

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -
Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel -

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée
et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية
و علوم التغذية

M.MB. 04/17

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme :
Master Académique en Biologie
Option : Microbiologie Appliquée

Thème

01
01

**Evaluation de la biodégradabilité du chlorpyrifos et du
glyphosate par quelques bactéries du sol**

Membres du Jury

Présidente : M^{me} Samia AMIRA
Examineur: P^r Tayeb IDOUI
Encadreur : P^r Mohamed SIFOUR



Présenté par :

M^r Rachid FENNOUR
M^{me} Yamina YOUNSI

Année Universitaire 2016-2017

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus vifs remerciements au Professeur Mohamed SIFOUR, pour nous avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail.

Nous remercions également, les membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail, et qui nous ont honorés de leur présence : M^{me} Samiya Amira, d'avoir accepté de juger notre travail en tant que présidente ainsi que du Professeur Tayeb IDOUI, pour avoir accepté d'évaluer et examiner ce mémoire.

Nos remercions aussi à Mme Aissaoui Salima et Docteur Khennouf Tarik, pour leur aide et collaboration, et surtout, leur disponibilité.

Aussi, nos plus sincères gratitudes à M^{me} Soumia Bouhali, et l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie, pour nous avoir accueilli au sein des laboratoires et nous avoir donné les moyens de mener à bout cette étude.

Nous remercions

Nous remercions vivement nos familles et nos amies pour leurs encouragements et leur compréhension.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iv
Introduction.....	01
I. Synthèse bibliographique	
I. 1. Définition des pesticides.....	03
I. 2. Classification des pesticides.....	03
I. 2. 1. Cibles et mode d'action.....	03
I. 2. 2. Classes chimiques.....	04
I. 3. Caractéristiques générales des pesticides.....	05
I. 3. 1. Le chlorpyrifos.....	06
I. 3. 1. 1. Mécanisme d'action et l'effet du chlorpyrifos.....	07
I. 3. 2. Le glyphosate.....	07
I. 3. 2. 1. Mécanisme d'action et l'effet du glyphosate	08
I. 4. Le devenir des pesticides dans l'environnement.....	08
I. 4. 1. La dégradation des pesticides	10
I. 4. 1. 1. La dégradation abiotique.....	10
I. 4. 1. 1. 1. La Photodégradation des pesticides.....	10
I. 4. 1. 1. 2. L'hydrolyse.....	10
I. 4. 1. 1. 3. L'oxydoréduction.....	11
I. 4. 1. 2. La dégradation biotique des pesticides.....	11
I. 4. 1. 2. 1. Les mécanismes de biodégradation.....	11
I. 4. 1. 2. 2. Les principaux acteurs.....	11
I. 5. Voies de dégradations du chlorpyrifos.....	12
I. 6. Voies de dégradations du glyphosate.....	14
II. Matériel et méthodes	
II. 1. Matériel.....	16
II. 1. 1 Les souches bactériennes.....	16
II. 1. 2. Les pesticides.....	16
II. 1. 3. Milieux de culture.....	16
II. 1. 4. Produits chimiques et réactifs.....	16

II. 1. 5. Appareillage.....	17
II. 2. Méthodes.....	17
II. 2. 1. Revivification des souches	17
II. 2. 2. Préparation de l'inoculum.....	17
II. 2. 3. Etude de la capacité des souches à croître en présence des pesticides testés.....	17
II. 2. 4. Etude de la biodégradation des pesticides.....	18
II. 2. 5. Les facteurs influençant la dégradation du chlorpyrifos et du glyphosate.....	18
II. 2. 5. 1. Effet de différentes concentrations des pesticides.....	18
II. 2. 5. 2. Effet du pH.....	18
II. 2. 5. 3. Effet de l'agitation.....	19
II. 2. 5. 4. Effet de l'addition du glucose.....	19

III. Résultats et Discussion

III. 1. Les souches bactériennes.....	20
III. 2. La croissance des souches testées en présence des pesticides.....	20
III. 3. Le teste de biodégradation.....	21
III. 4. Facteurs influençant la biodégradation.....	22
III. 4. 1. Effet de différentes concentrations.....	23
III. 4. 1. 1. Le Chlorpyrifos.....	23
III. 4. 1. 2. Le Glyphosate.....	24
III. 4. 2. Effet du pH.....	26
III. 4. 2. 1. Chlorpyrifos.....	26
III. 4. 2. 2. Glyphosate.....	26
III. 4. 3. Effet de l'agitation.....	27
III. 4. 3. 1. Chlorpyrifos.....	27
III. 4. 3. 2. Glyphosate.....	28
III. 4. 4. Effet de l'addition du glucose.....	28
III. 4. 4. 1. Chlorpyrifos.....	28
III. 4. 4. 2. Glyphosate.....	29
Conclusion et Prescribes.....	31
Références bibliographiques.....	32
Annexes	

Liste des abréviations

Ach	Acetylcholine
AchE-ase	Acetylcholine esterase
AMPA	Acide aminométhylphosphorique
BN	Bouillon nutritif
CP	Chlorpyrifos
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DETP	Diethylthiophosphate
DO	Densité optique
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
FAO	Food and Agriculture Organization
GN	Gélose nutritive
GP	Glyphosate
MMM	Milieu minéral minimum
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Pesticides organophosphorés
pH	Potentiel d'Hydrogène
rpm	Rotation par minute
TCP	3,5,6- trichloro-2-pyridinol
UV	Ultraviolet

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Distribution des pesticides dans l'environnement lors de l'épandage	09
Figure 02	Devenir des pesticides dans l'environnement	09
Figure 03	Voie de dégradation du chlorpyrifos	13
Figure 04	Voie C-P de dégradation du glyphosate	14
Figure 05	Voie C-N de dégradation du glyphosate	15
Figure 06	Cinétique de croissance des souches sélectionnées sur milieu MMM en présence de 100 mg/l du pesticide chlorpyrifos	21
Figure 07	Cinétique de croissance des souches sélectionnées sur milieu MMM en présence de 100 mg/l du pesticide glyphosate.	22
Figure 08	Cinétique de croissance de la souche B3-1 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos.	24
Figure 09	Cinétique de croissance de la souche C6 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos.	24
Figure 10	Cinétique de croissance de la souche B3-1 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de glyphosate.	25
Figure11	Cinétique de croissance de la souche C2 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de glyphosate.	25
Figure 12	Cinétique de croissance de C6 en fonction du pH en présence du chlorpyrifos.	26
Figure 13	Cinétique de croissance de C2 en fonction du pH en présence du glyphosate.	27
Figure 14	Cinétique de croissance de C6 avec ou sans agitation en présence du chlorpyrifos.	27

Figure 15	Cinétique de croissance de C2 avec ou sans agitation en présence du glyphosate.	28
Figure 16	Cinétique de croissance de C6 avec ou sans glucose en présence du chlorpyrifos	29
Figure 17	Cinétique de croissance de C2 avec ou sans glucose en présence du glyphosate	30

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Classification des pesticides selon leur composition chimique.	04
Tableau 02	Caractéristiques générales des pesticides.	05
Tableau 03	Quelques microorganismes dégradant le chlorpyrifos.	13
Tableau 04	Les microorganismes dégradant le glyphosate	15
Tableau 05	Croissance des souches testées en présence du chlorpyrifos et du glyphosate.	20

INTRODUCTION

Introduction

En raison des activités humaines, un grand nombre de polluants et de déchets sont actuellement libérés dans l'environnement. Parmi ces substances figurent les pesticides chimiques, où le secteur agricole mondial est le principal utilisateur, consommant plus de 4 millions de tonnes de pesticides par an. Ils sont largement utilisés dans la plupart des zones de production végétale afin de minimiser les infestations de ravageurs et de protéger les pertes de rendement des cultures (**Shukla *et al.*, 2010 ; Ortiz-Hernandez *et al.*, 2011**).

Un pesticide est une substance ou un mélange de substances destinées à prévenir, détruire, repousser ou atténuer tout organisme nuisible (insectes, acariens, nématodes, rats, etc.). Le terme pesticide inclut les insecticides, les herbicides, les fongicides et diverses autres substances utilisées pour lutter contre les parasites, ainsi que pour les soins de santé humaine et animale. Les pesticides se caractérisent par leur composition et leur structure très variées, de sorte que leurs propriétés physique, chimique et biologique le sont aussi diverses, ce qui explique leurs multiples usages, leur dangers, ainsi que les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols (**Calvet *et al.*, 2005 ; Singh et Walker, 2006 ; Agrawal *et al.*, 2010**).

Bien que les pesticides soient bénéfiques dans la lutte contre la prolifération des organismes nuisibles, leurs applications non réglementées et aveugles peuvent causer des effets néfastes pour la santé humaine, à différentes formes de vie et aux écosystèmes. Une fois libérés dans le sol après leur application ou leur mise en liberté accidentelle, les pesticides sont susceptibles d'être dégradés et/ou métabolisés (**Ortiz-Hernandez *et al.*, 2013**).

La dégradation des pesticides est le processus par lequel un pesticide se transforme en une substance bénigne compatible avec l'environnement sur le site auquel elle a été appliquée. Elle implique à la fois des processus de transformation biotiques et abiotiques. La transformation biotique est médiée par des microorganismes, tandis que la transformation abiotique implique des processus tels que des réactions chimiques et photochimiques (**Fenner *et al.*, 2013**).

La biodégradation est généralement reconnue comme le plus grand facteur de dégradation. Toutefois, les microorganismes qui ont été identifiés comme des agents de dégradation de pesticides ont été isolés à partir d'une grande variété de sites contaminés par un certain type de pesticide. Dans les sols par exemple, plusieurs paramètres influencent la vitesse des processus de biodégradation : les facteurs environnementaux tels que l'humidité et la température, les propriétés physico-chimiques du sol, la présence d'autres sources d'azote ou de carbone, etc, peuvent modifier

complètement la population microbienne et donc l'activité microbienne (**Besse-Hoggan *et al.*, 2009 ; Ortiz-Hernandez *et al.*, 2011**).

L'objectif du présent travail est :

- Etudier la cinétique de croissance de treize souches bactériennes isolées à partir d'un sol agricole, sur deux milieux minérales minimales contenant deux pesticides (Chlorpyrifos et Glyphosate) ;
- L'évaluation de l'influence de certains paramètres abiotiques sur la cinétique de croissance des isolats.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Synthèse bibliographique

I. 1. Définition

Le mot « pesticide » est un terme générique, dérivé des termes latins « caedere » (tuer) et « pestis » (fléau). Le Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides de la Food and Agriculture Organization des Nations Unies (**FAO, 2002**), qui est le document mondial d'orientation concernant la gestion des pesticides, définit le terme « pesticide » comme : « toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs (y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales) et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites. Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance des plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport » (**Calvet *et al.*, 2005**).

I. 2. Classification des pesticides

Les pesticides regroupent un grand nombre de substances très hétérogènes, qui peuvent être classés selon leur cible, leur mode d'action, leur classement chimique, la présentation du produit final ou bien encore leur devenir après épandage (**Maele-Fabry *et al.*, 2013**).

I. 2. 1. Cibles et mode d'action

Les pesticides peuvent être classés en fonction de leur cible principale. Les trois catégories principales sont (**James-Tano, 2011**) :

- les herbicides, qui luttent contre les plantes adventices des cultures ;
- les fongicides, qui luttent contre les champignons pathogènes ;
- les insecticides, qui luttent contre les insectes nuisibles.

À ces trois principaux groupes se rajoutent : les acaricides (pour la lutte contre les acariens, et qui sont souvent intégrés aux insecticides), les rodenticides (contre les petits rongeurs), les nématicides (contre les vers), les molluscicides (contre les escargots et les limaces), les taupicides (contre les taupes), les corvifuges ou corvicides (contre les corbeaux)...., les médiateurs

chimiques (phéromones)... La grande diversité des cibles s'accompagne d'une grande variété de modes d'action, aussi bien entre les différentes catégories de pesticides qu'à l'intérieur même de ces catégories, en lien avec leurs propriétés physicochimiques, et donc toxicologiques. Par exemple, les insecticides peuvent agir sur le système nerveux (inhibition de l'acétylcholinestérase, ouverture du canal sodium...), la respiration cellulaire (inhibition du transport des électrons dans la mitochondrie...), la mise en place de la cuticule... Les fongicides peuvent agir sur les processus respiratoires cellulaires, le métabolisme des glucides, la biosynthèse des protéines, la division cellulaire... De même, les herbicides peuvent agir sur la synthèse des acides aminés, des lipides ou affecter la photosynthèse. Enfin, ces substances peuvent agir par contact (sur les parasites cibles), ingestion, pression de vapeur, piège (confusion sexuelle par phéromone) (James-Tano, 2011).

I. 2. 2. Classes chimiques

Les pesticides peuvent être classés de différentes manières, mais l'un des plus utilisés est selon leur composition chimique, ce qui permet de regrouper les pesticides de manière uniforme et scientifique et d'établir une corrélation entre structure, activité, toxicité et mécanismes de dégradation, entre autres. Le tableau 1, regroupe les pesticides les plus importants en fonction de leur composition chimique.

Tableau 1. Classification des pesticides selon leur composition chimique (Ortiz-Henandez *et al.*, 2013).

Groupes	Composition principale
Organochlorés	Les atomes de carbone, le chlore, l'hydrogène et l'oxygène de temps en temps. Ils sont non polaires et lipophiles
Organophosphate	Possède un atome de phosphore central dans la molécule. En comparaison avec les organochlorés, ces composés sont plus stables et moins toxiques dans l'environnement. Les pesticides organophosphorés peuvent être aliphatiques, cycliques et hétérocycliques.
Carbamates	La structure chimique basée sur une plante alcaloïde <i>Physostigma venenosum</i> .
Pyréthrinoïdes	Les composés semblables aux pyréthrines synthétiques (alcaloïdes obtenus à partir de pétales de <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>).
Origine botanique	Les produits dérivés directement à partir de plantes. Non synthétisé chimiquement.
Biologique	Les virus, les micro-organismes ou de leurs produits métaboliques.

Tableau 1. Classification des pesticides selon leur composition chimique (suite) (Ortiz-Henandez *et al.*, 2013).

Cuivre	Composés inorganiques du cuivre.
Thiocarbamates	Diffère des carbamates dans leur structure moléculaire, contenant un-S-groupe dans leur composition.
Organostanniques	Présence d'étain comme atome central de la molécule.
Organosulfurés	Ils ont un atome central de soufre dans la molécule, très toxique pour les acariens ou les insectes.
Dinitrophénols	Ils sont reconnus par la présence de deux groupes nitro (NO ₂) lié à un noyau phénol.
Des dérivés d'urée	Les composés qui comprennent l'urée liés à des composés aromatiques.
Composition Diverse	Les triazines, les talimides, carboxamide, trichloracétique et les dérivés d'acides trichloropicoliniques, les guanidines et les naphthoquinones.

I. 3. Caractéristiques générales des pesticides

Certaines caractéristiques générales des pesticides sont présentées au tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques générales des pesticides (Ortiz-Henandez *et al.*, 2013).

pesticides	Caractéristiques	Exemples
organochlorés	Solubles dans les lipides, ils s'accumulent dans les tissus adipeux des animaux, transférés à travers la chaîne alimentaire ; toxique pour une variété d'animaux, persistant à long terme.	DDT, aldrine, lindane, chlordane, mirex.
Organophosphorés	Soluble dans les solvants organiques, mais aussi dans l'eau. Ils s'infiltrent jusqu'à atteindre les eaux souterraines, moins persistants que les hydrocarbures chlorés ; certains affectent le système nerveux central. Ils sont absorbés par les plantes, transférés aux feuilles et aux tiges, qui sont l'alimentation des insectes mangeurs de feuilles ou se nourrissent de sève.	Malathion, parathion-méthyl, diazinon

Tableau 2. Caractéristiques générales des pesticides (suite) (**Ortiz-Henandez et al., 2013**).

Carbamates	des dérivés d'acide carbamates ; tuent un spectre limité d'insectes, mais sont hautement toxiques pour les vertébrés. Une persistance relativement faible.	Sevin, carbaryl
Pyréthri-noïdes	Affectent le système nerveux ; moins persistants que les autres pesticides ; ils sont les plus sûres en termes de leur utilisation, certains sont utilisés comme insecticides ménagers.	Pyréthrines
Biologique	Seul le <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) et ses sous-espèces utilisées avec une certaine fréquence ; sont appliquées contre les ravageurs et les cultures forestières, en particulier contre les papillons. Affectent également d'autres chenilles.	Dissipation, incursion, Thuricide

I. 3. 1. Le chlorpyrifos

Les pesticides organophosphorés (OP) sont les pesticides les plus largement utilisés au niveau mondial avec plus de 36% de part du marché (**Briceño et al., 2012**). Ce sont des ester ou thiol dérivés de l'acide phosphorique, ce groupe comporte plus d'une centaine de composés dont la majorité sont interdit dû à leur toxicité élevée (**Supreeth et al., 2016**). Les OP sont divisées en 4 sous-groupes qui sont : phosphates, phosphorothioates, phosphorodithioates et phosphorothiolates (**Gilani et al., 2015**).

Le chlorpyrifos (CP) (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate) est un pesticide organophosphoré chloré à large spectre d'action. C'est l'OP le plus utilisé du fait de son efficacité et faible coût. Selon l'OMS, le chlorpyrifos appartient à la classe II des pesticides de toxicité modéré. Il a une action insecticide, nematicide, acaricide, termiticide, utilisé pour le contrôle des moustiques et des ravageurs des cultures de maïs, coton, citron, fruits, pommes de terre, betterave, légumineuses, etc (**Robles-Molina et al., 2012 ; George et al., 2014 ; John et Shaik 2015 ; Gilani et al., 2015**).

Introduit sur le marché en 1965, le CP est commercialisé sous différents noms comme : Dursban, Lorsban, Agromil, Dhauwan, Dorson, Omexan, etc (**George et al., 2014**). Il peut être sous forme liquide, gel, granule, microencapsulé, poudre, etc (**John et Shaik.,2015**). Dû à ses propriétés physico-chimiques, le CP a une faible solubilité dans l'eau (2 mg/l), et un temps de demi-vie dans le sol entre 10 à 120 jours (**Briceño et al., 2012**) et peut arriver jusqu'à 1 année selon le climat, le type de sol et d'autres conditions (**George et al., 2014**).

L'application excessive de ce pesticide conduit à une détérioration de l'environnement et des problèmes de santé publique. Des résidus de CP ont été trouvés à 24 Km du site d'application. Le CP pénètre dans le corps humain via inhalation, ingestion ou par la peau, il interfère avec le fonctionnement normal du système nerveux central, y compris le cerveau, à cause de son activité d'inhibition de l'acétylcholine-esterase. L'exposition peut provoquer une toxicité hépatique, des désordres immunologiques et au court de la grossesse conduit à une malformation du fœtus. Aussi les organismes non ciblé sont affectés directement par l'application du chlorpyrifos dans le sol et l'eau (**Dhanya 2014 ; George et al., 2014**).

I. 3. 1. 1. Mécanisme d'action et l'effet du chlorpyrifos

Le chlorpyrifos est un pesticide organophosphoré qui agit sur le système nerveux des insectes en inhibant l'acétylcholine-esterase (AChE-ase) (**Myers et al., 2016**). L'acétylcholine (ACh) est responsable de la transmission du flux nerveux dans les différentes parties du corps (**Gilani et al., 2015**) ; l'effet stimulant de l'ACh est rapidement annulé par l'action de l'AChE-ase. Le mécanisme d'action du CP est de se lier de façon irréversible à l'AChE-ase dans les tissus cibles (**George et al., 2014**), ce qui provoque l'inhibition de la dégradation de l'ACh, donc son accumulation, qui conduit à une stimulation excessive des nerfs, paralysie et puis la mort de l'insecte (**Gilani et al., 2015**).

Le CP est hautement toxique pour différentes espèces aquatiques et les oiseaux ainsi que plusieurs arthropodes (abeilles, libellules ...). Une exposition prolongée au CP provoque des anomalies chez les plantes. Chez l'homme, les signes d'un empoisonnement apparaissent quand l'activité de l'AChE-ase est réduite de moitié et sont : maux de tête, irritation de la peau, nausées, vomissements, crampes musculaires (**George et al., 2014**). De plus, le cancer de la vessie et des dommages du chromosome ont été associés à une exposition régulière au CP (**Lee et al., 2004**). La communauté microbienne est aussi affecté, il y a soit un effet stimulation ou bien inhibiteur (**Gilani et al., 2015**).

I. 3. 2. Le glyphosate

Le glyphosate (GP) (*N*-[phosphonométhyl] glycine) est un herbicide systémique, non sélectif à large spectre. C'est l'herbicide le plus utilisé dans le monde à cause de son faible coût, efficacité et faible impact environnemental. Le GP est un organophosphoré non cholinestérase. Ses propriétés physico-chimiques sont : son caractère amphotère, faible masse, haute solubilité dans l'eau et faible volatilité (**Guo et al., 2016**).

Il est utilisé pour détruire les vivaces à enracinement profond et les herbes annuelles ou bisannuelles dans certaines zones cultivées, mais également pour le désherbage des allées de parcs et de jardins publics et trottoirs. Appliqué sur les feuilles, il conduit au jaunissement et au déclin

de la plante dans 5 à 10 jours (parfois 30 jours) à cause de la perturbation de la voie de synthèse des acides aminés aromatiques (Arfarita *et al.*, 2016).

I. 3. 2. 1. Mécanisme d'action et l'effet du glyphosate

Le glyphosate inhibe l'activité du 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), une enzyme clef de la voie de synthèse des shikimate, ce qui bloque la synthèse du phénylalanine, tyrosine et tryptophane, ainsi la synthèse des composants régulateurs de la croissance des plantes, la membrane cellulaire, les protéines et les métabolites secondaires (flavonoïdes, lignin et coumarines...). Aussi, la voie de synthèse des shikimates est aussi présente chez les microorganismes, donc le GP peut être considéré comme une substance secondaire toxique pour un grand nombre de champignons filamenteux, actinomycètes et levures (Sviridov *et al.*, 2014 ; Fu *et al.*, 2016 ; Nguyen *et al.*, 2016).

L'utilisation extensive du GP est dû en grande partie à l'apparition de plantes génétiquement modifier de plus en plus résistantes à cet herbicide (soja, colza, maïs...), ainsi qu'à l'idée reçue que le glyphosate est une substance inoffensive (Sviridov *et al.*, 2014), ce qui a conduit à son accumulation dans le sol et dans l'environnement aquatique et c'est une menace potentiel pour l'équilibre de l'écosystème (Fu *et al.*, 2016).

1. 4. Le devenir des pesticides dans l'environnement

La dispersion des pesticides dans l'environnement est fortement liée aux processus de sorption du sol qui contrôle non seulement leur transfert mais aussi leur biodisponibilité. La contamination des sols par les pesticides en raison de leur manutention en vrac à la ferme ou après leur application sur le terrain ou leur mise en liberté accidentelle peut occasionnellement entraîner la contamination des eaux de surface et souterraines (figure 1). Le comportement des pesticides dans les sols, leur efficacité, leur persistance et leur potentiel en tant que contaminants environnementaux dépendent de leur rétention et de leur dégradation sur les constituants du sol (figure 2) (Bess-Hoggan *et al.*, 2009).

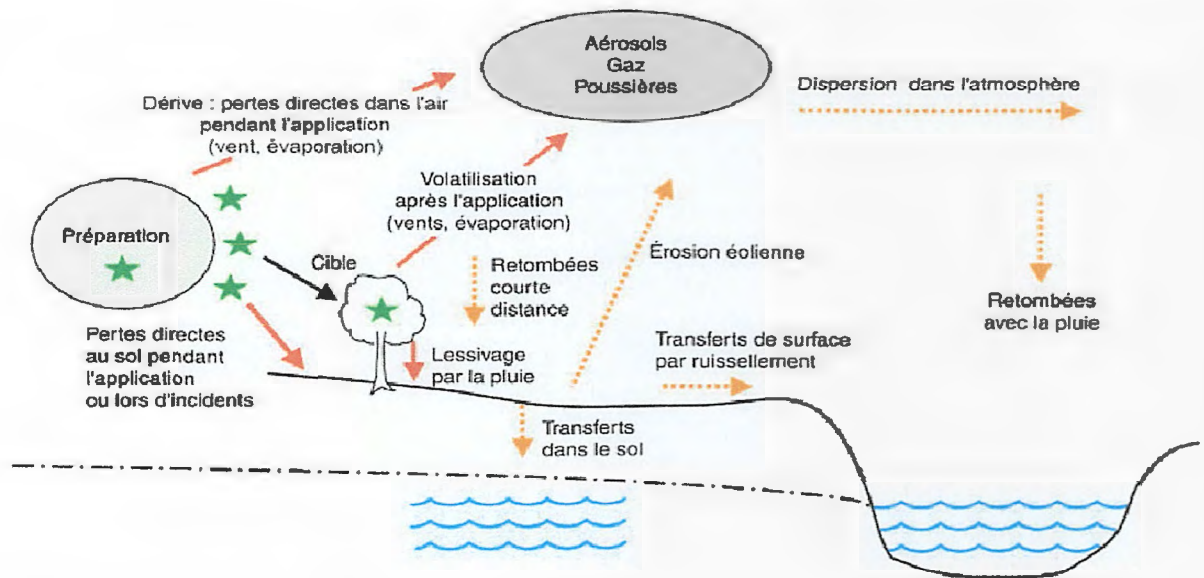


Figure 1. Distribution des pesticides dans l'environnement lors de l'épandage. Les flèches indiquent les interactions avec les différents compartiments de l'environnement (Aubertot *et al.*, 2005).

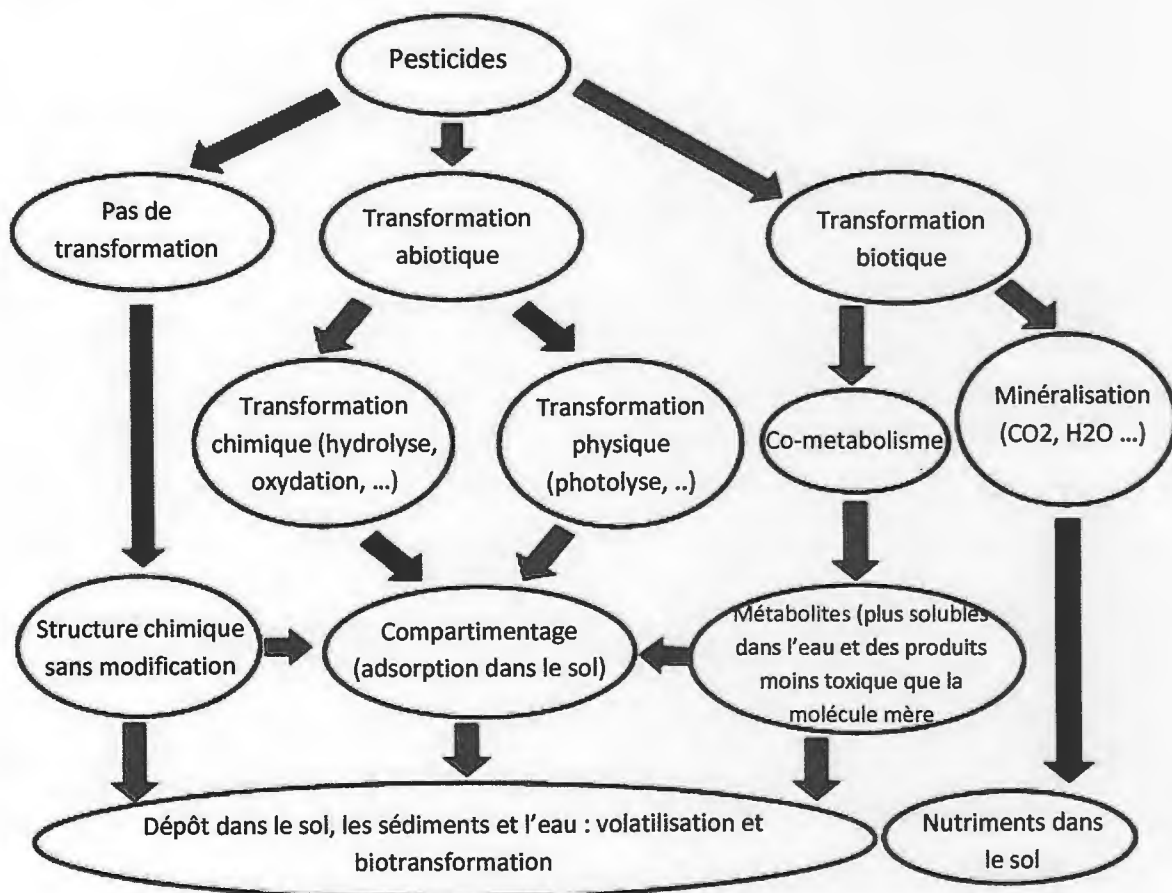


Figure 2. Le devenir des pesticides dans l'environnement (Bess-Hoggan *et al.*, 2009).

I. 4. 1. La dégradation des pesticides

La dégradation des pesticides est un des processus clef dans leur devenir dans le sol et les sédiments et joue un rôle majeur dans leur dissipation et leur élimination des milieux naturels. Elle est due à de nombreuses transformations chimiques, ces modifications peuvent être limitées à l'élimination d'un groupe fonctionnel, conduire à divers produits de transformation et aller jusqu'à la minéralisation. Les transformations chimiques responsables de la dégradation sont de nature abiotique et biotique (**Calvet *et al.*, 2005**).

I. 4. 1. 1. La dégradation abiotique

Les pesticides, qu'ils soient en solution ou adsorbés sur la phase solide du sol, peuvent subir une dégradation chimique : par processus hydrolytique majoritairement, par oxydation ou par réactions non-hydrolytiques. Parmi les processus de transformation chimique, seuls les phénomènes hydrolytiques peuvent avoir lieu en absence de micro-organismes. Ainsi, ils sont soit induits par le rayonnement solaire, soit catalysés par certains constituants du sol. La dégradation abiotique est souvent partielle et conduit en général à la formation de produits de transformation qui peuvent être ultérieurement dégradés de façon biologique (**Andreu et Pico, 2004 ; Guimont, 2005**).

1. 4. 1. 1. 1. La Photodégradation des pesticides

Les réactions photochimiques (induites par le rayonnement UV ou visible) impliquent deux types de processus : la photolyse directe et la photolyse indirecte. Dans le cas de la photolyse directe, le pesticide absorbe de l'énergie lumineuse, passe à l'état excité et peut subir une transformation si l'énergie absorbée est suffisante (**Gavrilescu, 2005**). Dans la photolyse indirecte, le pesticide à l'état fondamental réagit avec d'autres espèces produites photochimiquement et susceptibles de transférer de l'énergie, un électron ou un hydrogène ou de conduire à formation d'entités réactives (oxygène singulet, radical) (**Burrows *et al.*, 2002 ; Katagi, 2004**).

I. 4. 1. 1. 2. L'hydrolyse

L'hydrolyse est la rupture des liaisons dans une molécule par réaction avec l'eau. Typiquement, un composé est modifié par une réaction hydrolytique, par le remplacement de certains groupes chimiques avec un groupe hydroxyle. Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par la présence d'ions hydrogène ou hydroxyde, et par conséquent la vitesse de réaction est fortement dépendante du pH du système (**Gavrilescu, 2005**). La plupart des organophosphorés et des carbamates sont très sensibles à une réaction d'hydrolyse dans des conditions alcalines. Un pesticide qui est très soluble dans l'eau aura tendance à ne pas accumuler dans le sol en raison de sa nature polaire plus importante (**Zacharia, 2011**).

I. 4. 1. 1. 3. L'oxydoréduction

Ce processus englobe les réactions d'oxydation et de réduction. Dans le cas de réduction, l'oxydant est le pesticide et le réducteur est soit un composé inorganique (sulfure), un métal réduit (fer ferreux), soit un composé organique. Ce genre de réaction se produit dans les sols hydromorphes, les aquifères, et les sédiments, en général dans tous les milieux anaérobies ou peu aérobies. Pour l'oxydation, elle est souvent catalysée par des systèmes enzymatiques, ce qui traduit une origine biologique (**Calvet *et al.*, 2005**). Les oxydations abiotiques ont généralement lieu dans les eaux de surface, et les réductions dans les eaux anaérobiques et au fond des sédiments (**Zeng *et al.*, 2012**).

I. 4. 1. 2. La dégradation biotique des pesticides

I. 4. 1. 2. 1. Les mécanismes de biodégradation

Biodégradation qui implique des capacités des microorganismes dans l'élimination des polluants, c'est la technologie la plus prometteuse, relativement efficace et rentable. La biodégradation est un processus qui implique la rupture complète d'un composé organique dans ses constituants inorganiques. La transformation microbienne peut être entraînée par les besoins en énergie, ou un besoin de détoxifier les polluants, ou peut être fortuite dans la nature (cométabolisme). En raison de la nature omniprésente de microorganismes, leur nombre et leur biomasse importante par rapport à d'autres organismes vivants dans la terre, plus grande diversité et les capacités de leurs mécanismes catalytiques (**Paul *et al.*, 2005**), et leur capacité à fonctionner même en l'absence d'oxygène et dans des conditions extrêmes, la compréhension de leur génétique et de la biochimie, et le développement de leur application dans le domaine sont devenus une activité humaine importante (**Megharaj *et al.*, 2011**).

Autant que la diversité des sources et des complexités chimiques des polluants organiques existe, il y a probablement plus de diversité dans les membres microbiens et de leurs capacités à synthétiser ou dégrader des composés organiques (**Ramakrishnan *et al.*, 2010 ; Ramakrishnan *et al.*, 2011**).

I. 4. 1. 2. 2. Les principaux acteurs

Les microorganismes ont la capacité d'interagir, à la fois physiquement et chimiquement, avec des substances conduisant à des changements structurels ou la dégradation complète de la molécule cible. Parmi les communautés microbiennes, les bactéries, les champignons et actinomycètes sont les principaux transformateurs et dégradeurs de pesticides (**Briceno *et al.*, 2007**). Généralement la biotransformation fongique des pesticides et autres xénobiotiques est réalisée par introduction des modifications structurelles mineures à la molécule, le rendant non

toxique. Le pesticide biotransformé est libéré dans l'environnement, où il est sensible à une dégradation par des bactéries (**Diez, 2010**).

Les champignons et les bactéries sont considérés comme les microorganismes producteurs d'enzymes extracellulaires par excellence. Les champignons pourriture blanche ont été proposés comme agents de biorestauration prometteurs, en particulier pour les composés non facilement dégradés par les bactéries. Cette capacité provient de la production d'enzymes extracellulaires qui agissent sur un large éventail de composés organiques. Certaines de ces enzymes extracellulaires sont impliquées dans la dégradation de la lignine, comme la lignine peroxydase, la peroxydase de manganèse, laccase et oxydases. Plusieurs bactéries qui dégradent les pesticides ont été isolés et la liste est en pleine expansion (**Basse et Champ, 2011**).

I. 5. Voies de dégradations du chlorpyrifos

Après l'application du chlorpyrifos, la majeure partie est volatilisé. La dégradation du chlorpyrifos peut impliquer une combinaison de la photolyse, hydrolyse chimique et dégradation microbienne (**Briceño et al., 2012 ; Yadav et al., 2015**). La dégradation complète n'est pas possible à cause de la complexité de sa structure (**Dhanya 2014**). La photodégradation dans le sol joue un rôle dans l'hydrolyse, la dechlorination et l'oxydation du CP. Dans l'eau, la dégradation photocatalytique est la méthode la plus efficace. Parmi les méthodes chimiques, l'ozonation est la méthode la plus prometteuse, d'autres méthodes comme l'utilisation de chlore, chlore dioxyde et peroxyde d'hydrogène, sont cher et tant à contaminer le milieu avec des produits toxiques (**John et Shaik, 2015**).

La dégradation du chlorpyrifos par les microorganismes peut se faire par un mécanisme métabolique ou co-métabolique avec production du 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) et du diéthylthiophosphate (DETP) comme produits primaires de la dégradation. Ces composés sont très toxiques et possèdent de grandes propriétés d'accumulation. Le TCP a une plus grande solubilité dans l'eau que le CP ce qui provoque une large contamination du sol et des milieux aquatiques. De plus, le TCP a des propriétés antimicrobiennes qui servent à prévenir la dégradation du CP dans le sol. Cependant, plusieurs microorganismes ont la capacité de dégrader et de minéraliser le CP ainsi que le TCP (figure 3), ce sont des microorganismes indigènes (tableau 3) (présent dans le sol contaminé) (**Briceño et al., 2012 ; Dhanya, 2014 ; Yadav et al., 2015 ; John et Shaik, 2015**).

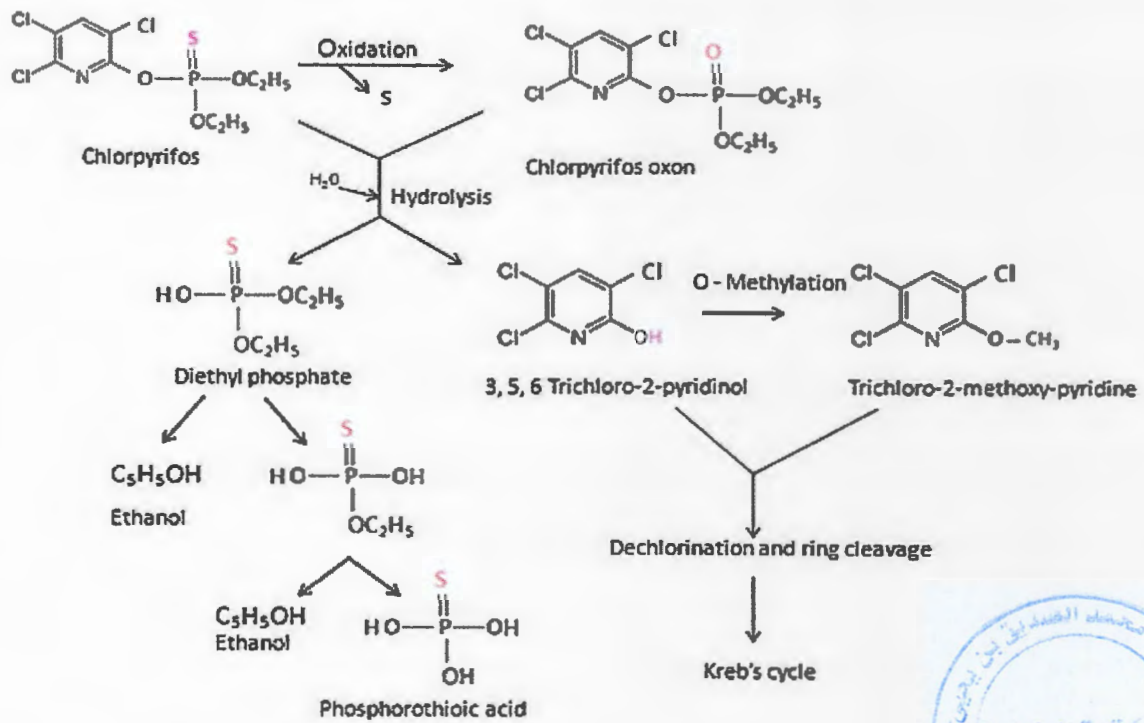


Figure 3. Voie de dégradation du chlorpyrifos (John et Shaik, 2015)

Tableau 3. Quelques microorganismes dégradant le chlorpyrifos.

Microorganismes	Références
Bactéries	
<i>Bacillus pumilus</i> C2A1	Anwer <i>et al.</i> , (2009)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sasikala <i>et al.</i> , (2012)
<i>Klebsiella</i> sp.	
<i>Streptomyces</i> sp. HP-11	Supreeth <i>et al.</i> , (2015)
Moisissures	
<i>Acremonium</i> sp.	Kulshrestha <i>et</i> Kumari (2011)
<i>Aspergillus</i> sp.	Maya <i>et al.</i> , (2012)
Algues	
<i>Lemna minor</i> L.	Parsertsup <i>et</i> Ariyakanon (2011)
<i>Plantago major</i> L.	Romeh <i>et</i> Hendawi (2013)



1. 6. Voies de dégradations du glyphosate

Trois voies de dégradation du glyphosate sont connues : la photodégradation, la dégradation chimique et la biodégradation (Fu *et al.*, 2016). La biodégradation peut se faire par les microorganismes indigènes ou bien par l'introduction de microorganismes avec des capacités d'éliminé le GP du sol et de l'eau (Sviridov *et al.*, 2014).

Deux voies de dégradation du glyphosate par les microorganismes sont connues : le clivage direct de la liaison C-P donnant le sarcosine et le phosphore inorganique (Pi) (figure 4) ; et la coupure de la liaison C-N donnant du glyoxylate et du AMPA (acide aminométhylphosphorique) qui est rejeté dans le milieu extracellulaire et qui tend alors à s'accumuler dans l'environnement (figure 5). Quelques souches bactériennes peuvent dégradés le AMPA (source de P) en clivant la liaison C-P donnant du méthylamine et du Pi (Sviridov *et al.*, 2014 ; Fu *et al.*, 2016). Les microorganismes responsables de la dégradation du GP sont regroupés dans le tableau 4.

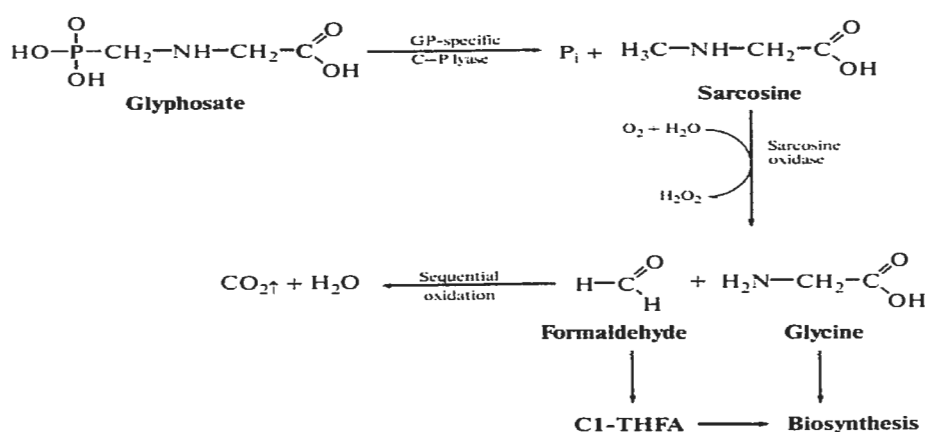


Figure 4. La voie C-P de dégradation du glyphosate (Sviridov *et al.*, 2014).

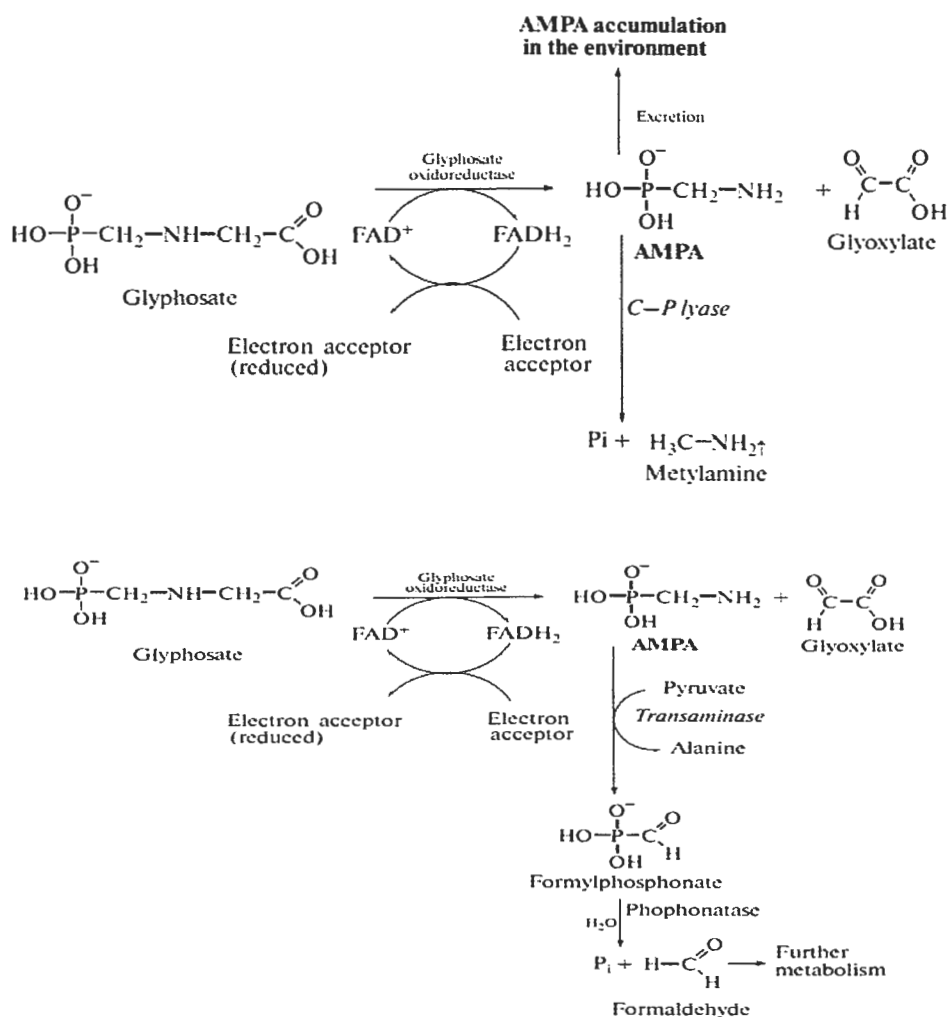


Figure 5. La voie C-N de dégradation du glyphosate (Sviridov *et al.*, 2014).

Tableau 4. Les microorganismes dégradant le glyphosate.

Microorganismes	Références
Bactéries	
<i>Achromobacter</i> sp. MPS 12A	Sviridov <i>et al.</i> , (2012)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> GDOS	Hadi <i>et al.</i> , (2012)
<i>Ochrobactrum</i> GPK 3	Sviridov <i>et al.</i> , (2012)
Moisissures	
<i>Trichoderma viride</i> FRP3	Arfarita <i>et al.</i> , (2016)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fu <i>et al.</i> , (2016)

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

II. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Jijel sur une période de deux mois.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la biodégradation du chlorpyrifos et du glyphosate par des bactéries du sol et d'étudier les facteurs influençant la dégradation.

II. 1. Matériel

II. 1. 1. Les souches bactériennes

Les 13 souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été fournies par le laboratoire de recherche en Toxicologie Moléculaire - Université de Jijel. Elles ont été précédemment isolées à partir des terres agricoles exposées en continu à l'application de pesticides ; elles ont été conservées par congélation en présence de 30% de glycérol (agent cryoprotecteur).

II. 1. 2. Les pesticides

Les pesticides utilisés dans cette étude sont : le chlorpyrifos et le glyphosate sous leur forme commerciale le Dursban (480 g/L de chlorpyrifos-ethyl) et le RoundUp (450 g/L de glyphosate), respectivement, ils sont largement utilisés en Algérie. Ils ont été achetés auprès d'un fournisseur des produits phytosanitaires.

II. 1. 3. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

Le bouillon nutritif et la gélose nutritive sont les milieux utilisés pour la revivification et le repiquage des souches.

Le milieu minéral minimum (MMM) (bouillon et gélose), dont la composition pour 1000 ml d'eau distillée est comme suit : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,013g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,013 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g), KH_2PO_4 (7,5 g), Na_2HPO_4 (5 g), NH_4NO_3 (5 g), extrait de levure (0,025 g), (agar-agar 15g), a été préparé au laboratoire. Le pH est ajusté à $7,0 \pm 0,2$, et autoclavé 15 minutes à 120°C .

Le milieu MMM Additionné par un pesticide à la fois, il a été utilisé pour l'étude de la tolérance et de la dégradation.

II. 1. 4. Produits chimiques et réactifs

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), glucose, NaCl, HCl, NaOH, agar-agar, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4NO_3 , extrait de viande, peptone.....

II. 1. 5. Appareillage

Tout au long de ce travail, nous avons utilisé l'appareillage qui suit :

- Bec Bunsen
- Autoclave (Slli AVX electronic)
- Etuve 37°C (Memmert)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Spectrophotomètre optique (Analytikjena : Specord 50 plus)
- Bain marie (Gerhardt Bonn)
- Incubateur agitateur (Infors HT Ecotron)
- Centrifugeuse (Hettich EBA 20)
- pH-mètre (Hanna)
- Balance électronique (Kern EMB600-2)
- Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002)
- Vortex (VWR VV3)
- Micropipettes (Smart)

II. 2. Méthodes

II. 2. 1. Revivification des souches

Les aliquotes des souches bactériennes à tester ont été décongelés et ensemencés dans le bouillon nutritif et incubés à 37°C pendant 24 heures. Pour s'assurer de leur vivacité et de leur pureté, les souches ont subi une série de repiquage sur gélose nutritive, ainsi que des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram.

II. 2. 2. Préparation de l'inoculum

Avant chaque test, une colonie de chaque souches a été prélevée à partir des boites contenant la gélose nutritive, et ensemencées dans du bouillon nutritif additionné d'une goutte du pesticide, et incubées à 37°C pendant 24 heures. Une standardisation de l'inoculum est effectuée à 600 nm par le spectrophotomètre (Analytikjena : Specord 50 plus).

II. 2. 3. Etude de la capacité des souches à croître en présence des pesticides testés

Le screening qualitatif consiste à évaluer la capacité des souches à croître sur la gélose MMM additionnée de chlorpyrifos ou de glyphosate à une concentration de 100 mg/l. L'ensemencement a

été fait par la technique d'étalement d'un millilitre d'inoculum, par râteau sur la surface de la gélose MMM. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, le résultat a été évalué par une croissance positive ou négative. Les souches présentant une bonne croissance ont été sélectionnées.

II. 2. 4. Etude de la biodégradation des pesticides

Le test de biodégradation a été effectué dans des flacons de 250 ml contenant 20 ml de bouillon MMMensemencé par 5% de l'inoculum des souches sélectionnées précédemment, en présence de 100 mg/l de chlorpyrifos ou de glyphosate. Les flacons exempts de cultures bactériennes ont été utilisés comme témoin. Le tout a été incubé à 37°C pendant 96 heures dans l'agitateur-incubateur (INFORS HT ECOTRON), à 120 rpm. Au cours de l'incubation, la croissance bactérienne a été estimée par mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 600 nm, chaque 24 heures (T₀-T₉₆). Tous les tests ont été effectués en double (Anwer *et al.*, 2009).

II. 2. 5. Les facteurs influençant la dégradation du chlorpyrifos et du glyphosate

Plusieurs facteurs peuvent influencer la biodégradation des pesticides chlorpyrifos et glyphosate, parmi lesquels on peut citer : le pH, la température, l'agitation, la concentration initiale du pesticide, le taux d'inoculation, source alternative de carbone, source d'azote. Les variations du pH, l'agitation, la concentration initiale des pesticides et l'addition du glucose comme autre source de carbone, ont été testés dans ce travail.

II. 2. 5. 1. Effet de différentes concentrations des pesticides

Les souches bactériennes présentant la meilleure activité dans l'étude de la biodégradation des pesticides, ont été sélectionnées pour l'évaluation de l'effet de la variation de la concentration des pesticides sur leur dégradation. L'ensemencement des souches bactériennes (5%) a été fait dans des flacons de 250 ml contenant 20 ml du bouillon MMM en présence de différentes concentrations du chlorpyrifos et du glyphosate (50, 100, 200 et 400 mg/l). Le tout a été incubé à 37°C pendant 96 heures, et la DO a été mesurée à 600 nm chaque 24 heures. Un contrôle sans souche bactérienne a été préparé pour chaque concentration. Chaque test a été effectué en double (Yu *et al.*, 2015).

II. 2.5. 2. Effet du pH

La capacité de dégradation du chlorpyrifos et du glyphosate dans le milieu MMM a été déterminée à différentes conditions de pH, acide (5,5), neutre (7) et basique (8,5), dans des flacons de 250 ml contenant 20 ml de bouillon MMM avec 5% d'inoculum. La concentration des pesticides est de 100 mg/l. La DO a été mesurée à 600 nm chaque 24 heures pendant 96 heures d'incubation. Le test a été effectué en double (Singh *et al.*, 2003).

II. 2. 5. 3. Effet de l'agitation

De la même façon, pour chaque pesticide (100 mg/l), un flacon contenant le milieu MMM a été incubé sous agitation à 37°C à 120 rpm et le deuxième flacon a été incubé dans l'étuve sans agitation à 37°C. La DO a été mesurée à 600 nm chaque 24 heures pendant 96 heures d'incubation. Le test a été effectué en double (**Shushkova *et al.*, 2012**).

II. 2. 5. 4. Effet de l'addition du glucose

Le glucose a été testé comme source alternative de carbone. Dans des flacons de 250 ml, 20 ml du milieu MMM additionné de chlorpyrifos ou de glyphosate à 100 mg/l et 0,5 g de glucose ont étéensemencés par les souches bactériennes testées (5%). Les flacons ont été incubés à 37°C pendant 96 heures. Chaque jour la DO a été mesurée à 600 nm. Au même moment et dans les mêmes conditions les flacons sans glucose ont été évalués. Les tests ont été effectués en double (**Singh *et al.*, 2004**).

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION

III. Résultats et Discussion

Notre travail a concerné l'évaluation de la biodégradation des pesticides : chlorpyrifos et glyphosate, par des bactéries du sol, en évaluant leur croissance en présence des pesticides et par la suite, en étudiant les facteurs influençant la dégradation. Les résultats obtenus sont résumés et interprétés ci-dessous.

III. 1. Les souches bactériennes

Après coloration de Gram et observations microscopiques il s'est avéré que les 13 souches testées sont des bacilles Gram négatifs.

III. 2. La croissance des souches testées en présence des pesticides

Toutes les bactéries testées étaient capables de croître sur gélose minimale MMM en présence du chlorpyrifos et du glyphosate à une concentration de 100 mg/l. Le tableau 5 résume les résultats obtenus. Des 13 souches testées, 5 souches (C1, C2, C6, B2-3 et B3-1) ont montré une bonne croissance en présence du chlorpyrifos ou du glyphosate. Parmi les 5 souches, la souche C6 a montré une croissance plus importante que les autres, sous forme d'un tapis bactérien bien dense, avec les deux pesticides.

Tableau 5. Croissance des souches testées en présence du chlorpyrifos et du glyphosate.

Les souches	Chlorpyrifos (100 mg/l)	Glyphosate (100 mg/l)
C1	++	++
C2	++	++
C3	+	+
C4	+	+
C5	+	+
C6	+++	+++
C7	+	+
C8	+	+
C9	+	+
B2-3	++	++
B3-1	++	++
B5-1	+	+
B5-2	+	+

+++ : Croissance importante. ++ : Croissance modérée. + : Croissance faible.

III. 3. Le teste de biodégradation

Les 5 souches sélectionnées précédemment ont été utilisées pour déterminer leur croissance et leur capacité à utiliser le chlorpyrifos et le glyphosate comme seule source de carbone, et de les dégradés, sur milieu minimal MMM liquide avec des concentrations de 100 mg/l pour chaque pesticide. La croissance a été déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm, pour chaque souche toute les 24 heures pendant 96 heures. Les figures 6 et 7 montrent la variation de l'absorbance à 600 nm en fonction du temps.

Pour le chlorpyrifos (figure 6), la croissance maximale a été observée pour les souches B3-1 et C6 après 72 h d'incubation ($DO_{600} = 0,534$, $DO_{600} = 0,455$, respectivement). Après 48 heures, la croissance de la souche C6 augmente rapidement en passant de 0,088 à 48 h à 0,455 à 72 h. Le taux de croissance faible, observé pendant les premières 48 h peut être expliqué par l'adaptation des souches testées au nouvel environnement (passage du bouillon nutritif riche en éléments de croissance, au bouillon minéral minimal MMM avec le chlorpyrifos comme seule source de carbone), c'est-à-dire production de la machinerie enzymatique nécessaire pour l'utilisation du chlorpyrifos comme source de carbone. Ces résultat sont en accord avec ceux de **Anwer et al., (2009)** car ils ont constatés que la souche de *Bacillus pumilus* C2A1 exposée à une concentration de 100 mg/l de chlorpyrifos, avait une croissance faible pendant les premières heures mais après 48 heures le taux de croissance augmente considérablement. Au contraire, **Yang et al., (2005)** ont trouvé que la souche de *Alcaligenes faecalis* testée avait un taux de croissance élevé en présence d'une concentration de 100 mg/l de chlorpyrifos dès les premières 24 heures.

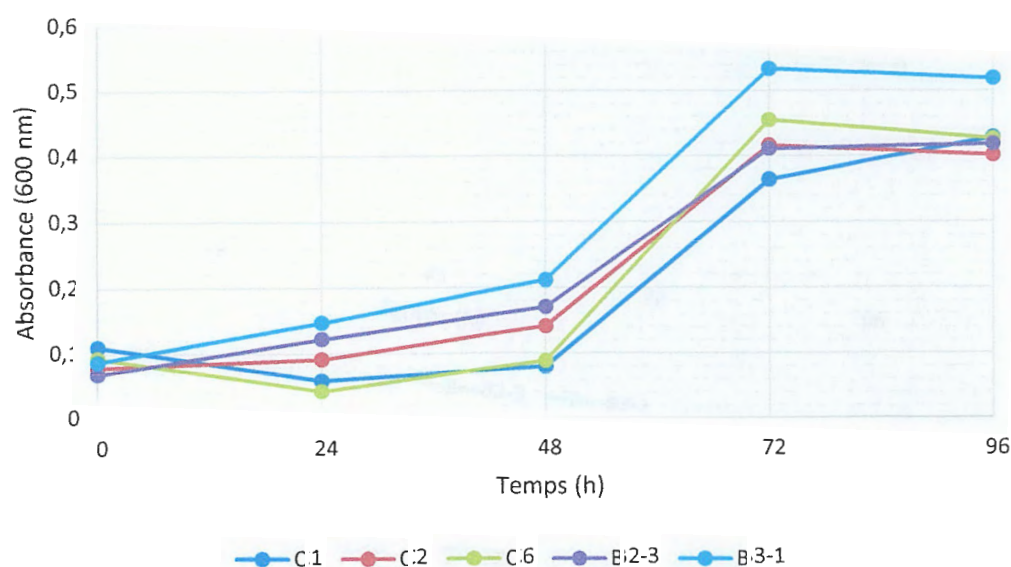


Figure 6. Cinétique de croissance des souches sélectionnées sur milieu MMM en présence de 100 mg/l du pesticide chlorpyrifos

III. 4. 1. Effet de différentes concentrations

Les souches sélectionnées pour l'étude de l'influence de la variation des concentrations initiales du pesticide chlorpyrifos sont B3-1 et C6, et du pesticide glyphosate sont B3-1 et C2. Elles ont été choisies pour leur aptitude à croître sur milieu solide et milieu liquide en présence du pesticide cité précédemment.

III. 4. 1. 1. Le Chlorpyrifos

Les figures 8 et 9 représentent l'évolution de la croissance des souches B3-1 et C6 en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos par la mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les 24 h pendant 96h.

La concentration optimale est de 100 mg/l, pour une croissance maximale ($DO_{600} = 0,389$) après 72h d'incubation pour la souche B3-1, la même cinétique est observée pour la concentration 200 mg/l mais à un degré moindre ($DO_{600} = 0,351$). Pour la concentration 50 mg/l, il y a une croissance pendant les 24 premières heures et puis un ralentissement, alors que pour la concentration 400 mg/l, on observe une longue phase de latence suivie d'une croissance à partir de 72h. **Karpouzas et Walker.,(2000)** avait suggéré qu'une longue phase de latence à une concentration élevée de chlorpyrifos pouvait être expliquée par la nécessité de la présence d'un nombre élevé de cellules bactériennes pour initier une croissance et une dégradation du pesticide.

De la même façon, pour la souche C6 les meilleures croissances sont observées pour les concentrations 100 mg/l et 200 mg/l après 72 h d'incubation, avec l'optimum à 100 mg/l ($DO_{600} = 0,444$). Aucune phase de latence n'a été observée. Une croissance lente a été remarquée pour la concentration 400 mg/l.

Les deux souches B3-1 et C6 avaient une croissance maximale à une concentration de 100 mg/l, et pouvaient tolérer jusqu'à 400 mg/l de chlorpyrifos dans le milieu. **Anwer et al., (2009)** avaient rapporté que la croissance de la souche *Bacillus pumilus* C2A1 augmentait avec l'augmentation de la concentration du chlorpyrifos jusqu'à atteindre une concentration relativement élevée (500 mg/l et 1000 mg/l) où la croissance était lente et la dégradation commençait après 7 à 10 jours d'incubation. Cette souche pouvait tolérer et dégrader jusqu'à 1000 mg/l de chlorpyrifos. **Essa et al., (2016)**, avaient quant à eux trouvé que la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* diminuait à des concentrations élevées de diazinon, un autre pesticide organophosphoré, aussi, que le taux de dégradation ralentissait considérablement.

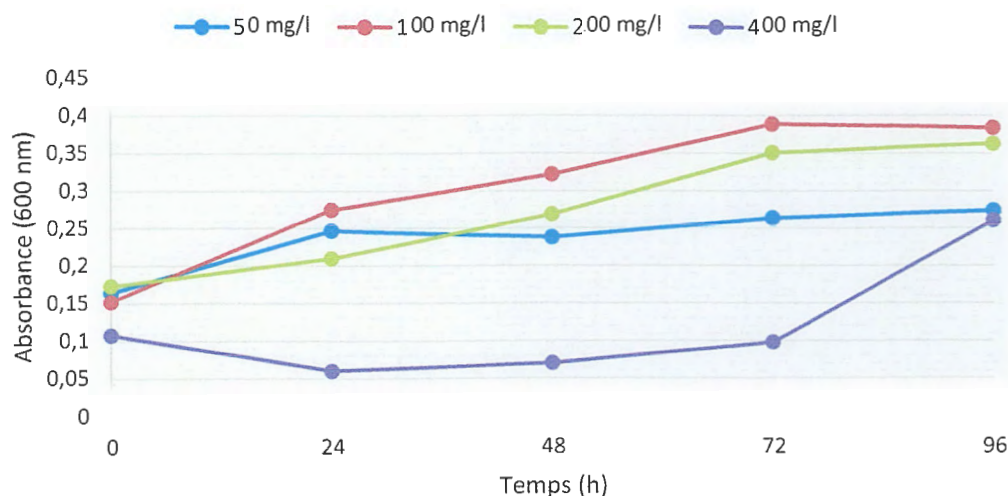


Figure 8. Cinétique de croissance de la souche B3-1 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlopyrifos.

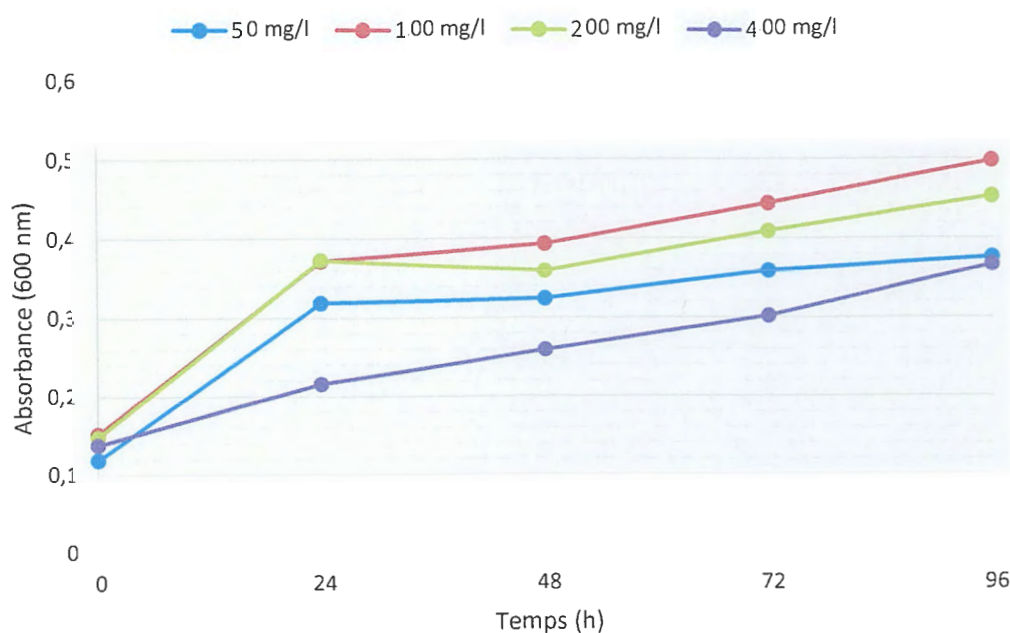


Figure 9. Cinétique de croissance de la souche C6 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlopyrifos.

III. 4. 1. 2. Le glyphosate

Les figures 10 et 11 représentent les variations de la croissance des souches B3-1 et C2 en fonction de la concentration initiale du glyphosate sur milieu MMM liquide, par la mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les 24 h pendant 96h.

La croissance est rapide et atteint une valeur maximale après 24h d'incubation à une concentration de 100 mg/l pour les deux souches ($DO_{600} = 0,341$ pour la souche B3-1 et $DO_{600} = 0,359$ pour la souche C2), suivi d'une phase stationnaire puis un déclin après 72 heures d'incubation. La même cinétique a été observée avec les autres concentrations avec des valeurs de croissance très proches. Cela peut suggérer que les souches pourraient tolérer des concentrations élevées de glyphosate sans un effet d'inhibition. En effet, **Yu et al., (2015)** avaient constaté que la souche *Bacillus subtilis* Bs-15 avait une croissance maximale à une concentration de 1000 mg/l de glyphosate, mais elle pouvait tolérer jusqu'à 40000 mg/l.

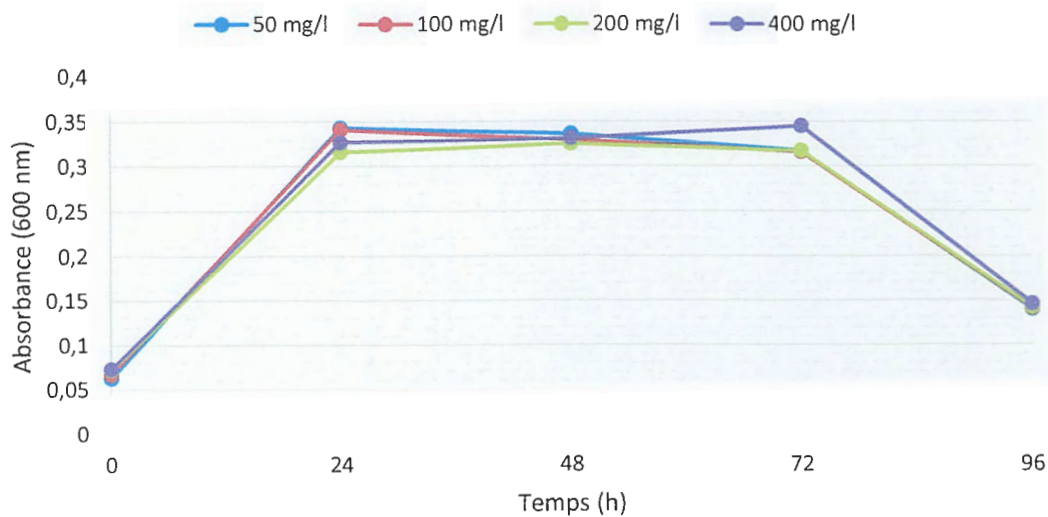


Figure 10. Cinétique de croissance de la souche B3-1 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de glyphosate.

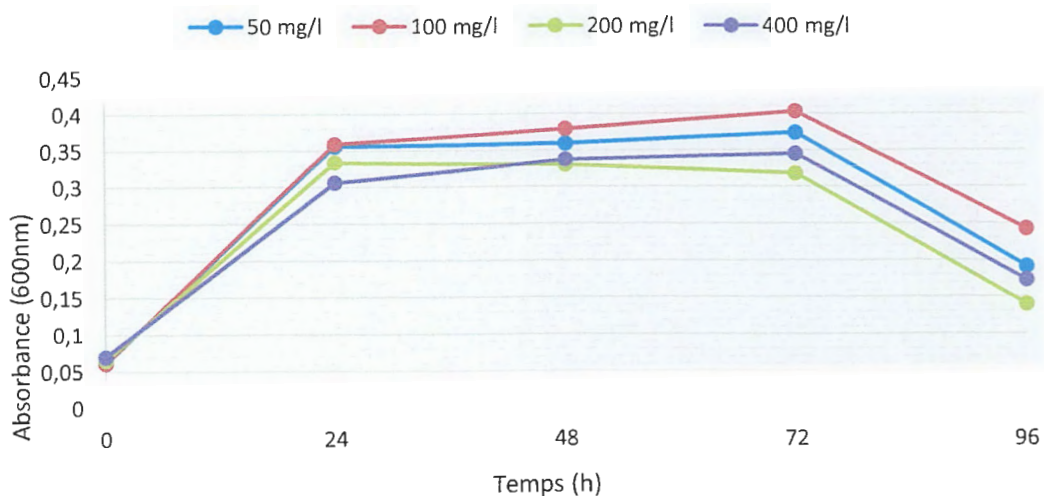


Figure 11. Cinétique de croissance de la souche C2 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de glyphosate.

III. 4. 2. Effet du pH

III. 4. 2. 1. Chlorpyrifos

La figure 12 représente la cinétique de la croissance de la souche C6 en fonction du temps à différents pH sur le milieu MMM en présence de 100 ml/l de chlorpyrifos. Les résultats obtenus ont montré une croissance rapide les premières 24 h, puis elle continue à augmenter plus lentement pour atteindre une valeur maximale à pH = 7 après 72 h d'incubation.

Les résultats obtenus sont proches à ceux obtenus par **Singh et al., (2003)** où la dégradation du chlorpyrifos dans les milieux acides (pH = 4,7 et pH = 5,7) était lente, en particulier à pH = 4,7, et rapide dans les milieux alcalins (pH = 7,7 et pH = 8,4). Mais la croissance la plus rapide a été obtenue dans le milieu à pH plus neutre (6,7). Ils avaient suggéré que l'activité des enzymes dégradantes était plus importante dans les milieux où les valeurs de pH étaient comprises entre 6.7 et 8.4.

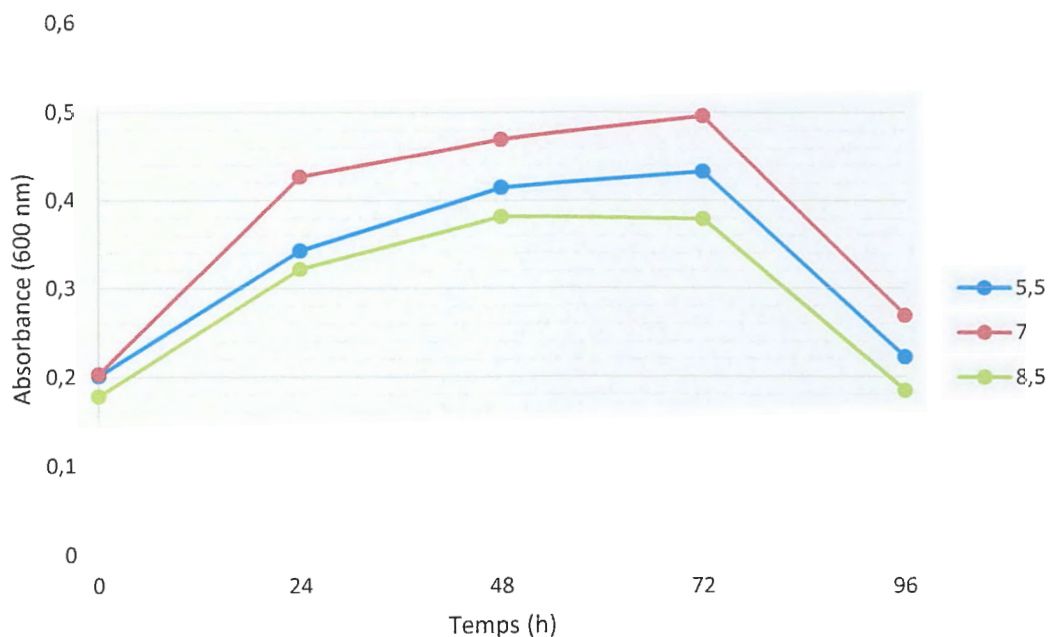


Figure 12. Cinétique de croissance de C6 en fonction du pH en présence du chlorpyrifos.

III. 4. 2. 2. Glyphosate

La figure 13 représente la courbe de la cinétique de croissance de la souche C2 à différentes valeurs de pH sur le milieu MMM en présence de 100 ml/l de glyphosate. La croissance optimale a été obtenue à pH = 7,0 après 24 h d'incubation. De plus, il est clair que le pH de 8,5 est défavorable pour la croissance de la souche C2 en présence du glyphosate.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Shushkova et al., (2012)**. La souche *Ochrobactrum anthropi* GPK3 avait une croissance élevée à un intervalle de pH entre 6,0 et 7,0, avec une croissance maximale à un pH = 7,0.

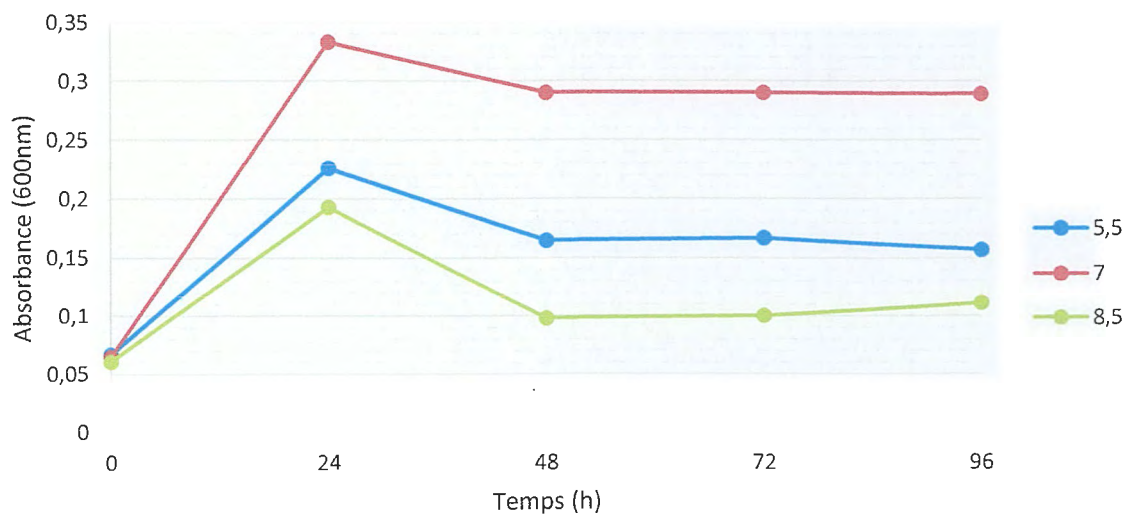


Figure 13. Cinétique de croissance de C2 en fonction du pH en présence du glyphosate.

III. 4. 3. Effet de l'agitation

III. 4. 3. 1. Chlorpyrifos

La variation de la croissance de C6 sur le milieu MMM en présence de 100 mg/l de chlorpyrifos avec et sans agitation est représentée dans la figure 14. La souche C6 avait une croissance maximale avec agitation après 24 h d'incubation. On peut suggérer alors que la souche testée aurait besoin d'un certain degré d'aération.

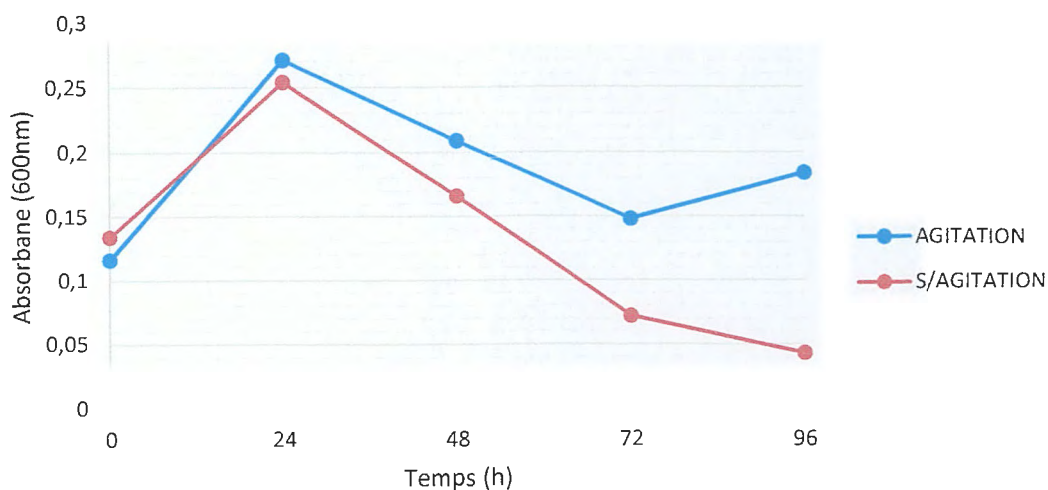


Figure 14. Cinétique de croissance de C6 avec ou sans agitation en présence du chlorpyrifos.

III. 4. 3. 2. Gyphosate

Contrairement au résultat précédent, le facteur agitation influe négativement sur la cinétique de croissance de la souche C2, le résultat obtenu (figure 15) montre que le taux de croissance de la C2 est plus faible avec agitation qu'en absence d'agitation. On suggère alors, que la souche C2 ne nécessite pas forcément l'agitation pour une meilleure croissance. Ce phénomène est plus distingué après 24h d'incubation.

Shushkova et al. (2012), ont eux aussi constaté des résultats similaires où la croissance de la souche *Ochrobactrum anthropi* GPK3 était indépendante du facteur agitation (10 à 60 % de saturation de l'air).

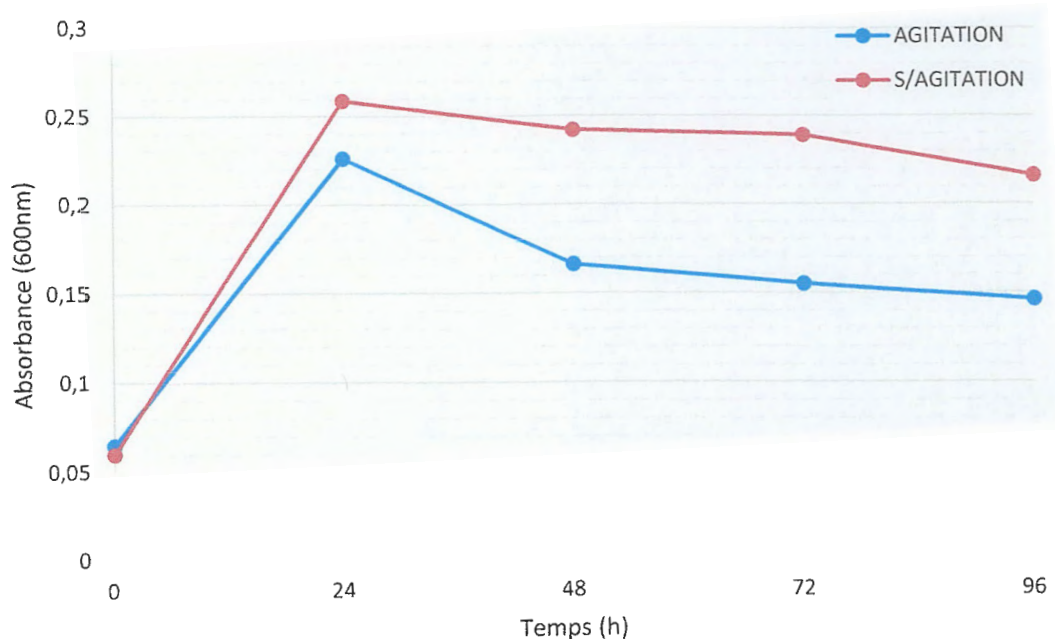


Figure 15. Cinétique de croissance de C2 avec ou sans agitation en présence du glyphosate.

III. 4. 4. Effet de l'addition du glucose

III. 4. 4. 1. Chlorpyrifos

Selon les résultats obtenus représentés sur la figure 16, on remarque qu'il ya une croissance de la souche C6 sur les deux milieux à 100 mg/l de chlorpyrifos en présence et en absence du glucose, mais elle est plus importante dans l'échantillon en présence du glucose et atteint une croissance maximale après 24 h d'incubation, un déclin puis une phase de stabilité. Cette amélioration de la croissance de la souche C6 est peut être due à la facilité de l'assimilation du glucose qui représente un substrat simple à dégrader.

Ces résultats peuvent être comparés avec les résultats obtenus par **Singh et al. (2004)**. La souche testée *Enterobacter sp* avait montré une croissance en présence du glucose sans la dégradation du chlorpyrifos pendant les trois premiers jours. Mais après le troisième jour, le chlorpyrifos a été dégradé. Dans le milieu sans autre source de carbone, le chlorpyrifos a été dégradé complètement en deux jours.

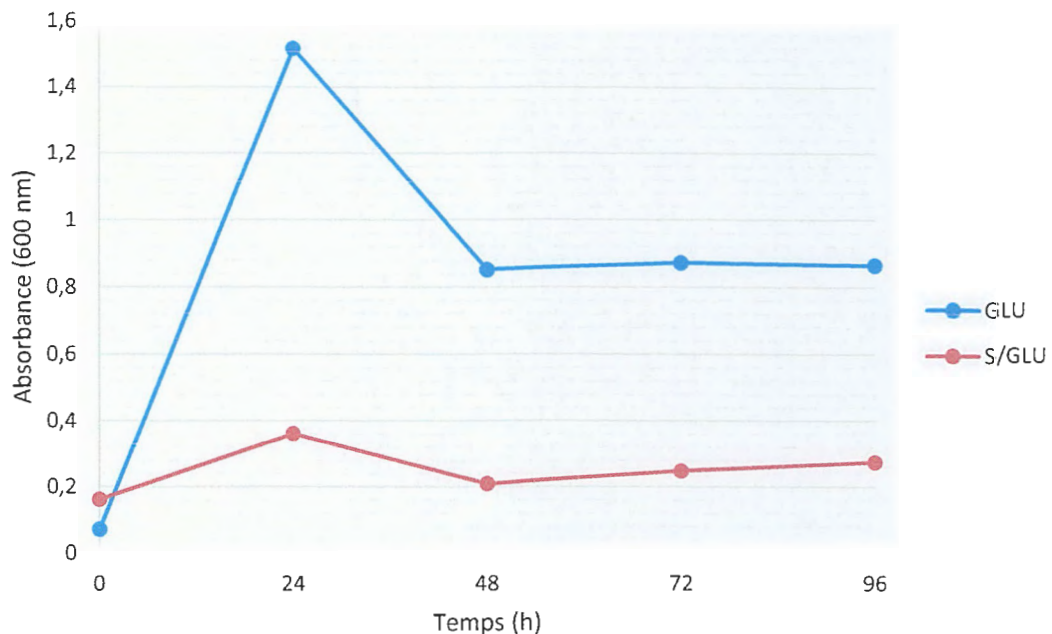


Figure 16. Cinétique de croissance de C6 avec ou sans glucose en présence du chlorpyrifos.

Singh et al., (2004), avaient suggéré alors qu'en présence d'autres sources de carbone, les bactéries ont cessé de dégrader le chlorpyrifos. Lorsque ces sources de carbone ont été épuisées, elles ont ensuite dégradé le chlorpyrifos et l'avaient utilisé comme source de carbone, ce qui signifie l'adaptation environnementale de cette souche bactérienne. L'utilisation du chlorpyrifos comme source d'énergie par cette bactérie lui procure un avantage concurrentiel important par rapport aux autres microorganismes.

III. 4. 4. 2. Glyphosate

La cinétique de croissance de la souche C2 sur le milieu MMM à 100mg/l de glyphosate avec ou sans glucose (figure 17), a montré une croissance importante avec le glucose et donne une valeur maximale après 24 heures d'incubation.

Moneke et al., (2010), avaient constaté après l'étude de la cinétique de croissance d'un isolat de *Pseudomonas fluorescens* qu'il y a une augmentation progressive de sa croissance lorsque le milieu contenant le glyphosate est additionné par le glucose. Le glyphosate a été utilisé comme source de

phosphore, en parallèle, le glucose est utilisé en tant que source de carbone. Ils ont suggéré que cette capacité de cet organisme pour utiliser cet herbicide *in vitro* pourrait être attribuée à son contact précédent avec le pesticide dans le sol d'où il était isolé. Il est également possible qu'une mutation génétique conduisant à l'adaptabilité des organismes à leur microenvironnement.

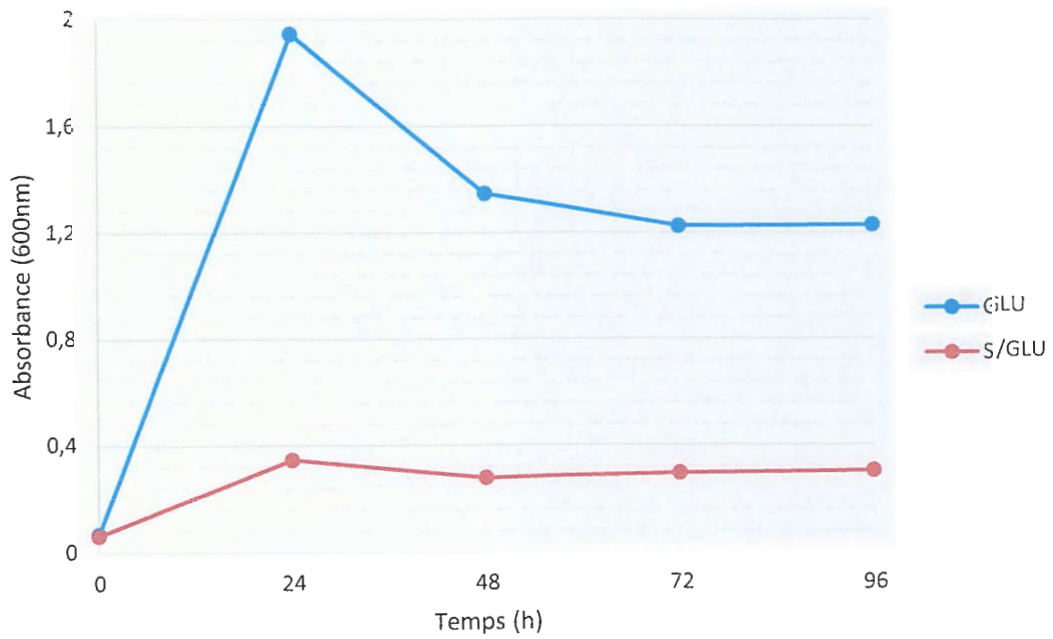


Figure 17. Cinétique de croissance de C2 avec ou sans glucose en présence du glyphosate.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion

L'objectif de ce travail était l'étude de la cinétique de croissance de treize souches bactériennes isolées d'un sol agricole, sur deux milieux minéraux minimaux contenant deux pesticides (Chlorpyrifos et Glyphosate), ainsi que l'évaluation de l'influence de certains paramètres abiotiques sur la cinétique de croissance des isolats.

Dans un premier temps, il s'est avéré que les 13 souches bactériennes testées avaient la capacité de croître sur le milieu MMM gélosé en présence d'une concentration de 100 mg/l de chaque pesticide à la fois comme seule source de carbone.

Les facteurs optimaux pour la souche C6 sont une concentration de 100 mg/l de chlorpyrifos, pH neutre, avec agitation et en présence de glucose comme co-substrat. Les facteurs optimaux pour la souche C2 sont une concentration de 100 mg/l de glyphosate, pH neutre, sans agitation et en présence du glucose comme co-substrat.

Par conséquent, compte tenu de l'ensemble des résultats fournis par cette étude, la souche C6 et la souche C2 pourraient être considérées comme un bon matériel biologique assez prometteur pour être utilisées en tant que dépolluant pour l'élimination du chlorpyrifos et du glyphosate, respectivement.

Perspectives

Dans la perspective qu'un jour nous puissions mettre en œuvre ces résultats et les exploiter dans le traitement biologique des sols pollués par ces pesticides, plus d'études sont nécessaires pour l'évaluation d'autres conditions influençant la biodégradation, ainsi que la détermination du métabolisme, des enzymes et des gènes impliqués dans ce processus de biodégradation. Aussi, l'évaluation de la dégradation *in vivo* ou *in situ* dans les conditions du sol serait un complément important à cette étude.

***RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

Références bibliographiques

A

Abraham W. R., Nogales B., Golyshin P. N., Pieper D. H. & Timmis K. N., (2002), Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments, *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 246-253.

Agrawal A., Pandey R. S., Sharma B., (2010), Pollution de l'eau avec une référence particulière à la contamination par les pesticides en Inde, *Journal des Ressources en Eau et de la Protection*, 2, 432-448.

Andreu V. & Picó Y., (2004), Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10), 772-789.

Anwar S., Liaquat, F., Khan Q. M., Khalid Z. M., & Iqbal S., (2009), Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1, *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 400-405.

Arfarita N., Djuhari D., Prasetya B. & Imai T., (2016), The application of *Trichoderma viride* strain frp 3 for biodegradation of glyphosate herbicide in contaminated land, *Agrivita*, 38(3), 275-281.

Aubertot J. N., Barbier J. M., Carpentier A., Gril J. N., Guichard L., Lucas P., Savary S. & Voltz M., (2007), Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux, *Expertise scientifique collective Inra-Cemagref*.

B

Basse C. & Champ L. M., (2011), L'amplification du gène de résistance aux insecticides, *Sciences de la Lutte Antiparasitaire*, 67(8), 886-890.

Besse-Hoggan P., Alekseeva T., Sancelme M., Delort A. M. & Forano C., (2009), Atrazine biodegradation modulated by clays and clay/humic acid complexes, *Environmental Pollution*, 157(10), 2837-2844.

Briceño G., Palma G. & Durán N., (2007), Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(3), 233-271.

Briceño G., Fuentes M. S., Palma G., Jorquera M. A., Amoroso M. J. & Diez M. C., (2012), Chlorpyrifos biodegradation and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 73, 1-7.

Burrows H. D., Santaballa J. A. & Steenken S., (2002), Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides, *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 67(2), 71-108.

C

Calvet R., (2005), *Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*, France Agricole Editions.

D

Diez M. C., (2010), Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 244-267.

Dhanya M. S., (2014), Advances in microbial biodegradation of chlorpyrifos, *Journal of Environmental Research and Development*, 9(1), 232-240.

E

Essa A. M. M., Reyad A. M., Radwan T. E. E. & Ibrahim W. M., (2016), Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from agricultural drainage ditches, *Egyptian Journal of Botany*, 56(1), 353-370.

F

Fenner K., Canonica S., Wackett L.P., Elsner M., (2013), Évaluation de la dégradation des pesticides dans l'environnement : points cachés et opportunités émergentes, *Science*, 341(6147), 752-758.

Fu G. M., Li R. Y., Hu M., Yuan X. Q., Li B., Wang F. X., Liu C. M. & Wan Y., (2016), Optimization of liquid-state fermentation conditions for the glyphosate-degradation enzyme

production of strain *Aspergillus oryzae* by ultraviolet mutagenesis, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 780-787.

G

Gavrilescu M., (2005), Fate of pesticides in the environment and its bioremediation, *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 510-513.

George N., Chauhan P. S., Sondhi S., Saini S., Puri N. & Gupta N., (2014), Biodegradation and analytical methods for detection of organophosphorous pesticide : chlorpyrifos, *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(2), 79-94.

Gilani R. A., Rafique M., Rehman A., Munis, M. F. H. & Chaudhary H. J., (2016), Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*, *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), 105-119.

Guimont S., (2005), Devenir des Pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol, Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Guo H., Riter L. S., Wujcik C. E. & Armstrong D. W., (2016), Direct and sensitive determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1443, 93-100.

H

Hadi F., Mousavi A., Noghabi K. A., Tabar H. G. & Salmanian A. H., (2013), New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(3), 208-213.

J

John E. M. & Shaik J. M., (2015), Chlorpyrifos: pollution and remediation, *Environmental Chemistry Letters*, 13(3), 269-291

K

Karpouzas D. G. & Walker A., (2000), Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11), 1753-1762.

Katagi T., (2004), Photodegradation of Pesticides on Plant and Soil Surfaces, *Reviews of Environmental Contamination Toxicology*, 182, 1–78.

Kulshrestha G. & Kumari A., (2011), Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil, *Biology and Fertility of Soils*, 47(2), 219-225.

L

Lee W. J., Blair A., Hoppin J. A., Lubin J. H., Rusiecki J. A., Sandler D. P., Dosemici M. & Alavanja, M. C., (2004), Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study, *Journal of the National Cancer Institute*, 96(23), 1781-1789.

M

Maya K., Upadhyay S. N., Singh R. S. & Dubey S. K., (2012), Degradation kinetics of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCP) by fungal communities, *Bioresource Technology*, 126, 216-223.

Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N. & Naidu R., (2011), Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective, *Environment International*, 37(8), 1362-1375.

Moneke A. N., Okpala G. N. & Anyanwu C. U., (2010), Biodegradation of glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice fields, *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4067-4074.

Myers J. P., Antoniou M. N., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L. G., Hansen M., Landrigan P. J., Lanphear B. P., Mesnage R., Vandenberg L. N., Vom Saal F. S., Welshons W. V. & Benbrook C. M., (2016), Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement, *Environmental Health*, 15(1), 15-19.

N

Nguyen D. B., Rose M. T., Rose T. J., Morris S. G. & Van Zwieten L., (2016), Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta-analysis, *Soil Biology and Biochemistry*, 92, 50-57.

O

Ortiz-Hernández M. L., Sánchez-Salinas E., Dantán-González E. & Castrejón-Godínez M. L., (2013), Pesticide biodegradation: Mechanisms, genetics and strategies to enhance the process, *Biodegradation-life of Science*, 251-287.

Ortiz-Hernández M. L., Sánchez-Salinas E., Olvera-Velona A. & FolchMallo L., (2011), *Pesticides in the Environment: Impacts and their Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment: Pesticides - Formulations, Effects, Fate*, Margarita Stoytcheva Edition, InTech.

P

Paul D., Pandey G., Pandey J. & Jain R. K., (2005), Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration, *TRENDS in Biotechnology*, 23(3), 135-142.

Prasertsup P. & Ariyakanon N., (2011), Removal of chlorpyrifos by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) and duckweed (*Lemna minor* L.), *International Journal of Phytoremediation*, 13(4), 383-395.

R

Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. & Sethunathan N., (2010), The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(8), 699-821.

Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Sethunathan N. & Naidu R., (2011), Mixtures of environmental pollutants: effects on microorganisms and their activities in soils, *In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 211, 63-120.

Riya P. & Jagatpati T., (2012), Biodegradation and bioremediation of pesticides in soil: its objectives, classification of pesticides, factors and recent developments, *World Journal of Science and Technology*, 2(7), 36-41.

Robles-Molina J., de Vidales M. J. M., García-Reyes J. F., Cañizares P., Sáez C., Rodrigo M. A. & Molina-Díaz A., (2012), Conductive-diamond electrochemical oxidation of chlorpyrifos in wastewater and identification of its main degradation products by LC-TOFMS, *Chemosphere*, 89(10), 1169-1176.

Romeh A. A. & Hendawi M. Y., (2013), Chlorpyrifos insecticide uptake by plantain from polluted water and soil, *Environmental Chemistry Letters*, 11(2), 163-170.

S

- Sasikala C.**, Jiwal S., Rout P. & Ramya M., (2012), Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1301-1308.
- Scott C.**, Pandey G., Hartley C. J., Jackson C. J., Cheesman M. J., Taylor M. C., Pandey R., Khurana J. L., Teese M., Coppin C. W., Jain R. K., Lal R., Russell R. J., Oakeshott J. G. & Weir, K. M., (2008), The enzymatic basis for pesticide bioremediation, *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 65-79.
- Shukla K. P.**, Singh N. K. & Sharma S., (2010), Bioremediation: developments, current practices and perspectives, *Genetic Engineering Biotechnology Journal*, 3(8), 1-20.
- Shushkova T. V.**, Ermakova I. T., Sviridov A. V. & Leontievsky A. A., (2012), Biodegradation of glyphosate by soil bacteria: optimization of cultivation and the method for active biomass storage, *Microbiology*, 81(1), 44-50.
- Singh B. K.**, Walker A., Morgan J. A. W. & Wright D. J., (2003), Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5198-5206.
- Singh B. K.**, Walker A., Morgan J. A. W. & Wright D. J., (2004), Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4855-4863.
- Singh B. K.** & Walker A., (2006), Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471.
- Supreeth M.**, Chandrashekar M. A., Sachin N. & Raju N. S., (2016), Effect of chlorpyrifos on soil microbial diversity and its biotransformation by *Streptomyces*, *3 Biotech*, 6(2), 1-6.
- Sviridov A. V.**, Shushkova T. V., Zelenkova N. F., Vinokurova N. G., Morgunov I. G., Ermakova I. T. & Leontievsky A. A., (2012), Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 787-796.

Sviridov A. V., Shushkova T. V., Ermakova I. T., Ivanova E. V., Epiktetov D. O. & Leontievsky A. A., (2015), Microbial degradation of glyphosate herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 183-190.

Y

Van Eerd L. L., Hoagland R. E., Zablotowicz R. M. & Hall J. C., (2003), Pesticide metabolism in plants and microorganisms, *Weed Science*, 51(4), 472-495.

Van Maele-Fabry G.V., Baldi I., Cordier S., Coumoul X., Elbaz A., Bailly P., Multigner L., Rahmani R. & Spinosi J., (2013), Effets des Pesticides Sur La Santé, Editions Inserm.

Y

Yadav M., Srivastva N., Shukla A. K., Singh R. S., Upadhyay S. N. & Dubey S. K., (2015), Efficacy of *Aspergillus* sp. for degradation of chlorpyrifos in batch and continuous aerated packed bed bioreactors, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 16-24.

Yan Q. X., Hong Q., Han P., Dong X. J., Shen Y. J. & Li S. P., (2007), Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), 207-213.

Yang L., Zhao Y. H., Zhang B. X., Yang C. H. & Zhang X., (2005), Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium, *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 67-73.

Yu X. M., Yu T., Yin G. H., Dong Q., An M., Wang H. & Ai C., (2015), Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15, *Genetic & Molecular Research*, 14, 14717-14730.

Z

Zacharia J. T., (2011), Identity, physical and chemical properties of pesticides. In : Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis, Intech, 10-14.

Zeng T., Chin Y. P. & Arnold, W. A., (2012), Potential for abiotic reduction of pesticides in prairie pothole porewaters, *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3177-3187.

Zhongli C., Shunpeng L. & Guoping F., (2001), Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4922-4925.

ANNEXES

Annexes

Annexe 01 : Composition de bouillon et de gélose nutritive

Peptone.....10g
 Chlorure de sodium.....5g
 Extrait de viande.....3g
 Agar-agar (gélose).....15g
 Eau distillée.....1000ml

pH = 7,0 ± 0,2 Autoclaver 20 min à 120°C

Annexe 02 : Cinétique de croissance des souches en présence de 100 mg/l de chlorpyrifos.

	C1	C2	C6	B2-3	B3-1
T = 0h	0,11	0,078	0,093	0,068	0,087
T = 24h	0,058	0,091	0,042	0,122	0,147
T = 48h	0,079	0,141	0,088	0,17	0,211
T = 72h	0,364	0,416	0,455	0,411	0,534
T = 96 h	0,428	0,401	0,426	0,418	0,519

Annexe 03 : Cinétique de croissance des souches en présence de 100 mg/l de glyphosate.

	C1	C2	C6	B2-3	B3-1
T = 0h	0,151	0,152	0,162	0,141	0,154
T = 24h	0,325	0,304	0,25	0,346	0,358
T = 48h	0,305	0,345	0,248	0,327	0,339
T = 72h	0,285	0,322	0,224	0,304	0,313
T = 96 h	0,281	0,307	0,223	0,297	0,313

Annexe 04 : Cinétique de croissance de la souche B3-1 en milieu MMM additionné de différentes concentrations de chlorpyrifos.

	50	100	200	400
T = 0h	0,164	0,152	0,173	0,108
T = 24h	0,247	0,275	0,21	0,06
T = 48h	0,238	0,322	0,269	0,07
T = 72h	0,264	0,389	0,351	0,098
T = 96 h	0,274	0,384	0,363	0,261

Annexe 05 : Cinétique de croissance de la souche C6 en milieu MMM additionné de différentes concentrations de chlorpyrifos.

	50	100	200	400
T = 0h	0,119	0,152	0,148	0,138
T = 24h	0,319	0,372	0,373	0,216
T = 48h	0,324	0,393	0,359	0,259
T = 72h	0,359	0,444	0,409	0,302
T = 96 h	0,376	0,498	0,453	0,367

Annexe 06 : Cinétique de croissance de la souche B3-1 en milieu MMM additionné de différentes concentrations de glyphosate.

	50	100	200	400
T = 0h	0,063	0,067	0,072	0,073
T = 24h	0,343	0,341	0,316	0,327
T = 48h	0,336	0,329	0,325	0,331
T = 72h	0,317	0,316	0,317	0,345
T = 96 h	0,14	0,141	0,142	0,146

Annexe 07 : Cinétique de croissance de la souche C2 en milieu MMM additionné de différentes concentrations de glyphosate.

	50	100	200	400
T = 0h	0,061	0,061	0,065	0,07
T = 24h	0,356	0,359	0,334	0,306
T = 48h	0,359	0,379	0,33	0,337
T = 72h	0,374	0,403	0,318	0,345
T = 96 h	0,191	0,242	0,14	0,173

Annexe 08 : Cinétique de croissance de la souche C6 en milieu MMM additionné de 100 mg/l de chlorpyrifos sous différents pH.

	T = 0h	T = 24h	T = 48h	T = 72h	T = 96h
5,5	0,201	0,343	0,415	0,433	0,222
7	0,203	0,427	0,47	0,496	0,269
8,5	0,178	0,322	0,382	0,379	0,184

Annexe 09 : Cinétique de croissance de la souche C2 en milieu MMM additionné de 100 mg/l de glyphosate sous différents pH

	T = 0h	T = 24h	T = 48h	T = 72h	T = 96h
5,5	0,067	0,226	0,165	0,167	0,157
7	0,065	0,333	0,29	0,29	0,289
8,5	0,061	0,193	0,098	0,1	0,111

Annexe 10 : Cinétique de croissance de la souche C6 en milieu MMM additionné de 100 mg/l de chlorpyriphos avec et sans agitation.

	T = 0h	T = 24h	T = 48h	T = 72h	T = 96h
AGITATION	0,116	0,271	0,209	0,148	0,184
S/ AGITATION	0,134	0,254	0,166	0,072	0,043

Annexe 11 : Cinétique de croissance de la souche C2 en milieu MMM additionné de 100 mg/l de glyphosate avec et sans agitation.

	T = 0h	T = 24h	T = 48h	T = 72h	T = 96h
AGITATION	0,065	0,226	0,166	0,155	0,146
S/ AGITATION	0,06	0,259	0,242	0,239	0,216

Annexe 12 : Cinétique de croissance de la souche C6 en milieu MMM additionné de 100 mg/l de chlorpyriphos en présence et en absence de glucose.

	T = 0h	T = 24h	T = 48h	T = 72h	T = 96h
GLUCOSE	0,072	1,517	0,852	0,872	0,865
S/ GLUCOSE	0,162	0,361	0,209	0,248	0,275

Annexe 13 : Cinétique de croissance de la souche C2 en milieu MMM additionné de 100 mg/l de glyphosate en présence et en absence de glucose.

	T = 0h	T = 24h	T = 48h	T = 72h	T = 96h
GLUCOSE	0,069	1,945	1,348	1,225	1,229
S/ GLUCOSE	0,064	0,347	0,279	0,295	0,303

Présenté par :

Rachid FENNOUR

Yamina YOUNSI

Présidente : M^{me} Samiya AMIRA

Examineur : Prof. Tayeb IDOUI

Encadreur : Prof. Mohamed SIFOUR

Evaluation de la biodégradabilité du chlorpyrifos et du glyphosate par quelques bactéries du sol

Abstract

Pesticides in agricultural areas affect not only the target organisms but can also induce in parallel pollution and accumulation in the environment of toxic products and derivatives. The aim of this work is to evaluate the biodegradability of two pesticides, chlorpyrifos and glyphosate by soil bacteria and to investigate the influencing factors on degradation. All the tested strains showed the capability of bacteria to grow on mineral medium supplemented with 100 mg/l of each pesticide. The strains B3-1 and C6, and B3-1 and C2 have the best growth with chlorpyrifos and glyphosate, respectively. The strain C6 had a better growth with 100 mg/l of chlorpyrifos in neutral pH with shaking. The strain C2 had a better growth with 100 mg/l of glyphosate in neutral pH without shaking. The addition of glucose as co-substrate have a positive effect on the bacterial growth.

Key words: Pesticide, Pollution, Environment, Chlorpyrifos, Glyphosate, Biodegradation.

Résumé

Les pesticides répandus dans les zones agricoles n'atteignent pas seulement les organismes cibles, mais provoquent aussi en parallèle la pollution et l'accumulation dans l'environnement de produits et dérivés toxiques. L'objectif de ce travail est d'évaluer la biodégradation des pesticides chlorpyrifos et glyphosate par des bactéries du sol et d'étudier les facteurs influençant la dégradation. Toutes les souches testées ont la capacité de croître sur milieu minimum en présence de 100 mg/l de chaque pesticide. Les souches B3-1 et C6, et B3-1 et C2 ont la meilleure croissance en présence du chlorpyrifos et du glyphosate respectivement. La souche C6 à une meilleure croissance en présence de 100 mg/l de chlorpyrifos à un pH neutre sous agitation. La souche C2 quant à elle présente une meilleure croissance avec 100 mg/l de glyphosate à pH neutre sans agitation. L'addition du glucose comme co-substrat a un effet positif sur la croissance bactérienne.

Mots-clés: Pesticides, Pollution, Environnement, Chlorpyrifos, Glyphosate, Biodégradation.

ملخص

لا تصل المبيدات المستعملة في المناطق الزراعية فقط إلى الكائنات المستهدفة، ولكن أيضا تسبب بالتوازي التلوث وتراكم المنتجات و المشتقات السامة في البيئة. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التحلل البيولوجي للمبيدين Chlorpyrifos و Glyphosate بواسطة بكتريا التربة و دراسة العوامل المؤثرة على هذا التحلل. جميع السلالات المختبرة لديها القدرة على النمو على الوسط المعدني في ظل وجود 100 ملغم / لتر لكل مبيد. السلالات B3-1 و C6، و B3-1 و C2 لديها أفضل نمو في وجود Chlorpyrifos و Glyphosate على التوالي. أظهرت السلالة C6 النمو الأفضل في وجود 100 ملغم / لتر من Chlorpyrifos عند درجة حموضة متعادلة تحت الرج. السلالة C2 بدورها تنمو بشكل أفضل مع 100 ملغم / لتر من Glyphosate في درجة حموضة متعادلة دون الرج. إضافة الجلوكوز كمصدر كربوني آخر له تأثير إيجابي على نمو البكتيري.

الكلمات المفتاحية : المبيدات، التلوث، البيئة، Chlorpyrifos، Glyphosate، التحلل البيولوجي.

