est encore non-résolue. Lee *et al.* (1999) décrivent de façon théorique ces phénomènes. Une question importante concerne la distribution, au sein d'un copolymère semi-cristallin, des unités A et B de comonomères dans les régions cristalline et non-cristalline. Deux modèles permettent de décrire cette situation. D'une part, le modèle de Flory qui suppose que l'un des comonomères n'est pas inclus dans les cristaux, mais reste dans la phase amorphe. D'autre part, le modèle de Eby pour lequel les deux comonomères sont compatibles et forment ensemble le réseau cristallin. Ces deux modèles représentent des cas extrêmes mais ils permettent dans de nombreux cas d'expliquer le comportement d'un polymère donné. Lee *et al.* (1999) ont appliqué le modèle de Flory à un mélange de monomères provenant de l'estérification du 1,4-butanediol avec de l'acide succinique (SA-BT) et de l'acide téréphtalique (DMT-BT). L'équation classique de ce modèle est :

$$\frac{1}{T'_m} - \frac{1}{T_m} = -\frac{R}{\Delta H_m} \ln X_A$$

T_m est la température de fusion de l'homopolymère SA-BT (K) et T'_m celle du copolymère (K), ΔH_m est l'enthalpie de fusion molaire (J/mol), X_A la fraction molaire de

SA-BT et R la constante des gaz parfaits (8.31 J/(K*mol)). Il est alors possible de calculer ΔH_m en traçant la courbe $1/T'_m=f(\ln X_A)$. Or, les résultats obtenus sont différents de ceux escomptés. Le modèle de Flory ne traduit pas les phénomènes observés. Des effets morphologiques plutôt que thermodynamiques sont responsables du comportement thermique des polyesters. L'inclusion de défauts au cours de la cristallisation peut causer le développement de zones cristallines métastables qui donneront plusieurs pics de fusion. De même, la présence de composés « non-cristallisables » peut retarder la vitesse de cristallisation et ce de façon très importante lorsque leur concentration augmente.

De nombreuses études ont aussi été effectuées sur l'amidon et sur l'amidon en mélange avec des polyesters, notamment le polycaprolactone (PCL). Le comportement de l'amidon est plus complexe. Il existe différents types d'amidon selon leurs quantités respectives d'amylose et d'amylopectine. De plus, pour être utilisés dans la fabrication de matériaux biodégradables, ils sont souvent modifiés pour leur conférer un caractère thermoplastique. Il y a donc de nombreux cas à étudier ; nous ne présenterons ici que quelques études.

Averous *et al.* (2000) ont étudié le comportement de mélanges d'amidon thermoplastique (TPS) et de PCL. L'amidon thermoplastique est obtenu par mélange et chauffage d'amidon natif, de glycérol et d'eau. Le thermogramme du PCL seul permet de déterminer sa Tg, -61.5°C et sa Tm, 61°C. Les courbes DSC des différentes compositions en TPS font apparaître deux variations de capacité calorifique, toutes deux dépendantes de la quantité de glycérol. L'une correspond à la Tg du TPS qui diminue lorsque la concentration en glycérol augmente, l'autre à la relaxation du glycérol. L'interprétation des courbes DSC des mélanges est très complexe. En effet, la relaxation du glycérol se situe dans le même domaine de température que la Tg du PCL. De même, la Tg du TSP se superpose avec la Tm du PCL. Il est donc très difficile de séparer les contributions de chacun des composants. Cependant, le pic endothermique autour de 56-60°C, dont l'enthalpie correspondante dépend de la quantité de PCL, peut être attribué à la fusion du PCL. Les auteurs ont calculé la valeur de la Tg théorique pour des polymères miscibles avec le modèle de Couchman-Karasz :

$$T_g = \frac{(w_1 \Delta C p_1 T_{g_1} + w_2 \Delta C p_2 T_{g_2})}{(w_1 \Delta C p_1 + w_2 \Delta C p_2)}$$

w_1 , w_2 , T_{g1} , T_{g2} (K), ΔC_{p1} et ΔC_{p2} (J/(K*mol)) sont, respectivement, les fractions massiques, les températures de transition vitreuse et les variations de capacité calorifique correspondantes de chacun des polymères. Les résultats obtenus par ce modèle sont très différents des valeurs mesurées, il n'est donc pas valide. Les polymères ne sont donc pas miscibles. Le mélange doit être considéré comme une dispersion du PCL dans la matrice TPS.

Lors d'une autre étude, Avella *et al.* (2000) obtiennent des résultats similaires. L'ajout d'amidon dans une matrice PCL ne modifie pas les températures de transition vitreuse et de fusion du polyester. En revanche, l'ajout d'un compatibiliseur pour favoriser les réactions entre les deux composants augmente la taux de cristallinité du mélange.

Day *et al.* (1998) et Fang *et al.* (2001a; 2001b) confirment eux aussi ces résultats. En effet, seules les transitions thermiques caractéristiques du polyester apparaissent sur les courbes DSC de mélanges amidon/polyesters. De plus, lorsque la concentration en amidon augmente, le polyester se trouve plus dilué, rendant ainsi certains pics indécélables. Mani *et al.* (2001) ont quant à eux pu observer un faible pic endothermique correspondant à la fusion des granules d'amidon de faibles masses moléculaires. Ils en concluent que la structure cristalline de l'amidon a été détruite lors de l'extrusion du mélange.

La DSC permet aussi d'évaluer les modifications occasionnées sur les polymères lors de la biodégradation de ce type de matériaux. Bastioli *et al.* (1995) ont pu observer une augmentation de la cristallinité au cours de la biodégradation du Mater-Bi (Amidon/PCL), et non lors du celle du PCL seul. Ces auteurs suggèrent une dégradation préférentielle de l'amidon. De plus, une différence entre les enthalpies de fusion à la surface et au cœur de l'échantillon montre que la dégradation commence en surface puis que le processus continue au centre du matériau.

1.3 Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Cette technique est particulièrement intéressante pour étudier la biodégradation des plastiques. Elle permet de voir comment évolue l'échantillon et de formuler des hypothèses sur les mécanismes de biodégradation.

Le microscope électronique à balayage a de nombreuses applications dans le domaine des polymères.

Il permet d'apprécier la compatibilité des constituants d'un mélange (Yu *et al.*, 2001). Il peut aussi être utilisé pour vérifier l'efficacité d'une réaction telle que le greffage de l'amidon sur le polycaprolactone en présence d'un catalyseur (Dubois *et al.*, 1999) ou la compatibilisation de ces deux polymères afin de favoriser l'insertion de l'amidon hydrophile dans une matrice PCL hydrophobe (Avella *et al.*, 2000). En l'absence de catalyseur ou d'agent compatibilisant, ces auteurs ont observé, au MEB, une répartition homogène de l'amidon à la surface du PCL mais une absence totale de greffage entre ces deux polymères. En revanche, l'utilisation de catalyseur ou d'agent compatibilisant améliore l'adhésion des grains d'amidon qui sont intégrés dans la matrice PCL.

Le MEB peut également permettre de mettre en évidence la dégradation préférentielle d'un composé dans un mélange (Avella *et al.*, 2000; Ratto *et al.*, 1999). Avella *et al.* (2000), Montaudo *et al.* (2000) et Ratto *et al.* (1999) rapportent une érosion homogène et superficielle du matériau lorsque celui-ci est constitué de polyesters tels que le PCL, le polybutylène succinate adipate (PBSA) ou le polybutylène succinate adipate sébacate. Ki *et al.* (2001), en étudiant par MEB des polyesters aliphatiques et aromatiques, ont observé une différence de comportement vis-à-vis de la dégradation. Ils rapportent que les polyesters aliphatiques se dégradent plus rapidement au centre par autocatalyse. En revanche, les polyesters aromatiques sont hydrophobes et diminuent l'accès de l'eau à la surface. Les enzymes ne peuvent pas pénétrer dans la matrice. La dégradation a donc lieu à la surface du matériau. Les images MEB permettent de visualiser les colonies formées. En revanche, ces mêmes polyesters aliphatiques (PCL et PBSA) en mélange avec de l'amidon présentent des mécanismes de dégradation très différents (Araujo *et al.*, 2001; Avella *et al.*, 2000; Ratto *et al.*, 1999). La dégradation du matériau commence par celle de l'amidon qui laisse, en disparaissant, des trous de la taille des grains d'amidon. La dégradation est alors hétérogène. Les trous s'agrandissent et se connectent entre eux. Des fissures apparaissent à travers le matériau et irradient à partir des trous déjà présents.

1.4 Analyses chromatographiques

1.4.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Certains groupes de chercheurs étudient les produits de dégradation, en fin de dégradation, donc après disparition quasi-totale des oligomères. Ils ont alors établi des

protocoles d'analyse pour les constituants des monomères. C'est le cas, par exemple de Giunchedi *et al.* (1998) qui détectent l'acide lactique et l'acide glycolique grâce à une colonne Ultrasphère ODS à 35°C, un éluant constitué d'un tampon phosphate à pH=7.4 et de méthanol, et un détecteur UV à 210 nm. Witt *et al.* (2001) étudient les produits de dégradation d'autres polyesters. Ils recherchent le 1,4-butanediol, l'acide adipique, l'acide téréphthalique et les esters en dérivant. Pour cela, ils utilisent la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les conditions sont les suivantes : détecteur à ionisation de flamme et spectromètre de masse, colonne DB-1, gaz vecteur Helium, programme de température entre 80 et 325°C. Cette méthode permet de vérifier qu'en fin de réaction subsistent seulement les diacides et diols, ainsi que diesters synthétisés à partir de ces réactifs. Mais les températures élevées, nécessaires pour vaporiser les produits, risquent de dégrader les constituants du mélange.

Pour la séparation et l'identification des produits inconnus et non-volatils d'échantillons environnementaux complexes, l'HPLC-¹H RMN couplée à l'HPLC-Spectrométrie de masse est particulièrement adaptée (Levsen *et al.*, 2000). Cette méthode non-destructive permet de donner des informations structurales sur les composés quelque soit leur polarité. Elle peut être utilisée pour des molécules de très faibles concentrations. En revanche, cette méthode est assez longue et peu économique.

Rissler (1997, 2000) étudie la séparation d'oligoesters par HPLC en phase inverse avec un gradient d'éluants. Il compare des colonnes classiques (Nucleosil 5C₁₈, 5C₈ et 7Phenyl) avec des colonnes non-poreuses (Micra « non-porous » C₁₈, Kovasil MS C₁₄ et Kovasil-H C₁₈). Il utilise un détecteur UV à 230 nm et ELSD (evaporation light scattering detection). Plusieurs éluants, constitués de gradients d'acétonitrile, d'eau, de tétrahydrofurane et d'acide trifluoroacétique, sont testés. Du fait de la structure des esters (relativement polaire, partie aromatique hydrophobe et partie aliphatique), il est nécessaire d'utiliser un solvant fortement éluotrope. Il est nécessaire d'utiliser du THF, qui est un bon solvant, pour éviter la précipitation des oligomères de masse élevée. L'acétonitrile malgré ses bonnes propriétés éluotropiques n'est pas capable d'éluer seul les oligomères apolaires. L'utilisation du THF comme co-solvant est donc fondamentale. De plus, les échantillons de polyesters contiennent des groupements carboxyles, une concentration de 0.5% d'acide acétique est nécessaire. Les colonnes non-poreuses donnent une meilleure résolution pour les faibles masses moléculaires. En revanche, les colonnes classiques C₁₈ donnent de meilleurs résultats pour les fortes masses

moléculaires. Il est alors possible de séparer 60 oligomères. Pour les faibles masses moléculaires, à une masse correspond plusieurs pics, donc la séparation se fait en fonction de la composition chimique mais aussi de la fonctionnalité du groupe terminal.

L'utilisation de la spectrométrie de masse n'est pas possible pour les polymères. En effet, par définition, ceux-ci sont dégradés chimiquement ou thermiquement avant détection. De nouvelles méthodes d'ionisation plus douces ont vu le jour comme l'électrospray (Barton *et al.*, 1995; Fenn *et al.*, 1990; Guittard *et al.*, 1996) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (Barnes *et al.*, 1995; Bryant *et al.*, 1997; Rissler, 1997). De plus, pour la séparation des oligomères, la séparation par HPLC est souvent couplée à la spectrométrie de masse utilisant la technique MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) et une analyse par temps de vol (Time-of-flight, TOF), MALDI-TOF-MS. Le polymère est mélangé à une matrice adaptée. Après évaporation du solvant, les molécules de polymères sont désorbées de la matrice par stimulation laser et ionisées. Cette technique donne des spectres assez simples à interpréter car les molécules sont « mono-chargées ». De plus, le temps de vol permet d'analyser des molécules de hauts poids moléculaires (1 kDa). L'utilisation d'une telle technique nécessite des études préalables sur le choix de plusieurs paramètres : la matrice, le solvant, les sels et la préparation de l'échantillon (Nielen, 1999). Cette technique est souvent associée ou comparée à la chromatographie par perméation de gel (Hagelin *et al.*, 1998; Montaudo *et al.*, 1998; Wachsen *et al.*, 1997).

1.4.2 Chromatographie par perméation de gel (GPC)

La GPC est une technique puissante de caractérisation de la distribution des masses des polymères. Les supports pour la GPC sont constitués de petites particules de silice constituant un réseau de chenaux et de pores uniformes, dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser. Les molécules, dont le taux de pénétration dans les pores dépend de leur diamètre, seront fractionnées en fonction de leur taille et dans une certaine mesure de leur forme. Contrairement aux autres techniques chromatographiques, cette technique ne fait intervenir aucune interaction physique ou chimique entre l'analyte et la phase stationnaire.

Cette technique est maintenant couramment utilisée, notamment pour la synthèse des polymères, pour déterminer les masses moléculaires avec précision.

Comme pour les techniques chromatographiques classiques, de nombreuses colonnes existent. Les plus couramment utilisées avec des solvants organiques pour l'analyse de polyesters sont rassemblées dans le tableau V-I.

Tableau V-I : Colonnes les plus couramment utilisées en GPC organique

Nom commercial	Nature	Fabricant	Référence
Ultrastyrigel	Polystyrène réticulé	Waters Associates (USA)	(Laine <i>et al.</i> , 2001; Ratto <i>et al.</i> , 1999; Shaik <i>et al.</i> , 2001)
Microstyrigel		Waters Associates (USA)	(Montaudo <i>et al.</i> , 2000; Montaudo <i>et al.</i> , 1998)
Shodex A 800		Showa Denco KK (Japon)	(Ahn <i>et al.</i> , 2001; Qian <i>et al.</i> , 2000; Witt <i>et al.</i> , 2001; Witt <i>et al.</i> , 1997; Witt <i>et al.</i> , 1996b)
TSK - gel		Toyo Soda Manuf. (Japon)	
PL gel		Polymer Laboratories (GB)	(Bryant <i>et al.</i> , 1997 ; Claesson <i>et al.</i> , 2002 ; Hagelin <i>et al.</i> , 1998; Lustig, 1999; Nikolic <i>et al.</i> , 2001 ; Rissler, 1997; Schué <i>et al.</i> , 2000)
Licrogel PSM		Merck (Allemagne)	
Jordi		Ass. Inc. (USA)	(Wachsen <i>et al.</i> , 1997)

De même de nombreux éluants sont utilisés. Contrairement à l'HPLC, il s'agit le plus fréquemment d'un solvant seul, sans mélange et sans gradient. De toute évidence, de la nature du polymère dépend le choix de l'éluant. Pour les polyesters, les solvants les plus couramment employés sont le chloroforme (Ahn *et al.*, 2001; Bryant *et al.*, 1997; Claesson *et al.*, 2002; Higashi *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Montaudo *et al.*, 2000; Nikolic *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2000; Ratto *et al.*, 1999; Schué *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 1997; Witt *et al.*, 1996b) et le tétrahydrofurane (Hagelin *et al.*, 1998; Laine *et al.*, 2001; Montaudo *et al.*, 1998; Rissler, 1997; Shaik *et al.*, 2001; Wachsen *et al.*, 1997). Quelques études mentionnent l'utilisation

d'éluant moins courant comme l'acide hexafluoroisopropanoïque (Lustig, 1999; Tsuji *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 2001).

Les détecteurs les plus couramment utilisés sont le réfractomètre différentiel (Bryant *et al.*, 1997; Claesson *et al.*, 2002; Laine *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Montaudo *et al.*, 2000; Montaudo *et al.*, 1998; Nikolic *et al.*, 2001; Ratto *et al.*, 1999; Schué *et al.*, 2000; Shaik *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 1997; Witt *et al.*, 1996b) qui a l'avantage d'être non spécifique et donc universel et le détecteur spectrométrique UV, plus sensible que le réfractomètre (Lustig, 1999; Rissler, 1997; Wachsen *et al.*, 1997). Très spécifique des polymères, le détecteur viscosimétrique est également utilisé (Hagelin *et al.*, 1998).

La GPC peut aussi être utilisée pour séparer des oligomères (Bryant *et al.*, 1997; Higashi *et al.*, 1999), suivre une synthèse (Ahn *et al.*, 2001; Laine *et al.*, 2001; Nikolic *et al.*, 2001) ou une dégradation (Ratto *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 1996; Tsuji *et al.*, 2001; Twardon *et al.*, 1998).

2 ANALYSE DES MATERIAUX AVANT DEGRADATION – MISE AU POINT DES METHODES ANALYTIQUES

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Analyses classiques

2.1.1.1 Analyse élémentaire

Les analyses en carbone, hydrogène, oxygène et azote ont été effectuées sur un appareil d'analyse élémentaire Carlo ERBA – Model 1106.

Les mesures sont réalisées deux fois sur chaque échantillon. Une mesure supplémentaire est faite si les deux mesures précédentes ne sont pas reproductibles.

2.1.1.2 Mesure de l'épaisseur

La mesure de l'épaisseur des trois matériaux test a été réalisée à l'aide d'un micro-mètre Digimatic Mitulyo. L'épaisseur a été mesurée en 10 points.

2.1.1.3 Mesure de l'angle de contact

Chaque matériau est découpé et trois échantillons sont prélevés par matériau.

Une goutte d'eau déminéralisée est déposée à la surface de l'échantillon à l'aide d'une micro-seringue. La mesure de l'angle de contact de la goutte sur le matériau est réalisée par photographie dès immobilisation de la goutte.

L'appareil utilisé est un GBX-DIGIDROP. Une mesure est effectuée sur la vue droite et une sur la vue gauche de la goutte. Trois mesures sont réalisées par échantillon. Nous avons trois échantillons par matériau, donc 18 mesures de l'angle de goutte sont calculées par matériau.

2.1.2 Résonance magnétique nucléaire (^1H -RMN)

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la NMP n'existe pas sous forme deutérée. Les matériaux A et B sont alors dissous dans du chloroforme deutéré (CDCl_3). Le matériau C est dissous dans du DMSO deutéré. Le tube est ensuite chauffé à 60°C pour faciliter la dissolution complète du matériau.

Les différents échantillons analysés sont les suivants :

- Matériau A sous forme de film
- Matériau B sous forme de film et sous forme de granules (sans le pigment noir)
- Matériau C sous forme de film

Les spectres RMN sont enregistrés sur un appareil Bruker AC à 200 MHz.

2.1.3 Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

Les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre infra-rouge à transformée de Fourier, Perkin Elmer Spectrum BX, FTIR System, géré par le logiciel Perkin-Spectrum V3.02. Les spectres sont enregistrés en transmission et sont retraités avec le logiciel ACD/Spec Viewer.

Les spectres IR des trois matériaux ont été enregistrés dans différentes conditions :

- Matériau A : en solution dans le chloroforme, entre deux pastilles de KBr
- Matériau B :
 - Le matériau B sous forme de film et sous forme de granules a été dissous dans le chloroforme. Une goutte de la solution est ensuite déposée entre deux pastilles de KBr.
 - Le matériau B sous forme de granules a été dissous dans le chloroforme. Cette solution est placée dans une cellule de KBr.
 - Le matériau B sous forme de film a été solubilisé dans la NMP. Une goutte de la solution est ensuite déposée entre deux pastilles de KBr.
 - Le matériau B sous forme de granules a été réduit en poudre en le râpant contre de la laine de verre. Cette poudre est ensuite mélangée à du KBr et compressée sous forme de pastille.
 - Le matériau B sous forme de granules a été solubilisé dans le chloroforme. Les parties solubles et insolubles ont été séparées, d'une part, par centrifugation (ALC 4222 Centrifuge MKII) et, d'autre part, par filtration (Système de filtration Whatman et filtres en microfibrilles de verre Whatman GF/A). Le culot de centrifugation et le solide récupéré sur le filtre ont été broyés dans une pastille de KBr. Le surnageant et le filtrat sont analysés sous forme liquide entre deux pastilles de KBr.
- Le matériau C sous forme de film et sous forme de granules a été dissous dans le DMSO. Une goutte de la solution est ensuite déposée entre deux pastilles de KBr.

2.1.4 Analyse enthalpique différentielle (DSC)

Les études sont réalisées avec un appareil de DSC à modulation de puissance Pyris 1 (Perkin Elmer), équipé d'un groupe froid Intracooler. Les cellules de mesure sont balayées par un courant d'azote sec. La calibration en température est réalisée à l'aide d'indium ($T_m=156.6^\circ\text{C}$) et d'eau distillée ($T_m=0^\circ\text{C}$). Le traitement des données recueillies est réalisé à l'aide du logiciel Pyris (Perkin Elmer).

Deux séries d'analyses ont été effectuées en DSC, les conditions étant affinées en fonction des résultats obtenus. Un essai préliminaire nous a permis de déterminer le domaine

de température dans lequel travailler. Dans chacun des cas, trois échantillons de chaque matériau sont analysés.

La première série (essai DSC1) correspond à une analyse fine du matériau B. Les échantillons sont placés au dessiccateur 48 h avant l'analyse. Les cellules utilisées sont des cellules perforées de 30 μl . Elles sont tout d'abord stabilisées à -50°C pendant 1 minute puis chauffées de -50°C à 180°C à $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Une nouvelle stabilisation intervient à 180°C pendant 1 minute, puis elles sont refroidies de 180°C à -50°C à $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La deuxième série (essai DSC2) a été effectuée sur l'ensemble des matériaux test. Les échantillons sont placés au dessiccateur 48 h avant l'analyse. Les cellules utilisées sont des cellules perforées de 50 μl . Les conditions d'analyse de l'essais DSC2 sont les suivantes :

- Stabilisation à 25°C pendant 1 minute puis chauffage de 25°C à 180°C à $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Stabilisation à 180°C pendant 1 minute puis refroidissement de 180°C à 25°C à $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Enfin, stabilisation à 25°C pendant 1 minute puis chauffage de 25°C à 180°C à $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

2.1.5 Chromatographie par perméation de gel (GPC)

Nous avons d'abord cherché les conditions optimales d'analyse des matériaux par chromatographie par perméation de gel. Pour cela, des essais dans le chloroforme et dans la NMP, sur différentes colonnes ont été effectués. Ces essais permettent également de vérifier certaines hypothèses et d'analyser les matériaux B et C avant dégradation.

2.1.5.1 Appareillage

L'appareillage de chromatographie est constitué d'une pompe Dionex P580 et d'un injecteur automatique Dionex ASI-100. Le détecteur est à indice de réfraction, Iota 2, Precision Instruments. Ils sont gérés par le logiciel d'exploitation Chromeleon© Dionex.

Les colonnes sont fournies par Polymer Laboratories. Elles sont étalonnées avec un kit de standards polystyrène (580-3065000). Deux solutions de cinq étalons sont préparées à partir de ce kit d'étalonnage, l'une comprenant les masses 580, 3790, 30300, 218800 et 1000000 Da, et l'autre 1660, 10050, 68900, 483000 et 3065000 Da.

Le volume d'injection est de 200 µl et le débit de 1 ml/min. Les échantillons sont injectés deux fois. Avant injection, les échantillons sont filtrés sur filtre Acrodisc® CR PTFE 0.45µm (Gelman). Les éluants utilisés, le chloroforme et la N-Méthylpyrrolidone, sont fournis par Riedel de Häen. Les chromatogrammes obtenus sont retraités grâce au logiciel SECential®.

2.1.5.2 Recherche des conditions d'analyse en GPC sur les matériaux B et C

Les différentes conditions d'analyse sont rassemblées dans le tableau V-II.

Tableau V-II : Recherche des conditions d'analyse en GPC

	Colonne	Eluant	Temp.	Débit	Echantillons	Conc°
GPC1	PLgel 10µm 10 ⁴ Å PLgel 10µm 10 ³ Å PLgel 3µm Mixte-E	CHCl ₃	25°C	1 ml/min	MB ¹ granules MB film	1%
GPC2	PLgel 10µm 10 ⁴ Å PLgel 3µm Mixte-E	NMP	70°C	0.8 ml/min	MBg ² sans US MBg sous US MCg ³ sous US	1%
GPC3	Précolonne 2 PLgel Mixte-C	NMP	70°C	1 ml/min	MBg sous US MBg sous US MC ⁴ sous US	1% 0.5% 0.5%
GPC4	Précolonne 2 PLgel Mixte-C PLgel Mixte-E	NMP	70°C	1 ml/min	MB film MB granule MB poudre (*2) MC film MC granule Estane (PCL- polyuréthane) PCL Tous les échantillons sont dissous par US	0.5% 0.5% 0.5% 0.16% 0.16% 0.6% 0.43%

¹ MB : Matériau B

² MBg : Matériau B sous forme de granules

³ MCg : Matériau C sous forme de granules

⁴ MC : Matériau C

Lors de l'essai GPC1, nous avons d'abord utilisé le chloroforme comme éluant et comme solvant pour le matériau B. De cette façon, nous pouvons déterminer la taille de la partie du polymère soluble dans le chloroforme. Trois colonnes Polymer Laboratories sont installées en série : PLgel 10 μ m 10⁴ Å, 10 μ m 10³ Å et 3 μ m Mixte-E. Elles permettent de séparer des molécules de tailles allant jusqu'à 600000 Daltons.

Toutefois, l'utilisation des trois colonnes en série augmente considérablement la durée de l'analyse. Or, nous n'avons pas de composé ayant une masse moléculaire inférieure à 10000 Daltons. Nous avons donc décidé d'enlever, dans l'essai GPC2, la colonne PLgel 10 μ m 10³ Å. Les matériaux B et C en granules broyées sont dissous à 1% (Masse/Volume) dans la NMP avec ou sans action des ultrasons. L'éluant utilisé est maintenant la NMP. Elle a une viscosité très supérieure à celle du chloroforme. Les colonnes sont donc placées dans un four à 70°C pour la fluidiser et éviter ainsi l'augmentation de la pression à l'intérieur des colonnes.

Dans l'essai GPC3, nous avons utilisé deux colonnes Mixte-C. Elles nous permettent de travailler sur un domaine de masses moléculaires plus étendu, notamment du côté des masses moléculaires élevées. Lors de cet essai, plusieurs extraits du matériau B ont été effectués à des dates variées et également injectés à des dates variées, afin de connaître la reproductibilité de la méthode.

Dans chacun de ces essais les colonnes sont mises en série pour améliorer la résolution. Les domaines d'utilisation des colonnes utilisées sont résumés dans le tableau V-III.

Tableau V-III : Domaine d'utilisation des colonnes PLgel

Colonnes	Domaine de masses moléculaires (Da)
PLgel 10 μ m 10 ⁴ Å	10000 – 600000
PLgel 10 μ m 10 ³ Å	500 - 60000
PLgel 3 μ m Mixte-E	Jusqu'à 3000
PLgel 10 μ m Mixte-C	200 - 2000000

2.2 Résultats et discussion

2.2.1 Analyses classiques

2.2.1.1 Analyse élémentaire

Les résultats sont rassemblés dans le tableau V-IV.

Tableau V-IV : Analyse élémentaire des trois matériaux testés (entre parenthèses sont indiqués les écart-types)

	%N	%C	%O	%H
Matériau A	0.27 (0.003)	60.28 (0.137)	27.75 (0.219)	6.46 (0.001)
Matériau B	0.06 (0.030)	57.38 (0.498)	32.51 (0.024)	6.86 (0.072)
Matériau C	0.68 (0.053)	50.58 (0.260)	37.12 (0.017)	7.50 (0.043)
Polyéthylène	0	85.71	0	14.29

Les compositions des trois matériaux sont assez similaires. Le matériau B contient un peu plus d'oxygène et un peu moins de carbone que les deux autres. Pour comparaison, les pourcentages théoriques en carbone et en hydrogène du polyéthylène sont indiqués dans le tableau. Sa teneur en carbone et en hydrogène est beaucoup plus élevée que celles des matériaux étudiés.

2.2.1.2 Mesure de l'épaisseur

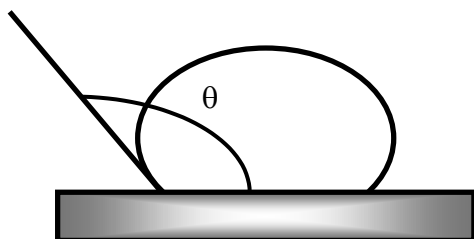
Les résultats moyens ainsi que les écart-types de l'épaisseur sont regroupés dans tableau V-V.

Tableau V-V : Mesure de l'épaisseur des films

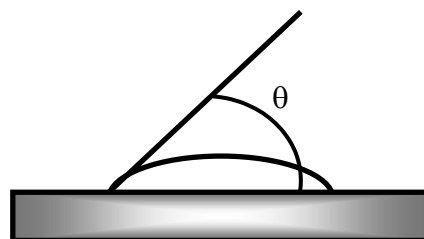
Matériau	Epaisseur (µm)	Ecart-type
Matériau A	15.6	1.713
Matériau B	17.2	3.225
Matériau C	23.9	3.178

2.2.1.3 Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact θ entre une goutte d'eau pure et une surface plane et propre permet de déterminer l'hydrophobicité de surface du matériau. Plus l'angle de contact est élevé plus le matériau a un caractère hydrophobe.



Caractère hydrophobe



Caractère hydrophile

Mozes *et al.* (1987) ont proposé un classement du caractère hydrophobe d'un matériau selon la valeur de l'angle θ .

- $\theta > 90^\circ$ Caractère hydrophobe marqué
- $\theta = 40-90^\circ$ Caractère hydrophobe intermédiaire
- $\theta < 40^\circ$ Caractère hydrophile

Les résultats obtenus pour les 3 matériaux test sont rassemblés dans le tableau V-VI.

Tableau V-VI : Mesure de l'angle de contact à la surface des trois matériaux testés

Nature de la goutte	Eau déminéralisée	
	Angle de contact	Ecart-type
Matériau A	73.26	3.80
Matériau B	88.19	1.77
Matériau C	87.18	5.99

Les trois matériaux présentent un caractère hydrophobe intermédiaire, mais légèrement plus marqué pour les matériaux B et C que pour le matériau A.

2.2.2 Résonance magnétique nucléaire (^1H -RMN)

2.2.2.1 Matériaux A et B

Nous savons que le matériau A est constitué essentiellement d'un mélange de polyester dont les monomères de base seraient deux diacides et un diol. Le matériau B serait partiellement constitué d'amidon.

Le solvant utilisé, le chloroforme deutéré (CDCl_3), ne solubilise pas totalement ces polymères et seules les fractions solubles sont analysées. L'amidon, modifié lors du procédé de mise en forme du matériau, n'est pas soluble dans le chloroforme et ne pourra donc pas être identifié.

Les spectres, regroupés en annexe 1, sont identiques pour les matériaux A et B. Ceci signifie que le polymère associé à l'amidon au sein du matériau B serait donc un mélange de polyesters de même structure que le matériau A.

Les spectres présentent un singulet à environ 8 ppm correspondant à quatre protons équivalents d'un groupement phényle. Si ce groupement phényle faisait partie du diol, son déplacement chimique serait moins élevé (environ 7-7.5 ppm). Il appartient donc à un diacide et se situe en alpha de la fonction carboxylique. L'un des deux diacides pourrait donc être l'acide 1,4-benzènedioïque (l'acide téréphtalique).

Nous observons par ailleurs deux triplets à 4.35 ppm et à 4.08 ppm d'intégration 2H. Ce sont donc deux groupements CH_2 liés eux-mêmes à des groupements CH_2 . Ces deux déplacements correspondent donc aux protons du groupement CH_2 du diol initial en alpha de la fonction ester lié aux diacides. Le triplet à 4.35 ppm pourrait correspondre au CH_2 proche d'une fonction phtalate.

Le tableau V-VII rassemble les valeurs théoriques de quelques déplacements chimiques du groupement CH_2 en alpha ou en bêta des fonctions esters.

Tableau V-VII : Déplacement chimique du groupement $-\text{CH}_2-$ au voisinage de la fonction ester

Fonctions environnantes	Déplacement en ppm (base+incrémentation)
$\underline{\text{CH}_2}\text{-O-C(=O)}$	4.33 (1.37 + 2.96)
$\underline{\text{CH}_2}\text{-C(=O)O}$	2.29 (1.37 + 0.92)
$\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-O-C(=O)}$	1.79 (1.37 + 0.42)
$\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-C(=O)O}$	1.72 (1.37 + 0.35)

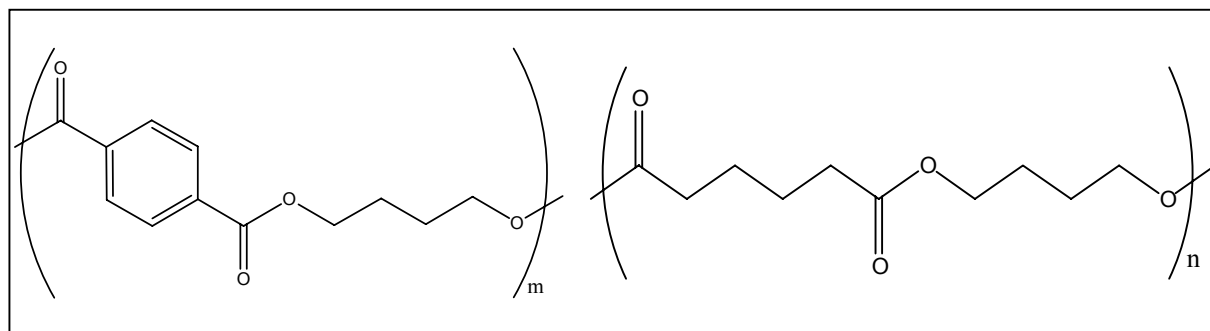
Nous observons, un singulet à 2.30 ppm, qui correspond à un groupement CH_2 du second diacide en alpha de la fonction ester.

Trois singulets assez proches à 1.94, 1.81 et 1.64 ppm sont également présents. Ils correspondent aux groupements CH_2 du diol et du diacide aliphatique en bêta de la fonction ester. Ici encore, le déplacement chimique le plus élevé est attribué à un CH_2 du diol proche de l'acide téréphtalique.

Toutes ces informations nous permettent de définir la structure de la partie soluble suivante :

Poly(butylène téréphtalate)

Poly(butylène adipate)



Deux autres spectres ^1H -RMN ont été réalisés sur le matériau B : le premier avec le matériau sous forme de film noir et le deuxième sous forme de granules blanches broyées. Par ailleurs, pour le matériau en granules, une analyse ^{13}C -RMN a aussi été effectuée. Les spectres du matériau sous ses deux formes sont identiques. Il n'y a donc pas de différence de

structure entre eux. Le spectre RMN du carbone permet de confirmer la structure du matériau précédemment établie.

Les surfaces d'intégration des signaux à 4.08 et à 4.35 ppm permettent de déterminer la proportion entre ces deux monomères :

$$\frac{H_{4.08}}{H_{4.35}} = \frac{\text{Nb de molécules d' adipate}}{\text{Nb de molécules de téréphtalate}}$$

Dans le cas du matériau B (en film ou en granules), ce rapport est de 4.5/4. Il y a donc 53% de butadiène adipate et 47% de butadiène téréphtalate.

Pour le matériau A, ce rapport est de 1. La proportion entre ces deux monomères est donc équivalente et égale à 50%.

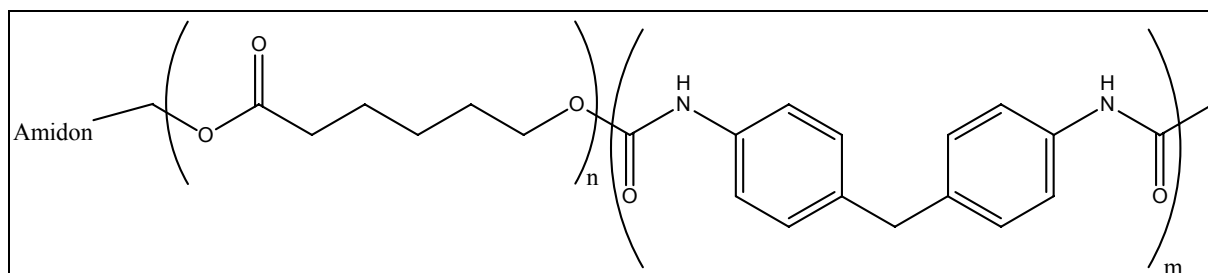
Les polyesters aliphatiques sont susceptibles d'être attaqués par des microorganismes, alors que les polyesters aromatiques le sont beaucoup plus difficilement (Müller *et al.*, 2001). Dans le matériau A, la proportion d'ester aromatique est plus forte que celle présente dans le matériau B. De plus, d'après les informations fournis par le fabricant, le matériau A ne contient pas d'amidon et d'après les résultats de l'analyse élémentaire, sa teneur en carbone est plus élevée que celle du matériau B. Nous nous attendons donc à une dégradation plus lente du matériau A que le matériau B. Les tests de biodégradabilité ont bien confirmé ce résultat (Chapitre 3).

2.2.2.2 Matériau C

Le spectre obtenu pour le matériau C dans le DMSO-d6 est présenté en annexe 1.

La structure de ce matériau est déjà connue (Bellia *et al.*, 1999; Tosin *et al.*, 1998). Son spectre permet de reconnaître les différents monomères constitutifs de ce polymère. On retrouve entre 4 et 5.5 ppm, les massifs correspondant à la résonance des 7 protons de la structure glycosidique. Du côté des fortes valeurs de déplacements chimiques (9.6 ppm), on retrouve les protons de la structure amide et vers les champs plus forts (faibles valeurs de déplacements chimiques : 1.6 et 2.4 ppm), les protons du polycaprolactone.

La structure de ce polymère est la suivante :



2.2.3 Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les différents spectres obtenus sont présentés en annexe 2.

2.2.3.1 Matériau A

Le spectre IR du matériau A en solution dans le chloroforme confirme la structure du polymère précédemment établie en $^1\text{H-RMN}$.

2.2.3.2 Matériau B

Le matériau B est étudié sous ses deux formes, en film ou en granules dans le chloroforme. La comparaison entre les deux spectres confirme là encore leur similitude de structure.

De même, nous avons comparé les spectres pour le matériau en granules, soit dissous dans le chloroforme, soit broyé sous forme solide dans le KBr. La principale différence observée est la présence d'une large bande à 3422 cm^{-1} , caractéristique des fonctions hydroxyles, lorsque les granules sont réduites en poudre dans le KBr. Seul, ce mode de préparation nous permet d'éviter une discrimination dans l'analyse des monomères présents dans le matériau. Ce résultat semble indiquer la présence d'amidon, riche en fonctions OH, dans le matériau B. En outre, ces spectres présentent les bandes d'élongation et de déformation caractéristiques des fonctions esters, de groupements phényles et alkyles CH_2 , à savoir : $\nu(\text{C-H aromatique})=3020\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=O ester})=1720\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{CH}_2)=2922\text{-}2852\text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{déformation O=C-O ester})=1272\text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{déformation CH}_2)=1467\text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{déformation }(\text{CH}_2)_4)=730\text{ cm}^{-1}$. Pour les spectres en solution dans le chloroforme, certaines de ces bandes sont masquées par les bandes caractéristiques du solvant.

Pour confirmer ces résultats, nous avons séparé la partie soluble de la partie insoluble du matériau B dans le chloroforme, puis analysé ces deux fractions. Les différences obtenues entre les spectres résident, ici encore, dans l'apparition d'une bande large à 3400 cm^{-1} , caractéristique des groupements hydroxyles. Cette bande est donc certainement due à l'amidon, comme nous l'avions déjà supposé.

Ces analyses ont également été effectuées en solution dans la NMP car elle seule permet de solubiliser en totalité le matériau B. Toutefois, ce solvant présente un spectre IR très intense qui masque toutes les bandes du matériau B et ne nous permet pas son identification.

2.2.3.3 Matériau C

Les spectres du matériau C dans le DMSO (Annexe 2) confirment la structure des monomères identifiée en RMN du proton. On y retrouve bien les bandes caractéristiques des groupements amide (-NH-), méthylène (-CH₂-), hydrolyle (-OH) et ester (-OC=O) : $\nu(\text{NH})=\nu(\text{OH})=3437\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{CH}_2)=2995\text{-}2912\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=O ester})=1723\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=O amide})=1660\text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{déformation CH}_2)=1437\text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{déformation NH amide})=1310\text{ cm}^{-1}$.

De même, on n'observe pas de différences entre les spectres enregistrés à partir du matériau C sous forme de film et de granules. Nous pouvons en conclure qu'elles possèdent les mêmes structures chimiques.

2.2.4 Analyse enthalpique différentielle (DSC)

2.2.4.1 Matériaux A et B

L'analyse DSC1 du matériau B montre trois pics endothermiques : le premier assez large à 70°C , puis deux plus petits à 105°C et à 120°C (Figure V-1). Les polyesters aromatiques, comme le poly(butylène téréphtalate) PBT, ont une structure rigide et possèdent un arrangement cristallin élevé. En revanche, les polyesters aliphatiques, comme le poly(butylène adipate) PBA, ont une phase amorphe plus importante (Shaik *et al.*, 2001). La température de fusion du PBT est donc supérieure à celle du PBA. La littérature nous donne des valeurs de température de fusion pour les homopolymères purs entre 60 et 80°C pour le PBA et entre 220 et 230°C pour le PBT (Ahn *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 1999; Ou, 2000; Shaik

et al., 2001). Le mélange d'un homopolymère dans l'autre a une influence réciproque sur chacune des structures, diminuant ainsi considérablement la température de fusion et l'intensité du pic correspondant. Nous supposons alors que le pic à 70°C correspond à la partie adipate du copolyester, et que le pic à 120°C correspond à la partie téréphtalate. Cependant nous constatons qu'un seul pic de cristallisation est visible à 93°C. Nous pouvons supposer que les chaînes se sont réarrangées au moment du refroidissement pour ne cristalliser que dans un seul état. Le pic à 105°C est plus délicat à attribuer. Bien que les échantillons soient séchés avant analyse, leur taux d'humidité peut ne pas être nul. Il est alors possible que ce pic corresponde à l'évaporation de l'eau piégée dans le matériau. Dans ce cas, la capsule étant perforée, la vapeur d'eau peut s'échapper. Une deuxième montée en température ne laisserait plus apparaître ce pic. D'autre part, nous savons que ce matériau contient de l'amidon. Ce pic pourrait aussi être attribué à l'amidon.

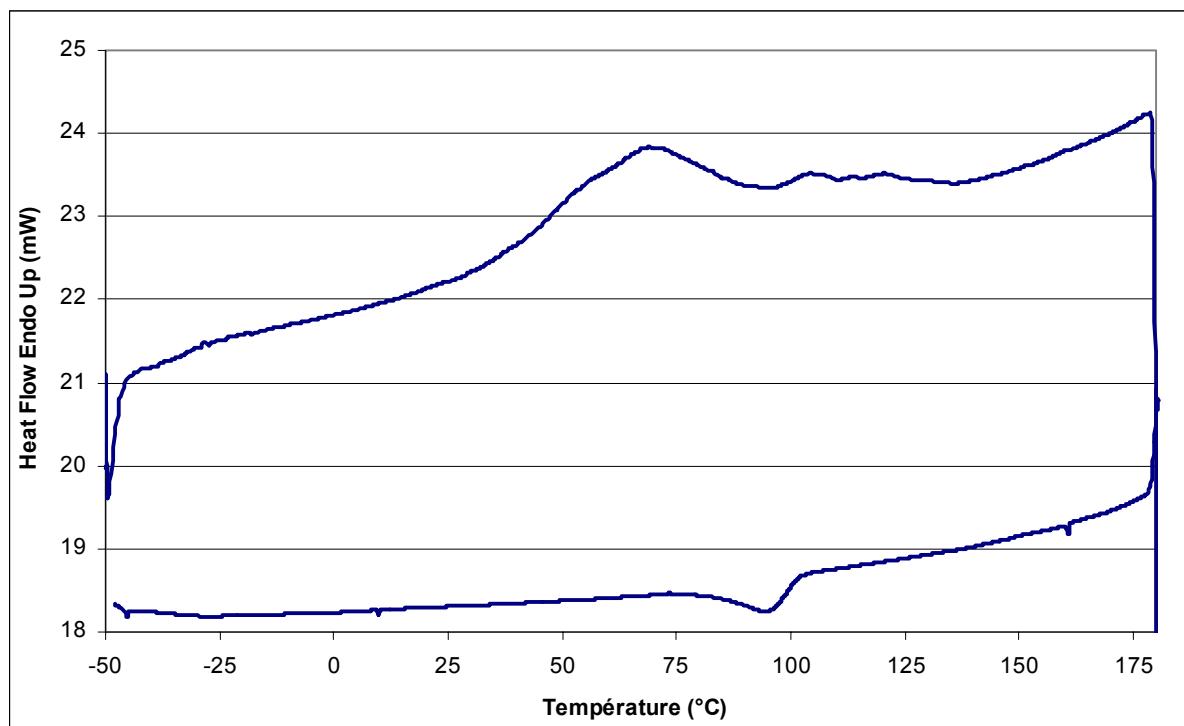


Figure V-1 : Analyse DSC du matériau B (Essai DSC1)

Un deuxième essai comprenant une nouvelle montée en température va nous permettre de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses. Nous comparons les résultats obtenus pour les matériaux A et B (Figures V-2 et V-3). Nous observons une similitude entre les courbes. Pour la première montée en température, trois pics endothermiques sont présents sur la courbe du matériau B alors que seulement deux le sont sur celle du matériau A. Les pics à 75 et 125°C

sont communs aux deux matériaux, alors que le pic à 105°C, n'est présent que pour le matériau B. Nous pouvons donc supposer que les deux pics à 75 et 125°C sont effectivement caractéristiques des deux parties du copolyester. La deuxième montée en température diminue considérablement l'intensité des pics, mais le pic à 105°C reste visible sur la courbe du matériau B. Il n'est donc pas dû à l'évaporation de l'eau. Comme ce pic n'est présent que sur la courbe du matériau B, nous pouvons supposer qu'il provient de l'amidon.

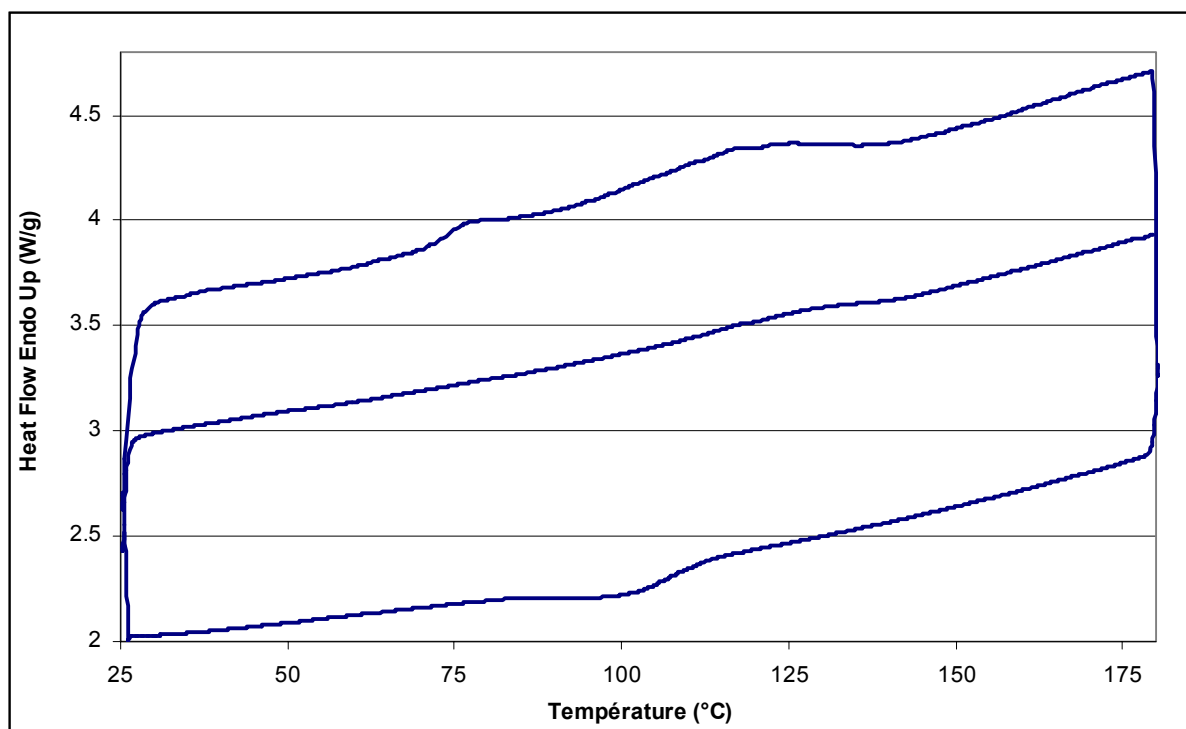


Figure V-2 : Analyse DSC du matériau A (Essai DSC2)

Pour les deux matériaux, un seul pic de cristallisation est observé à 96°C. Lors de la deuxième montée en température, les pics sont beaucoup moins intenses que pour la première. Ils sont difficilement décelables. Il semble que pour le matériau A, seul un pic à 120°C soit visible ; pour le matériau B, les pics à 105 et 120°C sont visibles. Le pic à 75°C a disparu pour les deux matériaux.

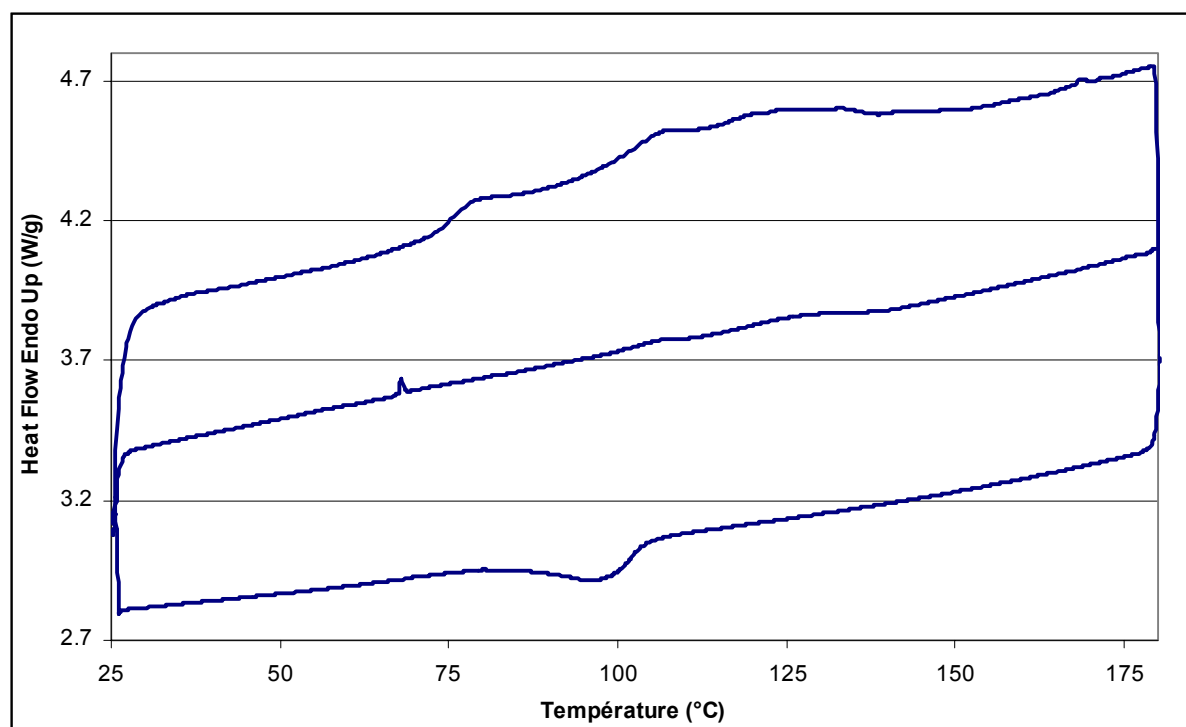


Figure V-3 : Analyse DSC du matériau B (Essai DSC2)

Deux explications sont envisageables pour justifier la présence d'un seul pic de cristallisation et la disparition du pic à 75°C. Les chaînes de polymères provenant des parties aliphatique et aromatique se réarrangent pour cristalliser dans l'état le plus stable. Nous n'avons donc qu'un pic de cristallisation et un seul pic à la deuxième montée en température. D'autre part, la cristallisation de la partie aliphatique peut être très lente, comme cela a été décrit par Shaik *et al.* (2001), et si la vitesse de refroidissement est trop élevée, la cristallisation n'est pas observable sur la courbe DSC. De plus, comme les pics de la deuxième montée en température sont très faibles, il est possible que celui correspondant à la partie aliphatique ne soit pas discernable de la ligne de base. Avec ces seuls éléments, il nous est difficile de conclure.

2.2.4.2 Matériau C

Lors de l'analyse DSC du matériau C, nous observons deux pics endothermiques à 55°C et 67°C (Figure V-4). Nous supposons qu'il s'agit des pics de fusion du PCL et de l'Estane (PCL-polyuréthane). L'Estane, par l'introduction d'un cycle aromatique, a une structure plus rigide que le PCL, sa température de fusion sera plus élevée. Averous *et al.* (2000), Day *et al.* (1998) et Fang *et al.* (2001a) qui ont étudié le comportement thermique de mélanges amidon/PCL ont noté la présence d'un pic à 60°C qui correspond au PCL. La

synthèse bibliographique nous a permis de constater que la température de fusion d'un polymère décroît lorsqu'il est mélangé à un autre polymère. Nous pouvons supposer que le pic à 55°C correspond au PCL et que celui à 67°C correspond à l'Estane. Nous observons un épaulement à 40°C qui pourrait correspondre à la relaxation de l'amidon. En revanche, contrairement au matériau B, nous ne constatons pas de pic correspondant à la fusion de l'amidon. Averous *et al.* (2000), Day *et al.* (1998) et Fang *et al.* (2001a), dans leurs études des mélanges PCL/amidon, ont observé le même phénomène. Les enthalpies de transition de l'amidon sont bien plus faibles que celles d'autres polymères synthétiques. Il est alors souvent impossible d'observer les pics correspondant à sa cristallisation ou sa fusion. D'autre part, nous n'observons qu'un seul pic de cristallisation à 32°C. Sa structure symétrique est similaire à celle du pic de fusion de l'Estane. Nous supposons qu'il s'agit du pic de cristallisation de l'Estane. La température de cristallisation du PCL doit se situer en dessous de 25°C. Mais nous n'observons aussi qu'un seul pic de fusion à 57°C lors du deuxième chauffage. Sa température correspond à celle du pic de fusion du PCL lors de la première montée en température, mais sa forme est moins étalée. L'Estane contient aussi du PCL, il est alors possible que ces deux parties se soit dissociées lors de la fusion pour recristalliser ensemble.

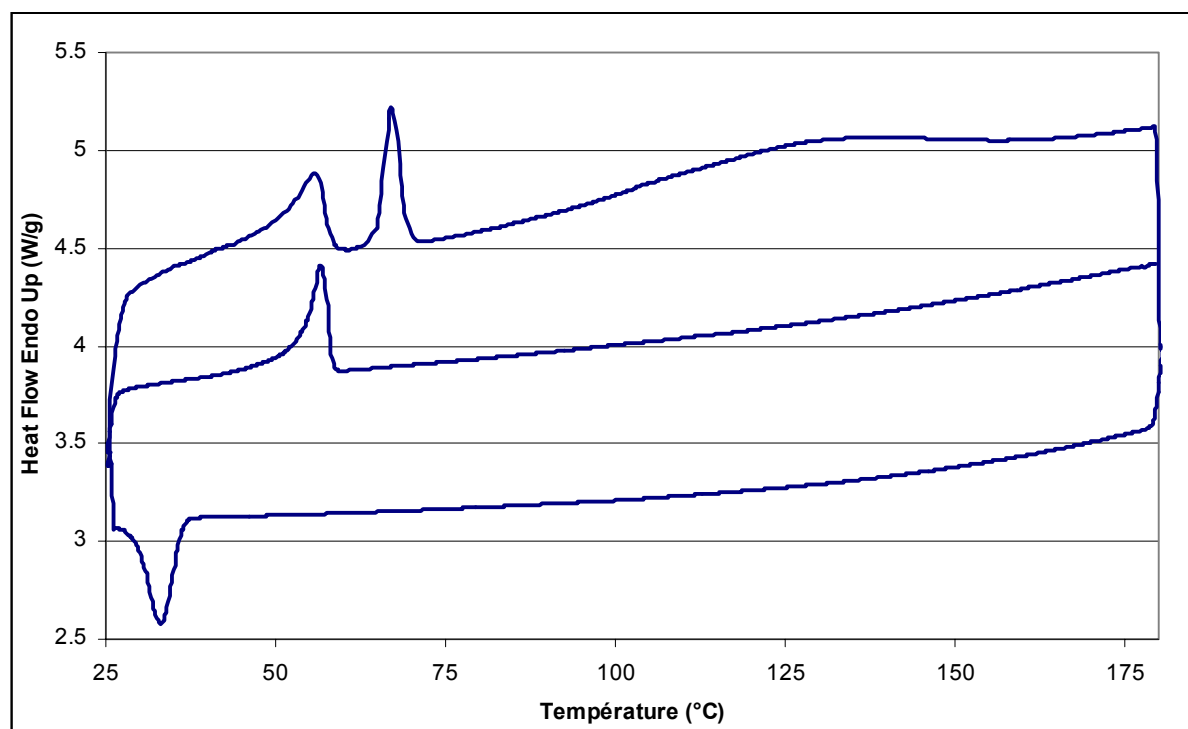


Figure V-4 : Analyse DSC sur matériau C (Essai DSC2)

2.2.5 Chromatographie par perméation de gel (GPC)

2.2.5.1 Analyses dans le chloroforme avec les colonnes PLgel 10 μ m 10⁴ Å, 10 μ m 10³ Å et 3 μ m Mixte-E

Lorsque l'éluant est le chloroforme, que le matériau soit sous forme de film ou de granules, nous obtenons un seul pic, dédoublé dans le cas du film à un temps de rétention compris entre 17 et 18 min (Figure V-5). Les masses moléculaires correspondantes sont résumées dans le tableau V-VIII.

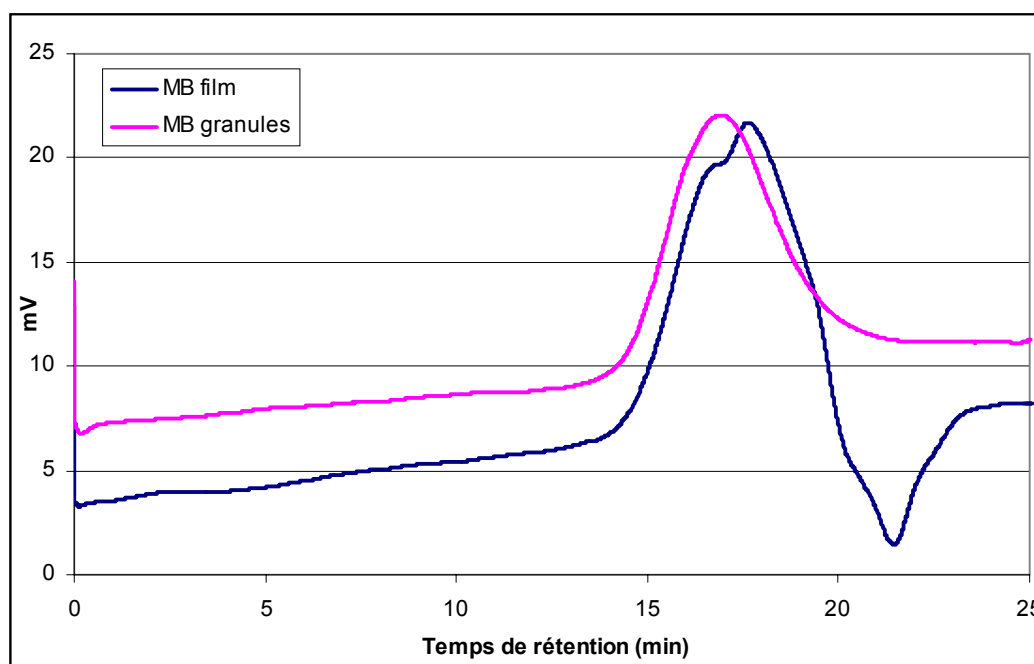


Figure V-5 : Chromatogrammes du matériau B sous forme de film et de granules injecté dans le chloroforme (GPC1)

Tableau V-VIII : Masses moléculaires en nombre (Mn) et en masse (Mw) correspondant au pic du matériau B

Matériau	Mn	Mw
Matériau B granules	29302	61767
Matériau B film	32742	57354

Rappelons que le chloroforme ne solubilise que partiellement ce matériau et qu'en conséquence, certains homopolymères, restant dans la phase solide, ne seront pas analysés. Par ailleurs, la forme (épaisseur, diamètre, ...) de ce matériau a une répercussion directe sur sa facilité à se solubiliser. De même, les procédés de mise en forme jouent un rôle capital dans le mélange et la répartition des copolymères constitutifs du matériau. Il n'est donc pas surprenant d'observer une légère différence dans les masses moléculaires obtenues. Cet écart n'est toutefois pas significatif et nous pouvons affirmer qu'il n'y a pas de réelle différence entre les deux formes de ce matériau.

2.2.5.2 Analyses dans le NMP avec les colonnes PLgel 10 μm 10⁴ Å et 3 μm Mixte-E

Les chromatogrammes du matériau B en granules solubilisé dans la NMP avec ou sans action des ultrasons présentent deux pics à des temps de rétention de 10 et 13 min (Figure V-6). En présence ou non d'ultrasons, ces temps de rétention sont parfaitement superposés. Les masses moléculaires correspondantes sont indiquées dans le tableau V-IX.

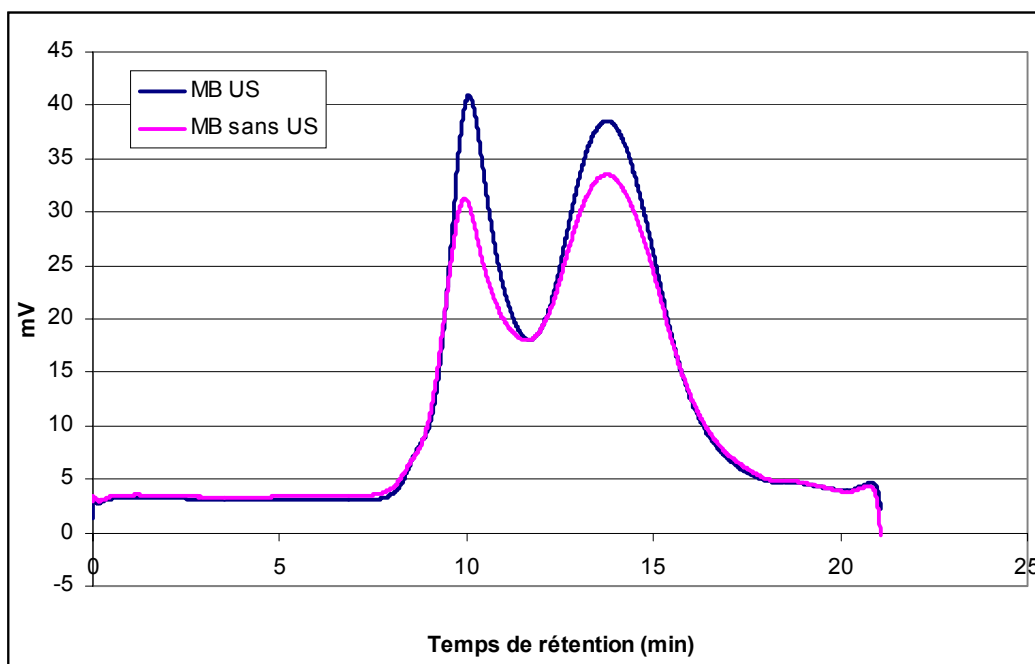


Figure V-6 : Chromatogrammes du matériau B sous forme de granules dissous dans la NMP, avec ou sans action des ultrasons, (GPC2)

Tableau V-IX : Masses moléculaires correspondant aux pics du matériau B dans la NMP

Matériau	Pic 1		Pic 2	
	Mn	Mw	Mn	Mw
Matériau B	704096	900494	45108	90636
Matériau B US	696965	864128	46691	91825

Ces résultats montrent, d'une part, qu'une solubilisation modérée par ultrasons n'apporte pas de modifications de l'enchaînement des unités constituant le polymère. Les temps de rétention et les masses moléculaires ne sont pas modifiés.

D'autre part, la solubilisation totale du matériau B dans la NMP permet de visualiser un nouveau pic ($T_R=10$ min) à des masses moléculaires plus élevées (environ 900000). Par ailleurs, la différence de masse moléculaire observée entre le pic de l'essai GPC1 et le pic 2 de l'essai GPC2 peut certainement être attribuée à la non solubilisation d'une partie du matériau par le chloroforme (peut-être par une non accessibilité des chaînes liée à la présence d'amidon).

Nous avons pu identifier en RMN la structure chimique des copolyesters correspondant au pic 2. En revanche, les analyses dans la NMP étant impossible, nous n'avons pas pu identifier la structure chimique des chaînes correspondant au pic 1. Toutefois, en spectroscopie infrarouge apparaît une bande caractéristique de l'amidon lorsqu'on passe du matériau B dissous dans le chloroforme à celui broyé dans une pastille de KBr. A ce stade, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce pic 1 correspond à « l'association » d'une matrice d'amidon et du copolymère alterné de butylène adipate et du butylène téréphtalate.

Le matériau C en granules, solubilisé dans la NMP, a aussi été injecté sur ces deux colonnes. Nous obtenons alors quatre pics (Figure V-7). Les valeurs des masses moléculaires correspondantes sont indiquées dans le tableau V-X.

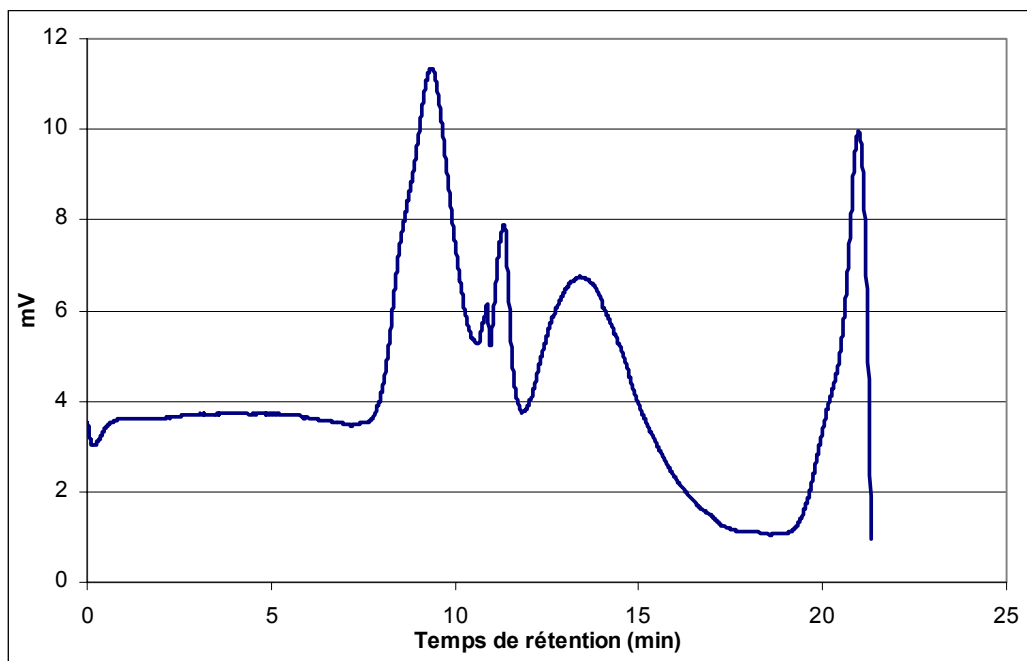


Figure V-7 : Chromatogramme du matériau C dissous dans la NMP par Ultra-sons (GPC2)

Tableau V-X : Masses moléculaires correspondant aux pics du matériau C dans la NMP

Pic 1		Pic 3		Pic 4		Pic 5	
Mn	Mw	Mn	Mw	Mn	Mw	Mn	Mw
1261461	1465586	357400	363502	59832	89975	741	802

Ce polymère est un « copolymère bloc », c'est à dire que les différents copolymères le constituant ont été synthétisés séparément puis ils sont associés lors de la mise en forme du matériau. A chaque pic doit correspondre un des copolymères. Nous avons donc un pic pour l'amidon, un pic pour le polycaprolactone (PCL) et un pic pour le polyuréthane, le dernier pic correspondant au plastifiant. Ce polymère se solubilise difficilement dans la NMP. Les ultrasons ont donc été nécessaires pour le solubiliser. Un usage trop intense a pu le fragiliser et dégrader le composé présent sous le deuxième pic qui, en conséquence, se dédouble.

La structure particulière de ce polymère est mise en évidence par la présence de ces quatre pics. L'injection de ce matériau sur de nouvelles colonnes ainsi que l'injection du PCL et du polyuréthane séparément permettront de confirmer ces résultats.

2.2.5.3 Analyses dans la NMP avec deux colonnes PLgel Mixte-C

Nous constatons, dès l'injection des deux solutions de cinq standards en polystyrène, une amélioration de la résolution liée à l'utilisation de deux colonnes en série de domaines d'application plus larges.

Nous avons alors injecté le matériau A, constitué uniquement de copolyesters et le matériau B composé conjointement du même copolyester associé pour partie avec de l'amidon. De nombreux échantillons ont été réalisés : à différentes concentrations, de 0.5% à 1% (M/V) dans la NMP ; à différentes dates, sur une période de 5 mois avec des injections immédiates après la préparation ou ultérieurement, afin de vérifier la reproductibilité de nos injections et la qualité de nos échantillons dans le temps. Les acides adipique et téréphtalique ont également été injectés seuls ou en mélange avec le matériau B. Les résultats obtenus (Figure V-8) montrent, d'une part, une excellente reproductibilité de nos injections, quelle que soit la concentration des échantillons, et d'autre part, un maintien de leur qualité dans le temps. Nous observons, dans toutes ces analyses, deux pics à des temps de rétention de 10 et 13.5 min dont les masses moléculaires sont indiquées dans le tableau V-XI.

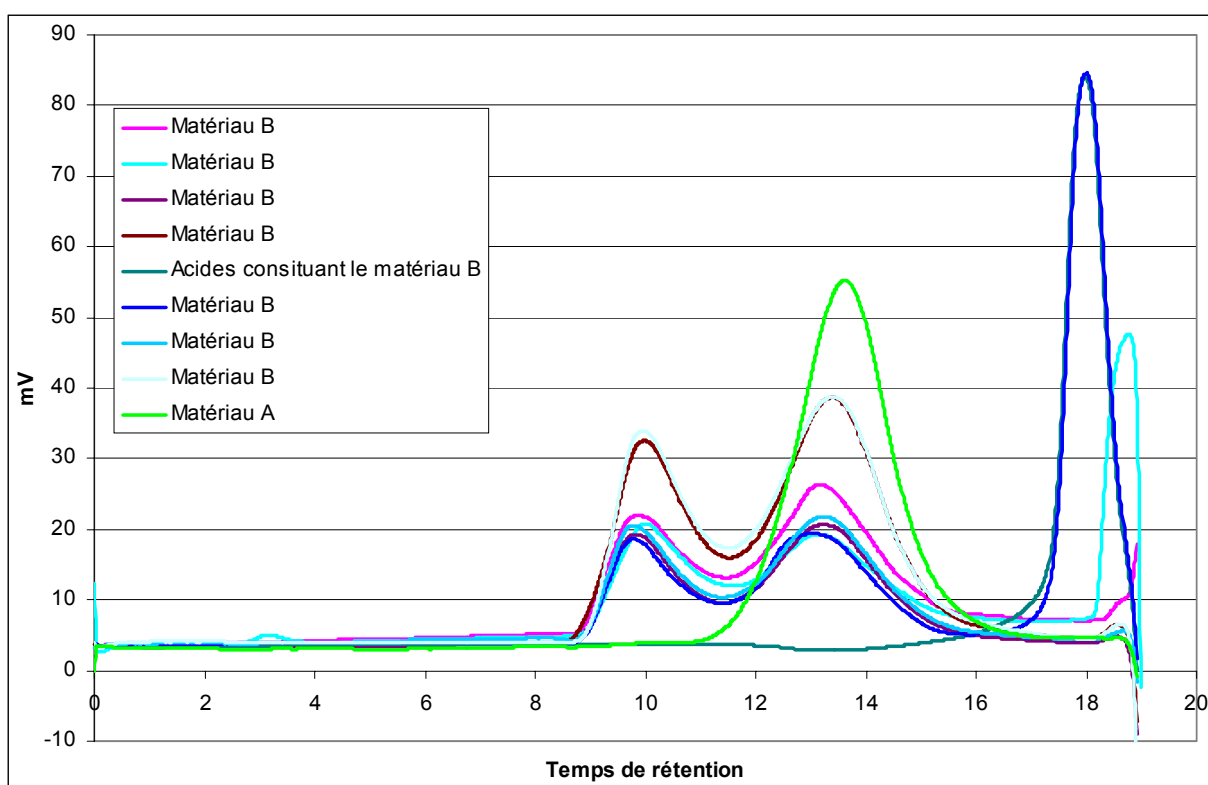


Figure V-8 : Chromatogrammes de différentes injections de matériau B dans la NMP, comparaison avec le matériau A et les acides le constituant (Mixte-C) (GPC3)

Tableau V-XI : Masses moléculaires correspondant aux pics du matériau B dans la NMP

Pic 1		Pic 2	
Mn	Mw	Mn	Mw
1705586	2460393	60417	137112

Les acides adipique et téréphtalique apparaissent à un temps de rétention proche de 18 min.

De même, différentes préparations de matériau C ont été injectées (Figure V-9). Les résultats sont beaucoup moins reproductibles que pour le matériau B. Nous observons deux phénomènes : le premier relatif au décalage des 3 pics principaux ($t_R=8.5$ min ; $t_R=12.5$ min et $t_R=16.5$ min) et le second qui révèle la présence d'un pic supplémentaire vers un temps de rétention de 10 min. Deux hypothèses peuvent être émises : d'une part une dégradation de la qualité des échantillons au cours du temps et/ou d'autre part, une détérioration plus ou moins importante du matériau C lors de sa solubilisation sous ultrasons (Problème évoqué au chapitre 4). Ils sont nécessaires à la solubilisation du matériau C mais ils provoquent sa détérioration.

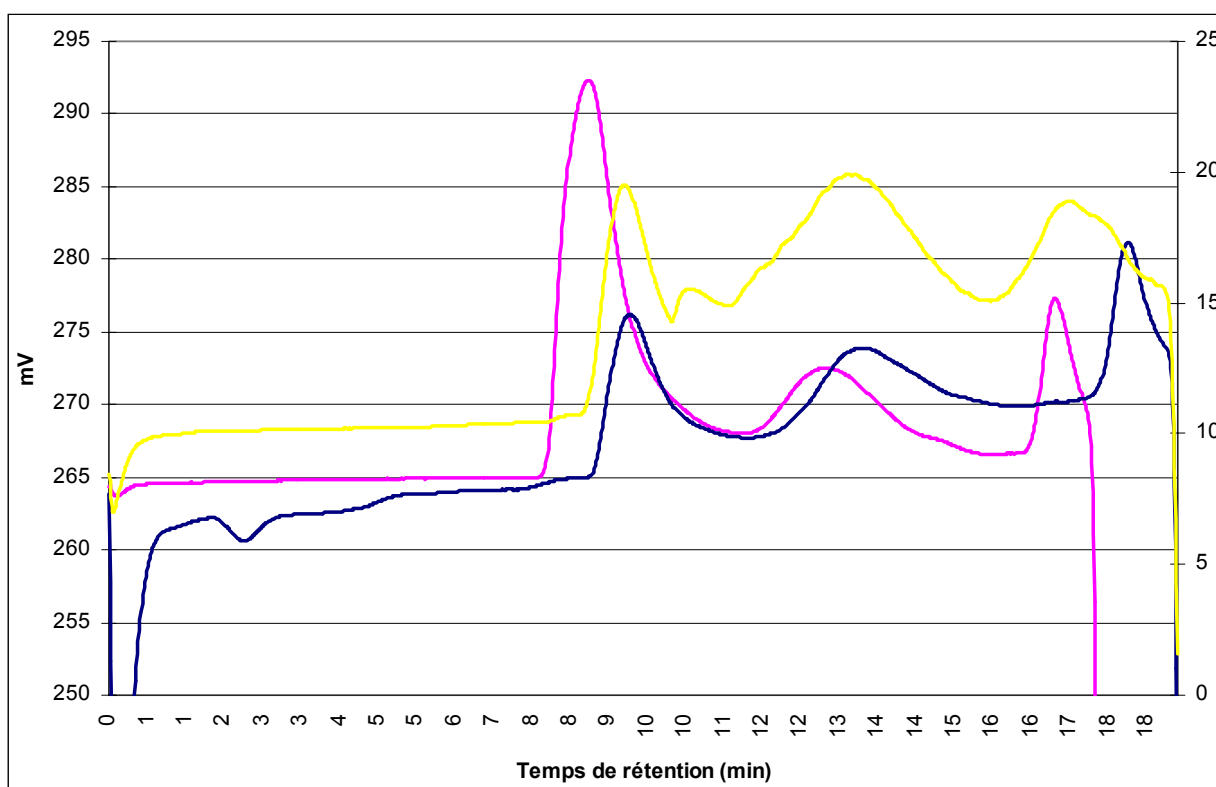


Figure V-9 : Chromatogrammes de différentes injections de matériau C dans la NMP (Mixte-C) (GPC3)

Toutefois, nous ne mettons pas en cause la reproductibilité et la qualité de la méthode d'analyse ; et le suivi de la dégradation des matériaux B et C sera effectué sur ces colonnes.

2.2.5.4 Analyses dans la NMP avec deux colonnes PLgel Mixte-C et une colonne Mixte-E

Les résultats obtenus pour le matériau B sont moins reproductibles que précédemment (Figure V-10). Le nombre de pics est identique, mais les temps de rétention sont parfois décalés. Bien que le décalage entre les chromatogrammes soit faible, il semble que la forme sous laquelle se trouve le matériau ait une importance. Dans la suite de notre étude, ainsi que pour la mise au point du protocole d'extraction, nous utiliserons le témoin sous la même forme que les échantillons à analyser.

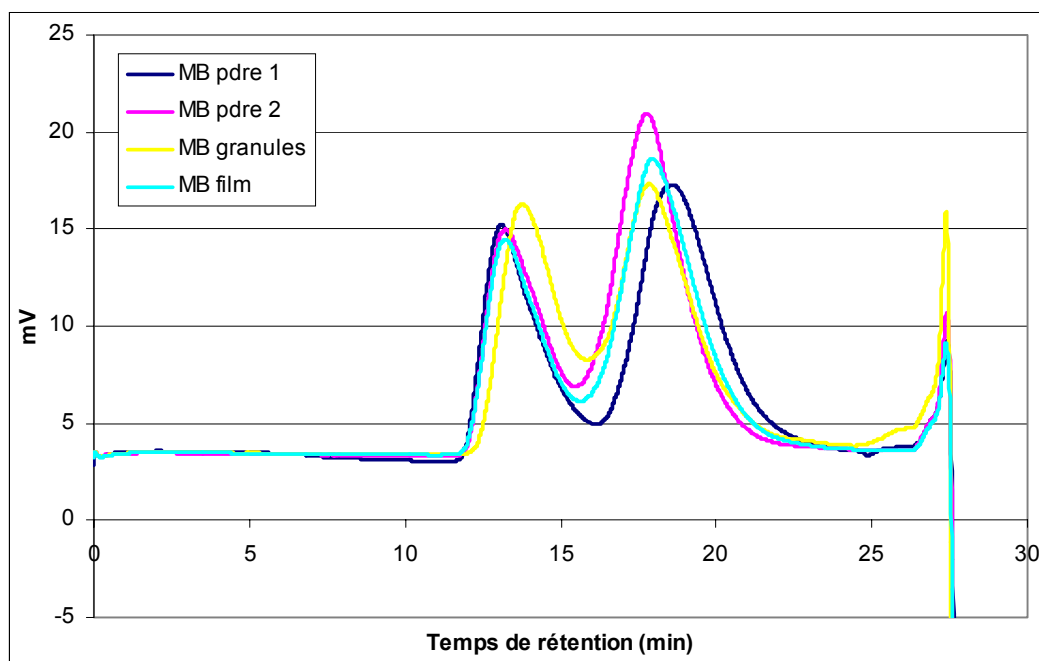


Figure V-10 : Chromatogramme du matériau B sous différentes formes dans la NMP (Mixte-C, Mixte-E) (GPC4)

Les résultats obtenus pour le matériau C sont plus reproductibles (Figure V-11). L'injection du PCL et de l'Estane (PCL-Polyuréthane) seuls permet d'identifier ces produits. Leurs pics se superposent avec le deuxième pic du matériau C. Nous pouvons alors supposer que le premier pic du matériau C correspond, comme pour le matériau B, à l'amidon, le second pic à l'Estane et au PCL.

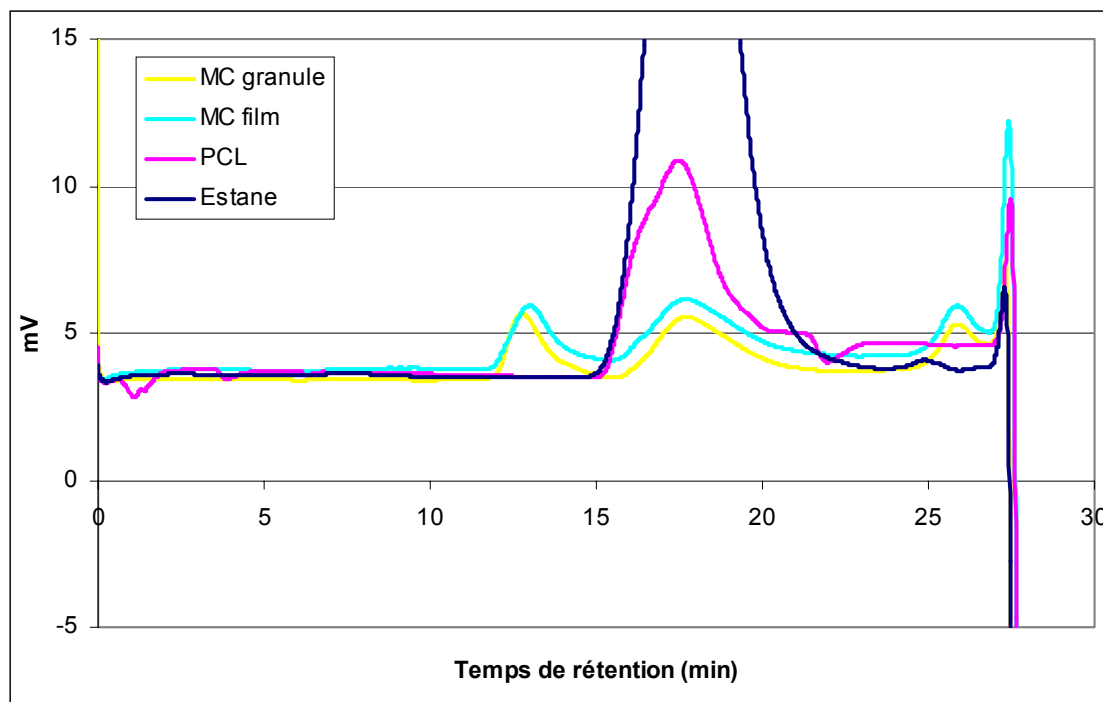


Figure V-11 : Chromatogrammes du matériau C sous différentes formes dans la NMP et des éléments le constituant (Mixte-C, Mixte-E) (GPC4)

3 ANALYSE DES MATERIAUX EN COURS ET APRES DEGRADATION

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Résonance magnétique nucléaire (^1H -RMN)

Seul le matériau B est analysé :

- Pendant la dégradation en milieu réel (enfouissement au Cemagref) : Sur ces échantillons, deux séries ont été effectuées. Les échantillons sont dissous dans le chloroforme deutéré.
- En cours de dégradation sur vermiculite et en fin de dégradation en laboratoire sur pouzzolane : Pour cela, 20 g pouzzolane et 4.2 g de vermiculite ont été extraits avec 120 ml de chloroforme par Soxhlet pendant 6 heures. Dans le cas de la pouzzolane, les cartouches ont été remplacées 4 fois au cours des 6 heures afin de concentrer l'extrait. Le chloroforme a ensuite été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le solide ainsi obtenu est dissous à nouveau dans du chloroforme deutéré.

Les spectres RMN sont enregistrés sur un appareil Bruker AC à 200 MHz.

3.1.2 Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Comme pour l'analyse des matériaux avant dégradation, les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre infra-rouge à transformée de Fourier, Perkin Elmer Spectrum BX, FTIR System, géré par le logiciel Perkin-Spectrum V3.02. Les spectres sont enregistrés en transmission et sont retraités avec le logiciel ACD/Spec Viewer.

Comme il a été décrit dans le paragraphe 3.1.1, les supports inertes, en cours et en fin de dégradation, sont soumis à l'extraction par soxhlet avec du chloroforme. Au moment de l'évaporation, quelques millilitres sont prélevés afin d'effectuer les analyses IR. Une goutte de cette solution est déposée entre deux pastilles de KBr

3.1.3 Analyse enthalpique différentielle (DSC)

L'appareil utilisé est le même que pour l'analyse des matériaux avant dégradation. Les études sont réalisées avec un appareil de DSC à modulation de puissance Pyris 1 (Perkin Elmer), équipé d'un groupe froid Intracooler.

Les échantillons analysés sont les résidus de dégradation du matériau B après enfouissement au Cemagref. Les conditions d'analyses DSC1 et DSC2 sont celles décrites au paragraphe 2.1.4.

3.1.4 Chromatographie par perméation de gel (GPC)

Ces analyses sont effectuées en solution dans la NMP. L'éluant utilisé est la NMP à un débit de 1 ml/min à 70°C.

3.1.4.1 Test sur pouzzolane en simulation de sol – matériaux B et C

Les échantillons analysés dans ce paragraphe sont les résidus et produits de dégradation des matériaux B et C obtenus en fin de réaction sur pouzzolane (Chapitre 3), ainsi que les résidus et produits de dégradation du matériau C obtenus en cours de réaction sur pouzzolane, après 12%, 24%, 36%, 48% et 60% de dégradation (Chapitre 3).

Matériau B

En fin de dégradation (après 180 jours), l'humidification de l'air entrant dans le réacteur est interrompue. De l'air sec pénètre alors directement dans les réacteurs, favorisant ainsi le séchage de la pouzzolane. Les trois réacteurs contenant le matériau B sont récupérés et leurs contenus sont mélangés. Une répartition granulométrique apparaît dans le mélange. Les petites particules de pouzzolane se trouvent en bas et les grosses en haut. De même, des résidus de dégradation du film sont concentrés dans les petites particules, en bas du mélange. Nous avons séparé ces deux parties et après introduction de la NMP dans les deux lots, les mélanges sont laissés au repos avant extraction. Nous avons effectué deux extractions : une sur les particules de petites tailles (MBP) et l'autre sur les particules plus grosses (MBG). Les échantillons sont extraits par ultrasons pendant 60 minutes dans la NMP. Ils sont ensuite filtrés sur système de filtration Whatman avec des filtres GF/A. Les conditions d'extraction et d'injection sont rassemblées dans le tableau V-XII. Le matériau B témoin sous forme de film à une concentration de 0.5% (M/V) est injecté dans les mêmes conditions que les extraits.

Les réacteurs sont disposés la tête en bas sur le banc. Leur capuchon est rempli de laine de verre pour éviter à la pouzzolane de s'échapper dans les tuyaux. Elle contient alors de la solution inoculum et du matériau. Nous avons donc effectué une extraction sur cette laine de verre dans les mêmes conditions que la pouzzolane, c'est-à-dire dans la NMP, par ultrasons, pendant 60 minutes. De même, des fragments de matériau restent collés à la paroi du réacteur. Nous avons donc essayé de les récupérer avec de la NMP. Enfin, les échantillons notés blanc correspondent aux réacteurs qui ne contenaient pas de matériau (pouzzolane seule).

Sur ces différents extraits deux types de séparation chromatographie ont été réalisés : sur deux colonnes Mixte-C, puis sur deux colonnes PLgel 10 μ m Mixte-C en série avec une colonne PLgel 3 μ m Mixte-E.

Tableau V-XII : Conditions d'extraction et d'injection du MB, dans la NMP, après dégradation sur pouzzolane

	Echantillons	Masse d'échantillon extrait (g)	Masse de NMP (g)	Nombre d'extraits	Nature des colonnes GPC
GPC5	MBG	45.6	30	3	2 Mixte-C
	MBP	15.2	10	3	2 Mixte-C
	Laine de verre MB	2	53.29	1	2 Mixte-C
	Rinçage réacteur		5 ml	3	2 Mixte-C
	Blanc (pouzzolane sans MB)	45.6	30	3	2 Mixte-C
	Laine de verre Blanc (réacteur sans MB)	2	63.05	1	2 Mixte-C
GPC6	Mélange MBG+MBP	10	6.67	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E
	Blanc	30	20	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E

Matériau C

Le séchage et le mélange des réacteurs ont été réalisés de la même façon que pour le matériau B. De même, la laine de verre présente dans les réacteurs a été extraite et les parois des réacteurs rincés à la NMP.

Sur ce matériau, deux expérimentations ont été réalisées. D'une part, comme pour le matériau B, les différents échantillons de matériau C et de blanc après une dégradation de six mois en simulation de sol ont été analysés. D'autre part, la dégradation du matériau C étant plus importante que celle du matériau B, nous avons choisi de suivre sa dégradation. Pour cela, une nouvelle expérience a été mise au point où la réaction de biodégradation est stoppée

dans deux réacteurs de matériau C à chaque fois qu'un nouveau palier de 12% de dégradation est atteint.

Les réacteurs proviennent donc, d'un part de l'expérience de six mois, et d'autre part, de l'expérience de suivi de la dégradation du matériau C avec prélèvement tous les 12% de dégradation (Prélèvement 1=12%, prélèvement 2=24%, prélèvement 3=36%, prélèvement 4=48% et prélèvement 5=60%). Contrairement aux autres analyses, pour cette expérimentation, la totalité du contenu du réacteur est extrait lors d'une extraction unique. Après introduction de la NMP, les mélanges sont laissés à reposer. Puis, les échantillons sont extraits par ultrasons pendant 40 minutes. Ils sont ensuite filtrés sur système de filtration Whatman avec des filtres GF/A.

Les conditions d'extraction et d'injection sont rassemblées dans les tableaux V-XIII et V-XIV. Le matériau C témoin sous forme de film à une concentration de 0.5% (M/V) est injecté dans les mêmes conditions que les extraits.

Tableau V-XIII : Conditions d'extraction et d'injection du MC, dans la NMP, en fin de dégradation sur pouzzolane

	Echantillons	Masse de support (g)	Masse de NMP (g)	Nb d'extraits	Colonnes	Durée de repos
GPC7	MCG	45.6	30	3	2 Mixte-C	2 mois
	MCP	15.2	10	3	2 Mixte-C	2 mois
	Laine de verre MC	2	43.92	1	2 Mixte-C	2 mois
	Rinçage réacteur		5 ml	3	2 Mixte-C	2 mois
	Blanc	45.6	30	3	2 Mixte-C	2 mois
	Laine de verre Blanc	2	63.05	1	2 Mixte-C	2 mois

Tableau V-XIV : Conditions d'extraction et d'injection du MC, dans la NMP, en cours de dégradation sur pouzzolane

	Echantillons	Masse de support (g)	Masse de NMP (g)	Nb d'extraits	Colonnes	Durée de repos
GPC8	MC Prélèvements 1 à 4	45.6	30	2	2 Mixte-C	6 jours
GPC9	MC Prélèvement 5	45.6	30	1	2 Mixte-C 1 Mixte-E	5 jours
	Blanc	45.6	30	3	2 Mixte-C 1 Mixte-E	5 jours
	MC Prélèvements 1 à 4 préparés pour l'essai GPC8				2 Mixte-C 1 Mixte-E	1 mois et 3 semaines
GPC 10	MC Prélèvements 1 à 5	15.2	30	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E	3 jours
GPC 11	MC Prélèvements 1 à 4 préparés pour l'essai GPC8				2 Mixte-C	2 mois

3.1.4.2 Test sur vermiculite en simulation de compost - Matériau B

Les échantillons analysés dans ce paragraphe sont les résidus et produits de dégradation du matériau B en conditions de compost sur vermiculite. Trois prélèvements ont été effectués sur la vermiculite seule (Blanc) et sur le mélange vermiculite – matériau B. Les échantillons sont identifiés de la façon suivante : MB ou Blanc, suivi de la durée d'incubation au moment du prélèvement (MB t=0j, MB t=40j, MB t=90j, Blanc t=40j et Blanc t=90j).

Après réception, les échantillons sont stockés en chambre froide à 4°C, jusqu'à leur utilisation. Afin d'évaporer l'eau, ils sont ensuite placés à l'étuve, à 62°C pendant 24h, jusqu'à stabilisation du poids. Les échantillons sont ensuite extraits aux ultrasons pendant 60 minutes et filtrés sur système de filtration Whatman avec des filtres GF/A.

Les résultats chromatographiques de l'essai GPC 12 montrant une dégradation de l'échantillon MB t=0j, pour les essais GPC 13 et 14, celui-ci est préparé en ajoutant le

matériau en poudre dans l'échantillon Blanc t=40j, avant séchage. Les échantillons MB t=0j sont préparés en mélangeant 3 g de matériau B et 48 g de Blanc t=40j, pour tenir compte du ratio 1/16 de la quantité de matériau sur la quantité de vermiculite activée (Chapitre 3). Les conditions d'extraction et d'injection sont rassemblées dans le tableau V-XV.

Les échantillons ont d'abord été injectés sur deux colonnes PLgel 10 μ m Mixte-C (GPC 12 et 13), puis sur deux colonnes Mixte-C et une colonne PLgel 3 μ m Mixte-E (GPC 14) afin d'affiner l'analyse des petites molécules. Le matériau B témoin sous forme de poudre à une concentration de 0.5% (M/V) dans la NMP est injecté dans les mêmes conditions que les extraits.

Tableau V-XV : Conditions d'extraction et d'injection du MB en cours et après dégradation sur vermiculite

	Echantillons	Masse (g)	Masse de NMP (g)	Nb d'extraits	Colonnes	Durée de repos
GPC 12	MB t=0j	3.3	80.5	3	2 Mixte-C	3 jours
	Blanc t=0j	3.3	80.5	3	2 Mixte-C	3 jours
GPC 13	MB t=0j	3.3	80.5	3	2 Mixte-C	7 jours
	MB t=40j	3.3	80.5	3	2 Mixte-C	7 jours
	Blanc t=40j	3.3	80.5	3	2 Mixte-C	7 jours
GPC 14	MB t=0j	1.5	36.6	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E	13 jours
	MB t=40j	1.5	36.6	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E	13 jours
	MB t=90j	1.5	36.6	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E	13 jours
	Blanc t=40j	1.5	36.6	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E	13 jours
	Blanc t=90j	1.5	36.6	2	2 Mixte-C 1 Mixte-E	13 jours

3.1.4.3 Test en milieu réel – Matériau B

Les films enfouis au Cemagref ont été rincés à l'eau déminéralisée, puis solubilisés dans la NMP avec une concentration de 0.5% (M/V). La solubilisation est accélérée par l'utilisation des ultrasons. Le matériau B témoin sous forme de film à une concentration de 0.5% (M/V) dans la NMP est injecté dans les mêmes conditions que les extraits. Après filtration, les échantillons sont injectés sur deux colonnes PLgel 10 μ m Mixte-C précédées d'une précolonne PLgel 5 μ m guard.

3.1.5 Microscope électronique à balayage (MEB)

Les échantillons analysés par microscope électronique à balayage sont les résidus de films enfouis au Cemagref (non exposés aux UV) ainsi que le film avant dégradation. Un fragment de film est collé sur le porte-échantillon, puis placé sous vide. Un dépôt d'argent est réalisé à la surface de l'échantillon. Il est ensuite soumis à un faisceau d'électrons. Les images sont enregistrées avec l'appareil JEOL JSM-6400 du laboratoire CIRIMAT de l'ENSIACET.

3.1.6 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) - détecteur Ultra-Violet

Ces conditions chromatographiques sont utilisées pour détecter le 4,4'-diamino diphenyle méthane (MDA) relargué lors de la dégradation du matériau C sur pouzzolane.

3.1.6.1 Conditions d'injection

L'appareil chromatographique utilisé est constitué d'une pompe LDC Milton Roy CM 4000. Le détecteur est à Ultra-Violet HP Series 1100.

Les conditions utilisées sont celles décrites par Bellia *et al.* (1999) :

La colonne est une C₁₈ Prontosil Eurobond 5,0 μ m. L'éluant est constitué par un mélange Acétonitrile/eau (40/60) contenant du NaH₂PO₄ (16 mmol/l) et du Na₂HPO₄ (4 mmol/l). La colonne est à température ambiante. Le débit est de 0.6 ml/min et le volume de la boucle d'injection est de 20 μ l. La longueur d'onde du détecteur UV est fixée à 244 nm.

3.1.6.2 Préparation des échantillons

Préparation de la gamme étalon

Une solution mère de MDA est préparée par dissolution de 0.1081 g de MDA dans 100 ml d'éthanol absolu. La gamme étalon est alors réalisée par dilution de cette solution dans l'eau déminéralisée à différentes concentrations (mg/l) : 1.3404 ; 0.1608 ; 0.1072 et 0.0536

Préparation des échantillons

Ils sont obtenus par extraction sous ultrasons, durant 60 minutes, de 45.6 g de pouzzolane sèche dans 30 g d'eau déminéralisée. Deux extraits sont préparés pour chacun des cinq prélèvements à 12, 24, 36, 48 et 60% de dégradation (du matériau C sur pouzzolane).

Après extraction, les échantillons sont filtrés sur un verre fritté. Ils sont ensuite stockés à 4°C avant leur utilisation. Avant injection, les échantillons sont filtrés sur filtre Acrodisc® CR PTFE 0.45µm (Gelman).

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Tests sur pouzzolane en simulation de sol après 180 j - Analyses sur les produits et résidus de dégradation des matériaux B et C

3.2.1.1 Matériau B

Résonance magnétique nucléaire

En soustrayant les pics propres au blanc, le spectre ¹H-RMN du matériau B est similaire à celui du film avant dégradation, les mêmes signaux sont identifiables (Annexe 1).

Nous avons cherché à savoir si la partie aliphatique du copolyester se dégradait plus vite que la partie aromatique, comme c'est le cas pour les homopolymères, ou si, au contraire, la structure était trop alternée pour qu'il y ait une préférence au niveau de la dégradation. Pour cela, nous avons calculé le rapport $H_{4.08}/H_{4.35}$, décrit au paragraphe 2.2.2.1. Nous obtenons un ratio de 0.98, soit une diminution de 13% par rapport au ratio initial. Il semble donc que la partie aliphatique se dégrade plus rapidement que la partie aromatique. Toutefois la différence de surface n'est pas suffisamment significative pour que l'on puisse l'affirmer avec certitude.

Chromatographie par perméation de gel

Les différents échantillons du matériau B et du blanc après une dégradation de six mois en simulation de sol ont été injectés en chromatographie par perméation de gel, sur deux colonnes Mixte-C. Les chromatogrammes obtenus (figure V-12) sont comparés avec celui du matériau B témoin.

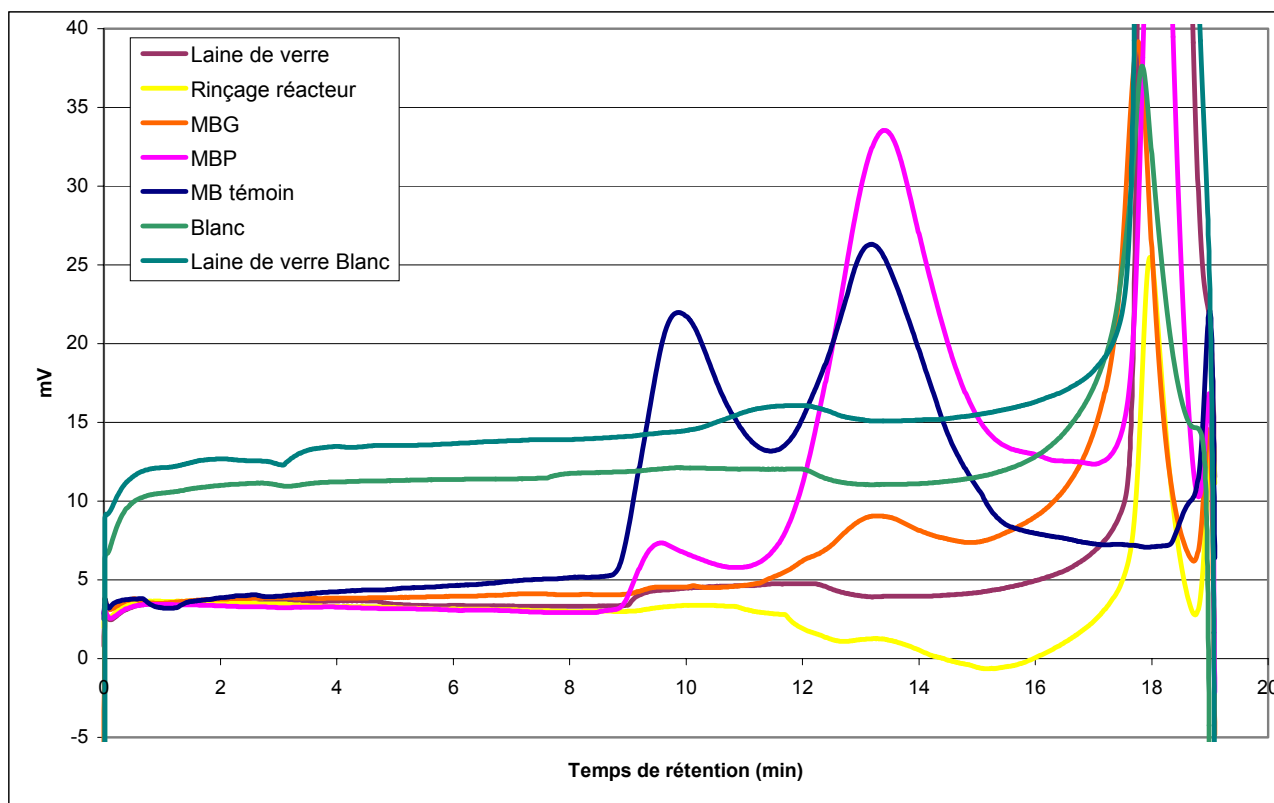


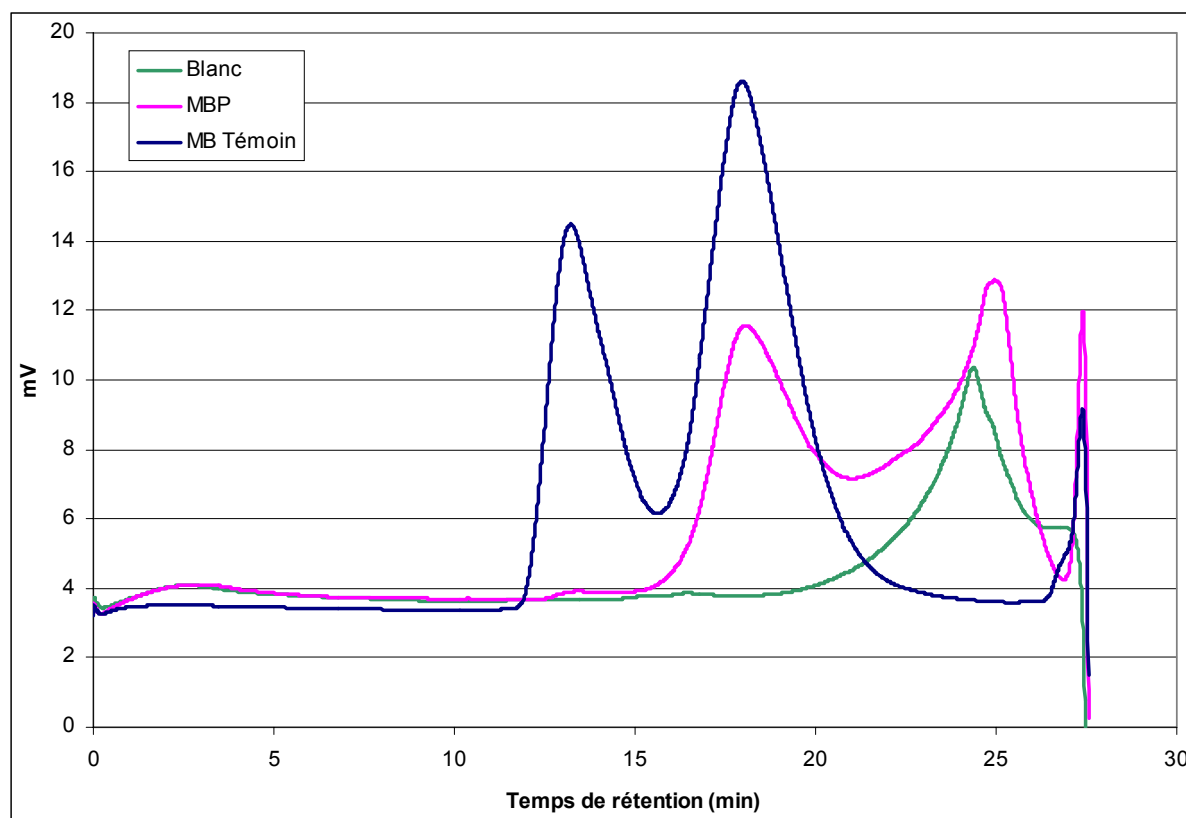
Figure V-12 : Chromatogrammes des résidus et produits de dégradation du Matériau B sur pouzzolane dans la NMP (Mixte-C) (GPC5)

Tous les extraits issus des réacteurs de biodégradation présentent un pic intense vers 18 min, n'appartenant pas au matériau B. Celui-ci n'étant pas visible lors de l'extraction de la pouzzolane brute (Chapitre 4), il s'agit des composés présents dans l'inoculum et extraits par la NMP. Sur les chromatogrammes des extraits de laine de verre et du rinçage des réacteurs, seul ce pic apparaît, ceux-ci ne semblent donc pas contenir de produits de dégradation. Les chromatogrammes des extraits MBG (grosses particules) et MBP (petites particules) font apparaître une nette diminution, voire la quasi disparition du premier pic (10 min) du matériau B correspondant à l'association amidon-polyester. En revanche, le pic du copolyester seul à 13.3 min est toujours présent. La minéralisation de 23% du matériau en 180 jours sur pouzzolane est donc principalement celle de l'amidon. Par ailleurs, la fraction polyester

intimement liée à ce polymère naturel serait fragilisée et donc plus facilement dégradée que la partie du matériau constituée uniquement de copolyester.

Dans le cas des extraits de MBP, la surface du pic à 18 min est plus importante que celle du blanc. Bien que nous ne puissions pas connaître avec précision la concentration en inoculum, il est possible que ce pic ne soit pas entièrement constitué des composants de l'inoculum.

Afin d'améliorer la séparation des molécules de plus faibles masses moléculaires, nous avons à nouveau préparé, puis injecté des extraits provenant du mélange MBP et de blanc sur deux colonnes Mixte-C en série avec une colonne Mixte-E. Les chromatogrammes obtenus sont représentés figures V-13 a et b.



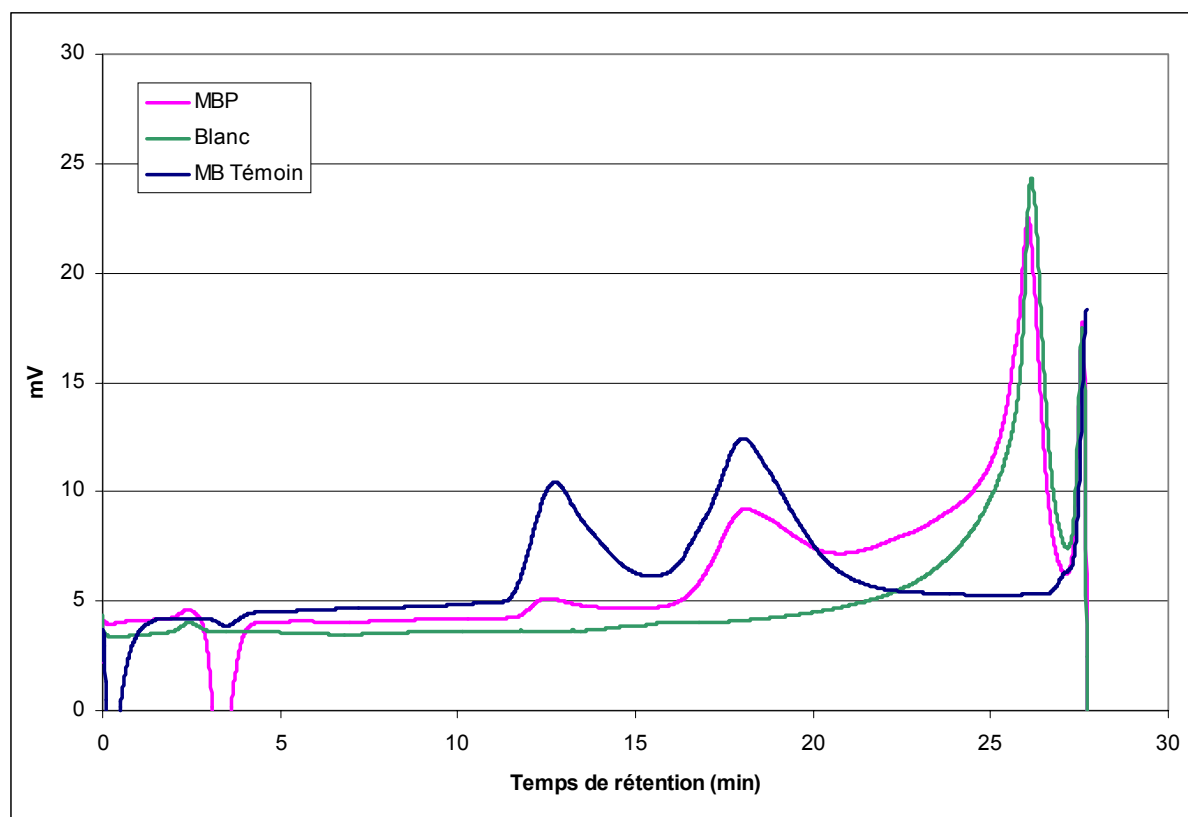


Figure V-13 : a et b : Chromatogrammes des résidus et produits de dégradation du Matériau B sur pouzzolane dans la NMP (Mixte-C, Mixte-E) (GPC6)

Nous constatons les mêmes phénomènes que précédemment. Le premier pic du MBP a totalement disparu et un nouveau pic correspondant à l'inoculum apparaît. Pour lever le doute sur la présence potentielle de produits de dégradation du matériau B sous ce même pic, c'est à dire l'existence de plusieurs pics superposés, nous avons calculé la dérivée seconde des courbes obtenues pour le matériau B et pour les blancs, par la méthode de Savitzky-Golay. Les pics négatifs qui apparaissent par dérivée seconde correspondent à des pics superposés dans le chromatogramme. Les résultats obtenus sont rassemblés figures V-14 et V-15. La dérivée seconde montre deux pics négatifs sous le troisième pic du matériau B, ce qui témoigne donc de la présence de plusieurs pics superposés. Cependant, le même résultat est obtenu pour les dérivées secondes des blancs. Nous ne pouvons donc pas lever l'ambiguïté et conclure de façon certaine à l'existence de produits de dégradation sous le troisième pic des chromatogrammes du matériau B. Une séparation plus précise de ce pic par HPLC est nécessaire.

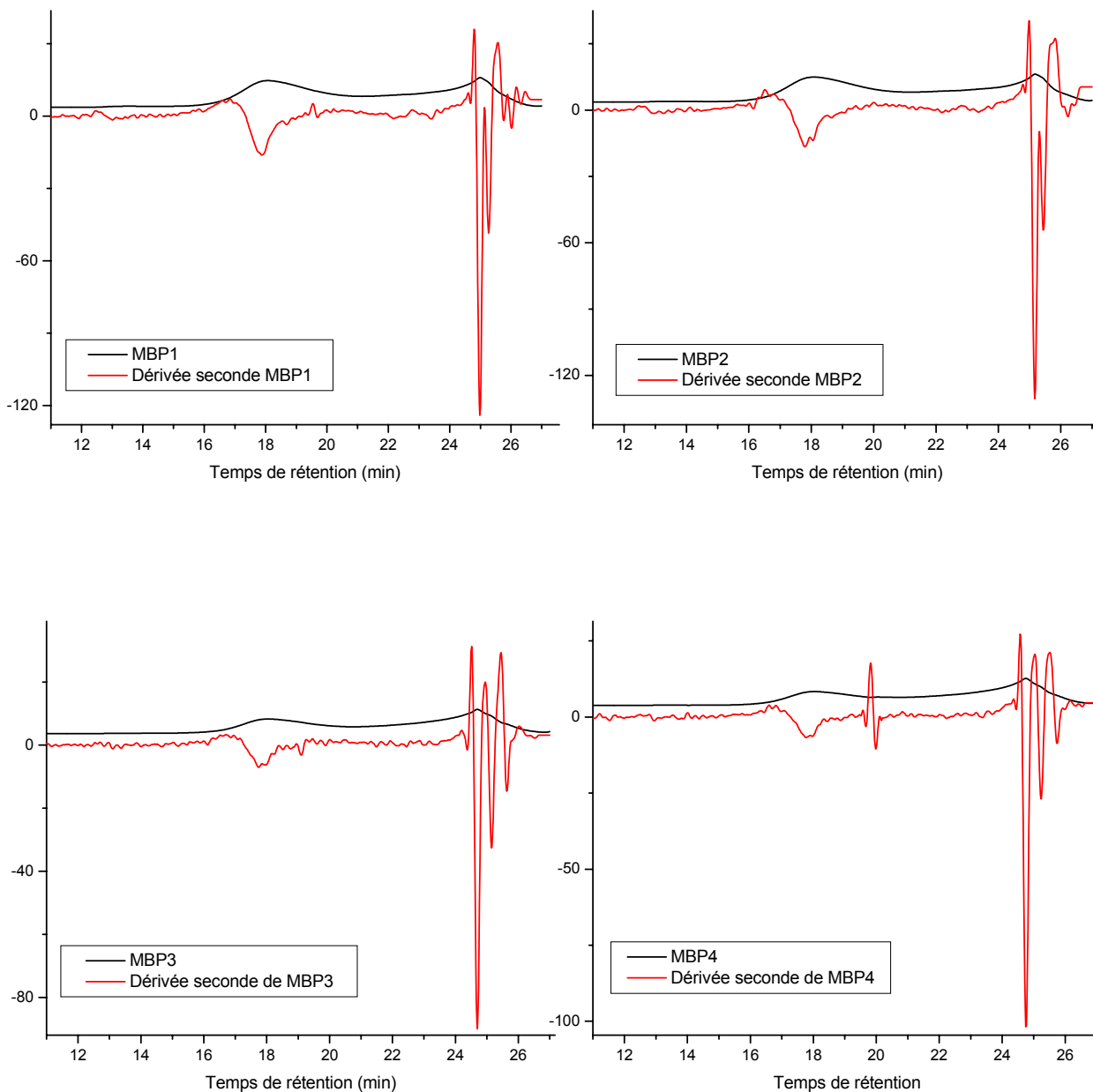


Figure V-14 : Dérivées seconde des courbes des quatre injections du matériau BP

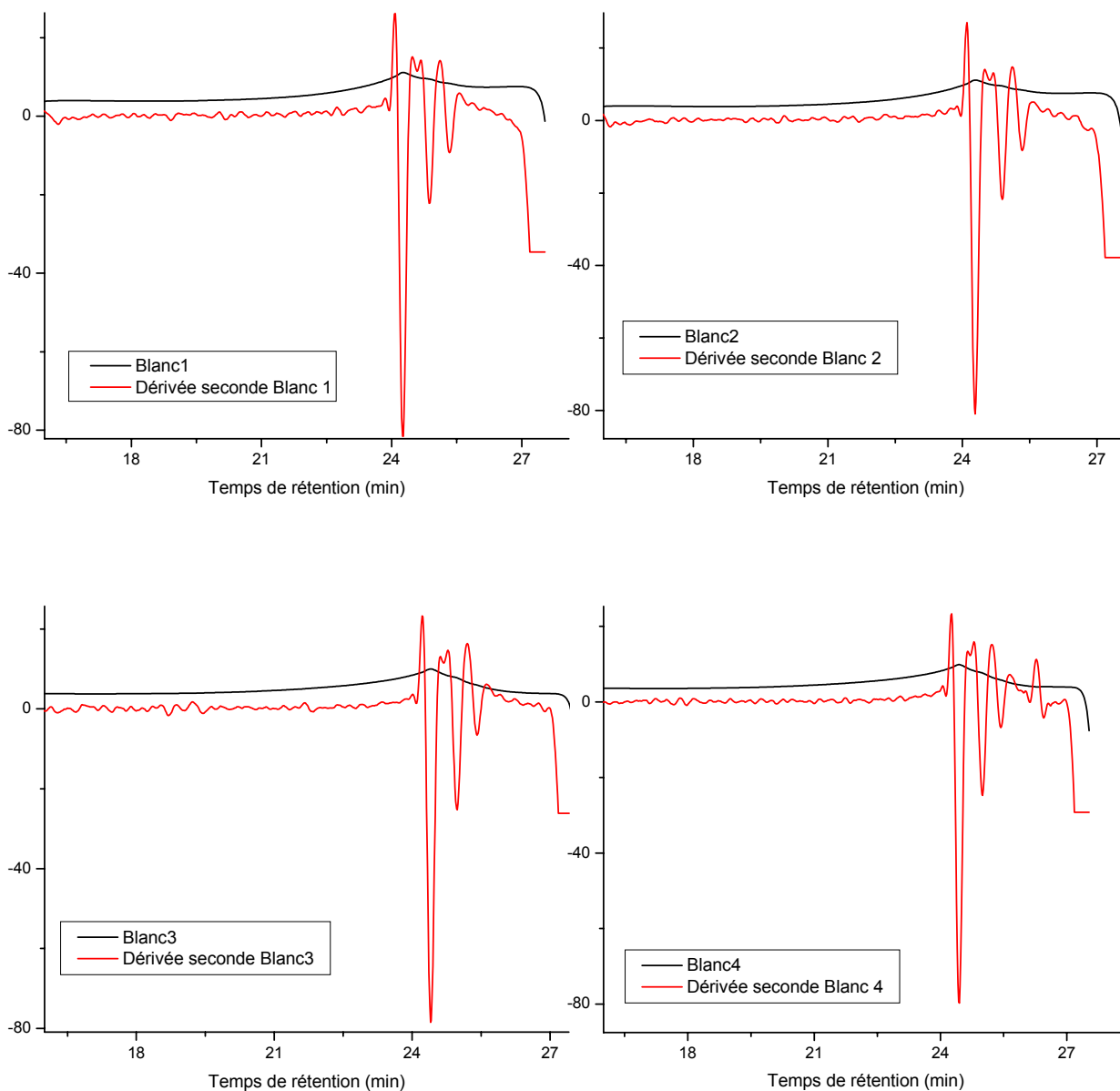


Figure V-15 : Dérivées secondes des courbes des quatre injections du blanc

3.2.1.2 Matériau C

Chromatographie par perméation de gel

Les chromatogrammes obtenus sur les produits de dégradation du matériau C après 180 jours de test (62% de biodégradation) sont présentés sur la figure V-16. Ils sont comparés au chromatogramme du matériau C témoin.

Les mêmes observations peuvent être faites que pour le matériau B, à savoir que tous les extraits issus des réacteurs de biodégradation présentent un pic vers 18 min lié à

l'inoculum. L'extraction de la laine de verre et du rinçage des réacteurs ne diffère pas de celles du blanc. Nous nous intéressons donc plus particulièrement au chromatogramme du MCP. Le premier pic correspondant à l'amidon a totalement disparu. Le second pic semble se décaler vers les plus faibles masses moléculaires. Il présente la particularité de ne pas revenir à la ligne de base, traduisant ainsi la présence d'un nombre important de composés de tailles différentes.

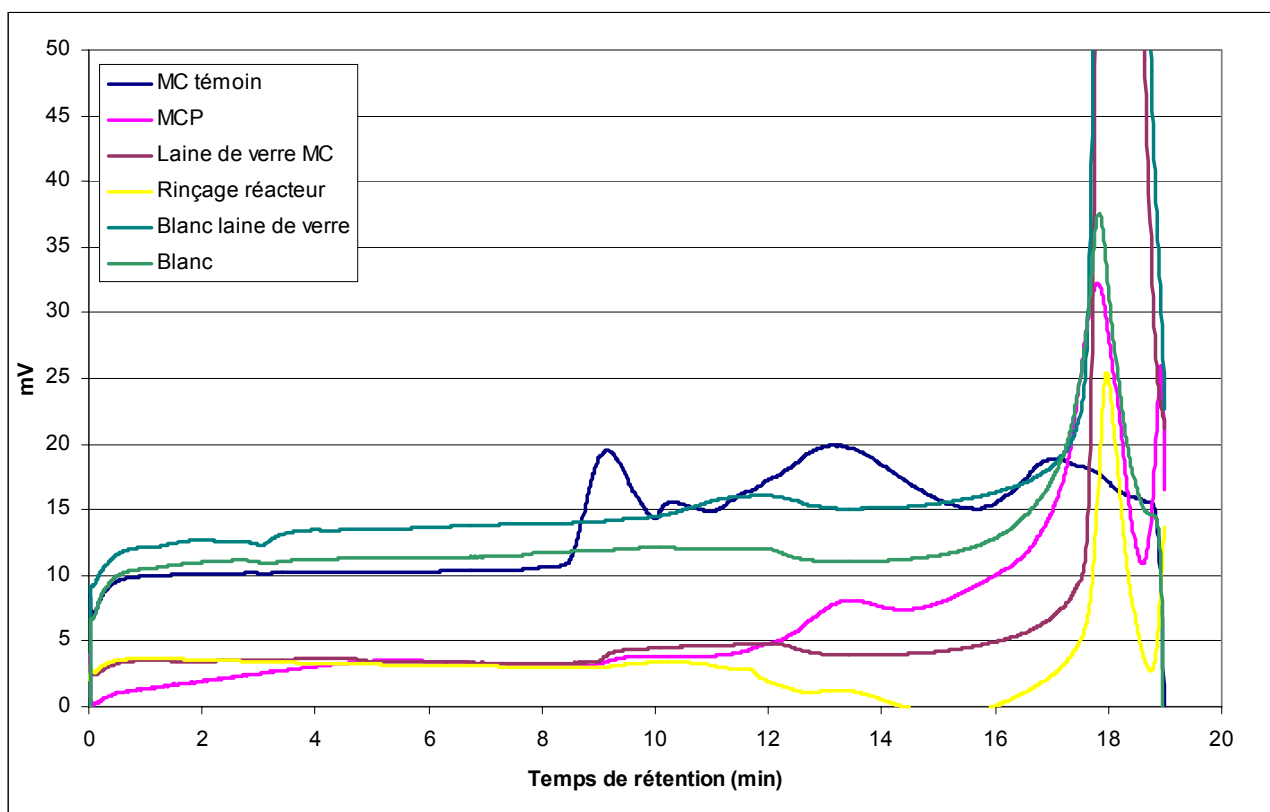


Figure V-16 : Chromatogrammes des résidus et produits de dégradation du Matériau C sur pouzzolane (Mixte-C) (GPC7)

Il semble donc que, outre l'amidon qui a totalement disparu, le PCL et le mélange PCL-polyuréthane (Estane) se soient partiellement dégradés, libérant ainsi des produits de dégradation de différentes masses moléculaires.

Afin d'analyser plus finement le mécanisme de dégradation du matériau C, la fermentation a été arrêtée tous les 12% de biodégradation. Des extraits de ces différents prélèvements ont été injectés.

Les quatre premiers prélèvements correspondant aux taux de biodégradation de 12, 24, 36 et 48%, injectés sur deux colonnes Mixte-C conduisent aux courbes présentées sur la figure V-17.

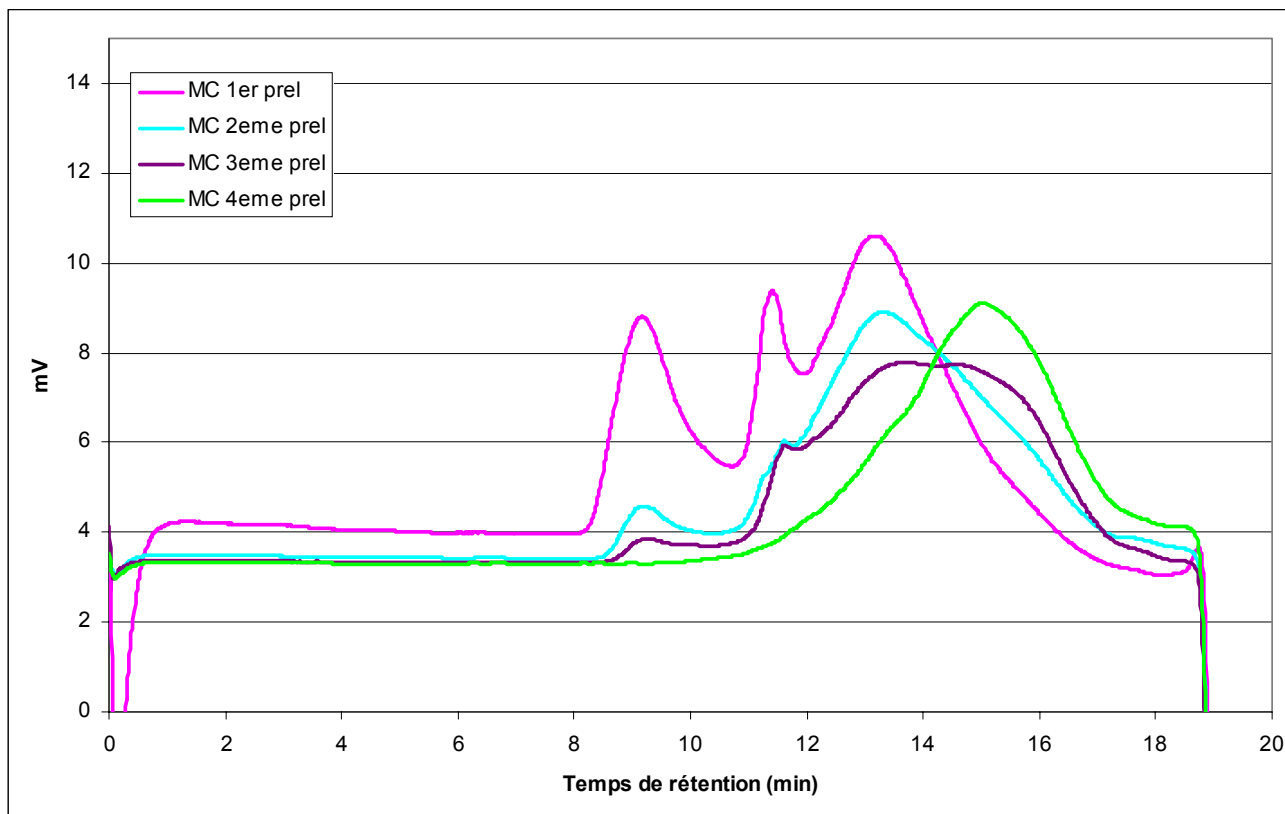


Figure V-17 : Suivi de la dégradation du matériau C sur pouzzolane (Mixte-C) (Préparation 1) (GPC8)

Tout d'abord, nous observons une diminution progressive du premier pic à 9.2 min, sans décalage des temps de rétention. Il a totalement disparu au quatrième prélèvement. Nous pouvons donc situer la disparition de l'amidon entre 36 et 48% de dégradation. De même, le deuxième pic à 11.5 min, disparaît de façon progressive. En revanche, le troisième pic à 13.25 min, voit, à la fois, son intensité diminuer et son temps de rétention au sommet du pic augmenter. Le pic se décale vers les masses moléculaires plus faibles. Nous aurions donc deux types de mécanismes différents selon la nature des polymères présents dans le matériau.

Pour le premier pic correspondant à l'amidon, des chaînes entières de même masse moléculaire se décrocheraient du matériau et seraient aussitôt assimilées par les microorganismes.

Pour le pic, à 13.25 min, correspondant au PCL (temps de rétention de 12.75 min pour le PCL témoin) et à l'Estane (temps de rétention de 13.1 min pour l'Estane témoin), la longueur des chaînes polymères diminuerait progressivement. De petites molécules se décrocheraient des longues chaînes. Une chaîne de masse M_n se décomposerait en deux chaînes de masse M_{n-i} et M_i . Ces deux chaînes se décomposerait à leur tour. Le pic correspondant à la masse M_n s'étalerait donc et se décalerait vers les plus petites masses moléculaires.

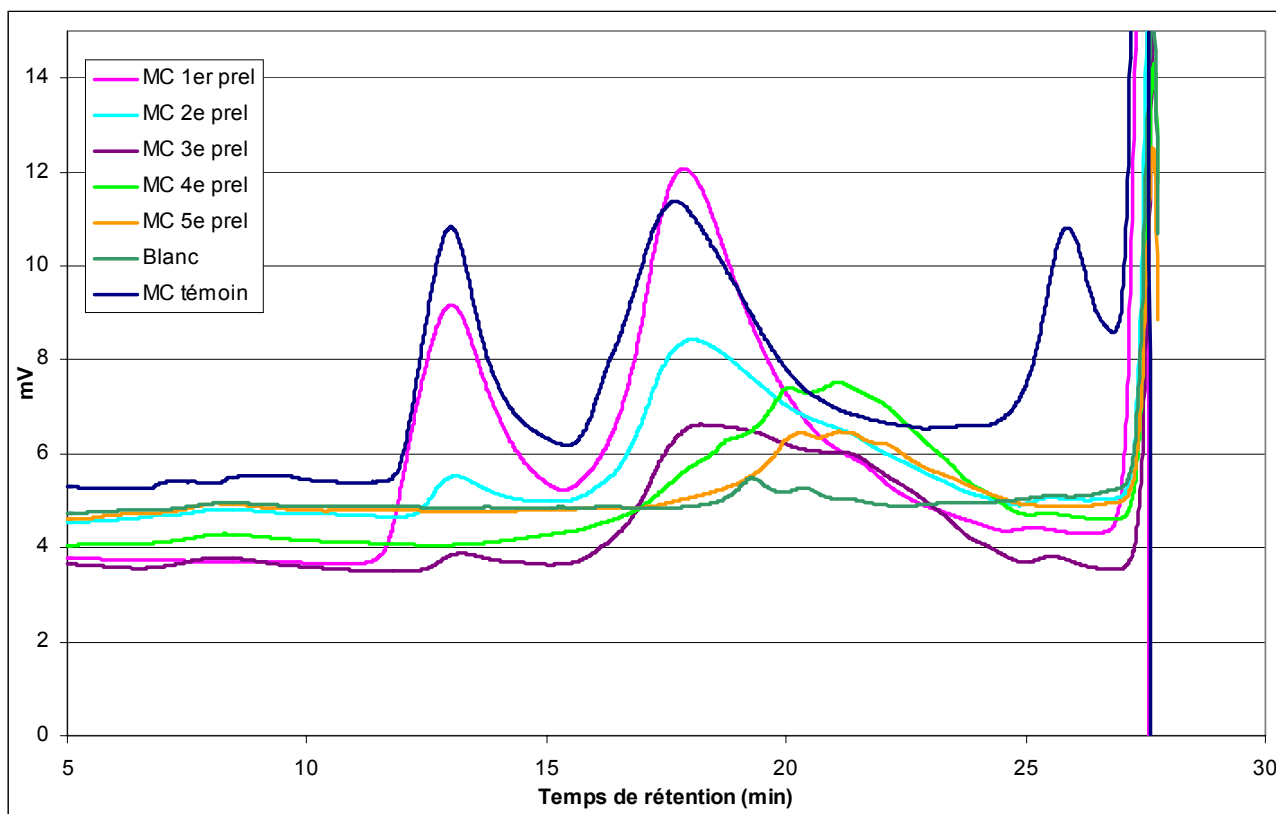


Figure V-18 : Suivi de la dégradation du matériau C sur pouzzolane (Mixte-C, Mixte-E) (Préparation 1) (GPC9)

Nous avons ensuite injecté ces mêmes échantillons ainsi que les extraits du cinquième prélèvement, correspondant à 60% de biodégradation, et du blanc en fin de réaction, sur deux colonnes Mixte-C et une colonne Mixte-E montées en série (Figure V-18). Nous constatons que le pic intermédiaire entre les deux pics principaux, apparaissant à 11.5 min sur les Mixte-C (Figure V-17), n'est plus visible, bien que nous ayons injecté les mêmes échantillons. Il semble qu'il y ait un problème de conservation des échantillons. Nous avons alors préparé, à nouveau, une série d'extraction des cinq prélèvements et du blanc. Puis les échantillons précédemment injectés sur Mixte-C, puis sur Mixte-C et Mixte-E, ont été injectés à nouveau

sur Mixte-C seules, pour déterminer si la disparition de ce pic provient du changement de colonnes ou de la conservation des échantillons. Les résultats sont rassemblés figures V-19 et V-20.

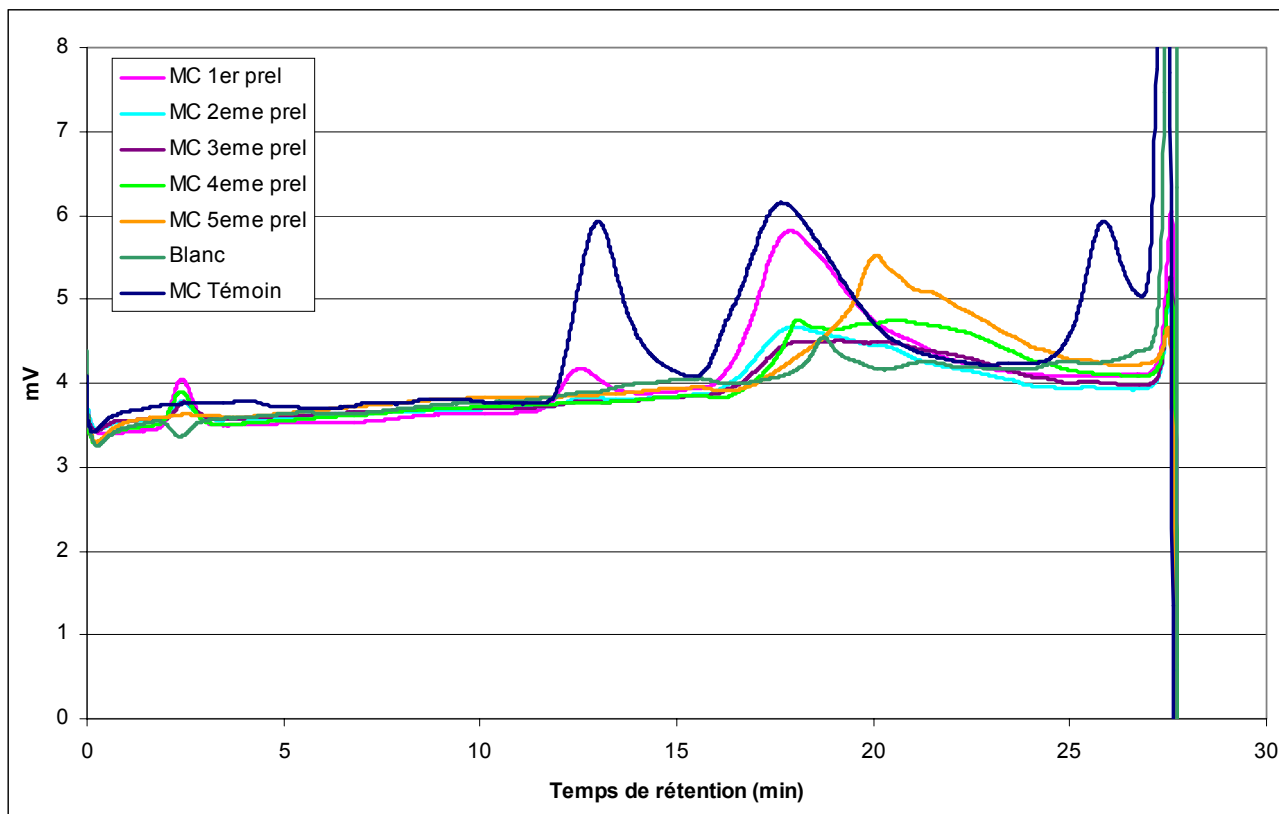


Figure V-19 : Suivi de la dégradation du matériau C sur pouzzolane (Mixte-C, Mixte-E) (Préparation 2) (GPC10)

Le pic à 11.5 min n'apparaît plus de façon aussi significative que sur la figure V-17. Les mêmes échantillons injectés sur les mêmes colonnes (Figure V-20) ne conduisent pas aux mêmes chromatogrammes. Nous avons donc un problème de conservation des échantillons. D'autre part, de nouveaux échantillons injectés sur Mixte-C et E (Figure V-19) et sur Mixte-C seules (non représentés), ne font toujours pas apparaître ce pic intermédiaire. Nous sommes aussi confrontés au problème de reproductibilité de l'échantillonnage que nous avons déjà évoqué et à la détérioration du matériau sous l'effet des ultrasons.

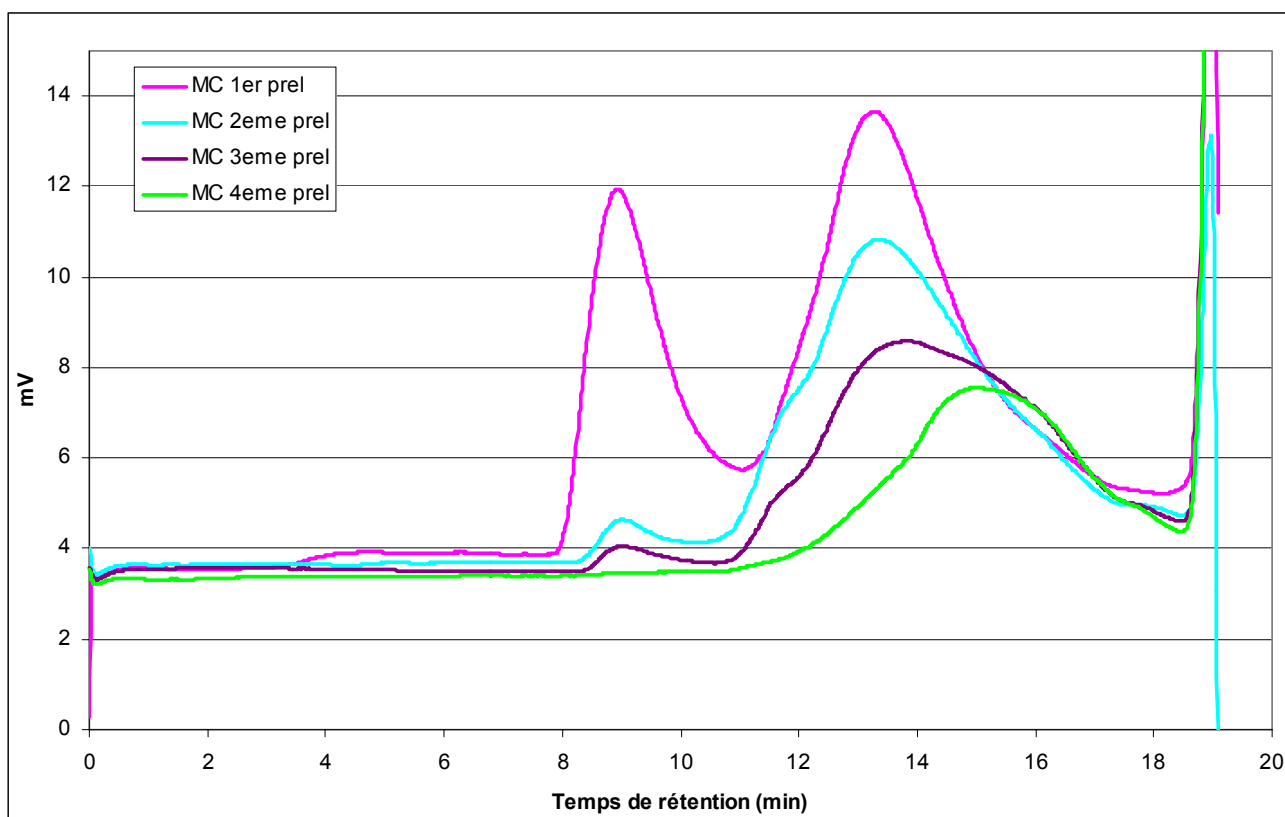


Figure V-20 : Suivi de la dégradation du matériau C sur pouzzolane (Mixte-C) (Préparation 2) (GPC11)

Toutefois, l'allure des courbes reste identique pour toutes les autres figures, quelle que soient la date de préparation et les colonnes utilisées. Comme nous l'avons décrit pour la figure V-17, nous observons une diminution du pic de l'amidon jusqu'à une disparition totale entre les 3^{ème} et 4^{ème} prélèvements. Parallèlement, à partir du 2^{ème} prélèvement, le pic du PCL et de l'Estane diminue en intensité puis s'étale et se décale vers les masses moléculaires plus faibles. Pour les échantillons injectés sur les colonnes Mixte-C et Mixte-E (Figures V-18 et V-19), il semble que pour les 4^{ème} et 5^{ème} prélèvements, ce pic se décompose en plusieurs produits qui se superposent sous ce même pic. L'Estane est composé d'une partie polyuréthane et d'une partie PCL (que nous appellerons PCL lié). De plus, le matériau C contient du PCL ne provenant pas de l'Estane (PCL libre). Tosin *et al.* (1998) ont montré que la partie PCL lié de l'Estane se dégrade plus rapidement que la partie polyuréthane. Par ailleurs, le PCL libre se dégrade aussi et nous pouvons supposer qu'il se dégrade plus rapidement que le PCL lié. Avant dégradation, le PCL libre, le PCL lié et le polyuréthane sortent au même temps de rétention. Leurs dégradations s'effectuent donc à des vitesses différentes. Le pic s'étale et laisse apparaître les pics correspondant au PCL libre, au PCL lié et au polyuréthane en cours de dégradation.

La partie polyuréthane du matériau C est susceptible de relarguer, en se dégradant, une molécule toxique, le 4,4' diamino diphényle méthane (MDA). Nous avons cherché à déterminer à partir de quel prélèvement le MDA apparaît et en quelle concentration.

Recherche du 4,4' diamino diphényle méthane par HPLC-UV

Pour cela, nous avons utilisé la chromatographie liquide avec un détecteur UV.

Une analyse qualitative nous a permis d'identifier la molécule. Son temps de rétention est de 11.7 min. Parallèlement, une analyse quantitative du MDA, dans les différents extraits, a été réalisée et nous a permis de tracer la courbe reliant la concentration en MDA au taux de biodégradation du matériau C (Figure V-21). Le MDA est présent à partir du troisième prélèvement. Nous pouvons alors supposer que la dégradation de la partie polyuréthane commence vers 36% de biodégradation. La concentration en MDA dans les extraits augmente de façon linéaire jusqu'au dernier prélèvement où elle est égale à 0.085 mg/l. Cette concentration reste faible. La dégradation de la partie polyuréthane est donc très limitée.

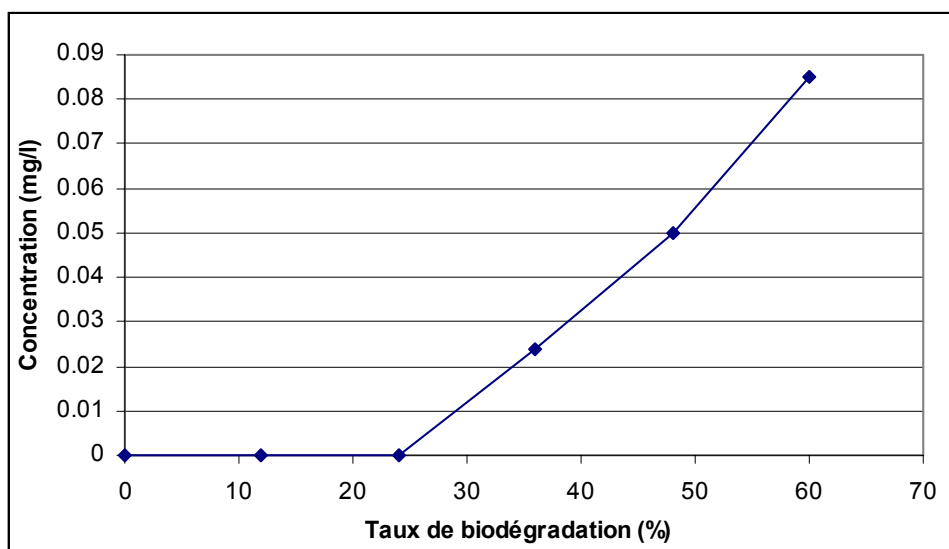


Figure V-21 : Concentration en MDA dans les extraits en fonction du taux de biodégradation du matériau C

En effet, nous pouvons calculer la valeur théorique maximale de MDA relarguée par le matériau C. Les réacteurs contiennent 3.93 mg de matériau C par gramme de matière sèche. Les extraits sont préparés en mélangeant 45 g de matière sèche dans 30 g d'eau. La concentration maximale dans les extraits en matériau C est donc de 5.90 mg/ml. L'analyse élémentaire indique 0.68% d'azote dans le matériau C. Nous avons donc au maximum

40.12 mg/l d'azote dans les extraits. Au 5^{ème} prélèvement, 60% du matériau sont dégradés. Donc 24 mg/l d'azote ont pu se transformer en MDA. Le taux d'azote dans le MDA est de 14.13%. Si on considère que tout l'azote compris dans le matériau C provient de l'Estane et, donc peut se transformer en MDA, on devrait récupérer au maximum dans les extraits 170 mg/l de MDA. La concentration obtenue est beaucoup plus faible. L'extraction à l'eau n'est pas quantitative, mais nous pouvons déduire que la dégradation de la partie polyuréthane est très limitée par rapport au reste du polymère.

Cette technique très sensible nous permet d'identifier et de doser de façon certaine le MDA. Nous pouvons ainsi déterminer à quel moment de la dégradation ce dernier apparaît et en quelle concentration. Cette méthode est ciblée sur une molécule, mais permet de mettre en évidence de façon rapide la présence d'un composé toxique, produit de la dégradation d'un composé non-toxique. Dans notre cas, la nature de la molécule à rechercher était connue, il a donc été simple de mettre au point la méthode analytique. Dans le cas, d'un composé inconnu, il sera nécessaire d'analyser en détails le matériau de départ et prédire quelles seront les molécules susceptibles de se former. L'analyse sera alors plus longue.

3.2.2 Tests sur vermiculite en simulation de compost - Analyses sur les produits et résidus de dégradation du matériau B

Résonance magnétique nucléaire et spectroscopie Infra-rouge

La vermiculite étant beaucoup plus concentrée en matériau que la pouzzolane, la concentration des extraits permet donc la réalisation d'analyses en spectroscopie IR. Les spectres obtenus (Annexe 2) ne font apparaître aucune différence entre les échantillons MB t=0j et MB t=40j. Il n'y a donc pas de modifications de structures entre ces deux prélèvements. Visiblement, il n'y a pas eu de dégradation préférentielle du polyester aliphatique par rapport au polyester aromatique. En revanche, l'échantillon MB t=90j est totalement différent des deux autres. Les bandes correspondant aux fonctions ester (1720 cm^{-1}) et méthylène (2962 cm^{-1}) ont disparu. Les seules bandes visibles sont également présentes sur les spectres des blancs. Le matériau a donc totalement été dégradé. Il ne reste aucun produit de dégradation contenant des fonctions ester ou méthylène.

Les spectres RMN des échantillons MB t=0j et MB t=40j sont assez similaires alors que le spectre de l'échantillon MB t=90j ne présente plus qu'un signal correspondant au

chloroforme (Annexe 1). Le matériau a donc totalement disparu et les produits de dégradation qui pourraient persister dans le réacteur ne seraient pas solubles dans le chloroforme. Nous avons également calculé le rapport $H_{4.08}/H_{4.35}$ pour les spectres des échantillons MB $t=0j$ et MB $t=40j$. Sa diminution est encore moins significative que pour la dégradation sur pouzzolane. De plus, la partie aromatique a totalement disparu en fin de dégradation. Il semble donc qu'en conditions de compost, la partie aliphatique ne se dégrade pas de façon préférentielle par rapport à la partie aromatique. La dégradation du copolyester serait donc simultanée pour ses deux constituants.

Chromatographie par Perméation de Gel

Les différents prélèvements du matériau B ont été extraits au NMP puis injectés en GCP afin d'étudier le comportement de biodégradation de ce matériau en situation de compost. Les prélèvements étant arrivés progressivement, nous les avons étudiés les uns après les autres.

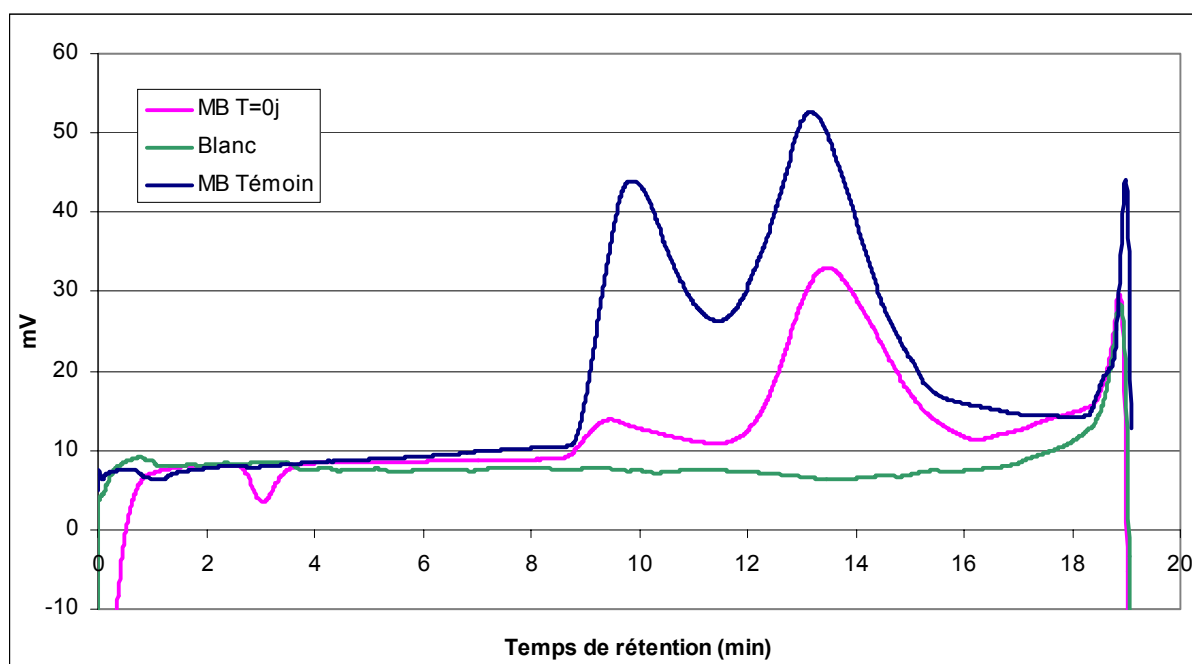


Figure V-22 : Matériau B extrait de la vermiculite après 0 jour de dégradation dans la NMP (Mixte-C) (GPC12)

Tout d'abord, nous avons extrait les échantillons de blanc et de matériau B pour le prélèvement à $t=0$ jour (Figure V-22). En comparant les chromatogrammes du témoin et du matériau B à $t=0j$, nous constatons que le premier pic a déjà pratiquement disparu. Pourtant,

l'échantillon a été prélevé aussitôt après l'ajout du matériau B dans la vermiculite activée. Il est possible que la réaction ait commencé pendant le transport entre les deux laboratoires. Nous avons donc décidé de fabriquer l'échantillon $t=0j$ au moment de son utilisation.

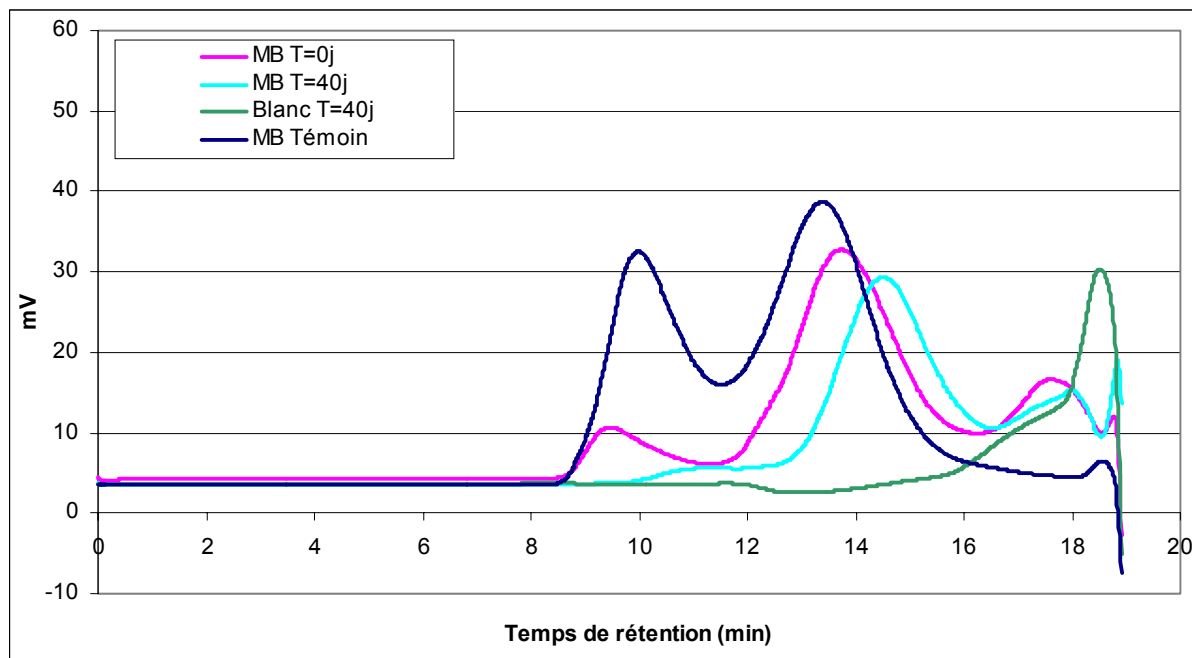


Figure V-23 : Suivi de la biodégradation du matériau B sur vermiculite (Mixte-C) (GPC13)

A l'arrivée des échantillons de blanc et de matériau B à $t=40j$, nous avons préparé de nouveaux extraits. Ils ont été injectés sur deux colonnes Mixte-C (Figure V-23). Nous observons un décalage des temps de rétention entre MB $t=0j$ et MB $t=40j$. Il semble que les mécanismes de biodégradation soient différents de ceux observés précédemment. Pour vérifier cette hypothèse, ces extraits ont été à nouveau préparés au moment de l'analyse du dernier prélèvement à $t=90j$. Ils ont été injectés sur deux colonnes Mixte-C et une colonne Mixte-E montées en série (Figure V-24). Le même phénomène est observé.

Cependant, nous constatons que malgré la préparation d'un nouvel échantillon $t=0j$, le premier pic est moins intense que celui du témoin (figure V-23). Nous avons supposé que l'étape de séchage des échantillons pouvait modifier les propriétés de ces derniers. Nous avons donc placé un échantillon de matériau B, à l'étuve à 62°C , pendant 24h, puis nous l'avons solubilisé dans la NMP et injecté. La comparaison de son chromatogramme avec celui du témoin ne montre pas de différence. La difficulté pour solubiliser les extraits $t=0j$ ne proviendrait donc pas de la température de séchage.

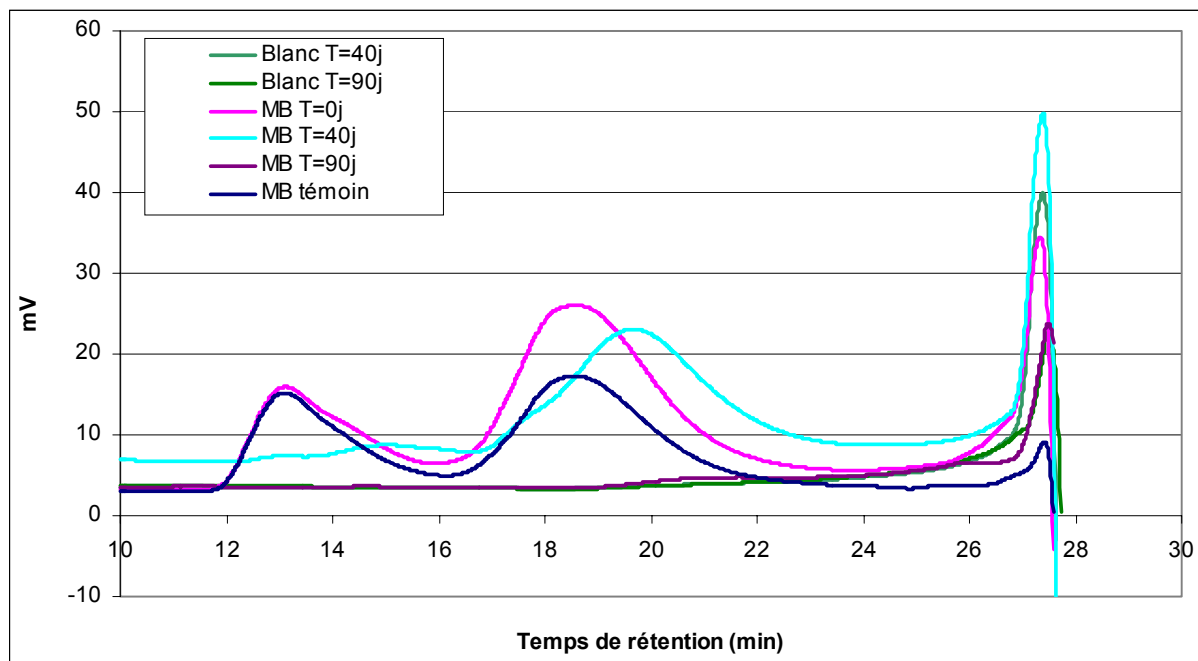


Figure V-24 : Suivi de la biodégradation du matériau B sur vermiculite (Mixte-C, Mixte-E) (GPC14)

Nous observons pour les différentes injections, une diminution importante du pic de l'amidon, à partir de $t=40j$. Contrairement aux phénomènes observés sur pouzzolane, une partie de ce pic persiste et se décale vers les temps de rétention plus élevés. Le deuxième pic ne s'étale pas mais se décale simplement vers les masses moléculaires plus faibles et son aire ne diminue pas. La dégradation du copolymère conduirait à la perte de fragments de copolymère et donc à une diminution de la masse moléculaire globale, ces fragments étant facilement bioassimilés par les microorganismes et transformés en dioxyde de carbone. A $t=90j$, nous constatons qu'il ne subsiste plus rien dans les échantillons. Le taux de biodégradation est alors compris entre 90 et 100%. Le carbone résiduaire correspond à la formation de la nouvelle biomasse.

Afin de confirmer l'existence d'un décalage entre les deuxièmes pics pour les prélèvements $t=0$ et $t=40j$, nous avons calculé l'intervalle de confiance pour les temps de rétention. Pour cela nous avons utilisé six valeurs pour les échantillons injectés six fois sur les colonnes Mixte-C et sur quatre valeurs pour les échantillons injectés quatre fois sur les colonnes Mixte-C et Mixte-E. Les résultats sont rassemblés dans le tableau V-XVI.

Tableau V-XVI : Calcul d'erreur sur les temps de rétention du deuxième pic sur le matériau B

	Mixte-C/Mixte-E		Mixte-C	
	<i>T=0</i>	<i>T=40</i>	<i>T=0</i>	<i>T=40</i>
<i>Moyenne</i>	18.575	19.671	13.739	14.511
<i>Ecart-type</i>	0.009	0.008	0.020	0.009
<i>Intervalle</i>	0.026	0.022	0.049	0.021
<i>Temps de rétention</i>	18.549-18.601	19.649-19.693	13.690-13.788	14.490-14.533

Nous vérifions que la moyenne du temps de rétention pour $t=0j$ ne se trouve pas dans l'intervalle de confiance de celle à $t=40j$ et ceci pour les deux types de colonnes. Et inversement, la moyenne du temps de rétention pour $t=40j$ ne se trouve pas dans l'intervalle de confiance pour $t=0$ jour. Nous avons donc deux pics distincts.

Il est délicat de comparer les courbes obtenues sur pouzzolane et sur vermiculite, car le taux de biodégradation atteint n'est pas le même. Les phénomènes se produisant au delà de 23% de biodégradation ne sont pas visibles sur pouzzolane. Cependant, nous avons observé sur le matériau C, où le taux de biodégradation atteint est plus élevé, un étalement du pic correspondant au PCL. Il ne s'agit pas de la même molécule, mais de la même famille chimique, les polyesters. Nous nous attendons donc à une attaque similaire des microorganismes sur la fonction ester. Il semble donc que d'autres phénomènes entrent en jeu en simulation de compost comme, par exemple, l'hydrolyse chimique, favorisée par des températures plus élevées.

3.2.3 Tests en milieu réel - Analyses sur les produits et résidus de dégradation du matériau B

Analyse enthalpique différentielle

Les échantillons de matériau B, non exposés aux UV, enfouis au Cemagref (Chapitre 3) et récupérés après une période connue d'enfouissement ont été analysés par DSC suivant deux programmes de température.

Les résultats obtenus pour le premier programme de température (Essai DSC1, Paragraphe 3.1.3) sont présentés figure V-25.

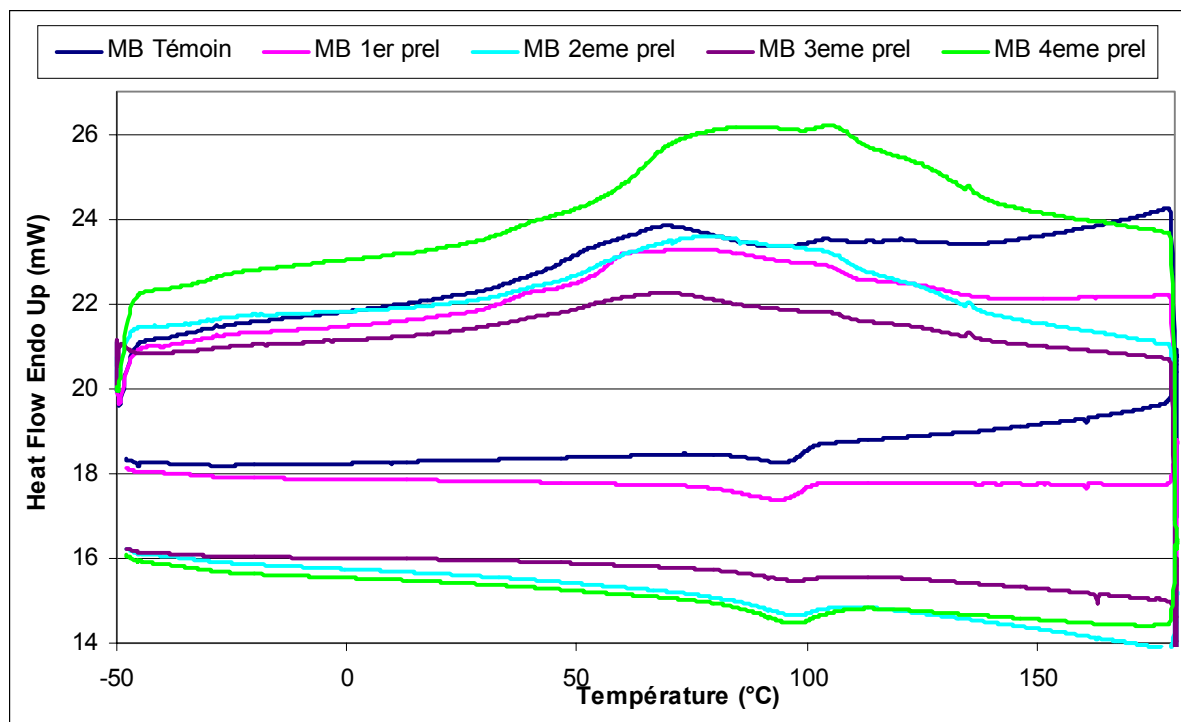


Figure V-25 : Analyse DSC du matériau B en cours de dégradation en milieu réel (DSC1)

Les graphes des quatre premiers prélèvements et du matériau témoin font apparaître deux pics lors de la montée en température et un seul lors du refroidissement. Le premier pic correspond à la fusion des différents arrangements entre l'amidon et le polyester, ce qui explique sa forme assez large. Le second pic correspond à la fusion de l'arrangement le plus stable, soit celui du PBT (polybutylène téréphtalate). On retrouve, lors du refroidissement, le pic de la recristallisation dans cet arrangement. Etant le plus stable, nous supposons que les chaînes du polymère se sont réarrangées pour cristalliser dans cet état (Shaik *et al.*, 2001). Dans le cas du MB témoin, les deux premiers pics sont assez distincts. L'échantillon n'a pas encore été soumis aux microorganismes. Sa structure physique n'a donc pas été modifiée et le nombre d'arrangements entre les chaînes est réduit. Dans le cas du MB 1^{er} prel, nous observons un autre pic, à 40°C, lors de la montée en température. Ce pic correspond à la relaxation de l'amidon. Celui-ci a commencé à être dégradé. Sa structure cristalline a été modifiée. Ceci nous permet de voir qu'il reste encore de l'amidon lors du premier prélèvement. Il semble que ce phénomène ait disparu à partir du deuxième prélèvement. A ce stade de la dégradation, il n'y a donc plus d'amidon.

Afin d'identifier avec plus de certitude les phénomènes se produisant entre 40 et 120°C, nous avons procédé à une deuxième série d'analyses (essai DSC2). Les résultats sont

rassemblés sur la figure V-26. Le pic de relaxation de l'amidon n'est plus visible. En effet, la matériau est stabilisé à 25°C, puis il est chauffé à partir de cette température. Son organisation est différente d'un matériau stabilisé à -50°C comme c'était le cas lors de l'essai DSC1.

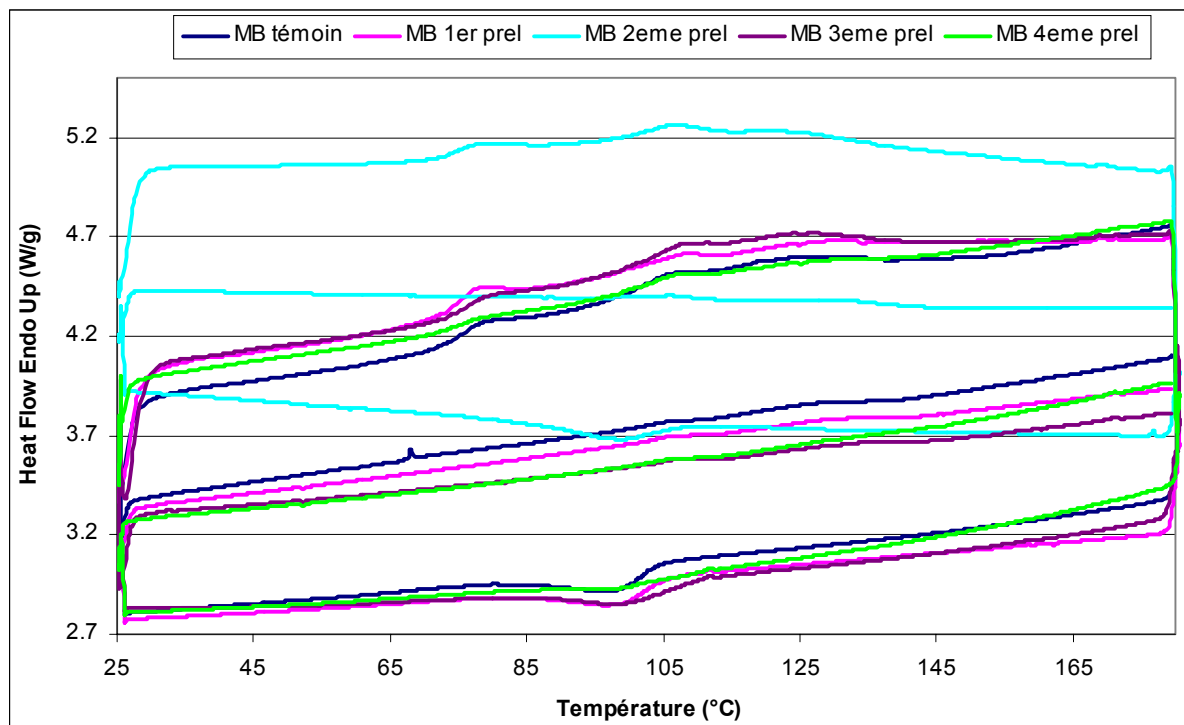


Figure V-26 : Analyse DSC du matériau B en cours de dégradation en milieu réel (DSC2)

Les résultats obtenus sont différents de l'essai précédent. La dégradation du film n'est pas homogène sur sa surface. Selon l'endroit du prélèvement, la dégradation sera plus ou moins avancée. Lors de l'essai DSC1, les prélèvements ont été effectués sur des parties fortement dégradées alors que lors de l'essai DSC2 ils l'ont été sur des parties faiblement dégradées. L'allure des courbes est néanmoins similaire au cours des prélèvements. Trois pics endothermiques sont visibles à la première montée en température, puis un seul pic exothermique pour le refroidissement et deux pics endothermiques lors de la deuxième montée en température. L'intensité de ces pics diminue au fur et à mesure des prélèvements. Les courbes ont été normalisées par rapport à la masse de chaque échantillon. Il est donc possible de comparer les intensités. La biodégradation d'un matériau commence par celle de sa partie amorphe, mais il semble qu'elle modifie aussi la structure cristalline du matériau. En effet, l'intensité des pics de fusion et de cristallisation diminuant, la proportion de phase cristalline dans le matériau diminue. Lors de la deuxième montée en température, les intensités sont encore plus faibles, les pics deviennent à peine visibles. Les chaînes se sont

réarrangées, lors du refroidissement, de telle façon que leur état cristallin initial n'est plus accessible.

Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence la modification de la structure du polymère au cours de la biodégradation. De plus, nous avons pu constater la disparition de l'amidon entre le premier et le deuxième prélèvement.

Microscope électronique à balayage

Les analyses par microscope électronique à balayage ont tout d'abord été effectuées sur le matériau B témoin (avant dégradation). La présence d'amidon au sein de la structure est matérialisée par des granules blanches, de tailles variées et réparties de façon homogène à la surface du matériau (Figure V-27). Il semble intégré dans la structure du polymère mais pas fixé par liaison chimique à la partie polyester. En effet, Dubois *et al.* (1999) ont greffé des granules d'amidon dans une matrice PCL. Les analyses MEB ont montré une différence importante entre un mélange simple d'amidon et de PCL, et un greffage de l'amidon dans le PCL. La comparaison des images que nous avons obtenues, avec les leurs, montrent qu'il n'y a pas de liaison chimique entre l'amidon et la matrice polyester dans le matériau B. Cependant, l'adhésion de l'amidon dans le copolyester semble avoir été améliorée. Le film, lavé et frotté sous l'eau, ne montre pas de trous laissés par le décrochage des granules d'amidon (Figure V-28). Il est donc possible qu'un agent compatibilisant amphiphile entre l'amidon hydrophile et le copolyester hydrophobe ait été introduit dans le mélange avant la mise en forme du matériau (Avella *et al.*, 2000).

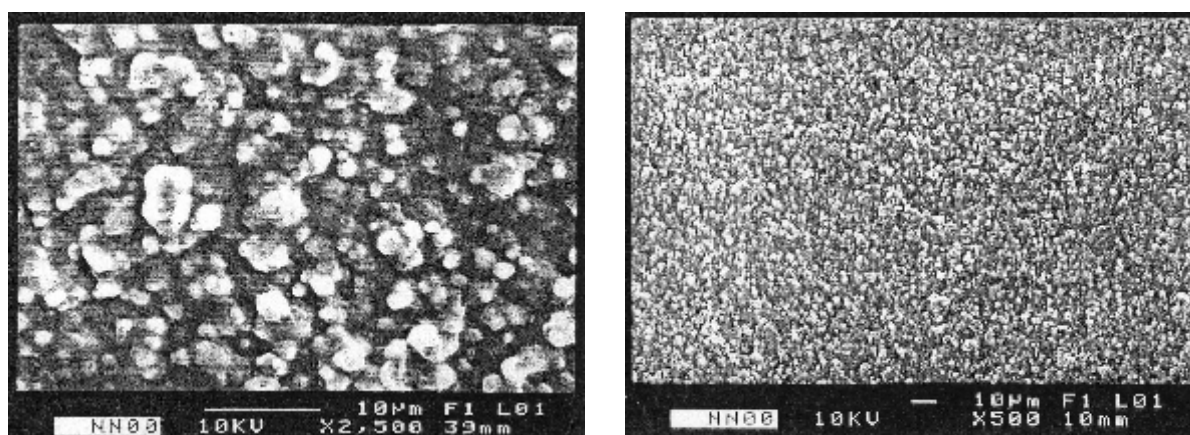


Figure V-27 : Images MEB du film de matériau B avant dégradation

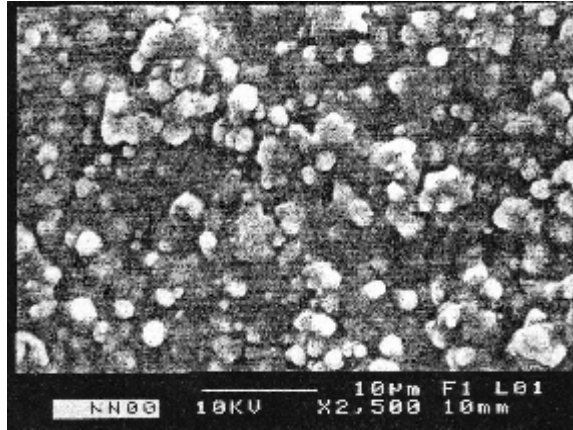


Figure V-28 : Image MEB du film de matériau B lavée à l'eau déminéralisée avant dégradation

A partir du premier prélèvement (Figure V-29), la disparition de l'amidon laisse des trous dans la structure du matériau. Des failles commencent à être visible. A partir du deuxième prélèvement les granules d'amidon ont presque toutes disparues. Au troisième prélèvement, les failles sont de plus en plus grandes. Les trous s'agrandissent et permettent de voir des « couches » à l'intérieur du matériau. On y observe aussi les trous laissés par l'amidon. Le matériau est très fragilisé. Au quatrième prélèvement, par endroit il semble que la couche supérieure ait disparu. La structure organisée semble s'être détruite. Le matériau a perdu sa tenue, il est totalement morcelé.

Ces analyses MEB nous permettent de confirmer que la dégradation du matériau débute par la disparition de l'amidon. Celui-ci semble avoir été totalement dégradé dès le deuxième prélèvement. La dégradation se fait alors en même temps à la surface et dans la masse du matériau. Les trous laissés par l'amidon s'agrandissent jusqu'à ce que des morceaux entiers de film disparaissent.

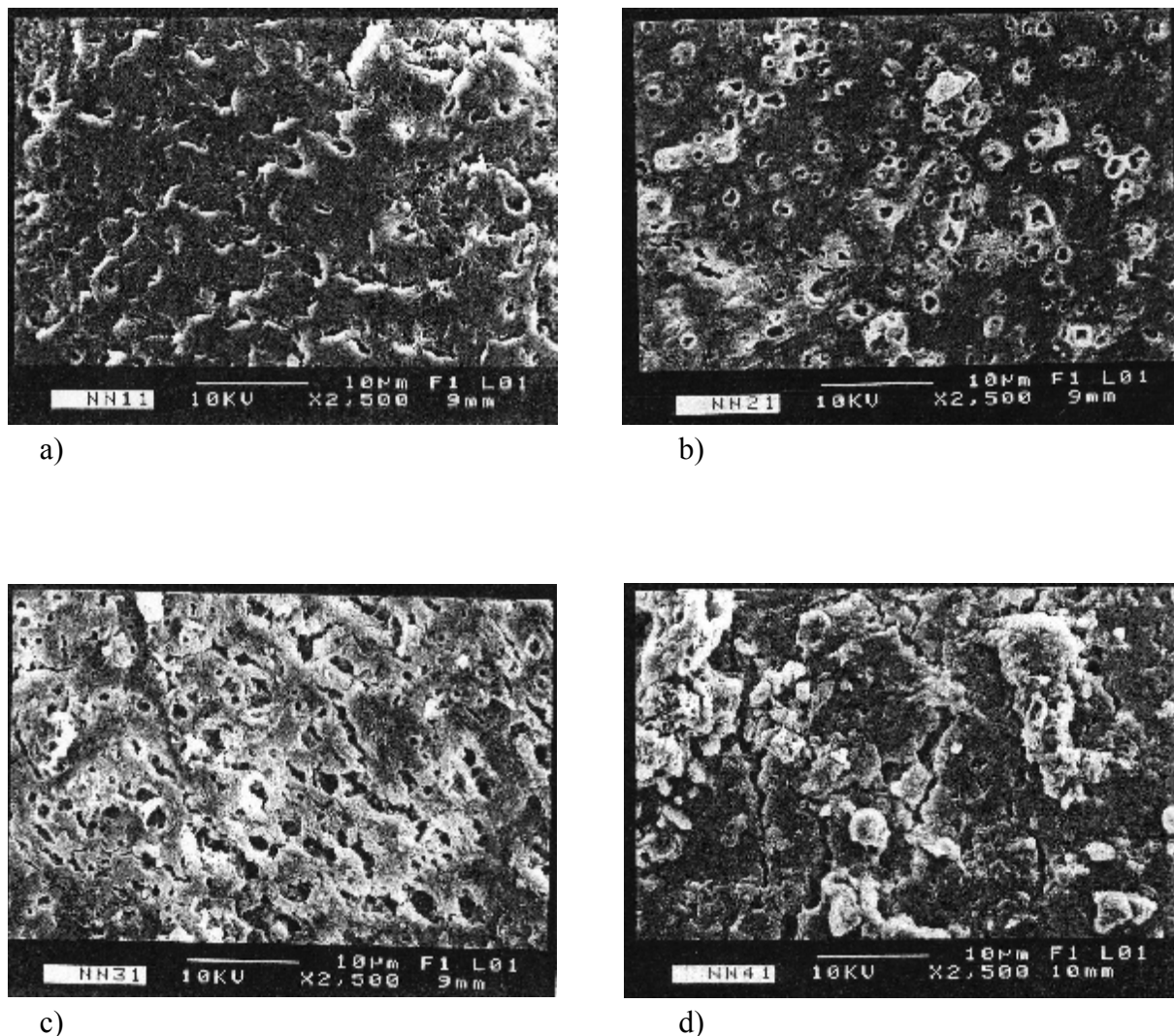


Figure V-29 : Images MEB du film de matériau B après dégradation en sol, a) premier prélèvement, b) deuxième prélèvement, c) troisième prélèvement, d) quatrième prélèvement

Résonance magnétique nucléaire

Le matériau B, non exposé aux UV, enfoui au Cemagref a été analysé par RMN, dans le chloroforme. Tous les signaux observés pour l'échantillon témoin (MB témoin) le sont toujours pour les spectres des quatre prélèvements (Annexe 1). Même pour le dernier prélèvement, qui correspond à une dégradation de 64%, à l'état de poussière, la structure chimique du copolyester peut être identifiée. L'enchaînement, aliphatique-aromatique, reste inchangé. Comme pour la dégradation sur pouzzolane et sur vermiculite, nous avons calculé le rapport $H_{4.08}/H_{4.35}$ sur les deux séries d'analyse. Nous observons une diminution faible et progressive de ce rapport. En effet, nous obtenons une diminution de 17% de ce rapport entre

l'échantillon avant dégradation et le quatrième prélèvement, pour la première série d'analyse, et de 21% pour la seconde. Les erreurs effectuées sur ces calculs d'aire sont importantes, pourtant, les résultats sont reproductibles sur les deux essais. Il semble donc que la dégradation de la partie aliphatique procède de façon un peu plus rapide que la partie aromatique. Cependant l'enchaînement semble inchangé et pour un taux de biodégradation de 64%, il reste encore 47% de polyester aliphatique dans le copolyester.

Chromatographie par perméation de gel

Nous avons analysé, par GPC, les résidus de dégradation en sol des films du matériau B enfouis à Montpellier. Les chromatogrammes obtenus sont représentés figures V-30 et V-31. Les masses moléculaires moyennes en nombre et en masse sont indiquées au-dessus des pics correspondants.

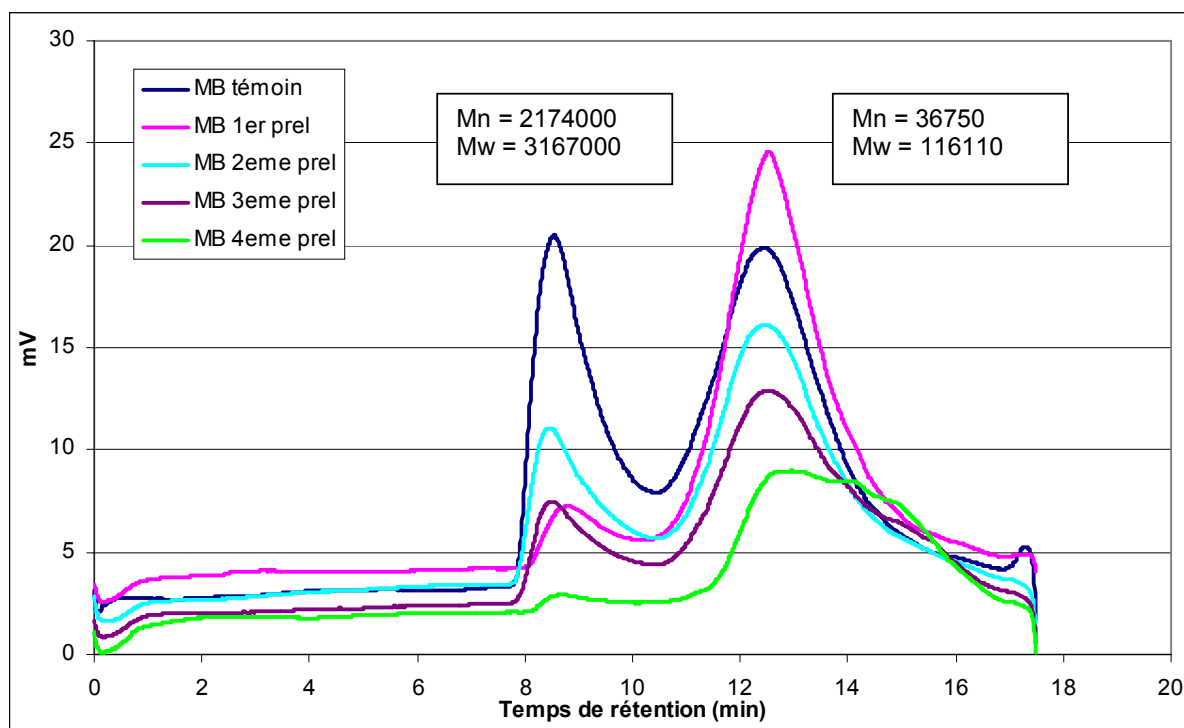


Figure V-30 : Résidus du matériau B non exposé aux UV après enfouissement à Montpellier

Les échantillons ont été préparés avec l'objectif qu'ils aient tous la même concentration. Toutefois, en raison des modifications structurales que les films ont subies, certains se sont solubilisés plus difficilement. Les concentrations en film dans la NMP ne sont donc pas forcément identiques pour tous les prélèvements. Nous avons alors comparé les

surfaces relatives des deux pics principaux de ces échantillons et analysé l'allure générale des courbes. Les rapports des surfaces du pic 1 sur le pic 2 sont donnés dans le tableau V-XVII.

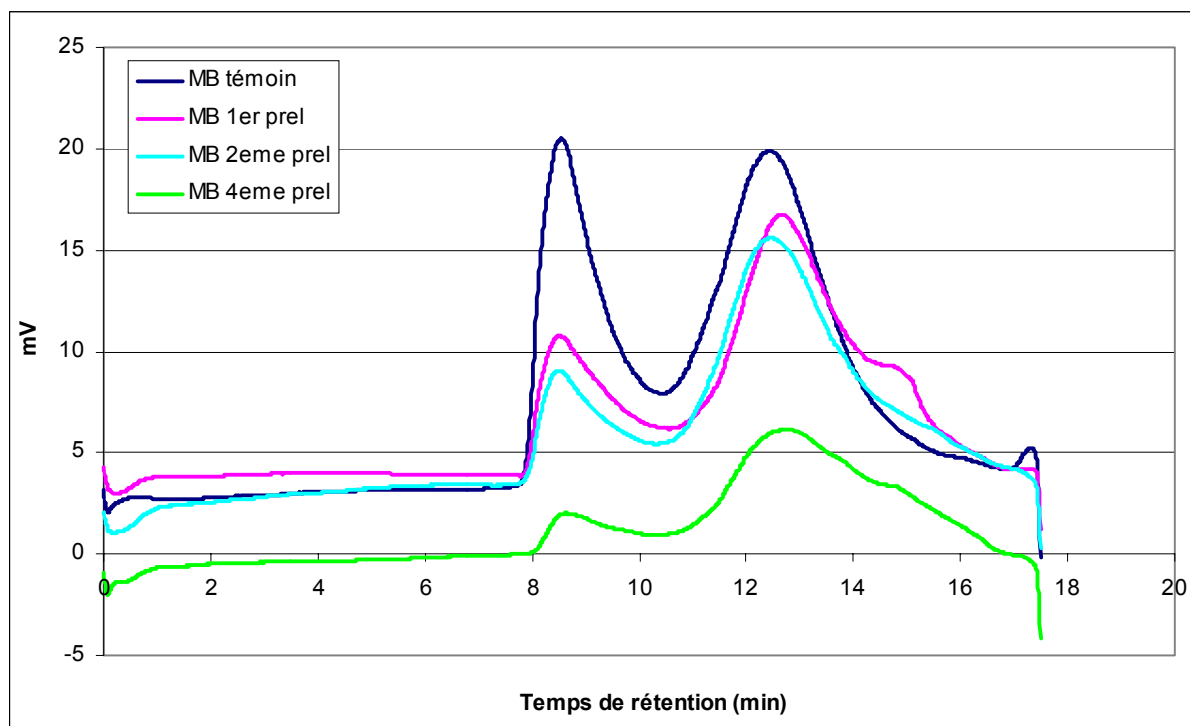


Figure V-31: Résidus du matériau B exposé aux UV après enfouissement à Montpellier

Tableau V-XVII : Rapport des surfaces des pics 1 et 2 pour le matériau B

Rapport Surf _{Pic1} /Surf _{Pic2}	Matériau B non-exposé	Matériau B exposé
R Témoin	0.59	0.59
R 1 ^{er} prélèvement	0.09	0.30
R 2 ^{ème} prélèvement	0.37	0.26
R 2 ^{ème} prélèvement	0.24	
R 4 ^{ème} prélèvement	0.05	0.09

A l'exception du premier prélèvement, les résultats résumés dans ce tableau montrent une diminution progressive du rapport entre les surfaces du pic 1 et du pic 2. Ceci traduit une disparition plus rapide des polymères de plus grande masse moléculaire.

Nous constatons, pour le premier prélèvement, une forte diminution de la surface du premier pic. Puis, nous observons pour les deuxième et troisième prélèvements une

diminution relative de la surface du deuxième pic par rapport à celle du premier. Le processus de biodégradation se poursuit donc par la dégradation des polymères de plus faibles masses. Enfin pour le quatrième prélèvement, le premier pic a pratiquement disparu.

La dégradation serait donc initiée par l'assimilation de l'amidon par les microorganismes. La disparition progressive de l'amidon laisse des « trous » dans la structure du matériau. L'accessibilité au reste du polymère est ainsi facilitée. La dégradation se poursuit alors par l'érosion de la partie polyester. Enfin, nous observons la disparition quasi-totale de la partie contenant l'amidon.

Pour le matériau non-exposé et avant le dernier prélèvement, nous n'observons pas réellement de décalage de temps de rétention, donc de masses moléculaires, des deux pics. Il semble que des chaînes polymères entières, de même masses moléculaires se décrochent du film. En revanche, au quatrième prélèvement, le second pic s'élargit de façon significative. Il y a formation de chaînes plus courtes, solidaires du matériau.

Pour les échantillons exposés aux UV, cet élargissement est moins sensible et nous observons plutôt un épaulement au niveau du second pic (Figure V-31). Nous pouvons donc supposer que les UV induisent une photodégradation qui fragilisent le polyester. Dans ce cas, nous aurions un double processus de dégradation (photodégradation et biodégradation) qui expliquerait la disparition plus rapide des films exposés aux UV.

Les analyses GPC nous donnent des indications sur la façon dont les matériaux ont pu se dégrader, mais elles ne permettent pas d'identifier les résidus ou les produits de dégradation. Nous avons donc tenté de mettre au point une méthode permettant de les séparer afin de procéder à leur identification. Une étude par HPLC a été réalisée, mais n'a pas actuellement permis de répondre à ces objectifs.

4 CONCLUSION

Cette étude relative à l'analyse des matériaux avant, en cours et après dégradation, nous a permis d'étudier et de mettre en évidence les principaux éléments suivants.

Nous avons, d'une part, étudié les propriétés physico-chimiques des matériaux et, d'autre part, élucidé les structures chimiques de leurs polymères constitutifs. Le matériau A est constitué d'un copolyester statistique de butylène téréphtalate et de butylène adipate. Le matériau B est composé d'un mélange d'amidon intimement associé au copolyester constituant le matériau A et de ce même copolyester « libre ». Le matériau C est un copolymère « bloc » composé d'amidon, de polycaprolactone et de polycaprolactone lié à un polyuréthane.

L'utilisation de la chromatographie par perméation de gel, de la spectroscopie IR et RMN, de l'analyse enthalpique différentielle et de la microscopie électronique à balayage, nous a permis d'étudier le comportement de deux matériaux (B et C) vis-à-vis de la dégradation dans différentes conditions : simulation de sol et de compost et enfouissement *in situ*.

En simulation de sol et en enfouissement réel, nous avons pu constater que, pour le matériau B, les phénomènes de biodégradation étaient identiques. En effet, la dégradation du matériau débute par celle de l'amidon. Sa minéralisation est totale, il n'apparaît pas de produits de réaction intermédiaires. Sa disparition induit une dénaturation de la structure du matériau, la dégradation du copolyester peut être initiée. Celui-ci se dégrade en formant des molécules de plus petites masses moléculaires. Au sein du copolyester, il semble qu'il n'y ait pas de dégradation préférentielle de la partie aliphatique par rapport à la partie aromatique.

En revanche, en compost, les phénomènes semblent différents, pour le matériau B. Nous observons toujours une dégradation principale de l'amidon. Mais, en plus d'une attaque des microorganismes, un autre phénomène a probablement lieu. Il s'agit d'une hydrolyse chimique se produisant grâce à la température élevée et au pH basique. Nous avons donc une dégradation dans la masse du matériau ainsi qu'une érosion due aux microorganismes. La dégradation du copolyester procède par décrochages successifs de fragments qui sont ensuite bioassimilés. Pour un taux de biodégradation de 90%, la minéralisation est totale et il ne persiste même plus de cycle aromatique dans le milieu.

La dégradation du matériau C a été suivie en simulation de sol. Comme pour le matériau B, nous observons en premier lieu une disparition de l'amidon. La dégradation se poursuit par celle du PCL et du mélange PCL-polyuréthane. Les trois constituants se dégradent à des vitesses différentes en formant des molécules de faibles masses moléculaires. De plus, l'analyse par HPLC nous a permis de mettre en évidence dans les réacteurs la présence d'une molécule toxique. Ces résultats seront mis en relation, dans le chapitre suivant, avec les tests d'écotoxicité et agronomiques.

5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn, B.D., Kim, S.H., Kim, Y.H., Yang, J.S.** 2001. Synthesis and characterization of the biodegradable copolymers from succinic acid and adipic acid with 1,4-butanediol. *Journal of Applied Polymer Science*. **82**: p2808-2826.
- Araujo, M.A., Vaz, C.M., Cunha, A.M., Mota, M.** 2001. In vitro degradation behaviour of starch/EVOH biomaterials. *Polymer Degradation and Stability*. **73**: p237-244.
- Avella, M., Errico, M.E., Laurienzo, P., Martuscelli, E., Raimo, M., Rimedio, R.** 2000. Preparation and characterisation of compatibilised polycaprolactone/starch composites. *Polymer*. **41**(10): p3875-3881.
- Averous, L., Moro, L., Dole, P., Fringant, C.** 2000. Properties of thermoplastic blends : starch-polycaprolactone. *Polymer*. **41**: p4157-4167.
- Barnes, K.A., Damant, A.P., Startin, J.R., Castle, L.** 1995. Qualitative liquid chromatographic-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometric analysis of polyethylene terephthalate oligomers. *Journal of Chromatography A*. **712**: p191-199.
- Barton, Z., Kemp, T.J., Buzy, A., Jennings, K.R.** 1995. Mass spectral characterization of the thermal degradation of poly(propylene oxide) by electrospray and matrix-assisted laser desorption ionization. *Polymer*. **36**(26): p4927-4933.
- Bastioli, C., Cerutti, A., Guanella, I., Romano, G.C., Tosin, M.** 1995. Physical state and biodegradation behavior of starch-polycaprolactone systems. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **3**(2): p81-95.

- Bellia, G., Tosin, M., Floridi, G., Degli-Innocenti, F.** 1999. Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*. **66**: p65-79.
- Bryant, J.J.L., Semlyen, J.A.** 1997. Cyclic polyesters: 7. Preparation and characterization of cyclic oligomers from solution ring-chain reactions of poly(butylene terephthalate). *Polymer*. **38**(17): p4531-4537.
- Cheng, X., Luo, X., Li, Z., Ma, D.** 1999. Proton NMR characterization of chain structure in butylene terephthalate-E-Caprolactone copolyesters. *Journal of Polymer Science : Part A : Polymer Chemistry*. **37**: p3770-3777.
- Claesson, H., Malmström, E., Johansson, M., Hult, A.** 2002. Synthesis and characterisation of star branched polyesters with dendritic cores and the effect of structural variations on zero shear rate viscosity. *Polymer*. **43**: p3511-3518.
- Day, M., Cooney, J.D., Shaw, K., Watts, J.** 1998. Thermal analysis of some environmentally degradable polymers. *Journal of Thermal Analysis*. **52**: p261-274.
- Dubois, P., Krishnan, M., Narayan, R.** 1999. Aliphatic polyester-grafted starch-like polysaccharides by ring-opening polymerization. *Polymer*. **40**: p3091-3100.
- Fang, Q., Hanna, M.A.** 2001a. Characteristics of biodegradable Mater-Bi(R) - starch based foams as affected by ingredient formulations. *Industrial Crops and Products*. **13**: p219-227.
- Fang, Q., Hanna, M.A.** 2001b. Preparation and characterization of biodegradable copolyester-starch based foams. *Bioresource Technology*. **78**: p115-122.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M.** 1990. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*. **9**: p37.
- Giunchedi, P., Conti, B., Scalia, S., Conte, U.** 1998. In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release*. **56**: p53-62.
- Gordon, S.H., Imam, S.H., James, C.** 2000. A method for measuring degradation of individual components in multicomponent biodegradable plastics by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Journal of Polymers and the Environment*. **8**(3): p125-134.

- Guittard, J., Tessiers, M., Blais, J.C., Bolblach, G., Rozes, L., Marechal, E., Tabet, J.C.** 1996. Electrospray and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the characterization of polyesters. *Journal of Mass Spectrometry*. **31**(12): p1409-1421.
- Hagelin, G., Arukwe, J.M., Kasparkova, V., Nordbo, S., Rogstad, A.** 1998. Characterization of low molecular weight polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. A comparison with gel permeation chromatography. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **12**: p25-27.
- Higashi, F., Ong, C.-H., Kim, J.-H.** 1999. Attempt to control monomer sequences in copolycondensation of IPA, TPA, BPA, and PHB. *Journal of Polymer Science : Part A : Polymer Chemistry*. **37**: p2371-2377.
- Kang, H.J., Park, S.S.** 1999. Characterization and biodegradability of poly(butylene adipate-co-succinate)/poly(butylene terephthalate) copolyester. *Journal of Applied Polymer Science*. **72**: p593-608.
- Kasperczyk, J.** 2001. NMR investigation of biodegradable polyesters for medical applications. *Macromolecular Symposia*. **175**: p19-31.
- Ki, H.C., Park, O.O.** 2001. Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyesters. *Polymer*. **42**: p1849-1861.
- Laine, O., Österholm, H., Seläntaus, M., Järvinen, H., Vainiotalo, P.** 2001. Determination of cyclic polyester oligomers by gel permeation chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **15**: p1931-1935.
- Lee, S.H., Lim, S.W., Lee, K.H.** 1999. Properties of potentially biodegradable copolyesters of (succinic acid-1,4-butanediol)/(dimethyl terephthalate-1,4-butanediol). *Polymer International*. **48**: p861-867.
- Levsen, K., Preiss, A., Godejohann, M.** 2000. Application of HPLC coupled to NMR and HPLC coupled to MS to complex environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. **19**(1): p27-48.
- Lotti, N., Finelli, L., Fiorini, M., Righetti, M.C., Munari, A.** 2001. Synthesis and Characterization of poly(butylene terephthalate-co-triethylene terephthalate) copolyesters. *Journal of Applied Polymer Science*. **81**: p981-990.

- Lustig, S.R.** 1999. Peak-referenced integral method for size exclusion chromatography and its application to aromatic polyesters. *Journal of Chromatography A*. **839**: p1-14.
- Mani, R., Bhattacharya, M.** 2001. Properties of injection moulded blends of starch and modified biodegradable polyesters. *European Polymer Journal*. **37**: p515-526.
- Montaudo, G., Rizzarelli, P.** 2000. Synthesis and enzymatic degradation of aliphatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*. **70**: p305-314.
- Montaudo, M.S., Puglisi, C., Samperi, F., Montaudo, G.** 1998. Application of size exclusion chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight to the determination of molecular masses in polydisperse polymers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **12**: p519-528.
- Mozes, N., Marchal, F., Hermesse, M.P., Van Haecht, J.L., Reulieayx, L., Leonard, A.J., Rouhet, P.G.** 1987. Immobilization of microorganisms by adhesion : interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. *Biotechnology and Bioengineering*. **30**: p439-450.
- Müller, R.J., Kleeberg, I., Deckwer, W.D.** 2001. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology*. **86**: p87-95.
- Nielen, M.W.F.** 1999. MALDI Time-Of-Flight Mass Spectrometry of synthetic polymers. *Mass Spectrometry Reviews*. **18**: p309-344.
- Nikolic, M.S., Djonlagic, J.** 2001. Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s. *Polymer Degradation and Stability*. **74**: p263-270.
- Ou, C.F.** 2000. Study of co[poly(butylene terephthalate-*p*-oxybenzoate)] thermotropic copolyester. II. Thermal behavior and crystalline morphology. *Journal of Applied Polymer Science*. **78**: p2363-2368.
- Pamula, E., Blazewicz, M., Paluszkiewicz, C., Dobrzynski, P.** 2001. FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibres composites. *Journal of Molecular Structure*. **596**: p69-75.
- Qian, H., Bei, J., Wang, S.** 2000. Synthesis, characterization and degradation of ABA block copolymer of L-lactide and E-caprolactone. *Polymer Degradation and Stability*. **68**: p423-429.

- Ratto, J.A., Stenhouse, P.J., Auerbach, M., Mitchell, J., Farrell, R.** 1999. Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system. *Polymer*. **40**: p6777-6788.
- Rissler, K.** 1997. Separation of polyester oligomers by gradient high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **786**: p85-98.
- Rissler, K.** 2000. Separation of polyesters by gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography on 1.5µm non-porous column. *Journal of Chromatography A*. **871**: p243-258.
- Schué, F., Jaimes, C., Dobрева-Shué, R., Giani-Beaune, O., Amass, W., Amass, A.** 2000. Synthesis and degradation of polyesters. *Polymer International*. **49**: p965-974.
- Shaik, A.-A., Richter, M., Kricheldorf, H.R., Krüger, R.-P.** 2001. New polymer syntheses. CIX. Biodegradable, alternating, copolyesters of terephthalic acid, aliphatic dicarboxylic acids, and alkane diols. *Journal of Polymer Science : Part A : Polymer Chemistry*. **39**: p3371-3382.
- Torres, A., Li, S., Roussos, S., Vert, M.** 1996. Poly(lactic acid) degradation in soil or under controlled conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. **62**(13): p2295-2302.
- Tosin, M., Degli-Innocenti, F., Bastioli, C.** 1998. Detection of toxic by-product released by a polyurethane-containing film using a composting test method based on mineral bed. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **6**(2): p79-90.
- Tsuji, H., Muramatsu, H.** 2001. Blends of aliphatic polyesters : V. Non-enzymatic and enzymatic hydrolysis of blends from hydrophobic poly(L-lactide) and hydrophilic poly(vinyl alcohol). *Polymer Degradation and Stability*. **71**: p403-413.
- Twardon, G., Bruckschlegel, M., Müller, W.R., Twardon, F.** 1998. Characterization of the degradation process of biodegradable packaging materials by size-exclusion chromatography. *Annual Technical Conference - Society of Plastics Engineers*. **56**(2): p2121-2125.
- Wachsen, O., Reichert, K.H., Kruger, R.P., Much, H., Schulz, G.** 1997. Thermal decomposition of biodegradable polyesters III. Studies on the mechanisms of thermal degradation of oligo-L-lactide using SEC, LACCC and MALDI-TOF-MS. *Polymer Degradation and Stability*. **55**: p225-231.

- Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W.D., Müller, R.J.** 2001. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters : evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*. **44**: p289-299.
- Witt, U., Müller, R.J., Deckwer, W.D.** 1996a. Studies on sequence distribution of aliphatic/aromatic copolyesters by high-resolution ¹³C NMR spectroscopy for evaluation of biodegradability. *Macromolecular Chemistry and Physics*. **197**: p1525-1535.
- Witt, U., Müller, R.J., Deckwer, W.D.** 1997. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **5**(2): p81-89.
- Witt, U., Müller, R.J., Deckwer, W.D.** 1996b. Evaluation of the biodegradability of copolyesters containing aromatic compounds by investigations of model oligomers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. **4**(1): p9-20.
- Yamadera, R., Murano, N.** 1967. Determination of randomness in copolyesters by high resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of Polymer Science*. **5**(9): p2259-2268.
- Yu, Y., Yu, Y., Jin, M., Li, G., Bu, H.** 2001. The influence of aliphatic low molar mass polyesters on crystallization of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecular Chemistry and Physics*. **202**(1): p139-144.

CHAPITRE 6 : TESTS
ENVIRONNEMENTAUX

CHAPITRE 6 :	TESTS ENVIRONNEMENTAUX	250
1	TESTS D'ÉCOTOXICITÉ.....	252
1.1	<i>Synthèse bibliographique.....</i>	252
1.1.1	Ecotoxicité aquatique (Ineris, 2002).....	253
1.1.2	Ecotoxicité terrestre (Ineris, 2002).....	254
1.2	<i>Matériels et méthodes</i>	256
1.2.1	Obtention de la pouzzolane activée et des mélanges pouzzolane – matériau C.....	256
1.2.2	Tests d'écotoxicité terrestre, essai d'inhibition de l'émergence de la croissance de l'orge	257
1.2.2.1	Tests sur pouzzolane seule	257
1.2.2.2	Tests sur pouzzolane activée avec ou sans matériau C.....	258
1.2.3	Tests d'écotoxicité aquatique	258
1.2.3.1	Essai d'inhibition de la croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	258
1.2.3.2	Essai d'inhibition de la croissance de la population de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	259
1.3	<i>Résultats et discussion</i>	260
1.3.1	Tests d'écotoxicité terrestre, essai d'inhibition de l'émergence et de la croissance de l'orge	261
1.3.1.1	Tests sur la pouzzolane seule	261
1.3.1.2	Tests sur pouzzolane activée avant ou sans matériau C	262
1.3.2	Tests d'écotoxicité aquatique	263
1.3.2.1	Essai d'inhibition de la croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	263
1.3.2.2	Essai d'inhibition de la croissance de la population de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	264
1.4	<i>Conclusion</i>	268
2	TESTS AGRONOMIQUES.....	269
2.1	<i>Matériels et méthodes</i>	269
2.2	<i>Résultats et discussion</i>	271
2.2.1	Comportement des films.....	271
2.2.2	Aspects agronomiques.....	273
2.2.2.1	Etat végétatif.....	273
2.2.2.2	Rendements.....	274
3	CONCLUSION	276
4	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	277

Il est primordial de savoir si les matériaux ou leurs résidus ne sont pas toxiques pour la faune et la flore, ainsi que pour les cultures qu'ils supportent. Pour cela, nous avons effectué des tests d'écotoxicité terrestre et aquatique sur le matériau C, ainsi que les tests agronomiques sur culture de melons, sur les trois films tests. Les résultats de ces tests pourront être comparés à ceux obtenus à l'aide des analyses physico-chimiques. Ils permettent de tester de façon plus universelle la toxicité d'un produit et pourraient donc être intégrés à une norme sur l'étude de la biodégradabilité d'un matériau agricole.

N'ayant pas la possibilité d'effectuer ces tests, ni au Cemagref, ni au Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, ils ont été réalisés sous la direction de Mr P. Pandard à l'Inéris et de Mme P. Erard au Ctifl. Nous les remercions vivement pour leur aide.

1 TESTS D'ÉCOTOXICITÉ

Ces tests d'écotoxicité ont été menés sur le matériau C toxifié, composé d'amidon, de polycaprolactone et de polyuréthane. La présence d'une molécule toxique dans la pouzzolane après dégradation de ce matériau a été mise en évidence par HPLC (Chapitre 5, paragraphe 3.1.6). La toxicité et l'apparition de cette molécule lors de la dégradation de polyuréthane à base de diphenyle méthane 4,4'-diisocyanate ont déjà été étudiés dans le passé (Dahiyat *et al.*, 1992; Szycher *et al.*, 1983; Vermette *et al.*, 1999). Nous nous attendons donc à obtenir un effet écotoxique lors de la dégradation du matériau C. Des tests préliminaires ont d'abord été effectués sur pouzzolane seule afin de mettre en évidence un éventuel effet toxique du support. Puis, ces tests ont été appliqués sur la pouzzolane ayant servi de support à la dégradation du matériau C. Différents prélèvements sont effectués au cours de la dégradation. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur la pouzzolane ne contenant pas de matériau.

1.1 Synthèse bibliographique

Afin d'évaluer des dangers écotoxicologiques, il existe de nombreux tests normalisés évaluant l'impact de la substance à analyser sur les espèces animales et végétales présentes dans un écosystème.

Deux cibles sont généralement étudiées dans les tests d'écotoxicité : le milieu aquatique et le milieu terrestre.

1.1.1 Ecotoxicité aquatique (Ineris, 2002)

Les milieux aquatiques représentent une ressource primordiale. La majorité des polluants retournera à un moment ou à un autre du cycle dans les écosystèmes aquatiques par lessivage ou entraînement par l'eau. Il est donc essentiel d'évaluer la toxicité des substances chimiques vis-à-vis des organismes présents dans ces écosystèmes. Pour cela, différents essais d'inhibition sont réalisés.

Les algues unicellulaires : Pseudokirchneriella subcapitata

Ces algues vertes unicellulaires sont des organismes photosynthétiques, à la base des réseaux trophiques aquatiques. La toxicité des substances chimiques ou des effluents vis-à-vis de ces organismes est évaluée à l'aide d'un essai d'inhibition de la croissance des populations.

La daphnie : Daphnia magna

La daphnie est un microcrustacé d'eau douce vivant dans les écosystèmes d'eau stagnante. Elle se nourrit d'organismes unicellulaires. Deux essais sont couramment réalisés sur cet organisme :

- Essai d'inhibition de la mobilité permettant d'évaluer la toxicité induite à court terme par les substances chimiques
- Essai d'inhibition de la reproduction permettant d'évaluer la toxicité à long terme des faibles concentrations sur la pérennité des populations de daphnies

Witt *et al.* (2001) ont utilisé ce test pour étudier la toxicité des produits de dégradation en milieu aqueux de l'Ecoflex®. La perte de la mobilité est mesurée. Le nombre de dilutions nécessaires pour que, sur dix daphnies, neuf soient encore capables de nager est déterminé. Sa valeur élevée indique un effet toxique faible causée par la conductivité de la solution, due à la présence de minéraux et des ions adipate et téréphtalate.

Les tests basés sur la bioluminescence

Les tests les plus courants utilisent *Vibrio fischeri*.

Degli-Innocenti *et al.* (2001) ont étudié la toxicité du même matériau C par tests sur *Vibrio fischeri*. Cette bactérie hétérotrophe émet de la lumière au cours de son métabolisme. Après introduction de la suspension de bactéries dans une solution, un pic intense de lumière

est obtenu en 5 s. Cette intensité reste constante pendant 30 s en cas d'absence de toxicité, mais décroît en cas de toxicité. Le taux d'inhibition est calculé comme étant le ratio entre la production de lumière pendant les cinq premières secondes et la production totale sur 30 s. La concentration en 4,4'-diamino diphényle méthane (MDA) conduisant à une inhibition de 50% est de 38 mg/l.

1.1.2 Ecotoxicité terrestre (Ineris, 2002)

Il est essentiel d'évaluer les effets des substances chimiques sur des espèces représentatives de différents niveaux trophiques. Les essais peuvent avoir lieu sur les organismes de la faune et de la flore.

Végétaux supérieurs : laitue, orge, radis

Les végétaux possèdent un rôle essentiel dans les écosystèmes terrestres du point de vue du cycle des éléments nutritifs et de la production primaire. L'écotoxicité des polluants vis-à-vis de ces organismes est évaluée à l'aide des essais normalisés suivants :

- Essai d'inhibition de la germination des semences
- Essai d'inhibition de l'émergence et des premiers stades de croissance
- Essai d'inhibition de la croissance des racines

Kim *et al.* (2001) ont étudié la toxicité des produits de dégradation de polyesters tels l'acide succinique (SA), l'acide adipique (AA), l'acide mandélique (MA), l'acide téréphtalique (TA), le 1,4-butanediol, (1,4-B), l'éthylène glycol (EG), le styrène glycol (SG) et le 1,4-cyclohexanediméthanol (1,4-C). Pour cela, ils ont utilisé des tests phytotoxiques sur la vitesse de germination de graines de radis. Les différents produits de dégradation sont dilués dans l'eau à différentes concentrations. Ces solutions sont placées dans des boîtes de Pétri avec 50 graines. Elles sont laissées six jours à 20°C. Le taux de germination ainsi que l'état des racines sont analysés. Il apparaît que les composés contenant un cycle phényle ou hémicycle sont plus toxiques que les composés aliphatiques. Ces résultats sont pratiquement identiques à ceux obtenus par tests cytotoxiques sur cellules épithéliales humaines.

Vers de terre (Eisenia fetida)

Les vers de terre ont une fonction indispensable d'aération, de structuration et de drainage des sols et contribuent à la fertilité des milieux en transformant les résidus organiques en des composés directement assimilables. L'écotoxicité des polluants vis-à-vis de ces organismes est évaluée à l'aide des essais suivants :

- Mortalité (effets aigus)
- Essai d'inhibition de la reproduction (effets chroniques)

Escargots

Les escargots représentent des indicateurs écotoxicologiques pertinents car ce sont des organismes caractéristiques de la couche superficielle du sol et vivant alternativement à la surface et dans le sol. Ils accumulent les polluants et ont une large répartition géographique. Une méthode nouvellement normalisée par l'AFNOR permet d'évaluer les effets chroniques des polluants en suivant l'évolution pondérale des jeunes.

Cétoines (larve et adultes)

Les cétoines sont des insectes de l'ordre des coléoptères et de la famille des scarabées. La cétoine grise est une espèce phytophage dont les premiers stades de développement sont souterrains : incubation des pontes, cycle larvaire, nymphose. Ce type d'organisme intervient au même titre que les vers de terre dans les phénomènes de brassage, d'aération des sols et sur la dynamique d'écoulement des eaux pluviales. Les effets aigus des polluants sont évalués par la mortalité des larves de cétoines.

Les tests décrits plus haut ont été complétés par d'autres tests applicables aux microorganismes du sol ou du compost Kapanen *et al.* (2001). Ces tests d'écotoxicité sur microorganismes sont rapides, simples et économiques. Ils peuvent concerner une culture pure ou un mélange de cultures. Les variables mesurées sont la mortalité, le taux de croissance, les changements de la diversité des espèces et la modification des activités de ces microorganismes. Certains de ces tests sont des tests enzymatiques, sur *Salmonella* ou sur *Pseudomonas putida*.

1.2 Matériels et méthodes

Parmi les différents tests réalisés par l’Inéris, nous présentons un test d’écotoxicité terrestre, l’essai d’inhibition de l’émergence et de la croissance de l’orge, et deux tests d’écotoxicité aquatique, essai d’inhibition de la croissance de l’algue *Pseudokirchneriella subcapitata* et essai d’inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia*. Ces tests ont été appliqués à la pouzzolane seule, lavée à l’eau déminéralisée et séchée, à la pouzzolane activée et aux mélanges pouzzolane activée – matériau C prélevés au cours de la dégradation du matériau.

1.2.1 Obtention de la pouzzolane activée et des mélanges pouzzolane - matériau C

Contrairement aux manipulations décrites sur pouzzolane au chapitre 3 qui visaient à mesurer la biodégradabilité, celle-ci a pour but de produire de la pouzzolane contenant des produits et résidus de dégradation du matériau C. Le dégagement de CO₂ n’est donc pas mesuré. En revanche, le principe et la préparation de la pouzzolane activée restent les mêmes. Les protocoles de préparation de la solution inoculum et d’activation de la pouzzolane sont décrits au chapitre 3.

Mise en place du test

Au bout des 10 jours d’activation, deux bacs sont préparés : un contenant environ 8 kg de pouzzolane activée seule et l’autre un mélange de 8 kg de pouzzolane activée avec le matériau (3.06 g de matériau par kg de pouzzolane activée). Les bacs sont mélangés tous les jours pour éviter la formation de chemins préférentiels ou l’instauration de conditions anaérobies. De même, ils sont pesés chaque jour pour évaluer la perte d’eau et la combler.

Suivi de l’écotoxicité du matériau C

Trois prélèvements de 2 kg de pouzzolane sont effectués dans les deux bacs, dès l’introduction du matériau C, puis au bout de 22 jours, ce qui correspond à une dégradation de 25%, et de 120 jours (4 mois), ce qui correspond à une dégradation de 50%. Ces échantillons sont envoyés à l’Inéris, dès le prélèvement effectué, où ils sont stockés à 4°C +/- 3°C, dans l’obscurité, jusqu’à leur traitement.

Dans le cadre de la mesure du caractère toxique, il convient de se poser la question de l'accessibilité du produit et des éventuels composés de dégradation aux organismes tests soumis aux essais. Etant donné la nature de la pouzzolane, une lixiviation avec une mesure des effets de l'éluat sur des organismes aquatiques paraît pour l'instant la méthode la plus adaptée pour suivre l'évolution du caractère toxique avant et après dégradation. Le contact organismes/pouzzolane n'est pas optimal dans le cas des organismes terrestres, pour pouvoir caractériser un effet toxique. De plus, comme nous l'avons vu au chapitre 5, la molécule relarguée lors de la dégradation du matériau C, dont nous cherchons à mettre en évidence un caractère toxique, est soluble dans l'eau.

1.2.2 Tests d'écotoxicité terrestre, essai d'inhibition de l'émergence de la croissance de l'orge

Ce test a été réalisé suivant la norme ISO 11269-2 (1995).

Un sol témoin est préparé selon les instructions de la norme ISO 11269-2.

Deux paramètres sont mesurés : l'émergence, exprimée en pourcentage de semences qui émergent par rapport aux pots témoins et les effets de la croissance, exprimés comme étant la différence de masse entre la partie supérieure des végétaux traités et celle des végétaux contenus dans les pots témoins.

Vingt semences uniformes sont plantées dans chacun des pots. Après avoir évalué l'émergence dans chaque pot, le nombre de semis est réduit pour donner un total de cinq échantillons représentatifs des végétaux en pot. L'essai est arrêté lorsque 50% des semis témoins ont émergé.

La teneur en eau des pots est fixée à 70% de la capacité de rétention en eau (CRE) du support.

1.2.2.1 Tests sur pouzzolane seule

Deux concentrations de pouzzolane dans un sol témoin ont été utilisées : 50% et 100%. La valeur de la teneur en eau est maintenue par ajout d'eau potable ou de milieu de Hoagland Arnon (milieu nutritif).

1.2.2.2 Tests sur pouzzolane activée avec ou sans matériau C

Ces tests sont menés pour les trois prélèvements (T=0j, T=22j et T=120j), sur la pouzzolane activée avec et sans matériau C.

Les récipients ont été arrosés, au cours de l'essai avec le milieu nutritif de Hoagland Arnon.

1.2.3 Tests d'écotoxicité aquatique

Un éluat a été préparé en mettant en contact de la pouzzolane avec de l'eau déminéralisée pendant 24 heures sous agitation rotative permanente à 10 cycles par minute. Le ratio pouzzolane/eau est de 1/10. Il a été tenu compte de l'humidité résiduelle de la pouzzolane pour calculer la quantité d'eau déminéralisée à introduire. L'éluat a été filtré à 100 μm puis à 0.45 μm (filtration sous pression, membranes nylon).

Les caractéristiques de l'éluat sont les suivantes : son pH est de 6.9, la concentration en oxygène dissous est supérieure ou égale à 8.5 mg/l et sa conductivité est environ de 50 $\mu\text{S/cm}$.

1.2.3.1 Essai d'inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*

Ces tests ont été réalisés suivant la norme NF T 90-375.

Les essais sont réalisés, en triplicats, dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu. Ils sont éclairés avec une intensité lumineuse de 6000 à 10000 lux et conservés à une température de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. L'inoculum initial contient 10000 cellules. Un comptage du nombre de cellules à l'aide d'un compteur de particules est effectué toutes les 24 h.

Ces essais ont été réalisés sur la pouzzolane seule aux concentrations d'essai 0%, 22.5%, 45% et 90% d'éluat ; sur la pouzzolane activée avec et sans matériau C au temps de prélèvement T=0j dans des gammes de concentrations comprises entre 5.4% et 90% ; et au temps de prélèvement T=120j dans des gammes de concentrations comprises entre 1.7% et 90%.

1.2.3.2 Essai d'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia*

Ces tests sont réalisés suivant la norme NF T 90-376 (2000).

Deux paramètres sont déterminés : la mortalité des mères en fin d'essai et l'inhibition de la croissance de la population déterminée par la comparaison entre le nombre de jeunes issus de mères vivantes en fin d'essai entre le lot témoin et le lot d'essai. La concentration provoquant 50% d'inhibition de la croissance de la population par rapport au lot témoin, CE50, est calculée.

De jeunes *Ceriodaphnia dubia*, âgées de moins de 24 h au début de l'essai, sont exposées individuellement à une gamme de concentrations de l'éluat, pendant une période de 7 jours. Les essais sont réalisés à une température de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et sont éclairés pendant 16 h par jour à une intensité lumineuse de 300 lux.

Les solutions d'essais sont préparées en mélangeant les volumes appropriés de l'échantillon, de milieu d'essai et de nourriture. La quantité de nourriture contenue dans les solutions d'essais doit être égale à un dixième du volume total. Les compositions du milieu d'essai et de la nourriture sont décrites dans la norme NF T 90-376. Les solutions d'essais sont ensuite réparties pour chaque concentration dans 10 récipients à raison de 50 ml dans chaque récipient. Des témoins sont également préparés, contenant uniquement le milieu d'essai et de la nourriture. Les jeunes *Ceriodaphnia dubia* sont ensuite réparties dans les récipients à raison d'un animal par récipient.

Les solutions d'essais et des témoins sont renouvelées suivant un calendrier décrit dans la norme. A chaque renouvellement, le nombre de mères mortes et de jeunes formés est déterminé, puis totalisé en fin d'essai.

Pour les tests préliminaires sur pouzzolane seule, les concentrations d'essai utilisées sont 0%, 4.8%, 8.6%, 15.4%, 27.8%, 50% et 90%.

Les tests sur pouzzolane activée avec ou sans matériau ont été effectués sur les échantillons à T=0j et T=120j. Les concentrations d'essai sont rassemblées dans le tableau VI-I.

Tableau VI-I : Concentration d'essai pour les tests d'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia*, sur la pouzzolane activée avec ou sans matériau C

Essai	Concentration d'essai (%)								
T=0j sans matériau C				0.51	1.28	3.2	8	20	50
T=0j avec matériau C	0.032	0.08	0.2	0.51	1.28	3.2	8	20	50
T=120j sans matériau C			0.05	0.3	0.95	3.1	9.8	31.3	100
T=120j avec matériau C				0.3	0.95	3.1	9.8	31.3	100

1.3 Résultats et discussion

Ces tests ayant été réalisés par un organisme extérieur, nous présentons, ici, les résultats obtenus par l'Inéris que nous discuterons.

1.3.1 Tests d'écotoxicité terrestre, essai d'inhibition de l'émergence et de la croissance de l'orge

1.3.1.1 Tests sur la pouzzolane seule

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI-II.

Tableau VI-II : Résultats concernant l'émergence et la croissance de l'orge sur pouzzolane seule

	Pourcentage moyen d'émergence	Masse de biomasse sèche moyenne (mg)	Variation de croissance par rapport au témoin	Phénomènes phytotoxiques
Témoin (arrosage Eau)	97.5%	50.91	-	
Témoin (arrosage Hoagland)	95.0%	105.39	107%	
Pouzzolane 50% (arrosage Eau)	97.5%	42.68	-16.2%	
Pouzzolane 50% (arrosage Hoagland)	100%	81.84	60.8%	
Pouzzolane 100% (arrosage Eau)	95.0%	31.66	-37.8%	Observation de chloroses
Pouzzolane 100% (arrosage Hoagland)	95.0%	40.84	-19.8%	

Une diminution de la production végétale par rapport au témoin a été constatée pour les semences d'orge placées dans 100% de pouzzolane. Certaines pousses ont présenté des décolorations à leur extrémité caractéristiques d'un manque de nutriments, mais qui pourraient aussi provenir de substances inhibitrices présentes dans le substrat. Dans les conditions de l'essai classique, la pouzzolane n'apparaît pas comme un support permettant une croissance optimale de l'orge alors que c'est un support classiquement employé en horticulture. L'apport d'un complément nutritif lors de la réhydratation améliore significativement la production végétale. Les tests sur pouzzolane activée avec ou sans

matériau C sont donc effectués avec un apport de milieu nutritif. Etant donné la granulométrie du support, il est nécessaire de travailler avec des semences de grosses tailles. Mais celles-ci, monocotylédones, sont reconnues comme moins sensibles aux substances toxiques.

1.3.1.2 Tests sur pouzzolane activée avant ou sans matériau C

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI-III.

Tableau VI-III : Résultats de l'inhibition de l'émergence et de la croissance de l'orge sur pouzzolane après activation, avec et sans matériau C, pour différents prélèvements

Echantillon		Emergence en fin d'essai	Masse sèche moyenne d'une pousse (mg)	% de variation par rapport à la pouzzolane seule
T=0	Témoin	100%	59.48	-
	Pouzzolane	100%	62.44	-
	Pouzzolane+matériau C	95%	69.22	+10.9%
T=22j	Témoin	100%	31.11	-
	Pouzzolane	92.5%	71.48	-
	Pouzzolane+matériau C	95%	64.34	-10.0%
T=120j	Témoin	97,5%	24.15	-
	Pouzzolane	90%	42.04	-
	Pouzzolane+matériau C	92,5%	46.69	+11.1%

Aucune différence significative de croissance n'a été mise en évidence entre le substrat d'essai seul, la pouzzolane, et le mélange pouzzolane + matériau C à chaque temps de prélèvement.

Des nécroses ont été observées aux extrémités des pousses aussi bien pour le substrat d'essai seul, la pouzzolane activée, que pour le mélange pouzzolane + matériau C. Les phénomènes phytotoxiques, mis en évidence, sont moins marqués que lors des essais préliminaires. Les nécroses indiquent que la pouzzolane n'apparaît pas comme un support permettant une croissance optimale de l'orge même en ajoutant du milieu nutritif.

1.3.2 Tests d'écotoxicité aquatique

1.3.2.1 Essai d'inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*

Tests sur la pouzzolane seule

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI-IV.

Tableau VI-IV : Résultats de l'inhibition de la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* sur pouzzolane seule

Concentration d'essai	Témoin	22.5%	45.0%	90%
Numération cellulaire en fin d'essai (*10 ⁴)	81.40	88.16	82.13	17.11
	98.74	104.50	60.22	14.62
	73.96	92.51	46.50	15.19
Nombre moyen de cellules (*10 ⁴)	84.70	95.06	62.95	15.64
Variation de la biomasse par rapport au témoin	-	+13.1%	-17.3%	-69.2%

Des effets toxiques sont observés. La concentration pour que le taux d'inhibition soit de 50% se situe donc entre 45% et 90%.

Tests sur pouzzolane activée avec et sans matériau C

Pour le prélèvement à T=0j, à la plus forte concentration testée, des effets inhibiteurs de faible intensité ont été observés. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre l'éluat de la pouzzolane + matériau C et l'éluat de pouzzolane activée sans matériau C. Les pourcentages d'inhibition de croissance respectifs sont 21.4% et 16.5%.

En revanche, pour le prélèvement à T=120j, quel que soit l'éluat considéré, aucun effet inhibiteur de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* n'a été observé.

1.3.2.2 Essai d'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia*

Tests sur pouzzolane seule

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI-V.

Tableau VI-V : Résultats de l'inhibition de la reproduction de *Ceriodaphnia dubia* sur éluat de pouzzolane seule

Concentration d'essai	Témoin	4.8%	8.6%	15.4%	27.8%	50.0%	90.0%
Mortalité des mères en fin d'essai	10%	10%	10%	0%	10%	60%	100%
Total de jeunes produits	239	98	124	91	82	25	0
Inhibition de la croissance de la population par rapport au témoin	-	59.0%	48.1%	61.9%	65.7%	89.5%	100%

Des effets inhibiteurs ont été observés pour les plus faibles concentrations d'éluat testées. Les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer de valeur de la concentration d'essai induisant une mortalité de 50%, mais permettent toutefois de situer cette valeur aux environs de 5% d'éluat. Un relargage de métaux contenus dans la pouzzolane lors de la préparation de l'éluat pourrait expliquer cette toxicité. Il serait donc nécessaire de déterminer la nature des métaux sur la matière minérale.

Bien qu'une inhibition importante ait été observée sur ce test ainsi que sur la croissance des algues, ces tests ont été conservés car ils sont plus sensibles que des essais aigus comme ceux sur *Vibrio fischeri* et ils permettent de mesurer un effet chronique plus en relation avec les effets que nous cherchons à mettre en évidence.

La comparaison entre les résultats obtenus sur pouzzolane activée avec et sans matériau C devrait nous permettre de faire la distinction entre une toxicité induite par la pouzzolane et par les produits de dégradation du matériau C.

Tests sur pouzzolane activée avec et sans matériau C

Les résultats obtenus pour la pouzzolane activée sans matériau C, au temps de prélèvements T=0j, sont présentés dans le tableau VI-VI.

Tableau VI-VI : Résultats de l'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* sur la pouzzolane activée sans matériau C à T=0j

Concentrations d'essai	Témoin	0.51%	1.28%	3.2%	8.0%	20%	50%
Mortalité des mères en fin d'essai	10%	0%	20%	20%	20%	20%	10%
Total de jeunes produits	179	100	90	79	67	140	192
Inhibition de croissance de la population par rapport au témoin	-	44.1%	49.7%	55.9%	62.6%	21.8%	-7.3%

Pour le mélange, pouzzolane activée avec matériau C, au temps de prélèvement T=0j, deux gammes de concentrations ont été testées. Les résultats sont présentés dans le tableau VI-VII.

Tableau VI-VII : Résultats de l'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* sur le mélange pouzzolane + matériau C à T=0j

Concentrations d'essai	Témoin	0.032%	0.08%	0.20%	0.51%	1.28%	3.2%	8.0%
Mortalité des mères en fin d'essai	10%	0%	10%	10%	10%	0%	20%	0%
Total de jeunes produits	186	56	78	59	43	78	74	120
Inhibition de croissance de la population par rapport au témoin	-	69.9%	58.1%	68.3%	76.9%	58.1%	60.2%	35.5%

Concentrations d'essai	Témoin	8.0%	20.0%	50.0%
Mortalité des mères en fin d'essai	10%	50%	0%	0%
Total de jeunes produits	179	111	337	395
Inhibition de croissance de la population par rapport au témoin	-	38.0%	-88.3%	-120.7%

Seule une mortalité importante des mères a été constatée à la concentration de 8%. Si l'on exprime les résultats en fonction des mères vivantes en fin d'essai, l'effet inhibiteur sur la reproduction n'est plus que de 10.6% à cette concentration par rapport aux récipients témoins.

D'une façon générale, les effets inhibiteurs les plus importants ont été mis en évidence pour les faibles concentrations. Pour les concentrations supérieures à 8% en éluat, aucun effet létal significatif n'est observé. Au contraire, la population augmente par rapport au témoin.

Pour la concentration de 50%, la croissance de la population est apparue équivalente à celle des témoins, pour la pouzzolane activée sans matériau C. En revanche, en ce qui concerne le mélange pouzzolane + matériau C, une croissance deux fois supérieure à celle des témoins a été observée. Le nombre de jeunes produits en fin d'essai, de l'ordre de 50, dans certains récipients est significativement plus élevé que les valeurs maximales observées jusqu'à présent au laboratoire.

Les résultats obtenus lors des deux essais réalisés sur pouzzolane sans matériau C (test sur pouzzolane seule et pouzzolane activée à T=0) sont totalement différents. Si les pourcentages d'inhibition observés sont du même ordre de grandeur aux faibles concentrations, les résultats divergent nettement aux plus fortes concentrations (Figure VI-1). Pour la concentration de 50%, la mortalité de 60% des mères a été constatée, dans un cas, se traduisant par une forte inhibition de la croissance de la population et, dans l'autre cas, une croissance équivalente aux témoins a été enregistrée.

Voici comment nous interprétons cette différence : la pouzzolane seule est différente de celle des essais à T=0j. Pour les essais à T=0j, la pouzzolane est activée. Elle contient donc une solution nutritive et des microorganismes qui ne sont pas présents dans la pouzzolane ayant servi pour les tests préliminaires. Des nutriments sont ajoutés dans tous les essais, mais il est possible que l'ajout supplémentaire de la solution d'activation soit responsable de l'augmentation de la population aux plus fortes concentrations en éluat. Cependant, un essai d'inhibition mené sur de la pouzzolane activée sans microorganismes (sans matériau C) montre une inhibition plus importante que pour la pouzzolane activée avec microorganismes. Ces derniers pourraient avoir une influence sur la reproduction des daphnies.

De plus, cette augmentation de la population est encore plus importante pour le mélange pouzzolane + matériau C à T=0j (Figure VI-1). Sa dégradation n'ayant pas encore

commencé, la molécule toxique qui pourrait inhiber l'augmentation de la population de *Ceriodaphnia dubia* n'a pas encore été produite.

Les résultats obtenus pour la pouzzolane activée sans ou avec matériau C, au temps de prélèvement T=120j, sont rassemblés dans les tableaux VI-VIII et VI-IX.

Tableau VI-VIII : Résultats de l'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* sur la pouzzolane activée sans matériau C à T=120j

Concentrations d'essai	Témoin	0.05%	0.30%	0.95%	3.1%	9.8%	31.3%	100%
Mortalité des mères en fin d'essai	10%	20%	0%	10%	20%	0%	20%	90%
Total de jeunes produits	211	114	73	131	124	195	145	1
Inhibition de croissance de la population par rapport au témoin	-	46%	65.4%	37.9%	41.2%	7.6%	31.3%	99.5%

Tableau VI-IX : Résultats de l'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* sur le mélange pouzzolane + matériau C à T=120j

Concentrations d'essai	Témoin	0.30%	0.95%	3.1%	9.8%	31.3%	100%
Mortalité des mères en fin d'essai	10%	20%	40%	10%	10%	10%	20%
Total de jeunes produits	211	125	193	183	227	214	176
Inhibition de croissance de la population par rapport au témoin	-	40.8%	8.5%	13.3%	-7.6%	-1.4%	16.6%

Si l'on compare les inhibitions obtenues avec pouzzolane seule à T=120j (Tableau VI-VIII) avec celles dues à la pouzzolane seule à T=0j (Tableau VI-VII), le même effet inhibiteur pour les très faibles concentrations apparaît. Mais l'évolution aux fortes concentrations est totalement différente.

Si l'on compare les résultats obtenus sur les deux éluats à T=120j, il apparaît que seul l'éluat de la pouzzolane témoin sans matériau C a entraîné des effets létaux vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia*. L'éluat du mélange pouzzolane + matériau C n'a entraîné aucun effet manifeste par rapport au témoin dans la gamme des concentrations testées. L'inhibition observée à la plus faible dose proche de 40% n'est pas apparue comme statistiquement significative.

L'augmentation de la population pour les fortes concentrations, décrite précédemment, n'est plus observée pour les échantillons prélevés à T=120j (Figure VI-1). Mais, à cette date, la molécule toxique se trouve dans l'éluat. Nous nous attendons donc à observer un effet toxique, mais l'inhibition est plus forte pour la pouzzolane sans matériau que pour le mélange pouzzolane + matériau C.

D'une façon générale, l'interprétation des résultats obtenus lors des essais de croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* apparaît très délicate :

- d'une part, il n'est pas possible de mettre en évidence des relations effet-dose (des inhibitions élevées sont généralement observées aux faibles concentrations d'éluat),
- d'autre part, les résultats obtenus sur pouzzolane témoin sans matériau C évoluent de façon importante entre les prélèvements T=0j et T=120j ce qui ne permet pas d'avoir une référence interne et semble indiquer que d'autres facteurs autre que la toxicité potentielle influent de façon significative sur la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia*.

1.4 Conclusion

Il n'est pas possible de mettre en évidence des effets inhibiteurs liés à la présence du matériau C. La seule certitude qui ressort à partir de l'ensemble des résultats est l'incompatibilité entre la pouzzolane et les essais d'écotoxicité sus-cités. Des tests préliminaires sur la vermiculite avait présenté les mêmes limites pour ces tests. Une étude approfondie sur des tests d'écotoxicité adaptés à ces supports sera donc indispensable dans le futur.

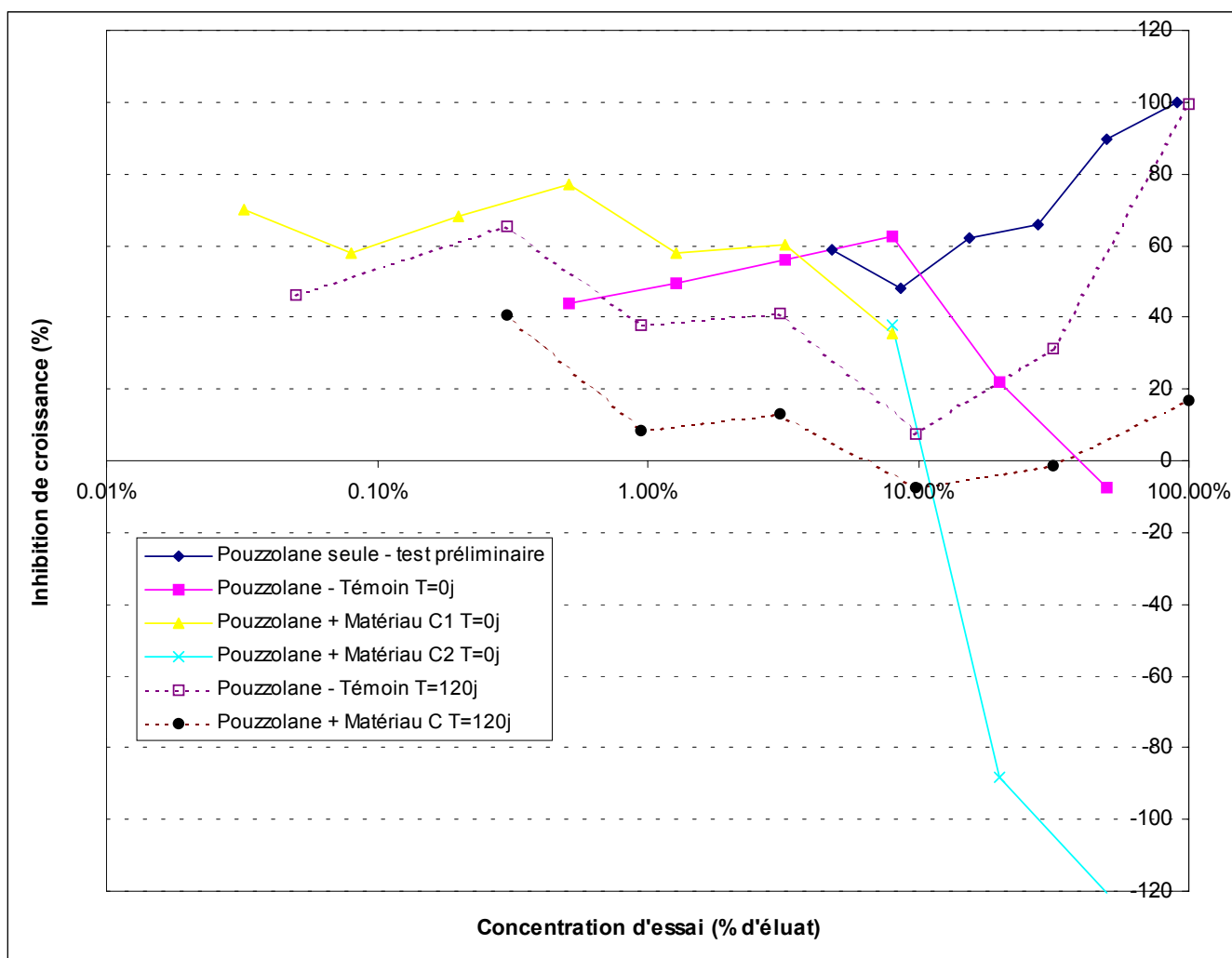


Figure VI-1 : Inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia*

2 TESTS AGRONOMIQUES

Les trois films que nous avons étudiés ont été étendus en paillage sur culture de melons en plein champ par le Ctifl.

2.1 Matériels et méthodes

Ces trois matériaux A, B et C ont été comparés avec un témoin qui est un film de paillage noir en polyéthylène (PE).

Le dispositif mis en place est le suivant (Figure VI-2) :

- Film témoin adjacent (noté PE(1) et PE(2)) à chaque matériau à tester avec deux rangs de bordure soit sept parcelles,

- Culture sur buttes de 1.20 m de large,
- Parcelle élémentaire de 60 plantes soit 30 m linéaire de butte (densité de plantation : 1 plante/m², distance entre rangs : 2 m, distance entre plante sur le rang : 0.5 m).

Nord

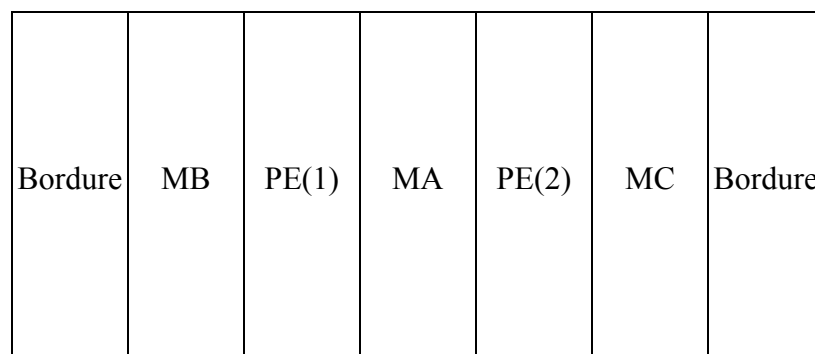


Figure VI-2 : Dispositif de mise en culture sur paillage de melons

La comparaison des résultats obtenus pour les films à tester doit se faire avec la parcelle témoin adjacente. Nous comparons donc les résultats du matériau A avec ceux des témoins PE(1) et PE(2), ceux du matériau B avec ceux du témoin PE(1) et enfin ceux du matériau C avec ceux du témoin PE(2).

Le déroulement de la culture est le suivant :

- Variété de melons : Héliobel
- Semis : le 19/03
- Pose des paillages : le 17/04
- Plantation : le 23/04
- Irrigation au goutte à goutte sous le paillage
- Protection sanitaire classique selon la fiche de préconisation APREL
- Fertilisation classique pour une culture de melon (Annexe 3)
- Début de récolte le 2 juillet 01. Fin de récolte le 27 juillet 01

- Broyage des fanes après récolte si nécessaire pour observation du comportement du paillage.

Différents contrôles et appréciations sont effectués au cours de la culture :

- Comportement du film à la pose mécanique
- Observation du comportement des films deux fois par mois durant les deux premiers mois de paillage :
 - appréciation visuelle de l'état de dégradation des films sur le sol,
 - appréciation visuelle de l'état de dégradation des films dans le sol,

Une note entre 1 et 5 est donnée, évaluant le degré de dégradation. La note 5 correspond à une absence de dégradation, et la note 1 à une disparition du matériau.

- Observation de la culture :
 - évaluation de la précocité de la mise à fleurs et de la mise à fruits,
 - appréciation de l'état végétatif de la culture sur chaque film, évaluée par une note comprise entre 1 et 5. La note 5 correspond à une bonne végétation, et la note 1 à une végétation déficiente.
 - date de la première récolte,
 - rendement à l'hectare (catégorie I et II, déchets)

2.2 Résultats et discussion

2.2.1 Comportement des films

Les résultats visuels obtenus pour les trois matériaux, en fin de test, sont les suivants.

- Le matériau A semble avoir subi une altération ou une photolyse, il est fragmenté.
- Le matériau B est plus dégradé dans le sol et est cassé en surface. Il s'est donc biodégradé dans le sol au contact des microorganismes. En revanche, en surface, il a subi les attaques UV.

- Le matériau C est très altéré et part en lambeau. Sa dégradation biologique et photochimique est tellement importante qu'il a perdu toutes ses propriétés mécaniques et ne tient plus.

Des photos ont été prises le 11 juin 01. Elles permettent de voir qu'après deux mois sur le sol, le matériau C est déjà fortement dégradé (Figure VI-3). Au bout de six mois, le matériau C a totalement disparu de la parcelle.



Matériau A



Matériau B



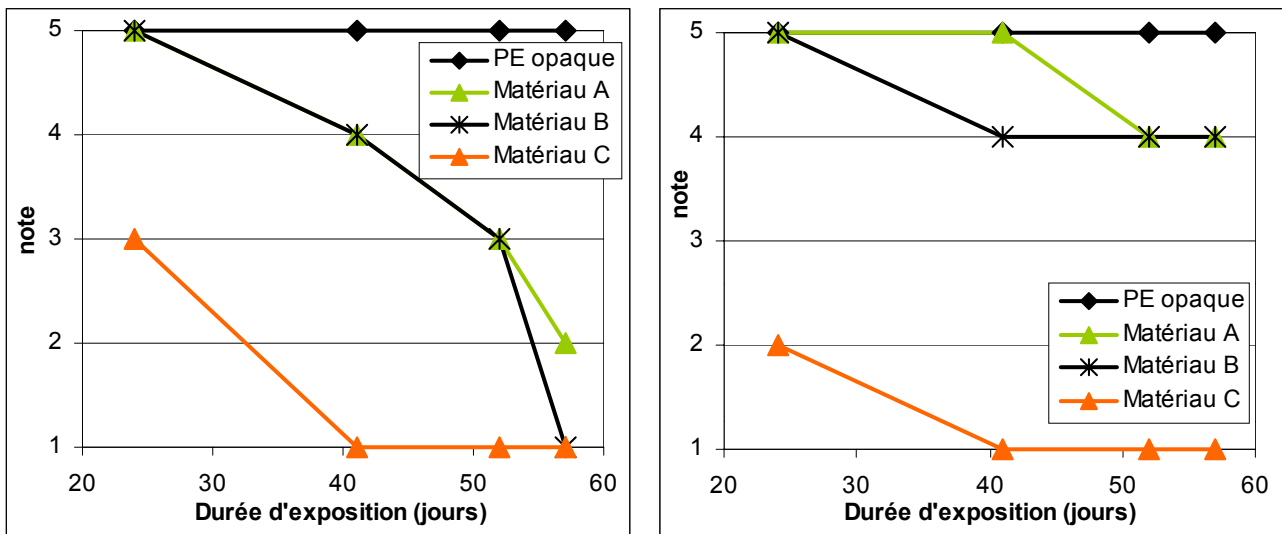
Matériau C



Témoin en PE

Figure VI-3 : Etat du paillage avec les trois matériaux test et le témoin au bout de deux mois

Les courbes retranscrivant l'état de dégradation, évalué par des notes entre 1 et 5, sont représentées figure VI-4.



a) Dégradation dans le sol

b) Dégradation sur le sol

Figure VI-4 : Evaluation de la dégradation des films test en paillage, dans le sol et sur le sol

Nous confirmons une absence de dégradation pour le témoin en polyéthylène. Le matériau C disparaît totalement en 41 jours, dans le sol et sur le sol. Nous observons une dégradation progressive pour les matériaux A et B, dans le sol, qui n'a pas lieu sur le sol. Ceci nous montre que ces matériaux se dégradent majoritairement par l'action de microorganismes et que la part de photodégradation dans le phénomène global de biodégradation est minoritaire.

2.2.2 Aspects agronomiques

2.2.2.1 Etat végétatif

L'évaluation de l'état végétatif obtenu pour les différents films en fonction de la durée d'exposition est représentée figure VI-5.

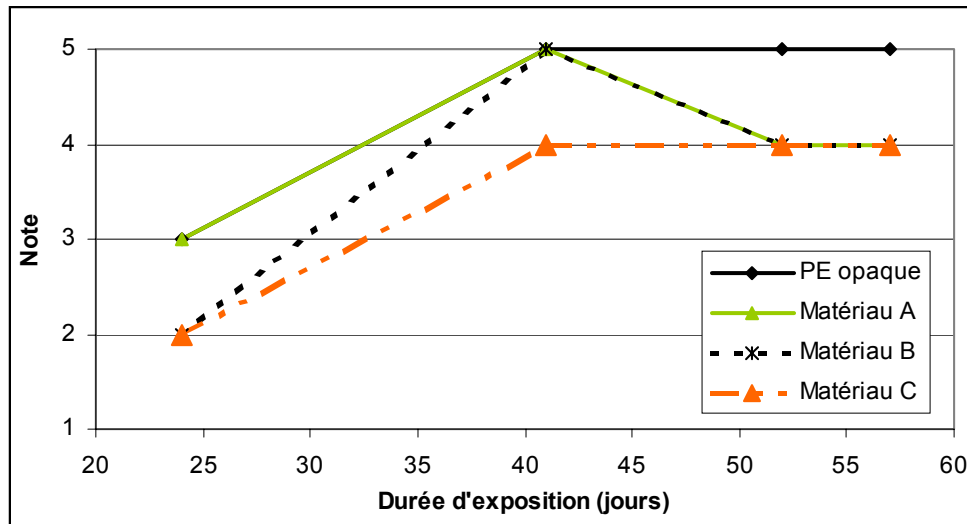


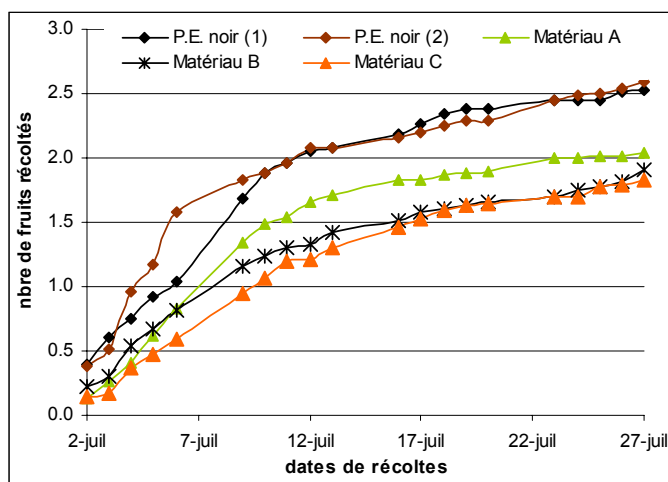
Figure VI-5 : Evaluation de l'état végétatif, note comprise entre 1 et 5

Nous pouvons constater que l'état végétatif pour le matériau C est toujours inférieur à celui du témoin PE. Ceci est certainement dû à la disparition du film à la surface de la parcelle. Le matériau A ayant la dégradation la plus lente, l'état végétatif qui lui est associé est le plus proche du témoin. Le matériau B provoque un état végétatif intermédiaire entre ceux des matériaux A et C. Nous notons que l'état végétatif est directement lié au taux de dégradation du matériau. Cependant, malgré la dégradation des films, après deux mois d'exposition, l'état végétatif lié à chacun des trois matériaux testés reste correct (4).

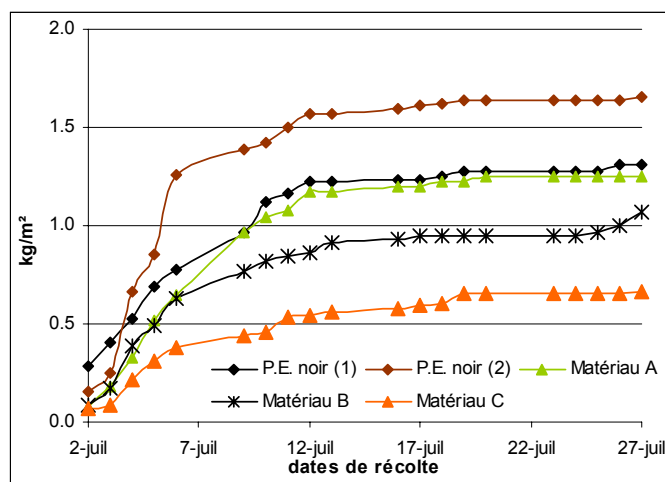
2.2.2.2 Rendements

Les rendements et le poids des déchets sont représentés figure VI-6.

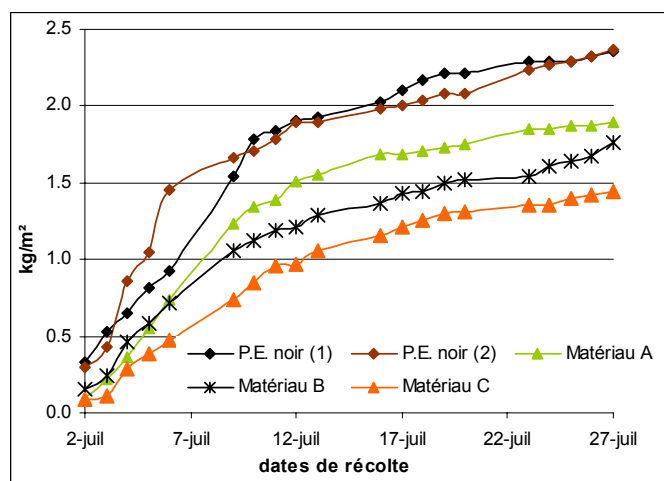
Nous constatons pour le matériau A que le nombre de fruits au m² est quasiment identique à celui des témoins PE(1) et PE(2). En revanche, les résultats sont inférieurs sur les matériaux B et C. De même le rendement commercialisable obtenu sur le matériau A est semblable à celui des témoins. Il est légèrement inférieur pour le matériau B. Dans le cas du matériau C, il est très inférieur aux autres. Les fruits sont plus petits, il y a beaucoup de déchets. Il n'a pas été observé de mortalité de plantes mais la végétation s'est avérée inférieure sur ce matériau en début de culture. L'effet combiné de cette phytotoxicité et la dégradation rapide du film sur le sol expliquent les rendements inférieurs.



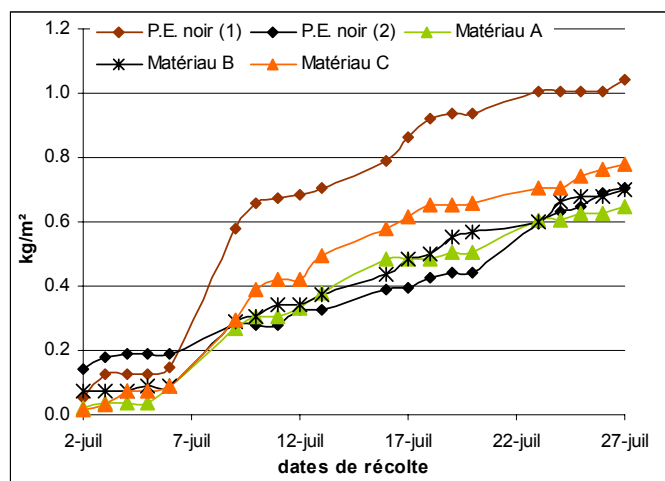
a)



b)



c)



d)

Figure VI-6 : a) Nombre de fruits au m², b) Rendement commercialisable en kg/m², c) Rendement brut en kg/m², d) Poids des déchets en kg/m²

Le matériau C n'est donc pas adapté pour le paillage sur melon car il se dégrade trop rapidement. Il présente peut-être également une certaine phytotoxicité en début de culture. Il faudrait analyser la plante et les fruits pour voir s'ils contiennent des produits toxiques.

Les deux autres matériaux peuvent convenir pour du paillage, mais leur effet à long terme est encore inconnu.

3 CONCLUSION

Les différentes études que nous avons menées sur ces trois matériaux nous ont permis d'évaluer le comportement de ces matériaux à la dégradation dans le milieu naturel.

Nous n'avons pas effectué de tests d'accumulation, mais lors de la dégradation de matériaux dans la pouzzolane, les quantités introduites correspondent environ à celles que l'on introduirait dans un sol en 50 ans de culture. Ces expérimentations sont donc représentatives de ce phénomène.

Concernant le matériau C, « toxifié » pour les besoins de l'étude, nous avons pu détecter la molécule toxique MDA, par HPLC, en fin de dégradation à une concentration de 0.0849 g/m^3 . La valeur limite acceptable dans l'air est de 0.8 g/m^3 . Toutefois, aucun effet toxique n'a été noté par rapport à la pouzzolane sans le matériau. La concentration en molécule toxique relarguée au cours de la dégradation est supérieure à la limite de détection par analyse chimique, mais elle est inférieure à celle ayant un effet léthal sur les organismes mis en œuvre dans les tests d'écotoxicité. Une réponse négative aux tests d'écotoxicité ne permet donc pas d'écarter avec certitude l'absence de molécule toxique dans le milieu. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire lorsque la nature de la molécule toxique est connue, il semble nécessaire de coupler les tests d'écotoxicité à une analyse chimique afin d'écarter tout risque de toxicité. Les tests d'écotoxicité utilisés pour cette étude ne sont pas adaptés à la pouzzolane. Il serait intéressant d'étudier le test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* qui s'est révélé efficace pour mettre en évidence un effet toxique sur un autre support inerte (la vermiculite) (Degli-Innocenti *et al.*, 2001) et qui ne montrait pas d'inhibition sur la pouzzolane seule (essai réalisé par l'Inéris, non présenté).

La minéralisation sur pouzzolane des matériaux A et B n'est pas totale. En enfouissement en sol, le matériau B a totalement disparu en un an, mais le matériau A persiste encore. Pour le matériau B, si les cultures sont suffisamment espacées pour permettre au film de se dégrader, il peut être laissé sur place. En revanche, une utilisation du matériau A pendant 50 ans conduirait en la présence dans le sol de fragments de film qui risque d'asphyxier le sol. Pour ce type de film, hydrolysable, mais trop résistant en sol, il est préférable de le ramasser en fin de culture et de le composter.

4 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dahiyat, B., Shi, F., Zhao, Z., Leong, K. 1992. Design of degradable elastomers for medical applications. *Polymeric Materials Science and Engineering*. **66**: p87-88.

Degli-Innocenti, F., Bellia, G., Tosin, M., Kapanen, A., Itävaara, M. 2001. Detection of toxicity released by biodegradable plastics after composting in activated vermiculite. *Polymer Degradation and Stability*. **73**: p101-106.

Ineris 2002. Evaluation des risques écotoxicologiques. <http://www.ineris.fr/connaître/domaines/chroniques/ecotox/equipement1.htm>.

ISO 11269-2. 1995. Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol. Partie 2 : Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.

Kapanen, A., Itävaara, M. 2001. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety, Environmental Research, Section B*. **49**: p1-16.

Kim, M.N., Lee, B.Y., Lee, I.M., Lee, H.S., Yoon, J.S. 2001. Toxicity and biodegradation of products from polyester hydrolysis. *Journal of Environmental Science Health A*. **36**(4): p447-463.

NF T 90-376. 2000. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours.

Szycher, M., Poirier, V.L., Dempsey, D.J. 1983. Development of an aliphatic biomedical-grade polyurethane elastomer. *Journal of Elastomers and Plastics*. **15**: p81-95.

Vermette, P., Wang, G.B., Santerre, J.P., Thibault, J., Laroche, G. 1999. Commercial polyurethanes : the potential influence of auxiliary chemicals on the biodegradation process. *Journal of Biomaterials Sciences. Polymer Editions*. **10**(7): p729-749.

Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W.D., Müller, R.J. 2001. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters : evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*. **44**: p289-299.

Les problèmes d'accumulation des déchets solides dans l'environnement et la mise en place de législations sur les déchets non-ultimes ont provoqué ces dernières années un intérêt croissant pour les matériaux polymères biodégradables. Les plastiques, utilisés en agriculture et donc souillés et de faibles poids, sont une voie d'application privilégiée pour ces nouveaux polymères. Toutefois, dans l'optique d'un développement durable de ces matériaux, il est impératif de prouver leur biodégradabilité par des méthodes rapides et représentatives des phénomènes observés dans le sol, et de vérifier leur non toxicité pour le milieu naturel.

Grâce à un état de l'art sur les différents paramètres influençant la biodégradation en milieu solide, nous avons étudié et mis au point une nouvelle méthode de dégradation sur support inerte. Nous avons alors déterminé et proposé des conditions optimales de test, à savoir :

- Le support inerte est constitué de pouzzolane et l'inoculum d'un lixiviat de sol.
- Une phase d'activation commune de dix jours est réalisée à 25°C afin d'acclimater les microorganismes aux conditions du test.
- La détermination du taux de biodégradation est effectuée par mesure IR du dioxyde de carbone produit par les microorganismes.

Nous avons, dès lors, appliqué ce protocole à la cellulose, produit de référence utilisé dans de nombreux tests normalisés. Nous obtenons un taux de biodégradation de 80% en 28 jours, ce qui correspond aux valeurs obtenues avec le test de Sturm. La répétition de cet essai en présence de différents extraits de sol a montré la bonne reproductibilité de la méthode. Grâce à ce protocole, le processus de biodégradation est moins dépendant de la composition du sol (humidité, matière organique, température, ratio C/N, etc.). Ces différents paramètres peuvent être fixés sur le support inerte. La biodégradation en sol peut donc, sous certaines conditions, être standardisée.

Nous avons ensuite automatisé ce test afin d'augmenter encore la reproductibilité de nos résultats. Puis nous avons appliqué ce protocole à trois matériaux. Nous avons sélectionné trois films de paillage, deux proches des paillages commercialisés et un confectionné pour les besoins de cette étude. Nous avons comparé notre méthode aux tests existants. Les résultats obtenus varient selon la méthode utilisée. Cependant quel que soit le test, l'évolution de la biodégradabilité reste la même. Le matériau C se dégrade mieux que le B lui-même mieux que le A.

Nous avons, par ailleurs, pu mettre en évidence une accélération du processus de biodégradation lors du test sur pouzzolane par rapport au sol laboratoire ou au test de Sturm. Et, bien que les taux de minéralisation des matériaux A et B restent faibles, ces résultats en simulation de sol ne préfigurent pas de la dégradation en conditions réelles car d'autres paramètres physico-chimiques favorisent également la dégradation tels que l'influence des UV, des racines, des vers de terre, ...

Cette méthode laboratoire permet en outre l'extraction, et donc l'analyse des produits de dégradation. Dans cet objectif, nous avons recherché un solvant d'extraction et donc une solubilisation de nos matériaux. En raison de la trop faible dégradation du matériau A, seuls les produits de dégradation des matériaux B et C ont été étudiés.

Nous avons pu trouvé un solvant solubilisant ces deux matériaux, la N-Méthylpyrrolidone (NMP). Nous l'avons utilisée pour les analyses par chromatographie par perméation de gel. Mais par sa structure chimique, la NMP n'est pas appropriée pour l'analyse en solution des matériaux B et C. Nous avons donc choisi le DMSO-d₆ pour les analyses RMN du matériau C et le chloroforme pour les analyses IR et RMN du matériau B.

Nous avons comparé l'extraction par agitation magnétique et par Ultra-sons de ces deux matériaux dans la NMP. Cette extraction à partir des différents supports inertes (pouzzolane et vermiculite) s'est avérée quantitative et rapide grâce aux Ultra-sons. Après optimisation des conditions d'extraction, nous avons choisi d'extraire le matériau B en 60 minutes et le matériau C en 40 minutes.

Cette étude, ayant permis de valider l'inertie des supports choisis vis à vis de l'extraction, montre tout l'intérêt de travailler sur un support inerte par rapport à un support naturel et complexe, comme le sol.

Avant l'analyse des extraits des différents mélanges, nous avons procédé à l'analyse des matériaux avant dégradation. Les spectroscopies IR et RMN ont permis d'élucider les structures chimiques des trois matériaux à tester. Le matériau A est constitué d'un copolyester statistique de butylène téréphtalate et de butylène adipate. Le matériau B est composé d'un mélange d'amidon intimement associé au copolyester constituant le matériau A. Le matériau C est un copolymère « bloc » composé d'amidon, de polycaprolactone et de polycaprolactone lié à un polyuréthane.

L'utilisation de la chromatographie par perméation de gel, de la spectroscopie IR et RMN, de l'analyse enthalpique différentielle et de la microscopie électronique à balayage, nous a permis d'étudier le comportement de deux matériaux (B et C) vis-à-vis de la dégradation dans différentes conditions : simulation de sol et de compost et enfouissement « in situ ». Les matériaux ont été analysés en cours de dégradation (simulation de compost sur vermiculite et en enfouissement réel), pour le matériau B, et en simulation de sol sur pouzzolane pour le matériau C ; et en fin de dégradation (plateau atteint) pour tous ces tests ainsi qu'en simulation de sol sur pouzzolane pour le matériau B.

Pour le matériau B, les résultats d'analyse obtenus, après dégradation en simulation de sol et en enfouissement réel, nous ont permis de mettre en évidence des similitudes de comportement. En effet, nous observons pour ces deux conditions de test que la dégradation du matériau débute par celle de l'amidon. Sa minéralisation est totale, il n'apparaît pas de produits de réaction intermédiaires. En disparaissant, l'amidon laisse des « trous » dans la matrice ce qui induit la dénaturation de la structure du matériau, la dégradation du copolyester est alors initiée. Celui-ci se dégrade en formant des molécules de plus petites masses moléculaires. L'analyse par spectroscopie RMN du copolyester montre qu'il n'y aurait pas de dégradation préférentielle de la partie aliphatique par rapport à la partie aromatique. Il semble donc que le test de simulation de sol sur pouzzolane permette de retranscrire les phénomènes de biodégradation présents dans le sol.

En compost, des comportements différents de ceux observés en sol ou en simulation de sol apparaissent. Nous observons toujours une dégradation principale de l'amidon. Mais, l'analyse chromatographique par perméation de gel permet de mettre en évidence des phénomènes différents pour la dégradation du copolyester. En effet, les matériaux sont soumis à une température élevée (58°C) et à un pH basique (8-9). En plus d'une attaque des microorganismes, les matériaux subissent probablement une hydrolyse chimique. Nous avons alors une dégradation dans la masse du matériau ainsi qu'une érosion due aux microorganismes. La dégradation du copolyester procède par décrochages successifs de fragments qui peuvent ensuite être bioassimilés. Pour un taux de biodégradation de 90%, la minéralisation est totale et il ne persiste même plus de cycle aromatique dans le milieu.

La dégradation du matériau C a été suivie uniquement en simulation de sol. Comme pour le matériau B, nous observons en premier lieu une disparition de l'amidon. La dégradation se poursuit par celle du PCL (libre) et du mélange PCL (lié) -polyuréthane.

L'accessibilité de ces trois constituants ainsi que leur compatibilité avec les microorganismes sont différentes, ils se dégradent donc à des vitesses différentes. Le PCL libre, plus accessible, se dégrade le plus rapidement, puis le PCL lié et enfin la partie polyuréthane qui se dégrade faiblement. Ils se dégradent en formant des molécules de faibles masses moléculaires.

D'autre part, sur le matériau C, toxifié pour les besoins de l'étude, nous avons pu détecter, en fin de dégradation, par HPLC, la molécule toxique MDA relarguée lors de la dégradation de ce matériau, à une concentration de 0.0849 g/m³. L'utilisation de ce type de film, c'est-à-dire à base de polyuréthane, peut induire des effets toxiques à long terme.

Cependant, en chimie analytique seule une analyse ciblée sur un groupe de molécules permet de mettre en évidence une éventuelle toxicité des produits de dégradation. Afin d'observer un effet toxique de façon plus universelle, des tests d'écotoxicité terrestre et aquatique ont été menés à l'INERIS, sur des mélanges de pouzzolane et de matériau C au cours de sa dégradation. Mais ces tests ne sont pas compatibles avec la pouzzolane. Il nous a été difficile de mettre en évidence une inhibition des organismes testés. Des approfondissements supplémentaires sont donc nécessaires pour appliquer cette technique. Pourtant, la concentration en matériau C dans la pouzzolane ayant servi pour les tests de biodégradation et d'écotoxicité représentent environ 50 ans de culture. Une réponse négative aux tests d'écotoxicité ne permet donc pas d'écarter avec certitude l'absence de molécule toxique dans le milieu. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire lorsque la nature de la molécule toxique est connue, il est préférable de coupler les tests d'écotoxicité à une analyse chimique afin d'écarter tout risque de toxicité.

Parallèlement des tests agronomiques ont été menés par le CTIFL sur ces trois films. Le matériau C n'est pas adapté pour le paillage sur melon car il se dégrade trop rapidement, et présente une certaine phytotoxicité en début de culture. Il faudrait analyser la plante et les fruits pour voir s'ils renferment des produits toxiques.

Au regard des rendements obtenus, les deux autres matériaux peuvent convenir pour du paillage, mais leur effet à long terme est encore inconnu.

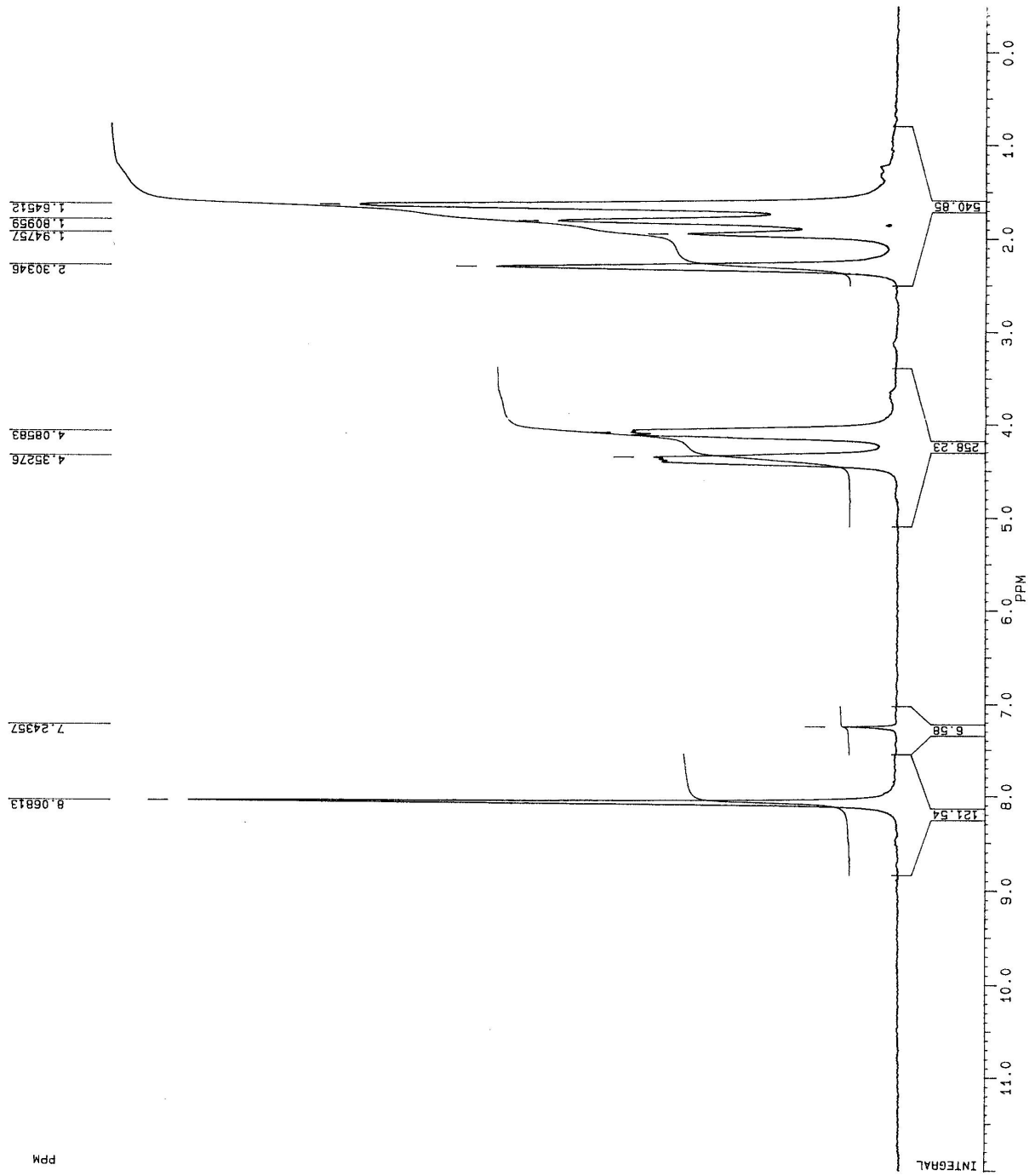
Pour ces deux matériaux A et B, nous avons aussi simulé une accumulation en utilisant une concentration en matériau dans la pouzzolane équivalente à 50 ans de culture. La mesure des UFC en fin de test nous permet de vérifier l'activité des microorganismes et l'absence d'inhibition. Cependant les vitesses de biodégradation obtenues pour ces deux

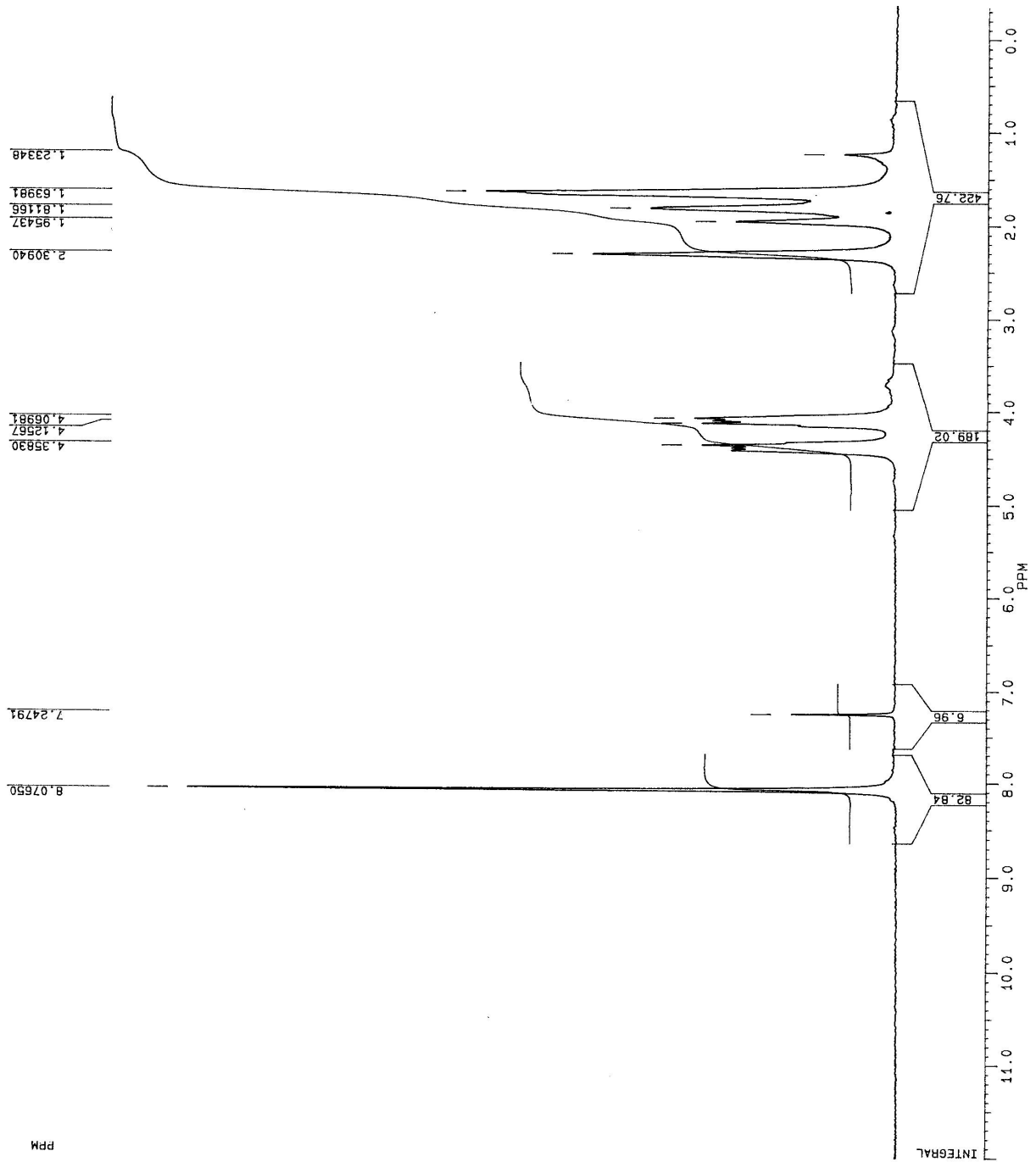
matériaux sont assez faibles. Un an est nécessaire au matériau B pour disparaître totalement en sol. Il pourrait être utilisé sur des cultures suffisamment espacées. En revanche, le matériau A se dégrade beaucoup plus lentement. Il persiste encore au bout de deux ans. L'utilisation de ce film pour du paillage pendant plusieurs années résulterait en la présence dans le sol de fragments de film qui risqueraient d'asphyxier le sol. Pour ce type de film, hydrolysable, mais trop résistant en sol, il est préférable de le ramasser en fin de culture et de le composter.

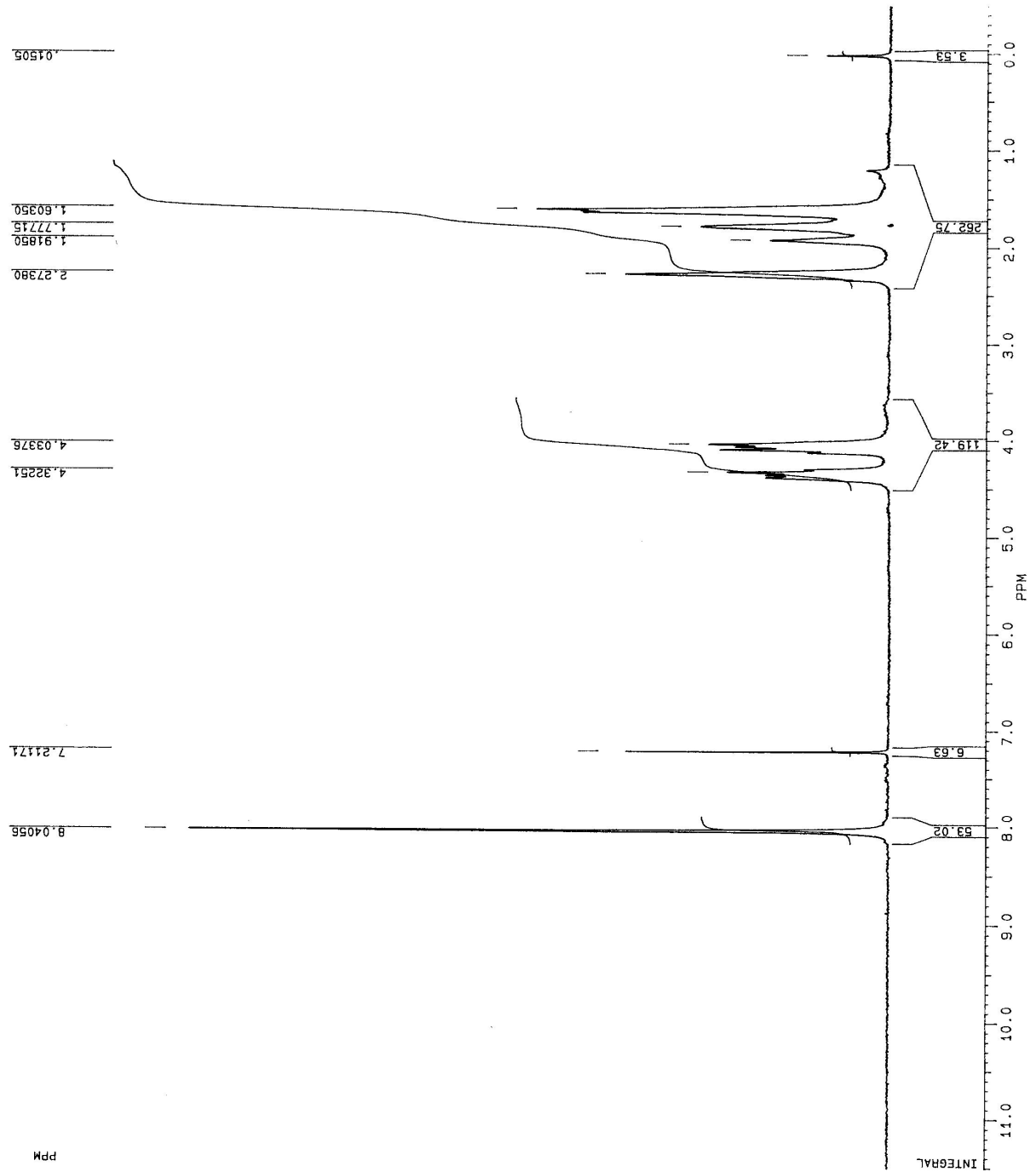
Même si elle a permis de répondre à de nombreuses questions, cette thèse ouvre de nombreuses voies de travaux :

- Afin d'identifier les produits et résidus de dégradation, il serait nécessaire de développer des méthodes analytiques supplémentaires. La recherche de colonnes chromatographiques permettant une séparation efficace des produits de dégradation et l'utilisation de la spectroscopie de masse devraient apporter de nombreuses informations sur la nature des produits de dégradation.
- Pour compléter cette étude, l'identification des microorganismes responsables de la dégradation pourraient permettre de déterminer les mécanismes de dégradation.
- La pouzzolane ne s'est pas avérée adaptée pour mettre en évidence un effet toxique des produits de dégradation. Il serait alors intéressant d'employer la terre utilisée pour les tests en terrines pour les tests d'écotoxicité.

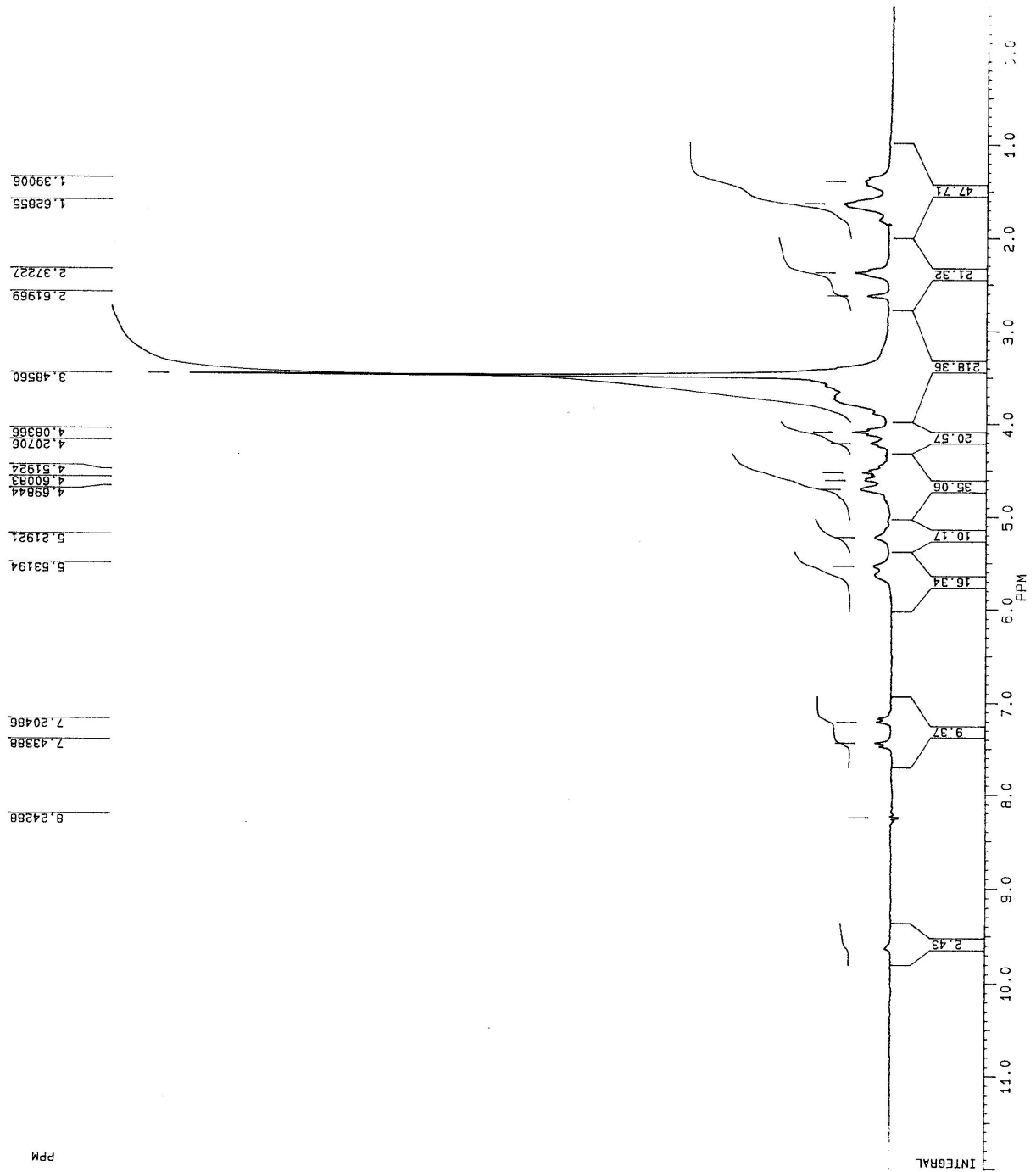
ANNEXE 1 : SPECTRES RMN

Annexe 1-1 : Spectre ^1H -RMN du matériau A

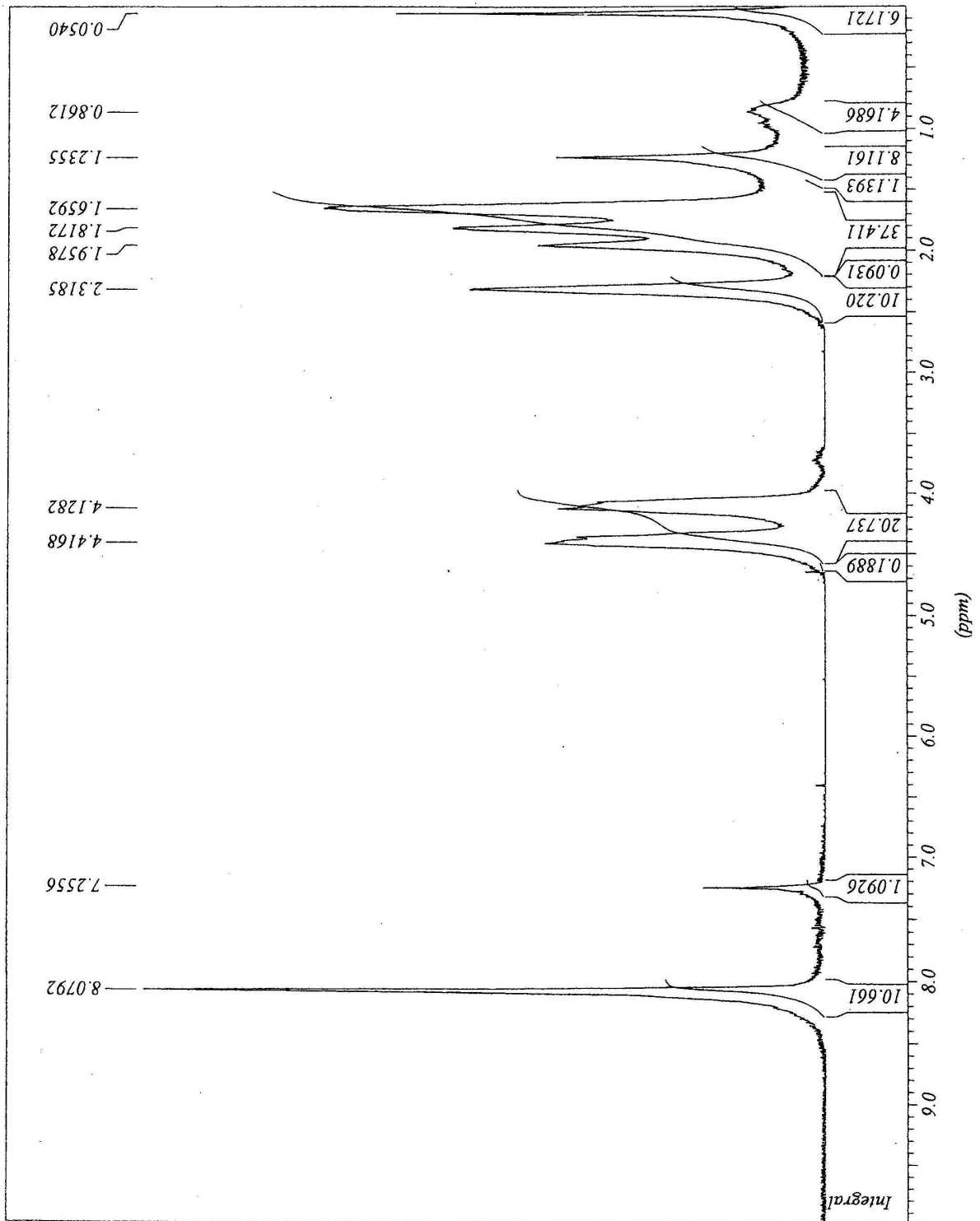
Annexe 1-2 : Spectre ^1H -RMN du matériau B sous forme de film

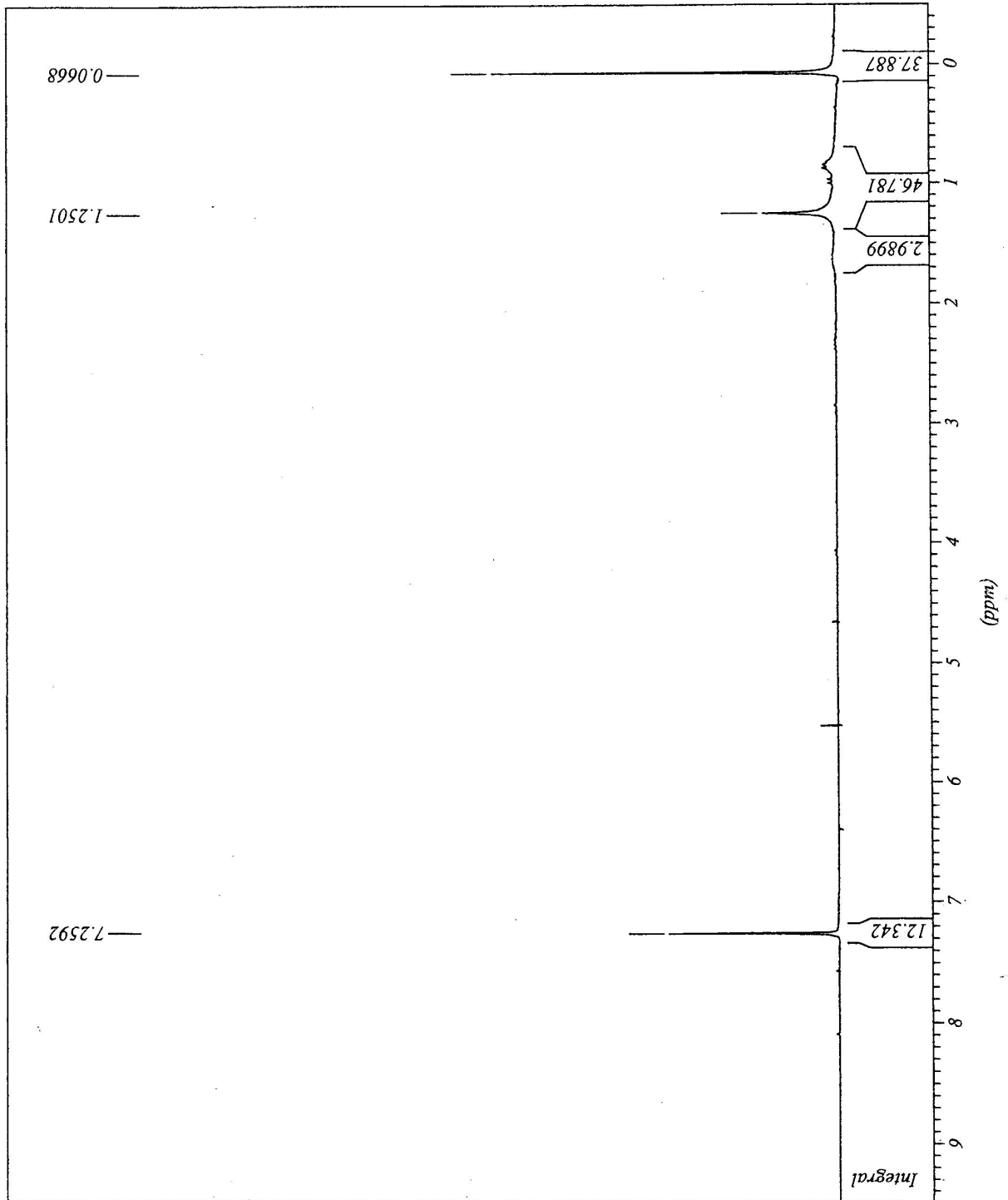


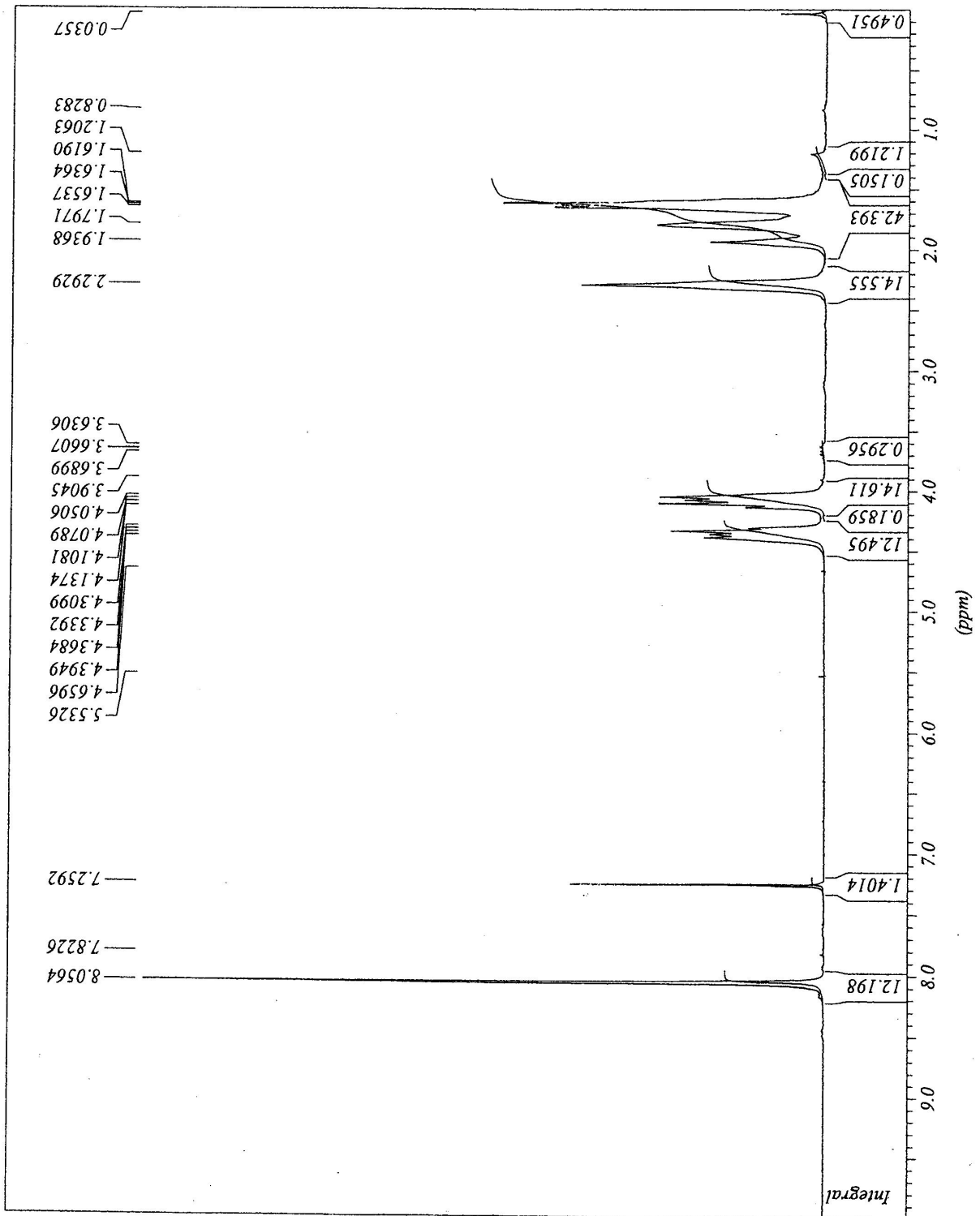
Annexe 1-3 : Spectre ^1H -RMN du matériau B sous forme de granules

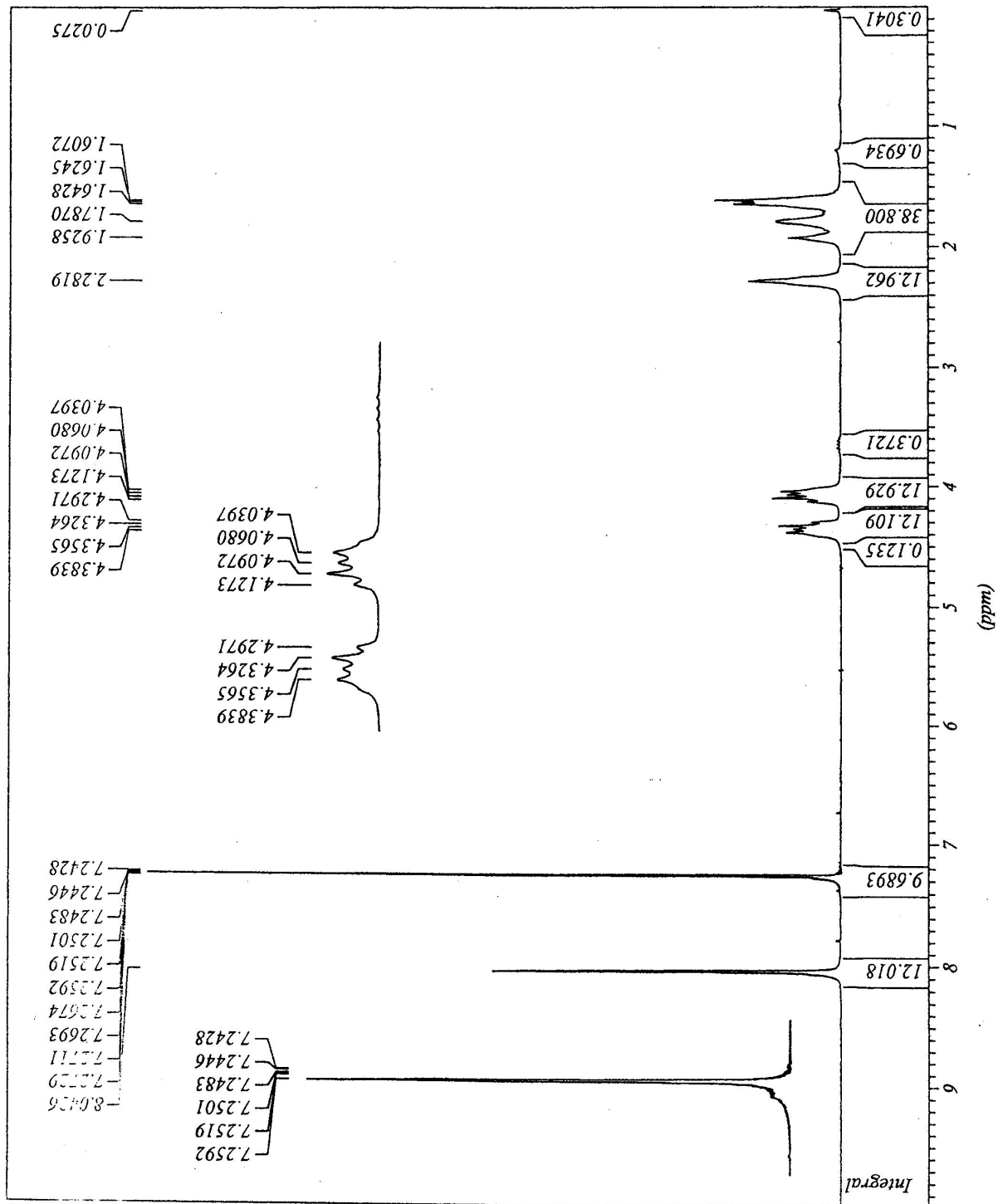


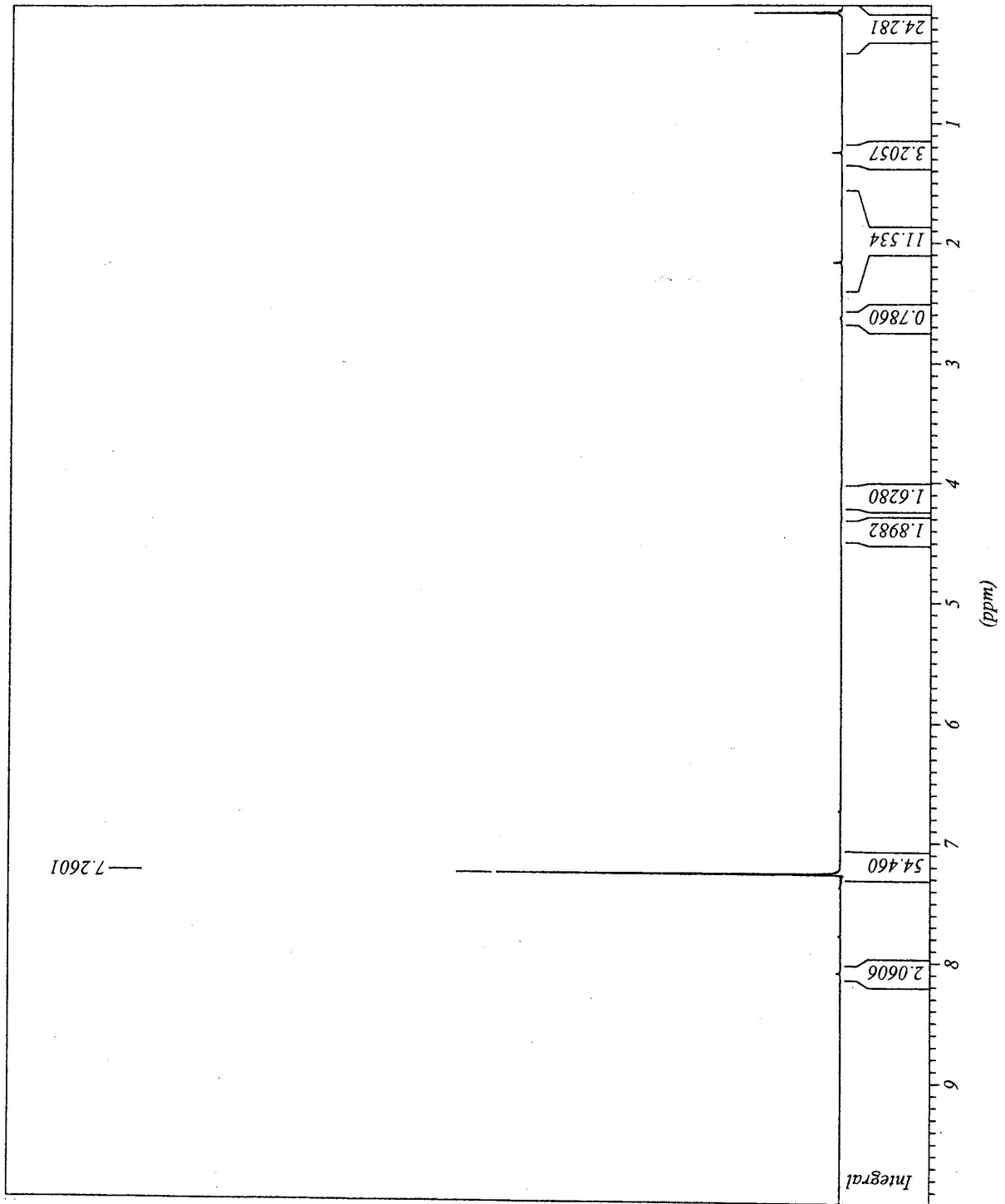
Annexe 1-4 : Spectre ¹H-RMN du matériau C

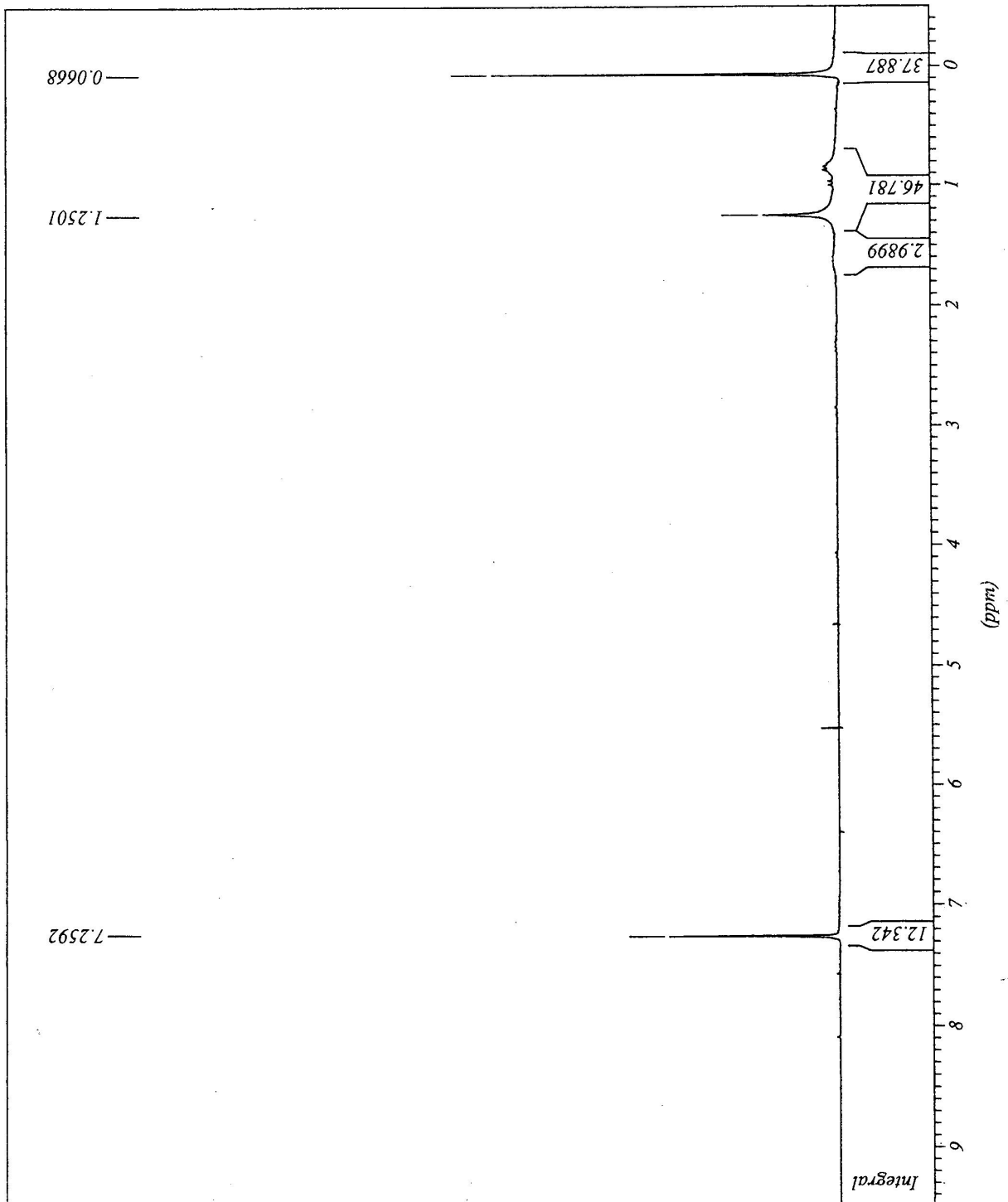
Annexe 1-5 : Spectre ^1H -RMN du matériau B après 180 jours de dégradation sur pouzzolane

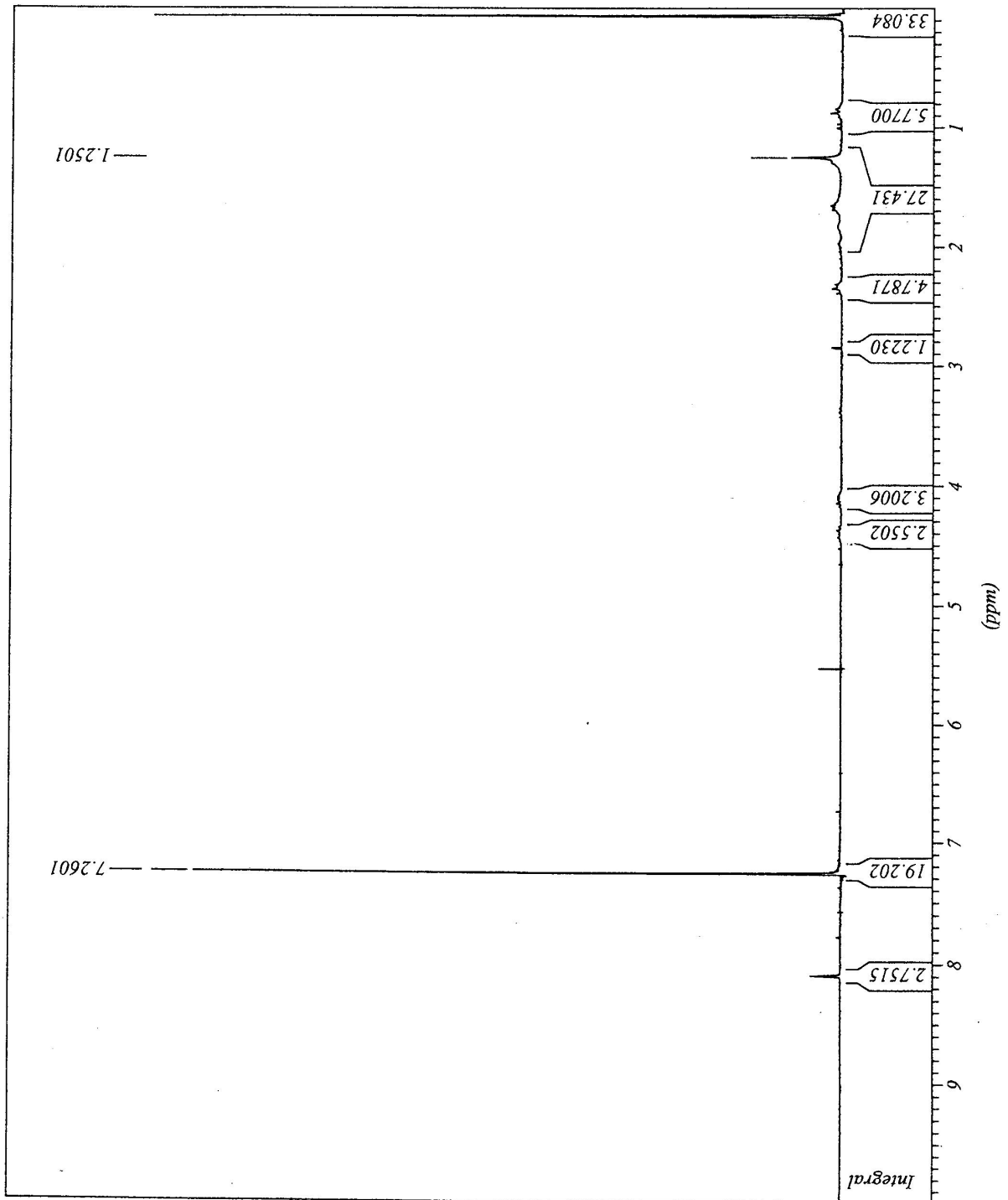
Annexe 1-6 : Spectre ^1H -RMN du « blanc » après 180 jours de dégradation sur pouzzolane

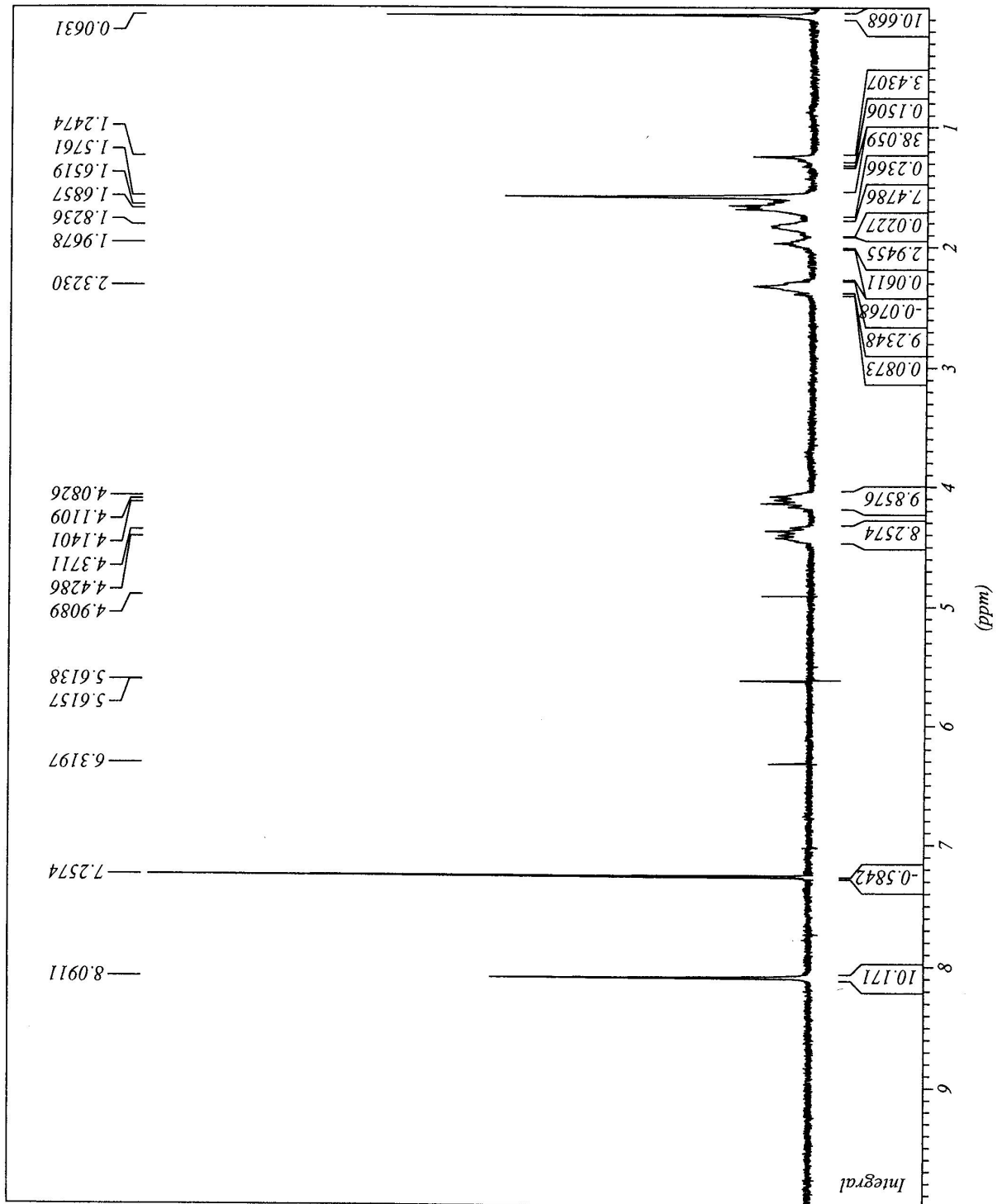
Annexe 1-7 : Spectre $^1\text{H-RMN}$ du matériau B après 0 jours de dégradation sur vermiculite

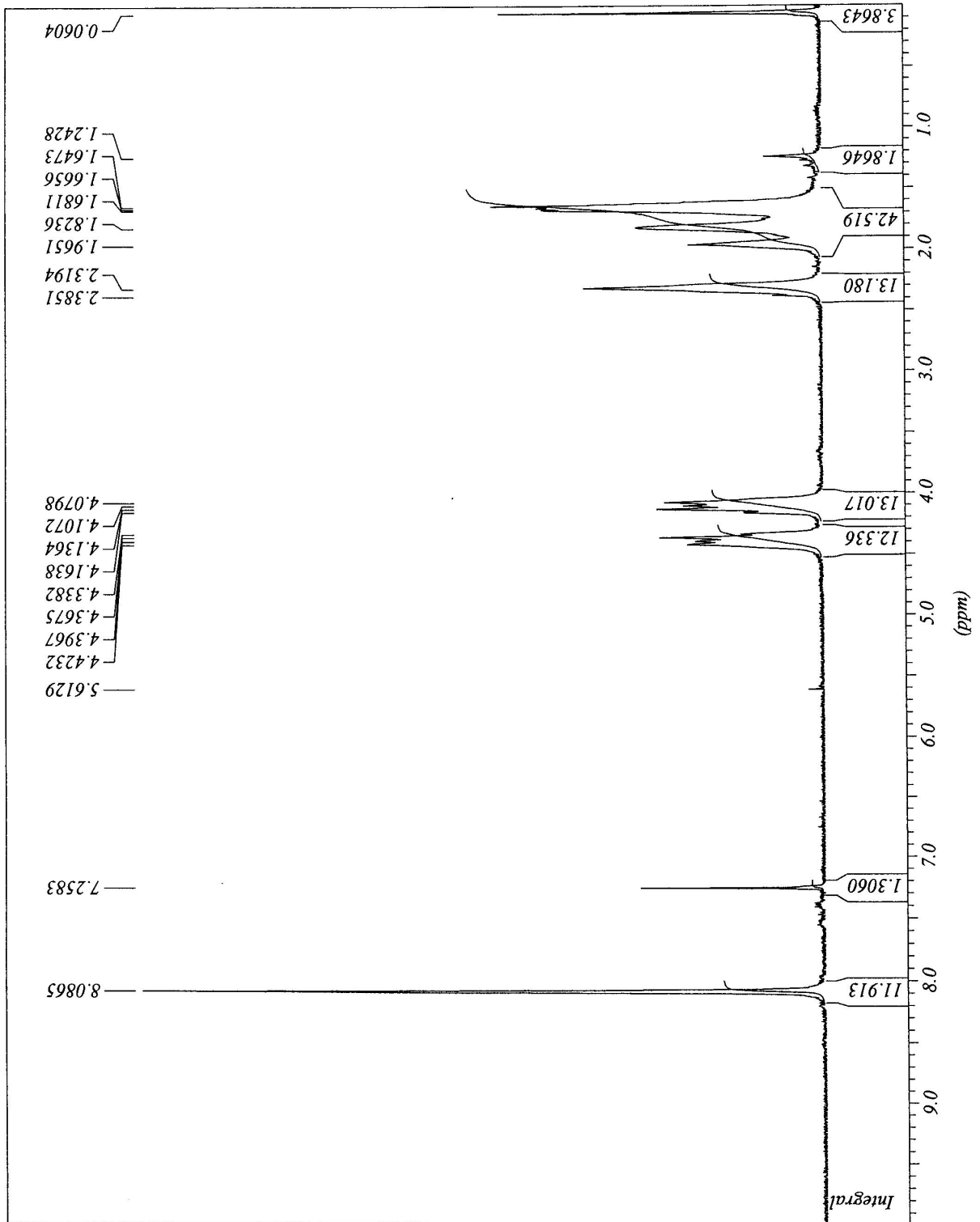
Annexe 1-8 : Spectre $^1\text{H-RMN}$ du matériau B après 40 jours de dégradation sur vermiculite

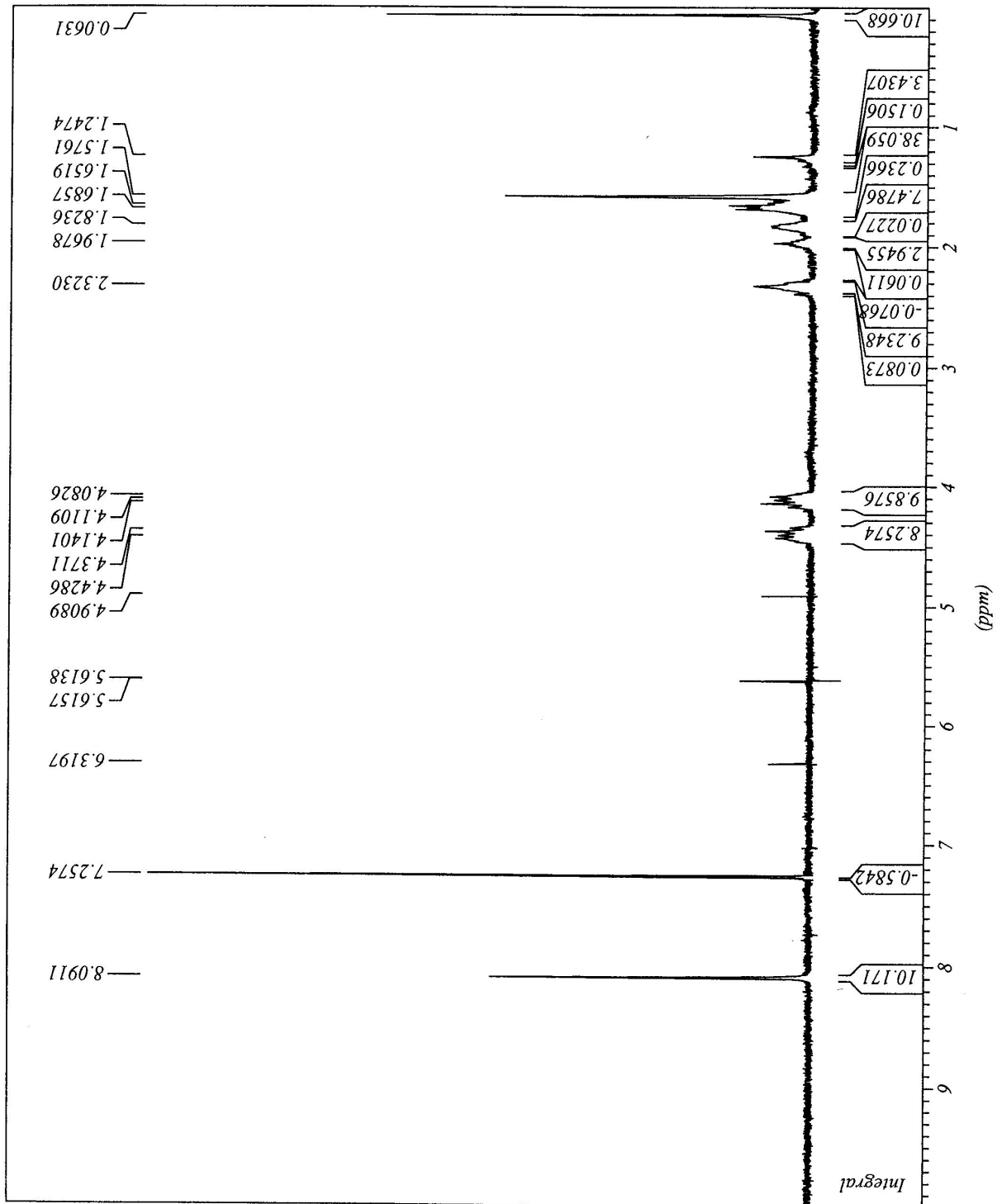
Annexe 1-9 : Spectre ^1H -RMN du matériau B après 90 jours de dégradation sur vermiculite

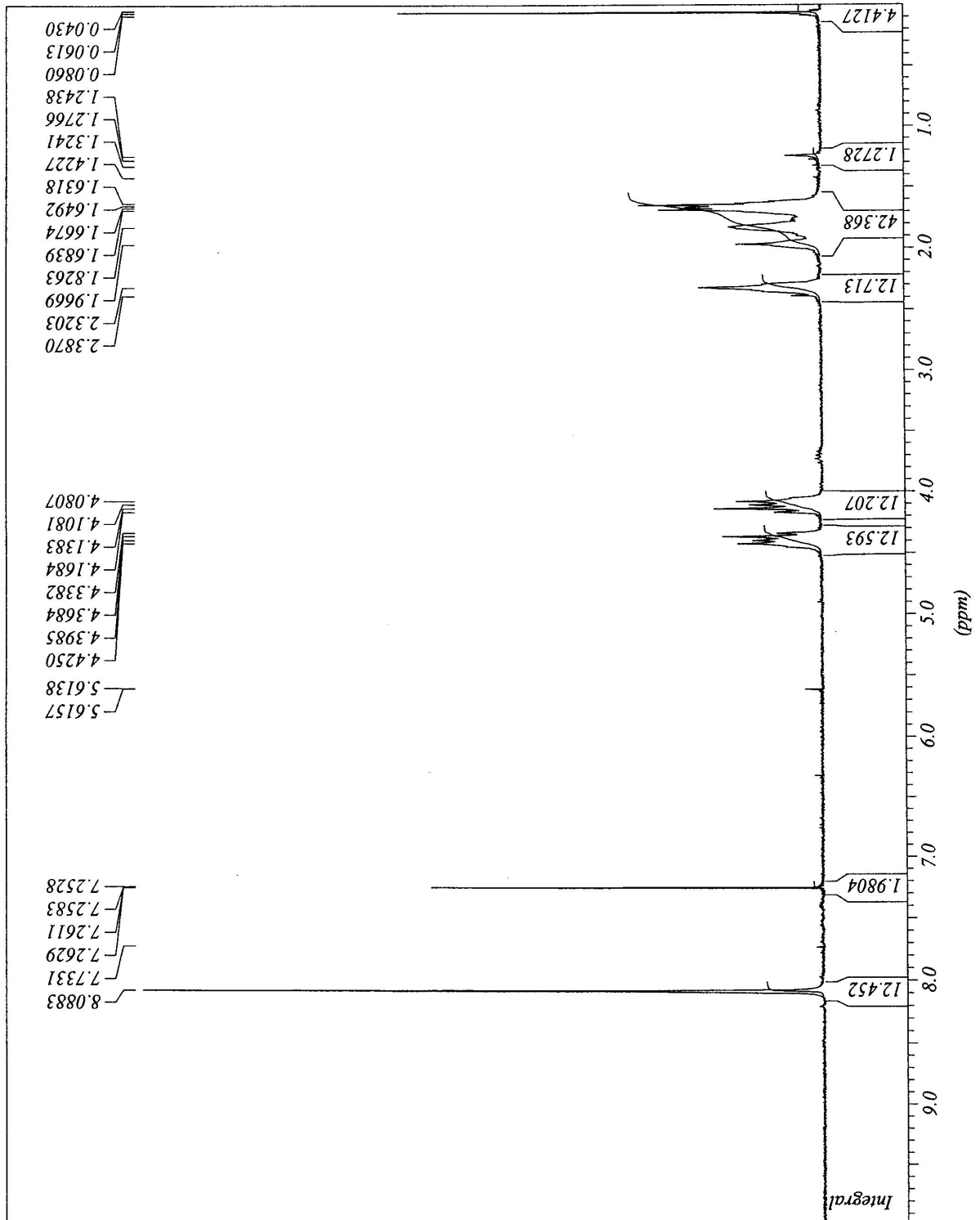
Annexe 1-10 : Spectre ^1H -RMN du « blanc » après 40 jours de dégradation sur vermiculite

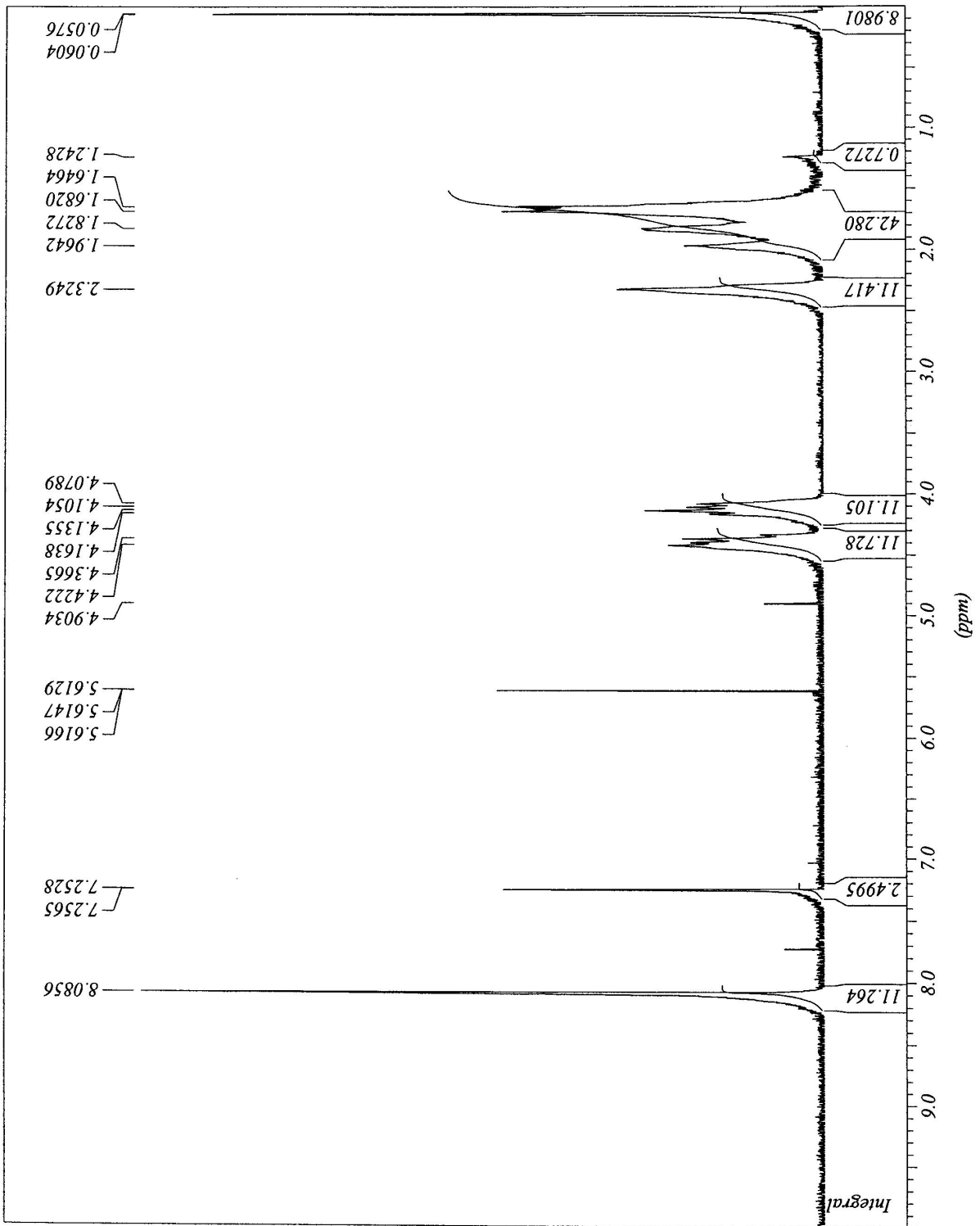
Annexe 1-11 : Spectre ^1H -RMN du « blanc » après 90 jours de dégradation sur vermiculite

Annexe 1-12 : Spectre ^1H -RMN du matériau B avant dégradation en sol

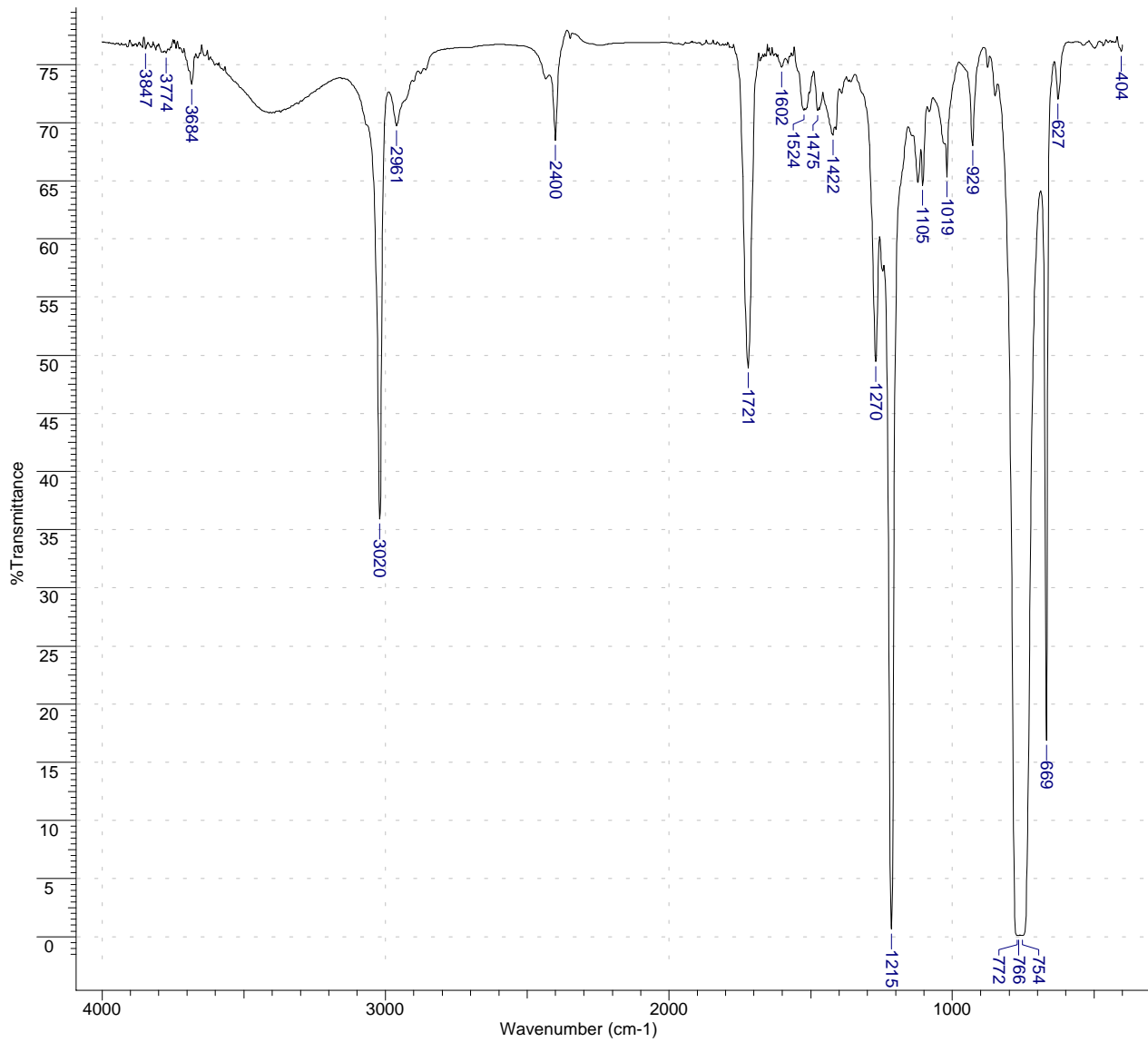
Annexe 1-13 : Spectre ^1H -RMN du matériau B dégradation en sol, premier prélèvement

Annexe 1-14 : Spectre ^1H -RMN du matériau B dégradation en sol, deuxième prélèvement

Annexe 1-15 : Spectre ^1H -RMN du matériau B dégradation en sol, troisième prélèvement

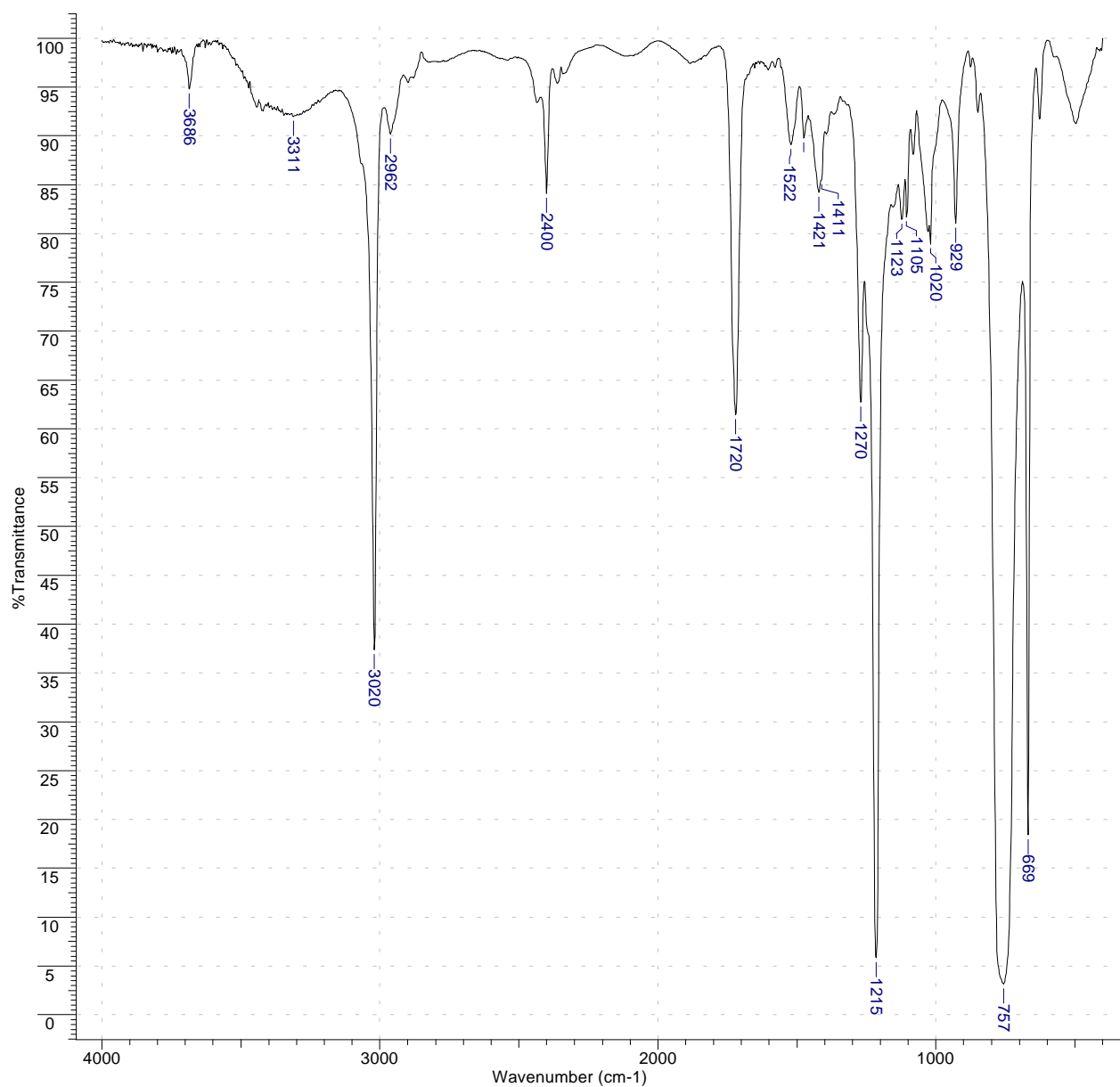
Annexe 1-16 : Spectre ^1H -RMN du matériau B dégradation en sol, quatrième prélèvement

ANNEXE 2 : SPECTRES IR



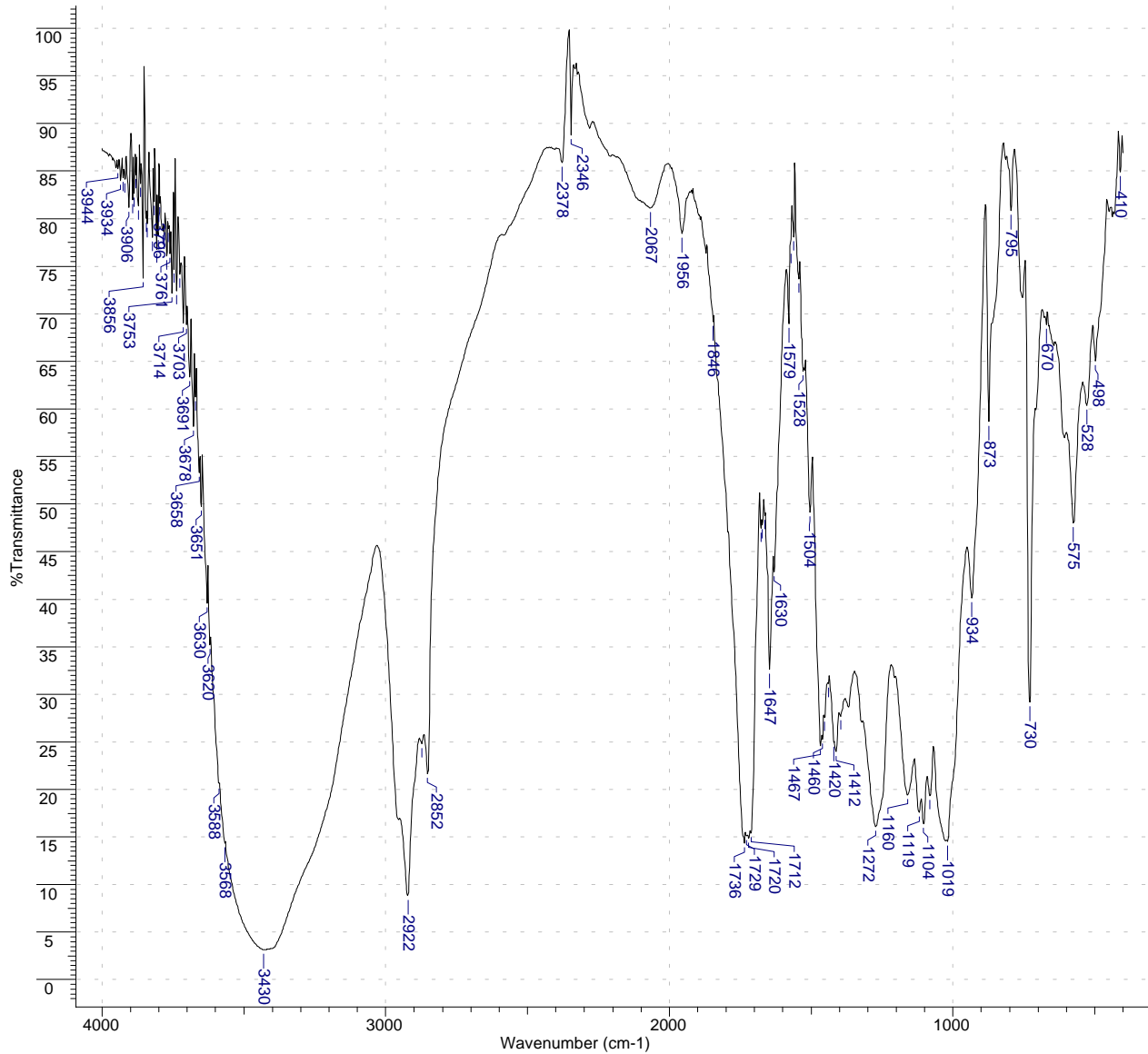
No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity
1	404.00	76.125	VW	12	1422.00	68.922	W
2	627.00	71.999	VW	13	1475.00	71.040	VW
3	669.00	16.904	S	14	1524.00	71.059	VW
4	754.00	0.122	VS	15	1602.00	74.778	VW
5	766.00	0.114	VS	16	1721.00	48.912	M
6	772.00	0.115	VS	17	2400.00	68.480	W
7	929.00	67.995	W	18	2961.00	69.740	W
8	1019.00	65.303	W	19	3020.00	35.892	M
9	1105.00	64.617	W	20	3684.00	73.272	VW
10	1215.00	0.639	VS	21	3774.00	75.972	VW
11	1270.00	49.442	M	22	3847.00	76.331	VW

Annexe 2-1 : Spectre IR du Matériau B film dans CHCl_3



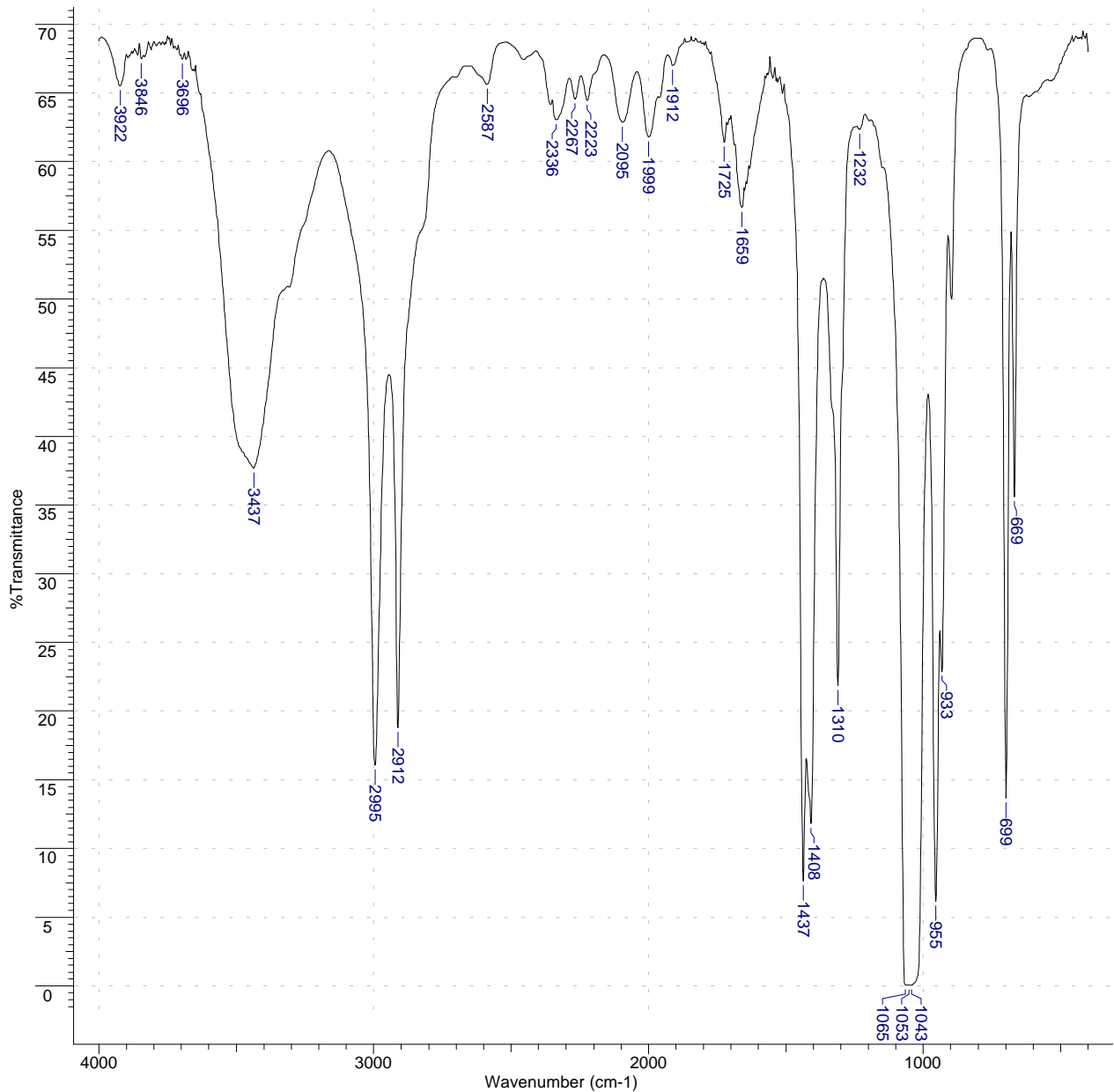
No	cm-1	%T	Intensity
1	669.00	18.401	S
2	757.00	3.162	VS
3	929.00	81.030	W
4	1020.00	78.910	W
5	1105.00	81.698	W
6	1123.00	81.406	W
7	1215.00	5.802	VS
8	1270.00	62.739	M
9	1411.00	85.466	W
10	1421.00	84.215	W
11	1475.00	89.760	W
12	1522.00	89.093	W
13	1720.00	61.455	M
14	2400.00	84.094	W
15	2962.00	90.175	W
16	3020.00	37.378	S
17	3311.00	91.984	VW
18	3686.00	94.811	VW

Annexe 2-2 : Spectre IR du Matériau B granules dans CHCl_3



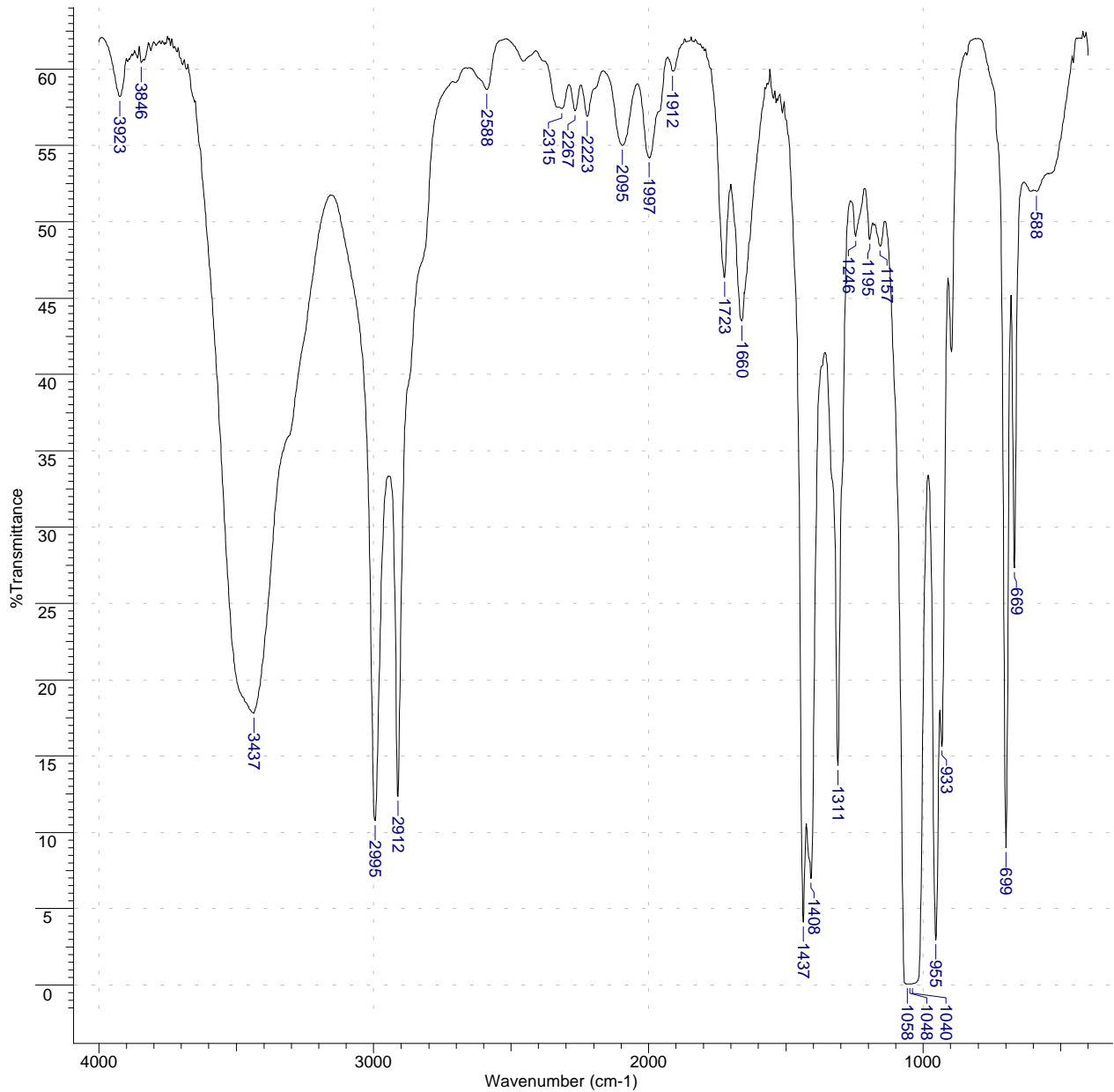
No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity
1	410.00	84.896	W	22	1467.00	24.580	S	43	2852.00	21.652	S	64	3772.00	76.066	W
2	498.00	65.046	M	23	1504.00	49.158	M	44	2874.00	24.795	S	65	3781.00	78.206	W
3	528.00	60.346	M	24	1528.00	63.990	M	45	2922.00	8.807	VS	66	3786.00	78.699	W
4	575.00	47.990	M	25	1543.00	73.642	W	46	3430.00	3.162	VS	67	3796.00	81.632	W
5	670.00	68.849	M	26	1562.00	78.088	W	47	3568.00	14.335	S	68	3802.00	78.178	W
6	730.00	29.152	S	27	1572.00	76.751	W	48	3588.00	20.515	S	69	3808.00	76.774	W
7	795.00	80.869	W	28	1579.00	68.952	M	49	3620.00	35.200	S	70	3817.00	81.797	W
8	873.00	58.656	M	29	1630.00	42.865	M	50	3630.00	39.573	S	71	3823.00	78.006	W
9	934.00	40.134	S	30	1647.00	32.611	S	51	3651.00	49.758	M	72	3840.00	79.484	W
10	1019.00	14.546	S	31	1664.00	48.794	M	52	3658.00	53.333	M	73	3845.00	80.009	W
11	1081.00	19.333	S	32	1672.00	47.799	M	53	3670.00	61.225	M	74	3856.00	73.741	W
12	1104.00	16.375	S	33	1676.00	47.458	M	54	3678.00	58.150	M	75	3865.00	83.707	W
13	1119.00	17.603	S	34	1712.00	15.413	S	55	3691.00	63.365	M	76	3872.00	81.294	W
14	1160.00	19.416	S	35	1720.00	14.866	S	56	3703.00	68.880	M	77	3882.00	84.611	W
15	1272.00	16.075	S	36	1729.00	15.121	S	57	3714.00	69.017	M	78	3886.00	82.636	W
16	1396.00	27.699	S	37	1736.00	14.319	S	58	3726.00	74.164	W	79	3893.00	81.975	W
17	1412.00	23.957	S	38	1846.00	69.170	M	59	3738.00	72.417	W	80	3906.00	81.156	W
18	1420.00	24.945	S	39	1956.00	78.435	W	60	3746.00	74.689	W	81	3920.00	84.135	W
19	1439.00	31.119	S	40	2067.00	81.090	W	61	3753.00	72.140	W	82	3926.00	84.317	W
20	1453.00	27.577	S	41	2346.00	88.773	W	62	3761.00	76.309	W	83	3934.00	83.970	W
21	1460.00	25.276	S	42	2378.00	85.882	W	63	3766.00	78.929	W	84	3944.00	85.224	W

Annexe 2-3 : Spectre IR du Matériau B granules solide ds KBr



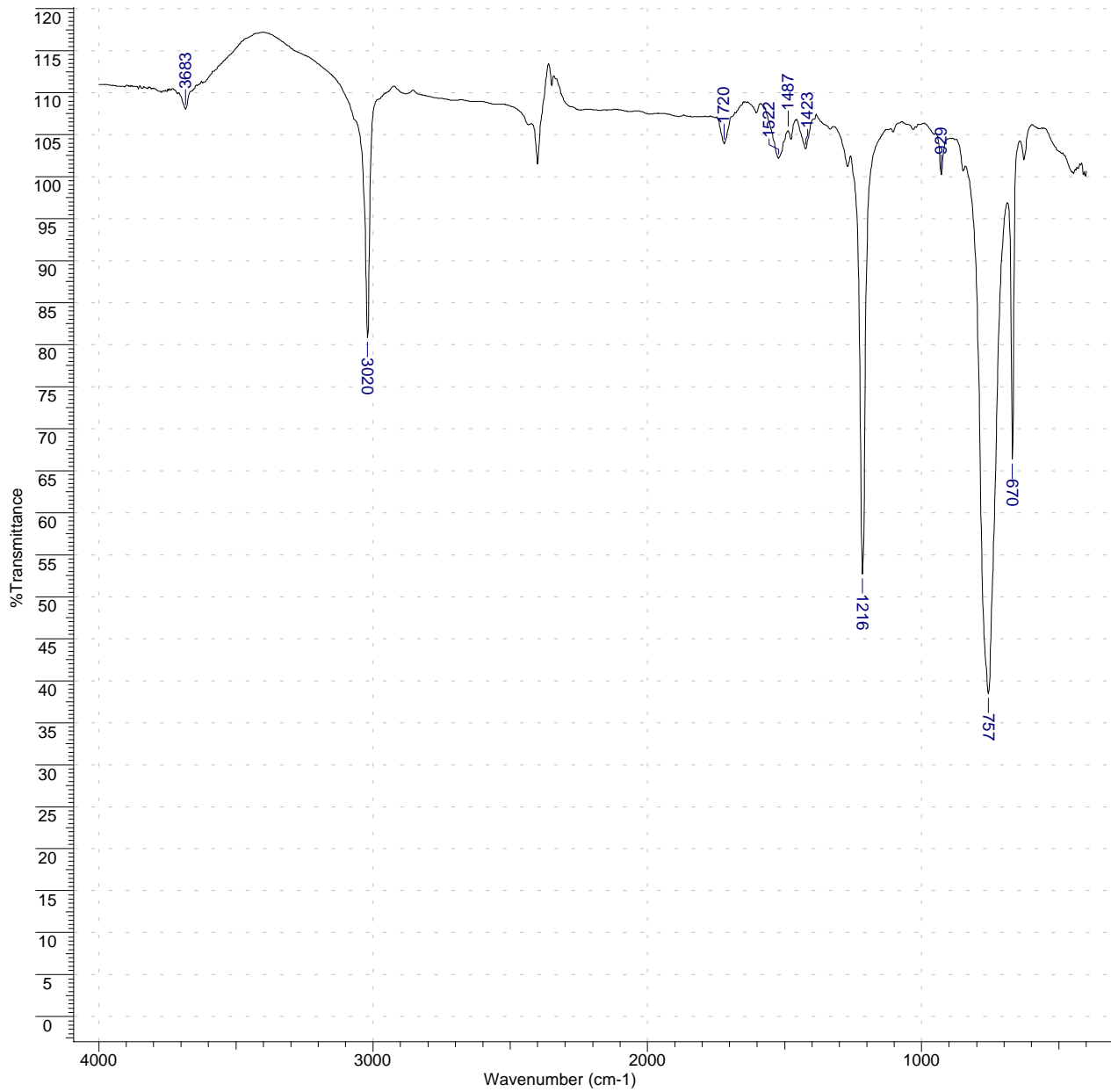
No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity
1	669.00	35.616	M	14	1912.00	66.997	VW
2	699.00	13.670	S	15	1999.00	61.798	W
3	933.00	22.879	S	16	2095.00	62.863	VW
4	955.00	6.164	VS	17	2223.00	64.462	VW
5	1043.00	0.061	VS	18	2267.00	64.561	VW
6	1053.00	0.069	VS	19	2336.00	63.046	VW
7	1065.00	0.068	VS	20	2587.00	65.611	VW
8	1232.00	62.354	W	21	2912.00	18.781	S
9	1310.00	21.851	S	22	2995.00	16.048	S
10	1408.00	11.832	S	23	3437.00	37.681	M
11	1437.00	7.636	S	24	3696.00	67.421	VW
12	1659.00	56.658	W	25	3846.00	67.466	VW
13	1725.00	61.406	W	26	3922.00	65.507	VW

Annexe 2-4 : Spectre IR du Matériau C film dans le DMSO



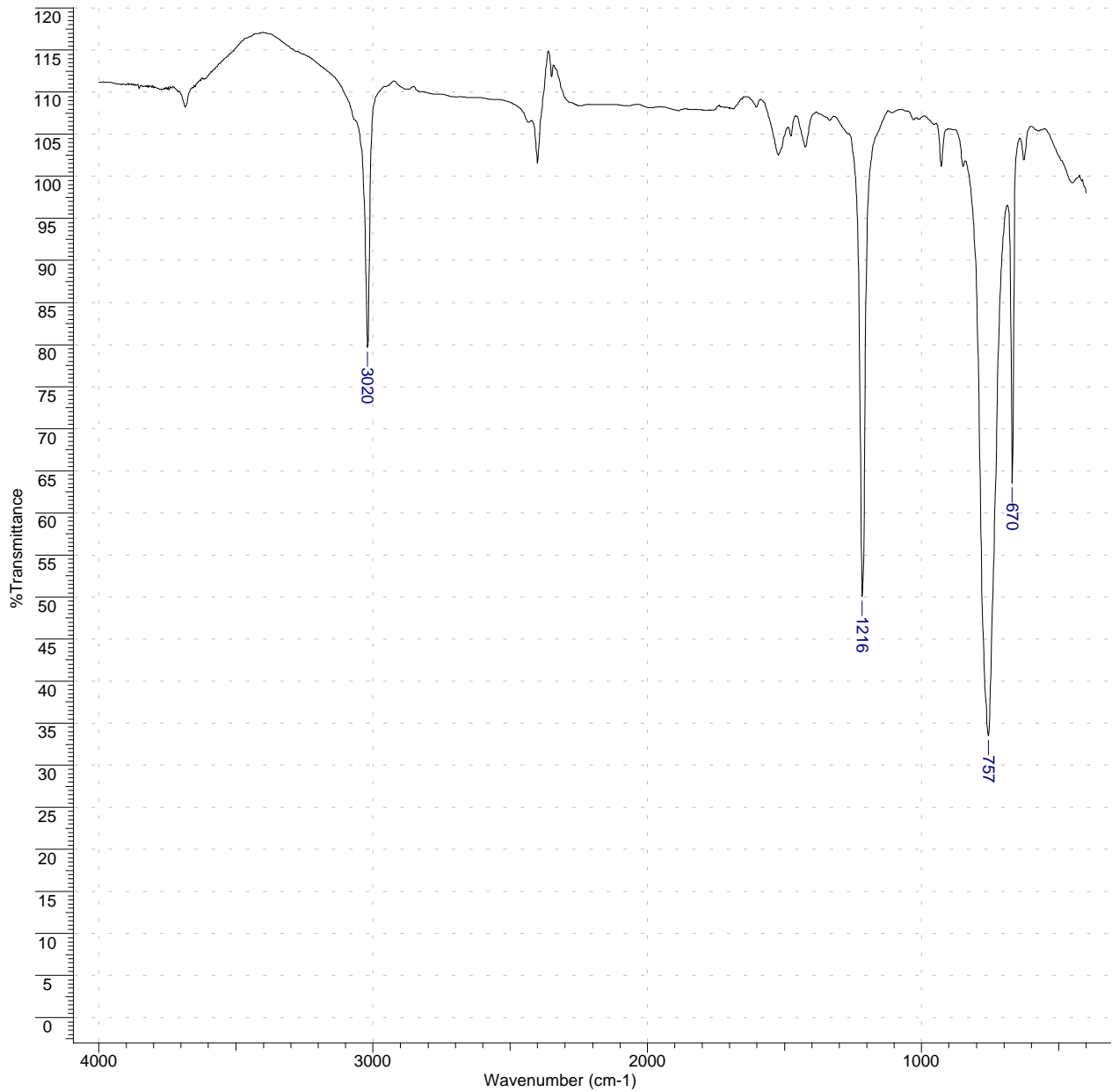
No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity
1	588.00	51.987	W	15	1660.00	43.504	M
2	669.00	27.337	M	16	1723.00	46.342	W
3	699.00	8.983	S	17	1912.00	59.872	VW
4	933.00	15.632	S	18	1997.00	54.200	W
5	955.00	2.943	VS	19	2095.00	55.008	W
6	1040.00	0.073	VS	20	2223.00	56.897	VW
7	1048.00	0.065	VS	21	2267.00	57.270	VW
8	1058.00	0.062	VS	22	2315.00	57.421	VW
9	1157.00	48.419	W	23	2588.00	58.653	VW
10	1195.00	48.837	W	24	2912.00	12.351	S
11	1246.00	49.032	W	25	2995.00	10.772	S
12	1311.00	14.385	S	26	3437.00	17.790	S
13	1408.00	6.981	S	27	3846.00	60.440	VW
14	1437.00	4.131	VS	28	3923.00	58.197	VW

Annexe 2-5 : Spectre IR du Matériau C granules dans le DMSO



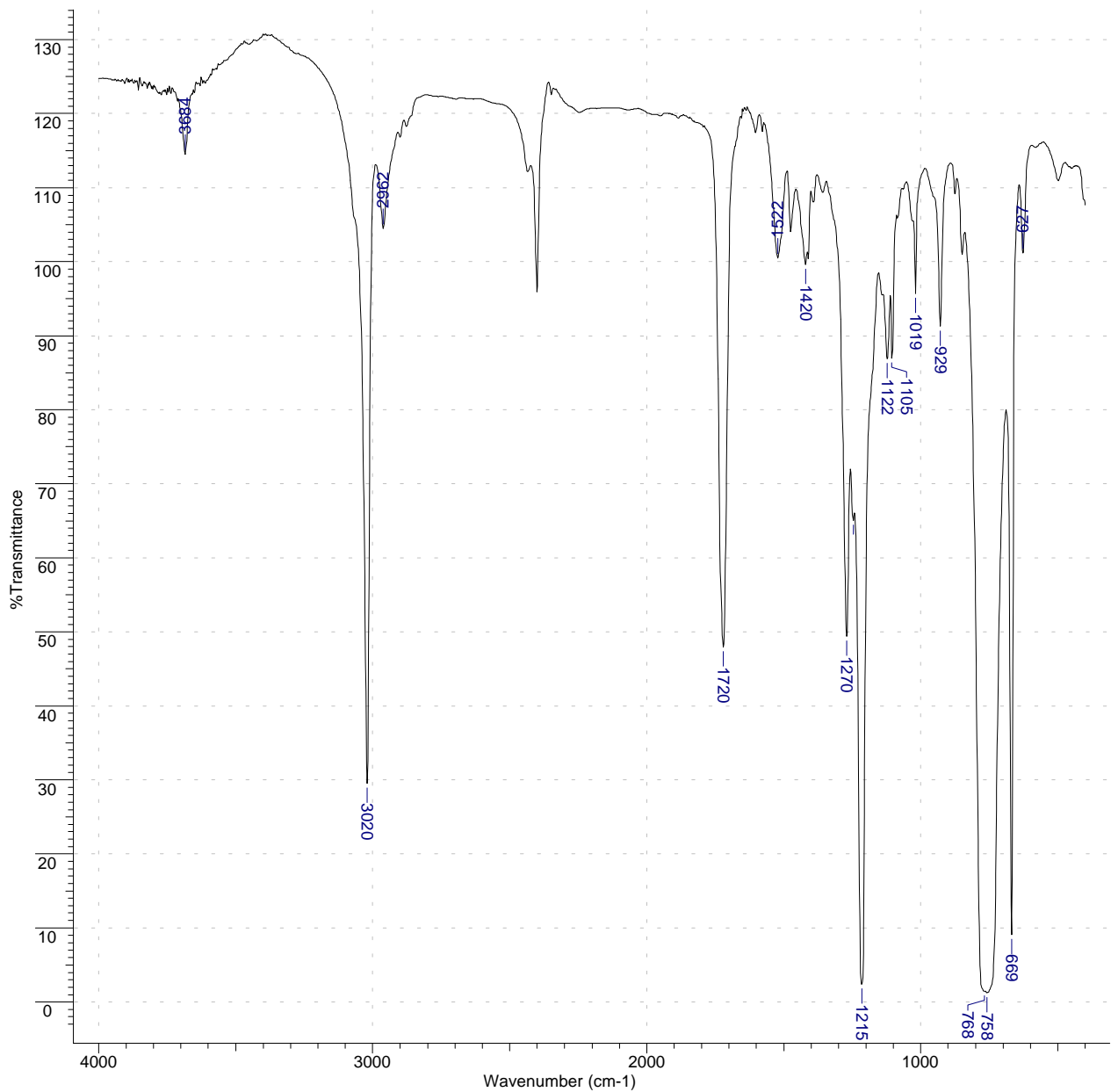
No	cm-1	%T	Intensity
1	670.00	66.380	S
2	757.00	38.461	VS
3	929.00	100.232	W
4	1216.00	52.666	S
5	1423.00	103.314	W
6	1487.00	105.509	W
7	1522.00	102.184	W
8	1720.00	103.899	W
9	3020.00	80.828	M
10	3683.00	108.028	W

Annexe 2-6 : Spectre IR du matériau B après dégradation de 180 jours sur pouzzolane



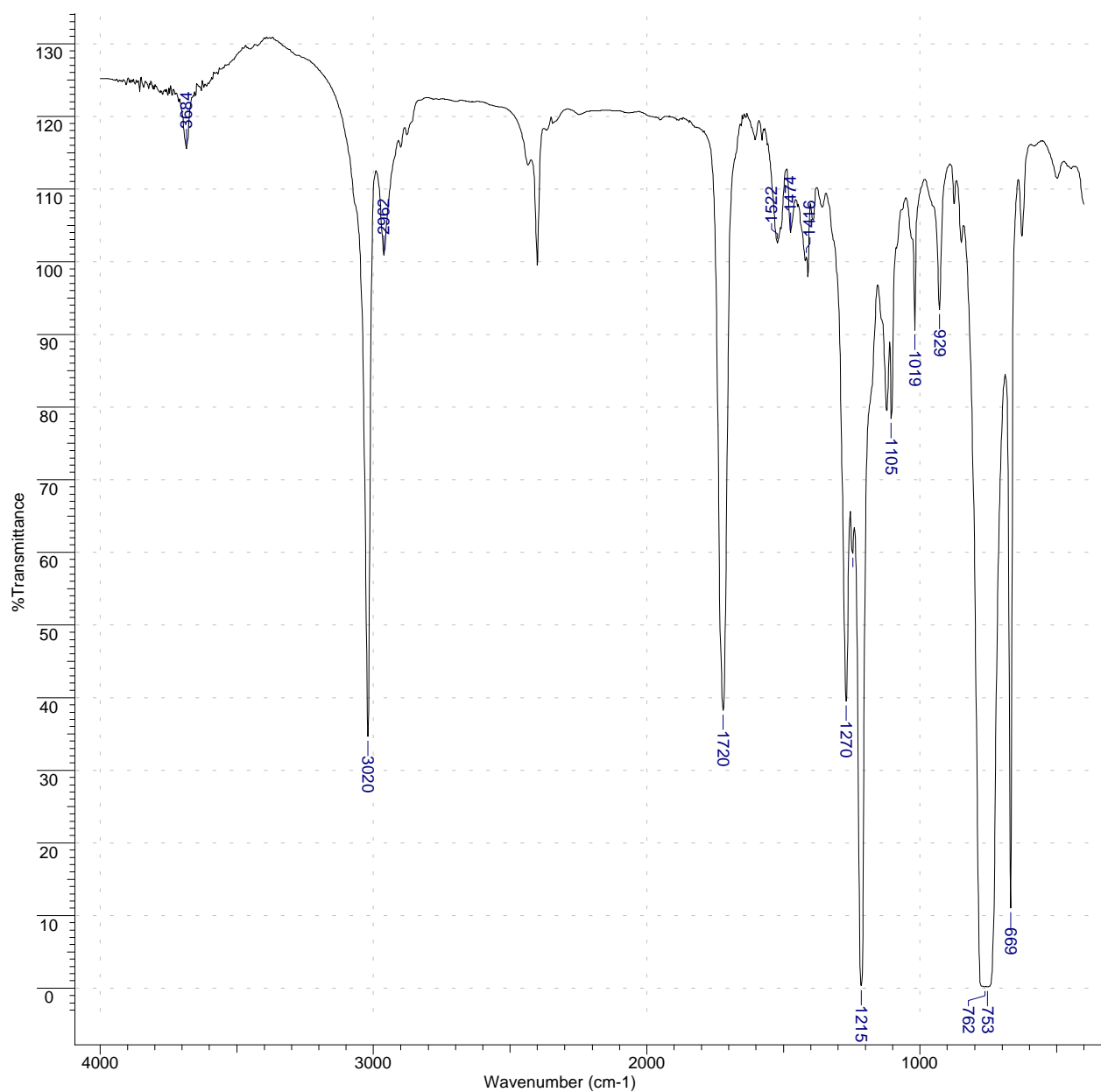
No	cm-1	%T	Intensity
1	670.00	63.560	S
2	757.00	33.473	VS
3	1216.00	50.071	S
4	3020.00	79.689	M

Annexe 2-7 : Spectre IR du blanc après dégradation de 180 jours sur pouzzolane



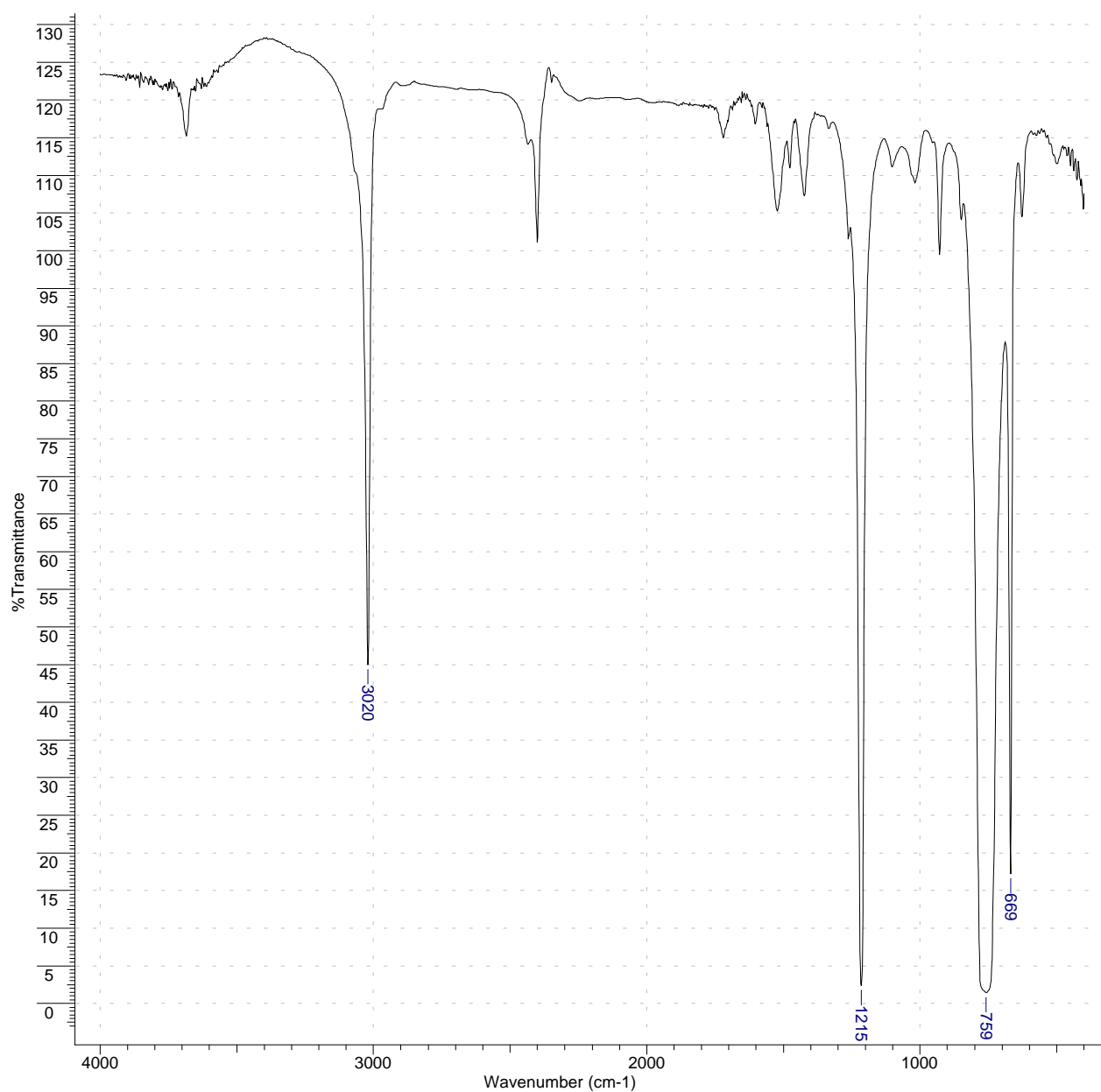
No	cm-1	%T	Intensity
1	627.00	101.152	W
2	669.00	9.091	VS
3	758.00	1.250	VS
4	768.00	1.447	VS
5	929.00	91.273	M
6	1019.00	95.702	W
7	1105.00	86.967	M
8	1122.00	86.894	M
9	1215.00	2.387	VS
10	1247.00	65.058	M
11	1270.00	49.403	S
12	1420.00	99.622	W
13	1522.00	100.517	W
14	1720.00	47.986	S
15	2962.00	104.462	W
16	3020.00	29.506	S
17	3684.00	114.510	W

Annexe 2-8 : Spectre IR du matériau B après dégradation de 0 jours sur vermiculite



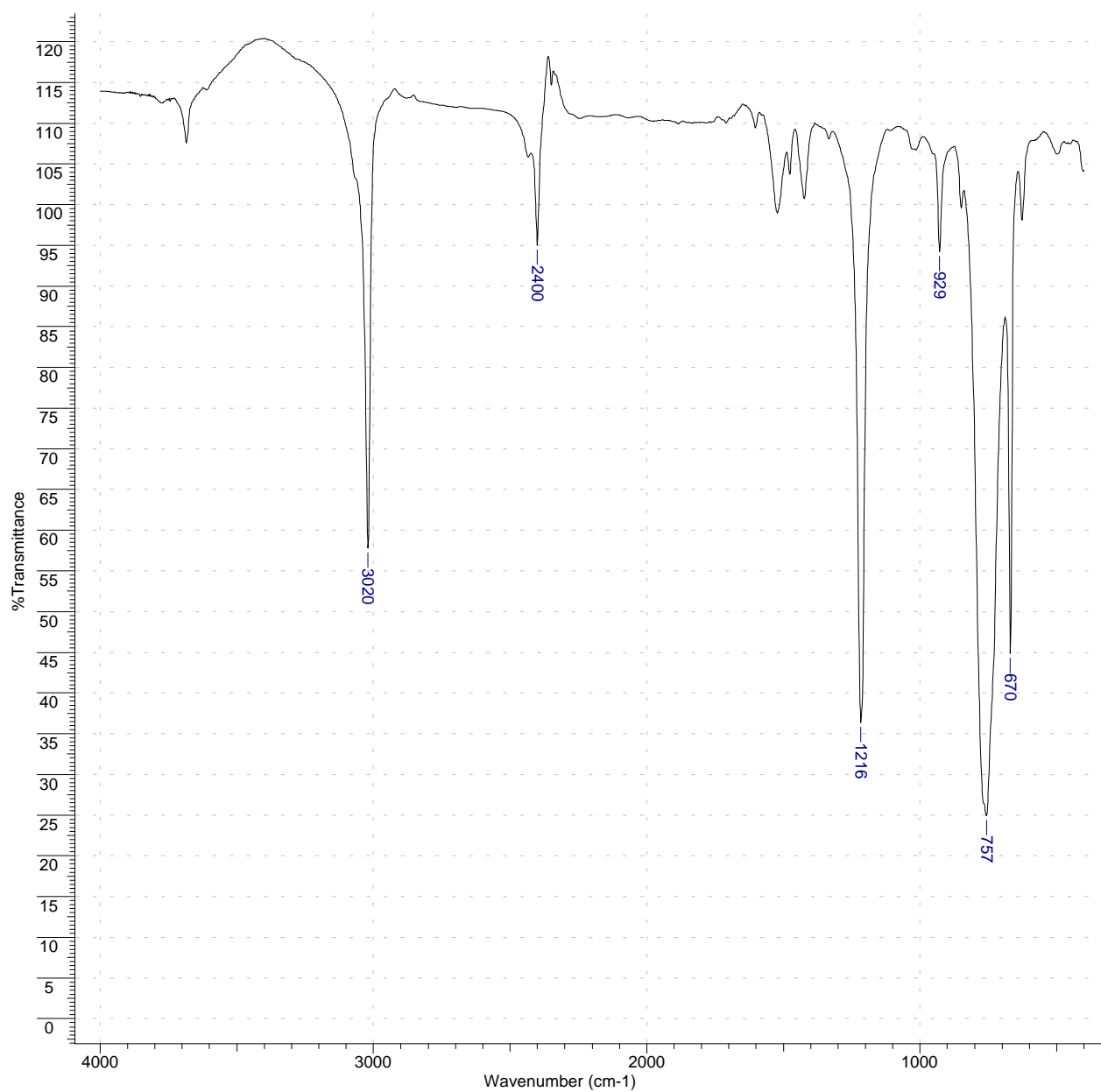
No	cm-1	%T	Intensity
1	669.00	11.018	VS
2	753.00	0.207	VS
3	762.00	0.212	VS
4	929.00	93.388	W
5	1019.00	90.540	M
6	1105.00	78.394	M
7	1215.00	0.371	VS
8	1247.00	59.857	M
9	1270.00	39.505	S
10	1416.00	100.632	W
11	1474.00	103.999	W
12	1522.00	102.562	W
13	1720.00	38.225	S
14	2962.00	100.877	W
15	3020.00	34.657	S
16	3684.00	115.554	W

Annexe 2-9 : Spectre IR du matériau B après dégradation de 40 jours sur vermiculite



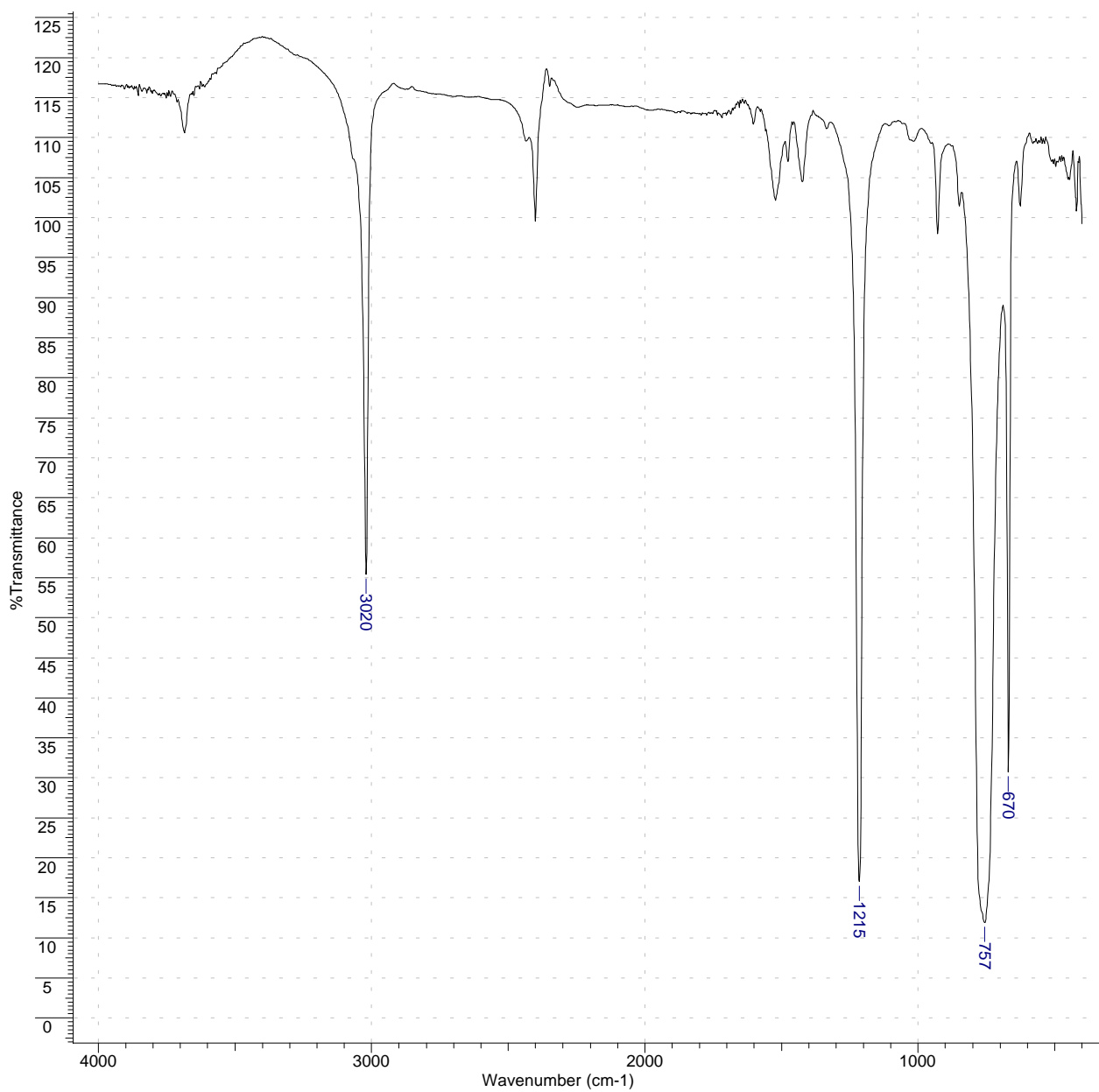
No	cm-1	%T	Intensity
1	669.00	17.200	S
2	759.00	1.431	VS
3	1215.00	2.338	VS
4	3020.00	44.979	S

Annexe 2-10 : Spectre IR du matériau B après dégradation de 90 jours sur vermiculite



No	cm-1	%T	Intensity
1	670.00	44.827	S
2	757.00	24.915	VS
3	929.00	94.164	W
4	1216.00	36.359	S
5	2400.00	95.026	W
6	3020.00	57.777	S

Annexe 2-11 : Spectre IR du blanc après dégradation de 40 jours sur vermiculite



No	cm-1	%T	Intensity
1	670.00	30.718	S
2	757.00	11.919	VS
3	1215.00	17.025	VS
4	3020.00	55.462	S

Annexe 2-12 : Spectre IR du blanc après dégradation de 90 jours sur vermiculite

ANNEXE 3 : FICHE DE FERTILISATION

Melon Paillages Biodégradables

FERTILISATION AZOTEE

- 50 kg/ha avant la plantation
- 15 kg/ha par semaine pendant 5 semaines (semaine 16 à 20)

Contrôle de la fertilisation azotée par analyse rapide de sol

APPORTS NUTRITIFS

Semaines	Acide phosphorique (kg P ₂ O ₅)	Chlorure de calcium (kg CaO)	Sulfate de potasse (kg K ₂ O)	Chlorure de potassium (kg K ₂ O)
14	40			
15				
16				
17				
18				
19				
20		20		
21		20		
22		20	20	
23		20	20	
24		20	20	
25		20	20	
26				10
27				10
28				10
29				10
30				10
31				10