الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى _جيجل_

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires

كليـــة علـــوم الطبيـــعة والحيـــــاة

قسم المكر وبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance des souches bactériennes en présence de chlorpyrifos ou du flint

Membres de Jury

Présidente : Dr. KHANOUF. T

Examinatrice : Mme. AMIRA. S

Encadreur : Pr. SIFOUR. M

Présenté par :

BOUAMOUCHA Ghaniyya

BOUDJERIDA Hassiba

Année Universitaire: 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliographique) :……

Remerciement

Au terme de ce travail, nous remercions Allah, le bon Dieu miséricordieux de

Nous avoir aidés à réaliser ce travail.

Nous remercierons profondément, notre encadreur Mr : le professeur ***Sifour Mohamed*** *pour le privilège et la confiance qu'il nous accordées durant la manipulation pratique « Sincèrement monsieur, nous ne pouvons que vous exprimez notre respect et notre gratitude, grâce à vous conseils cruciales et à votre supervision et de savoir ou a connu des gens formidable qu'on n'aurait jamais rencontré ailleurs »*

Nous remerciements s'adressent également aux honorables ***membres de jury****, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

On souhaiterait aussi adresser nos gratitudes à tout nos enseignants pour l'accompagnement
et le savoir transmis tout au long de notre parcours universitaire,

Nous exprimons aussi notre sincère gratitude, à toute la promotion de Microbiologie Appliquée et à tous les ingénieurs du laboratoire de microbiologie surtout mademoiselle ***Salima****. Ainsi que tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

Merci à vous

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents*, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur Soutien et leurs prières tout au long de mes études, ce travail est le fruit de votre Soutien infaillible.*

A ma grande mère et mon grand père *pour ces prières.*

A mes chères sœurs *: Loubna, Soumia, Ikram et Nassiha pour leurs encouragements permanents, et leur soutien.*

A mes chers frères *: Mohammed et Hamza pour leur appui et leur encouragement.*

A mon fiancé *:Mokhter.*

Aux membres de ma grande famille *: oncles, tantes, cousins, cousines pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.*

Sans oublier bien sur mes amis*: Loukha, Hassiba, Hidaya, Khadidja, Hannan, Fatima et Aicha, Nadjia et Meryem pour les bons moments passés ensemble, pour m'avoir comblé avec leur sympathie et leur bonté, pour le fait d'être mes amis tout simplement.*

Ghaniyya

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents*, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur Soutien et leurs prières tout au long de mes études, ce travail est le fruit de votre Soutien infaillible.*

A ma chère sœur *: Nouha.*

A mes chers frères*.*

A mes adorables *: Abd rahmen et Ahmed.*

A toute ma famille *pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.*

A mes chères ami (e)s *: Amina, Ghaniyya, Roqia, Manel, Hidaya ,Linda et Lamia.*

Hassiba

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction **1**

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les pesticides **3**

I.1. Définition **3**

I.2. Classification des pesticides **3**

I.3. Caractéristiques générales **4**

I.4. Propriétés des pesticides favorisant la contamination de l'environnement **6**

I.5. Dispersion et le devenir des pesticides dans l'environnement **7**

I.5.1. Phénomène de rétention **7**

I.5.1.1. Adsorption **8**

I.5.1.2. Biosorption **8**

I.5.2. Phénomène de transfert des pesticides **8**

I.5.2.1. Lixiviation **8**

I.5.2.2. Lessivage **8**

I.5.2.3. Ruissellement **9**

I.5.2.4. Volatilisation **9**

I.5.2.5. Érosion éolienne **9**

I.5.3. Phénomène de dégradation des pesticides **9**

I.5.3.1. Dégradation abiotique **10**

I.5.3.1.1. Photo-décomposition **10**

I.5.3.1.2. Dégradation chimique **10**

I.5.3.2. Dégradation biotique **10**

I .5.3.2.1. Mécanismes de la biodégradation des pesticides **11**

1. Métabolisme direct **11**

2. Co-métabolisme **11**

3. Conjugaison et la condensation **11**

1.5.3.2.2. Facteurs influençant la biodégradation des pesticides **12**

1. Facteurs biologiques **12**

2. Facteurs propres aux pesticides **12**

3. Facteurs environnementaux **12**

I.6. Organophosphorés **12**

I.6.1. Chlorpyrifos **13**

I.6.1.1. Propriétés physico-chimiques et éco-toxicologiques de chlorpyrifos **14**
I.6.1.2. Microorganismes dégradant le chlorpyrifos **14**
I.6.1.3. Voies de la biodégradation de chlorpyrifos **15**
I.7. Flint **17**
I.7.1. Propriétés physico-chimiques et éco-toxicologiques du trifloxystrobine **17**
I.7.2. Microorganismes dégradant le fongicide flint **17**
I.7.3. Voies de la biodégradation du trifloxystrobine **18**
II. Enzymes microbiennes impliquées dans la biodégradation des pesticides **19**
III. Microorganismes génétiquement modifiés et la biodégradation des pesticides **19**

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels
II.1. 1. Matériel biologique **21**
II.1. 2. Pesticides **21**
II.1. 3. Milieux de culture **21**
II.1. 4. Produits chimiques et réactifs **21**
II.1. 5. Appareillages **22**
II.2. Méthodes
II.2. 1. Préparation des milieux de culture et les solutions **22**
II.2. 2. Revivification et purification des souches bactériennes **22**
II.2. 3. Conservation des souches bactériennes **22**
II.2. 4. Préparation de l'inoculum bactérien **22**
II.2. 5. Identification des isolats **23**
II.2. 5.1. Par l'étude des caractères culturaux des souches à testées **23**
- Aspect macroscopique **23**
- Aspect microscopique **23**

II.2. 5.2. Par l'utilisation de la galerie API 20E **23**
II.2. 5.3. Par la recherche des cytochromes respiratoires (catalase) **25**
II.2. 6. Sélection des souches résistantes aux pesticides (chlorpyrifos et flint) **25**
II.2.6.1. Sur milieu solide **25**
II.2.6.2. Sur milieu liquide **26**
II.2.7. Effet de différentes concentrations des pesticides sur la croissance bactériennes **26**
II.2. 8. Caractérisation de la souche sélectionnée **26**
II.2.8.1. Effet du pH sur la croissance de la souche sélectionnée (SB8) **26**
II.2.8.2. Effet de la concentration de NaCl sur la croissance de la souche sélectionnée (SB8) . **26**

II.2.8.3. Effet de la température sur la croissance de la souche sélectionnée (SB8)..... **26**
II.2.9. Calcul du taux de croissance (μ) **27**
II.2.10. Evaluation de la biodégradabilité par mesure de la DBO_5 ..... **27**
II.2.11. Criblage des facteurs affectant la croissance par la matrice de Plackett-Burman **28**

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Identification des isolats **30**
III.2. Sélection des souches résistantes aux pesticides sur milieu solide **30**
III.3. Sélection des souches résistantes aux pesticides sur milieu liquide **32**
III.3.1. Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence et en absence des deux pesticides **32**
III.4. Effet de différentes concentrations en pesticides..... **35**
III.4.1. Cinétique de croissance en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos **35**
III.4.2. Cinétique de croissance en présence de différentes concentrations en flint **37**
III.5. Caractérisation de la souche sélectionnée..... **39**
III.6. Evaluation de la biodégradabilité par mesure de la DBO_5 ..... **41**
III.7. Criblage des facteurs affectant la croissance par la matrice de Plackett-Burman **43**
Conclusion et perspectives **47**
Références bibliographiques……**49**
Annexes
Résumé

ABREVIATIONS

ACh : Acétylcholine;

AChE : Acétylcholinestérase;

ADPase : Aryldialkylphosphatase de *Nocardia sp;*

AMPP : Aminopeptidase P;

A-OPH : Organophosphate hydrolase *d'Aspergillus niger;*

CCME : Conseil canadien des ministres de l'environnement;

CWA : Agents de guerre chimique (Chemical Warfare Agents) ;

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane ;

DL_{50} : La dose létale médiane;

CL_{50} : Concentration létale médiane ;

gfp : Gène codant pour la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein) *;*

HOCA : Phosphotriestérase de *Pseudomonas monteilii;*

INPNC : Protéine de nucléation de la glace tronquée (The truncated ice nucleation protein*);*

INRS : Institut national de recherche et de sécurité;

Koc : Coefficient d'adsorption au sol;

Kow : Coefficient de partage octanol-eau;

mcd : Gène codant pour le malonyl-CoA decarboxylase;

MMM : Milieu minimum minérale ;

MP : Méthyl-parathion;

mpd : Gène codant pour le méthyl-parathion hydrolase;

MPH : Méthyl-parathion hydrolase;

NC-OPH : Organophosphate hydrolase de *Nocardiodes simplex;*

OCP : Pesticides organochlorés;

OPAA : Organophosphorus acid anhydrolase (Anhydrolase d'acide organophosphoré) d'*Alteromonas sp;*

OPDA : Organophosphosphate hydrolase d'*Agrobacterium radiobacter;*

OPH : Organophosphosphate hydrolase*;*

ORS : Observatoire Régional de la Santé (Rhône-Alpes) ;

PEH: Phosphonate ester hydrolase de *Burkholderia caryophilli;*

POP : Pesticides organophosphorés;

P-OPH : Organophosphate hydrolase de *Penecillium lilacinum;*

sulE : Gène codant pour l'estérase (estérification de l'herbicide sulfonylurée) ;

SC-OPH *:* Organophosphate hydrolase de *SC* strain;

TCP : 3, 5,6-Trichloro-2-pyridinol;

γ-HCH : γ-Hexachlorocyclohexane.

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 01 : Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans l'environnement..... **7**

Figure 02 : Formule générale des composés organophosphorés et les voies major de leur dégradation **13**

Figure 03 : Formulation générale de chlorpyrifos **14**

Figure 04 : Voies proposées pour la biodégradation de chlorpyrifos..... **16**

Figure 05 : Formulation générale du trifloxystrobine **17**

Figure 06 : Voies de la biodégradation du trifloxystrobine..... **18**

Figure 07 : DBO mètre **27**

Figure 08 : Cinétique de croissance des souches bactériennes en absence des deux pesticides (Témoins) **33**

Figure 09 : Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence de chlorpyrifos ... **34**

Figure 10 : Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence du flint **35**

Figure 11 : Cinétique de croissance de la souche SB 1 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos **36**

Figure 12 : Cinétique de croissance de la souche SB 8 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos **37**

Figure 13 : Cinétique de croissance de la souche SB 4 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en flint **39**

Figure 14 : Cinétique de croissance de la souche SB 8 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en flint **39**

Figure 15 : Cinétique de la croissance de la souche SB8 à différentes températures **40**

Figure 16 : Cinétique de la croissance de la souche SB8 à différentes valeurs du pH..... **40**

Figure 17 : Cinétique de croissance de la souche SB8 à différente concentration de Na Cl..... **41**

Figure 18 : Variation de la DBO_5 (mg d'O_2/l) **42**

Figure 19 : Quantité de l'oxygène dissout (mg/l) **42**

Figure 20 : Effet de différents facteurs sur la croissance de la souche SB8 en présence de..... chlorpyrifos..... **43**

Figure 21 : Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur la croissance **44**

Tableau 01 : Systèmes de classification des pesticides **4**

Tableau 02 : Propriétés des pesticides favorisant la contamination des eaux souterraines **6**

Tableau 03 : Microorganismes isolés de sites contaminés dégradant le chlorpyrifos **15**

Tableau 04 : Microorganismes isolés de sites contaminés dégradant le flint **18**

Tableau 05 : Principales enzymes microbiennes impliquées dans la biodégradation des pesticides **19**

Tableau 06 : MGM utilisés dans la biodégradation des pesticides **20**

Tableau 07 : Différents niveaux de chaque facteur étudié **28**

Tableau 08 : Conditions expérimentales utilisées pour l'estimation de l'influence de cinq facteurs physicochimiques sur la biodégradabilité de chlorpyrifos par la souche SB8 en appliquant un modèle pilote de Plackett-Burman **29**

Tableau 09 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches bactériennes **31**

Tableau 10: Croissance des souches testées en présence de chlorpyrifos et du flint **32**

Tableau 11 : Conception de Plackett-Burman pour la biodégradation de CP par la souche SB8 ..... **43**

Tableau 12 : Analyse de régression de l'effet de chaque variable avec le coefficient, la valeur t et la valeur p **44**

INTRODUCTION

L'agriculture est l'un des principaux secteurs d'activité qui contribuent au développement socio-économique de la population. Elle emploie plus de 40% de la main-d'œuvre mondiale dont plus de 52% d'entre eux sont en Afrique et en Asie **(Yarou *et al*., 2017)**. L'agriculture moderne est basée sur l'utilisation des pesticides comme des composantes vitales permettant d'assurer une protection rapide et efficace des cultures contre les différents ennemies à pour but de maintenir une productivité agricole élevée afin de satisfaire la demande nutritionnelle liée à l'accroissement de la population mondiale **(Rahmoune *et al*., 2018)**.

En 2009 plus de 400 types de pesticides sont enregistrés en algerie dont environ 30000 tonnes de ces composés sont épandues chaque année cela a permis de classer l'agriculture Algérienne d'après les derniéres déclarations de l'Association Algérienne pour la protection de l'environnement parmi les gros consommateurs des pesticides **(Bordjiba** et **Ketif, 2009)**.

L'usage de ces produits phytosanitaires dans notre pays se répand de plus en plus avec le developpement de l'agriculture et elle ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. La plupart des pesticides importés en Algérie rentrent dans la catégorie des polluants organiques persistants **(Bouziani, 2007; Bordjiba** et **Ketif, 2009)**.

La persistance des résidus de ces polluants dans les différents compartiments de l'environnement (sol, eau et air) après plusieurs années de leur application signifié que l'usage non raisonné de celui-ci se révèle problématique par les risques qu'elle génère dans l'environnement. Étant donné qu'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les microorganismes tout en limitant leurs activités métaboliques et sur la macrofaune du sol ainsi que sur la santé des consommateurs des produits agricoles ou sur les agriculteurs et les travailleurs agricoles **(Bordjiba** et **Ketif, 2009 ; Rahmoune *et al*., 2018)**.

La biodégradation des pesticides a suscité un intérêt croissant au cours de ces dernières années puisque, ce processus est considéré comme étant le nouveau système respectueux de l'environnement qui est utilisé avec succès dans le traitement et la dépollution des déchets phytosanitaires, dont l'élimination de ces polluants représente un intérêt croissant et un enjeu majeur. Ce système est beaucoup moins onéreux et très rentable et efficace que les techniques physicochimiques. Il est basé sur l'utilisation des microorganismes ayant des voies métaboliques aptes à la biodégradation et à l'élimination de ces polluants **(Sharma *et al*., 2016)**.

Les différents microorganismes du sol représentent les principaux acteurs de ce processus où ils permettent de générer grâce à leurs systèmes enzymatiques qui sont très diversifiés des

métabolites qui sont souvent moins complexes et toxiques que la molécule du départ (**Doolotkeldieva *et al*., 2018)**.

C'est pourquoi on assiste dans ces dernières années à l'émergence d'un ensemble des études ont le but d'isoler, d'identifier, de caractériser et parfois aussi de construire de nouveaux microorganismes doués de nouvelles voies métaboliques et qu'ont la capacité de biodégrader les pesticides ou d'autre polluants connu comme étant persistants **(Sharma *et al*., 2019)**.

Le but essentiel de notre travail est d'identifier puis d'évaluer la capacité de neuf souches bactériennes précédemment isolées à partir des terres agricoles exposées en continu à l'application des pesticides de résister et/ou d'utiliser les différents pesticides (chlorpyrifos et flint) comme seule source de carbone et d'énergie. L'effet de quelques paramètres physicochimiques sur la croissance de ces souches bactériennes en présence de ces pesticides est également étudié.

La première partie de notre travail représente une synthèse bibliographique, comporte des informations générales sur les pesticides, leur classification, devenir et aussi leur dégradation dans l'environnement.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale qui comporte :

- L'identification des souches bactériennes qu'ont été utilisées dans notre étude.
- Mettre en évidence la capacité de ces isolats de résister et d'utiliser quelques pesticides comme seule source de carbone et d'énergie dans leurs croissances.
- La sélection des souches qui résistent et qui dégradent le plus.
- L'étude de l'effet de quelques paramètres physicochimiques sur la croissance des souches sélectionnées en présence des pesticides.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les pesticides

I.1. Définition

Les pesticides sont des substances ou mélanges de substances **(Joutey *et al*., 2013)** destinés à lutter contre les organismes considérés comme nuisibles, en particulier les mauvaises herbes, les animaux ou les microorganismes. Ils peuvent être, soit des composés d'origine biologiques (virus, bactéries, champignons…etc.) ou minérales (soufre, cuivre, arsenic), soit des substances organiques naturelles (pyrèthre, roténone, nicotine) ou de synthèses (organochlorés, organophosphorés, urées …etc.**)(Alix *et al*., 2005; ORS, 2016)** dont ses matières actives sont souvent mélangées avec d'autres substances (les produits de dilution, les surfactants, les adjuvants …etc.) afin d'améliorer leur efficacité et de faciliter leur emploi **(Sarwar, 2015)**.

Selon la **Directive 91/414/CE** et la **Directive 98/8/CE** on distingue deux utilisations principales des pesticides, en agriculture comme des produits phytosanitaires (phytopharmaceutiques) et dans le domaine médicale et/ou vétérinaire comme des biocides (antibiotiques, antiparasitaires, etc.). Mais en dehors de ces domaines, il existe d'autres utilisations de ces composés tels que dans la conservation des produits industrielles en cours de fabrication (textiles, papier…etc.), la protection des matériaux d'élevage…etc **(Calvet *et al*., 2005)**.

I.2. Classification des pesticides

La classification des pesticides est principalement basée sur deux systèmes : le premier prend en considération la nature chimique de la substance active des pesticides, tandis que le deuxième est selon la cible du pesticide **(Calvet *et al*., 2005; El Mrabet, 2007)**. Le **tableau 01** représente ces différents systèmes de classification.

Tableau 01: Systèmes de classification des pesticides **(Calvet *et al*., 2005; El Mrabet, 2007)**.

Premier système de classification	**Deuxième système de classification**	
En fonction de la nature chimique de la substance active des pesticides	**En fonction de la cible**	**Le spectre d'action**
• **Organochlorés** • **Organophosphorés** • **Carbamates** • **Pyréthroides** • **Triazines** • **Urées- substituées**	**Herbicides**	**Les mauvaises herbes des cultures**.
	Fongicides	**Les champignons** ou encore **les bactéries** responsables aux phytomaladies.
	Insecticides	**Les insectes**, Dans ce cas, les insecticides interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire.
	Acaricides	**Les acariens**
	Nématicides	**Les nématodes**
	Rodenticides	**Les rongeurs**
	Taupicides	**Les taupes**
	Molluscicides	**Les limaces** et **les escargots** essentiellement
	Corvicides et les Corvifuges	Respectivement contre les **corbeaux** et les autres **oiseaux** ravageurs de culture.

I.3. Caractéristiques générales

Les caractéristiques générales de quelques groupes de pesticides les plus couramment utilisés sont présentées dans les passages suivants :

- **Organophosphorés (POP)**

➢ Solubles dans les solvants organiques et dans l'eau ;

➢ Moins persistants et toxiques que les organochlorés ;

➢ Très stables grâce à la présence d'un atome de phosphore au centre de ces molécules;

➢ Ils sont absorbés par les plantes **(Ortiz Hernandez *et al*., 2013)** ;

➢ Ils sont caractérisés par un large spectre d'action avec un mode d'action très diversifié où ils affectent le système nerveux central des ravageurs lorsqu'ils sont utilisés comme insecticides,

acaricides…etc, ou la voie de schikimate lorsqu'ils sont utilisés comme herbicides contre les mauvaises herbes **(Calvet *et al.*, 2005)** ;

- Les pesticides organophosphorés les plus largement utilisés, ce sont : le **malathion**, le **méthyle parathion**, le **chlorpyrifos,** le **glyphosate** et le **diazinon (Ortiz Hernandez *et al*., 2013)**.

- **Organochlorés (OCP)**

- Les organochlorés sont des composés de nature non polaire et lipophile, donc ils sont solubles dans les lipides et s'accumulent dans les tissus adipeux des animaux ;
- Les atomes de carbone de ces composés peuvent être liés avec du chlore, de l'hydrogène et parfois aussi avec de l'oxygène ;
- La plupart d'entre eux se décomposent lentement et persistent dans l'environnement après leur application et dans les organismes après l'exposition ;
- Certains exemples des pesticides organochlorés, ce sont : l'**heptachlore**, l'**endosulfan**, le **méthoxychlore** et le **dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) (Ortiz Hernandez *et al*., 2013)**.

- **Pyréthroides :**

- Moins persistants et toxiques que les autres pesticides (organophosphorés, carbamates…etc.) ;
- Ce sont les pesticides les plus sûrs en termes d'utilisation dont certains d'entre eux sont appliqués contre les parasites domestiques ;
- La nature chimique des pyréthroides est semblable aux pyréthrines synthétiques (alcaloïdes obtenus à partir de pétales de ***Chysanthemun cinerariefolium***) **(Ortiz Hernandez *et al*., 2013)**;
- Il sont utilisés comme insecticides ou acaricides **(Calvet *et al.*, 2005)** où ils affectent le système nerveux central de ces ravageurs **(Ortiz Hernandez *et al*., 2013)** ;
- Certains exemples de ce type des pesticides, ce sont : la **phénothrine**, la **pralléthrine**, la **résméthrine** et la **tétraméthrine (Ortiz Hernandez *et al*., 2013)**.

- **Carbamates**

- Ils sont caractérisés par une faible persistance dans l'environnement après leur application ;
- Ils sont très toxiques pour les vertébrés ;

- Souvent utilisés comme insecticides (un spectre étroite) avec un mode d'action similaire à celui des organophosphorés ; mais sont également utilisés comme des fongicides et des herbicides **(Calvet *et al.*, 2005 ; Ortiz Hernandez *et al.*, 2013)**;
- Certains exemples de ce type de pesticides, ce sont : le **fénoxycarbe**, l'**isoprocarbe** et le **méthomyl (Ortiz Hernandez *et al.*, 2013)**.

- **Biopesticides**

- La souche de ***Bacillus thuringiensis*** et ses sous-espèces sont les organismes les plus largement utilisés comme biopesticides contre les ravageurs forestiers et des cultures (chenilles…etc.), mais il existe aussi d'autres organismes qui l'on peut utiliser tels quels ou d'utiliser leurs différents produits métaboliques comme agents de lutte biologique**(Ortiz Hernandez *et al.*, 2013 ; Deravel *et al.*, 2014)** tels que les virus (**Ex** : *Baculovirus*), les champignons (**Ex** : *Trichoderma sp*), les nématodes, les phytohormones…etc.

I.4. Propriétés des pesticides favorisant la contamination de l'environnement

La pénétration des pesticides dans le sol et les eaux souterraines peuvent être réalisée par l'infiltration qui représente une source importante de pollution environnementale (**Cardeal *et al.*, 2011)**. Certaines propriétés des pesticides qui favorisent leur infiltration dans le sol et donc la contamination des eaux souterraines sont présentées dans le **tableau 02**.

Tableau 02 : Les propriétés des pesticides favorisant la contamination des eaux souterraines **(Cardeal *et al.*, 2011)**.

Parameter	Value
Water solubility	> 30mg/L
Koc *	< 5, usually < 1
Kow *	< 300
Speciation	Negatively, fully or partially charged at ambient pH
Hydrolysis half-life	> 25 weeks
Photolysis half-life	> 1 week
Field dissipation half-life	> 3 weeks

*Koc = organic carbon content/ water partition coefficient

*Kow = octanol-water partition coefficient

I.5. Dispersion et le devenir des pesticides dans l'environnement

Le devenir et la circulation des pesticides dans l'environnement après leur application constituent un problème majeur, car ils sont souvent à l'origine de la pollution écologique. C'est pourquoi, la compréhension des divers phénomènes impliqués dans ces deux processus **(Figure 01)** est considérée comme étant le meilleur moyen pour parvenir à enrayer ce problème **(Barriuso *et al*., 1996)**.

Ces phénomènes (la rétention, le transport et la dégradation biotique et abiotique des pesticides) ne se déroulent pas indépendamment les uns des autres, et ils sont influencés par les propriétés physico-chimiques des pesticides, les conditions climatiques ainsi que les différentes caractéristiques des compartiments concernés : le sol, l'eau et l'atmosphère **(Barriuso *et al*., 1996 ;Calvet *et al*., 2005)**.

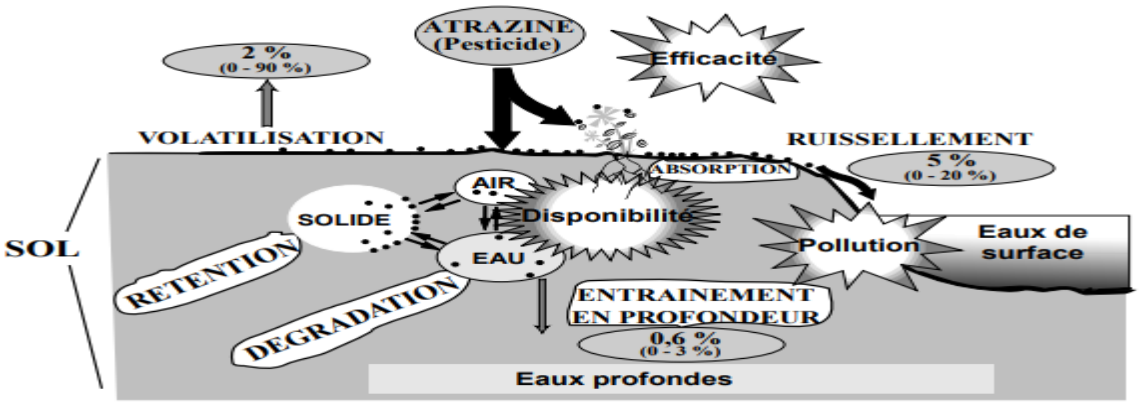


Figure 01: Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans l'environnement **(Barriuso *et al*., 1996)**.

I.5.1. Phénomène de rétention

La rétention est un processus qui consiste à limiter la mobilisation des pesticides dans la matrice du sol **(Zhu et Selim, 2002)**, via l'intervention d'un ensemble des phénomènes physico-chimiques (l'adsorption est le phénomène dominant) et biologiques (absorption et/ou adsorption par les végétaux ou la microflore du sol) **(Calvet *et al*., 2005)**. Elle est en relation étroite avec la dégradation des pesticides dont elle diminue leur biodégradabilité par la réduction de l'accessibilité de ces composés aux microorganismes du sol **(Schrack *et al*., 2009; Cardeal *et al*., 2011)**. La rétention est influencée par plusieurs paramètres tels que : la teneur du sol en matières organiques; le pH et les oxydes du sol…etc.

I.5.1.1. Adsorption

L'adsorption des pesticides est défini comme le passage de ces composés de la phase liquide (pesticides dissout dans la solution du sol) à l'interface solide-liquide du sol, sous l'action de leurs propriétés physico-chimiques, des caractéristiques des sols (la teneur en matière organique, la teneur en argiles granulométriques, le pH du sol …etc.) et des conditions du milieu **(Calvet *et al.,* 2005)**. La désorption est le processus inverse de l'adsorption dont l'équilibre entre ces deux processus est atteint lorsque leurs vitesses sont égales **(Calvet *et al.,* 2005)**.

I.5.1.2. Biosorption

La biosorption ou la rétention biologique est le résultat d'un ensemble d'interactions physico-chimiques (interactions hydrophobes…etc.) qui s'établissent entre la paroi des microorganismes du sol (ou les racines) et les polluants, ce phénomène est valable pour les pesticides dont la biosorption du pesticide organochloré, lindane, sur la paroi de ***Rhizopus oryzae*** confirme la validité de cette hypothèse **(Février *et al.,* 2007; Ghosh *et al.,* 2009)**.

I.5.2. Phénomène de transfert des pesticides

Le transfert des pesticides est défini comme le déplacement de ces composés de leur site d'application. Plusieurs processus sont impliqués dans ce phénomène tels que la lixiviation, le lessivage et le ruissellement, la volatilisation et l'érosion éolienne (**Navarro *et al.,* 2007)**.

Les processus impliqués dans le transfert des pesticides ainsi que les quantités transférées sont en fonction des caractéristiques physico-chimiques des pesticides (tension de vapeur, constante de Henry, solubilité dans l'eau…etc.) et des conditions climatiques (température, humidité du sol, mouvements de l'air, pluviosité ...etc.) **(Grébil *et al.,* 2001)**.

I.5.2.1. Lixiviation

C'est un processus qui permet, dans un milieu non saturé en eau, de transférer des pesticides solubles et en solution jusqu'aux nappes souterraines au cours de l'infiltration. Ce processus est influencé par les caractéristiques pédologiques et l'intensité des précipitations et il est en relation étroite avec le ruissellement car lorsque celui-ci est nul, le transport par l'infiltration est maximum, et l'inverse est juste **(Calvet *et al.,* 2005)**.

I .5.2.2. Lessivage

C'est la capacité d'une matière active non soluble de s'associer à la phase solide (sur des particules fines) et de s'infiltrer dans le sol via les systèmes de drainage. Ce processus permet

donc d'entrainer les pesticides non solubles dans le profil du sol et de contaminer les nappes phréatiques. Le lessivage est fortement influencé par la précipitation et la structure du sol **(Landry *et al*., 2006; Borggaard et Gimsing, 2008; Simunic *et al*., 2011)**.

I .5.2.3. Ruissellement

Le ruissellement est le mouvement de l'eau, contenant des matières dissoutes et suspendues ainsi que des matières adsorbées sur des sédiments, à la surface du sol. Il est responsable donc à la contamination des eaux superficielles. Le ruissellement des pesticides est influencé par plusieurs facteurs : la topographie, l'intensité des précipitations, la nature et la structure du sol, la nature du couvert végétal et l'intervalle du temps qui sépare l'application du pesticide de la première pluie **(Navarro *et al*., 2007; La Jeunesse *et al*., 2015)**.

I.5.2.4. Volatilisation

C'est un processus qui permet le transfert, par évaporation ou sublimation, des composés du sol, de l'eau ou des plantes vers l'atmosphère. Elle représente la voie de dissipation majeure des pesticides, où elle peut causer dans certains cas des perte allant jusqu'à 90 % de la dose appliquée **(Bedos *et al*., 2002; Navarro *et al*., 2007; Diop, 2013)**. Ce phénomène dépend des propriétés physico-chimiques des pesticides (constante de volatilisation ou constante d'Henry), des conditions environnementales (température, contenu du sol en eau, nature du sol…etc.) ainsi que des pratiques agricoles (incorporation ou non des pesticides dans les couches superficielles des sols**) (Bedos *et al*., 2002; La Jeunesse *et al*., 2015)** et il est remarqué chez les pesticides présentant une tension de vapeur élevée et une faible solubilité **(Diop, 2013)**.

I.5.2.5. Érosion éolienne

Les pesticides déposés dans un sol restent étroitement liés à quoi que ce soit par adsorption ou par simple mélange, donc le sol peut agir comme un transporteur de ces pesticides vers l'atmosphère via leurs fractions qui sont arrachées puis déplacées par le vent. Ce transfert, dépend de plusieurs facteurs : la pente du sol et sa structure et l'intensité du vent **(Navarro *et al*., 2007)**.

I.5.3. Phénomène de dégradation des pesticides

La dégradation joue un rôle important dans le devenir des pesticides dans l'environnement parce qu'elle assure la transformation de la molécule initiale d'une manière plus ou moins prononcée **(Grébil *et al*., 2001)**. Il existe une grande diversité des réactions chimiques, biologiques et/ou

photochimiques **(Gavrilescu, 2005; Navarro *et al*., 2007)** qui peuvent se produire et donc conduire à cette transformation qui peut être partielle ou complète **(Grébil *et al*., 2001)**.

I.5.3.1. Dégradation abiotique

Les transformations abiotiques des pesticides sont d'origine chimique et/ou photochimique **(Grébil *et al*., 2001)** et le plus souvent sont les résultats des réactions d'oxydation, de réduction, de photo-réaction et d'hydrolyse de ces composés chimiques **(Schrack *et al* ., 2009)**. Ces réactions ne nécessitent pas l'intervention des microorganismes **(Calvet *et al*., 2005; Cardeal *et al*., 2011)**, mais elles sont conditionnées par plusieurs paramètres tels que le pH, la température, l'humidité et la teneur des sols en matières organiques…etc **(Navarro *et al*., 2007)**.

I.5.3.1.1. Photo-décomposition

La photo-décomposition est un phénomène naturel permet la destruction de façon irréversible des liaisons chimiques entre les atomes des pesticides dans l'atmosphère, à la surface du sol, de l'eau et des végétaux. Ce processus est induit par l'exposition à des rayonnements ultraviolets ou visibles **(Keum *et al*., 2002)** et il est essentiellement due à des réactions d'hydrolyse et d'oxydation **(Keum *et al*., 2002; Calvet *et al*., 2005)**. Ces réactions se produisent soit directement par l'excitation du pesticide, soit par l'intermédiaire d'un autre composé susceptible lui aussi d'être excité facilement **(Navarro *et al*., 2007)**. La photo-décomposition est sous le contrôle d'un ensemble des paramètres qui sont : la présence des catalyseurs photochimiques, l'intensité et la durée d'exposition aux radiations, le pH et l'aération du sol, la structure chimique et l'état physique du pesticide et le degré d'adsorption des colloïdes **(Navarro *et al*., 2007)**.

I.5.3.1.2. Dégradation chimique

Les pesticides peuvent subissent dans les différents compartiments environnementaux (air, eaux et sols) une dégradation chimique qui peut conduire à la production des métabolites moins toxiques que la molécule du départ. Cette dégradation se produit par des réactions incluant l'hydrolyse, l'oxydoréduction et l'ionisation dont ces dernières sont fortement liées au pH **(Gavrilescu, 2005 ; Adamou *et al*., 2010)**.

I.5.3.1. Dégradation biotique des pesticides

La biodégradation des pesticides est un processus naturel **(Sing, 2008)** définie comme la réduction de la complexité et parfois aussi la toxicité de ces produits chimiques **(Ajaz *et al*., 2005; Joutey *et al*., 2013; Doolotkeldieva *et al*., 2018)**, elle s'effectue par un ou plusieurs microorganismes (bactéries, champignons), et se déroule à l'intérieur et/ou à l'extérieur de celui-ci **(Barriuso *et al*., 1996 ;Calvet *et al*., 2005; Singh, 2008; Doolotkeldieva *et al*.,2018)**. Ces

microorganismes peuvent être naturels ou modifiés génétiquement afin d'augmenter leur taux de dégradation et de réduire le temps nécessaire pour réaliser ce processus **(Singh, 2008)**.

Trois mécanismes sont considérés comme étant directement à l'origine de la dégradation microbienne des pesticides, ce sont : le métabolisme direct, le co-métabolisme et la conjugaison **(Schrack *et al.*, 2009)**. Ces mécanismes peuvent conduire à une dégradation partielle ou complète (minéralisation) de ces composés **(Ajaz *et al.*, 2005**).

I .5.3.1.1. Mécanismes de la biodégradation des pesticides

1. Métabolisme direct

Il s'agit d'une transformation microbienne des pesticides catalysée par des enzymes exocellulaires ou endocellulaire. Cette transformation vise à rendre les microorganismes capable d'utiliser ces polluants comme source de carbone et d'énergie dans l'assurance de leurs activités et la maintenance de leurs survies **(Calvet *et al.*, 2005)**.

2. Co-métabolisme

C'est un mécanisme de dégradation microbienne des pesticides au cours duquel un pesticide dégradé ne peut subvenir seul à la croissance cellulaire (il ne constitue pour le microorganisme ni une source de carbone ni d'énergie) **(Luo *et al*., 2008; Sharma *et al*., 2014; Doolotkeldieva *et al*., 2018)**, et sa dégradation est conditionnée par la présence obligatoire d'un second substrat nutritif appelé le co-substrat dont la nature chimique peut être variée (**Luo *et al*., 2008; Sharma *et al*., 2014; Syakti, 2018)**.

Cette conversion fortuite des pesticides est le résultat d'une faible spécificité des enzymes microbiennes **(Ortiz Hernandez *et al*., 2013)**.

3. Conjugaison et la condensation

La conjugaison des pesticides est un processus métabolique au cours duquel des enzymes microbiennes exocellulaire ou endocellulaire catalysent via des réactions chimiques (xylosylation, alkylation, acylation et la nitrosation) l'interaction des pesticides (ou l'un de leurs produits de transformation) entre eux ou avec les substances naturelles exogènes ou endogènes présentent dans la solution du sol, ce qui facilite donc leur détoxification, compartimentation, séquestration et / ou leur minéralisation. Lorsque la conjugaison réunit plus de deux molécules on l'appelle : la condensation **(Van Eerd *et al*., 2003; Calvet *et al*., 2005)**.

1.5.3.1.2. Facteurs influençant la biodégradation

Les microorganismes peuvent dégrader de nombreux polluants organiques en raison de leurs voies métaboliques qui sont très diversifiées.

Cependant, leur efficacité et taux de dégradation dépendent de nombreux facteurs, qui sont liés aux microorganismes lui même (facteurs biologiques), aux propriétés des pesticides ou associés à l'environnement (facteurs environnementaux) **(Huang *et al.*, 2018)**.

1. **Facteurs biologiques**

La biodégradation des pesticides nécessite la présence des microorganismes avec des activités métaboliques appropriées, des taux de prolifération et de dégradation élevés et qui sont capable de s'adapter directement aux différents contaminants et aux conditions du milieu **(Singh, 2008; Cao *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018**) telles que la température, le pH, l'humidité, la concentration des polluants…etc.

2. **Facteurs propres aux pesticides**

Les facteurs propres aux pesticides, tels que le poids moléculaire, la structure spatiale et la nature chimique de ces composés peuvent affecter la vitesse et l'efficacité de leur biodégradation. En général, le composé de grand poids moléculaire est moins biodégradable que le composé de faible poids moléculaire **(Huang *et al.*, 2018)**.

3. **Facteurs environnementaux**

En plus des facteurs physico-chimiques (température, humidité, salinité, pH, nutrition, dioxyde de carbone, oxygène, concentration du substrat et le surfactant…etc.) qui nuisent à la dégradation des pesticides par les microorganismes car ses enzymes ont besoin des conditions optimum pour pouvoir fonctionner **(Huang *et al.*, 2018)**, il existe d'autres facteurs dépendant du sol (type de sol et sa teneur en matière organique…etc.) qui peuvent affecter le potentiel d'adsorption et d'absorption des pesticides et donc réduire leur disponibilité pour la plupart des microorganismes et donc leur biodégradabilité **(Singh, 2008; Cardeal *et al.*, 2011)**.

I.6. Organophosphorés

Les organophosphorés sont des composés biogènes et xénobiotiques utilisés comme agents de guerre chimique (CWA) (**Zheng *et al.*, 2013; Rezaie., 2018)** ou comme insecticides, nématicides, acaricides ou herbicides en agriculture **(Derkaoui *et al.*, 2011)**. Ces composés représentent environ 38% de l'utilisation total des pesticides dans le monde **(Chishti *et al.*, 2013; Eissa *et al.*, 2014)**.

Ils sont caractérisés par la présence d'une liaison stable entre le carbone et le phosphore **(Figure 02) (McGrath *et al.*, 2013)**. Cette liaison souvent confère à ces molécules une résistance relative à la dégradation biotique et abiotique, ce qui les rends persistant dans l'environnement et donc causent des graves problèmes de pollution (**Ternan *et al.*, 1998 ; Zheng *et al.*, 2013)**.

Les pesticides organophosphorés (POP) sont des pesticides organiques de synthèse agissant comme des inhibiteurs de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) **(Derkaoui *et al.*, 2011; Erguvena *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2019)**, sauf le glyphosate qui est dépourvu de cette activité **(Bonnard *et al.*, 2018)**. La plupart de ces composés sont dégradés par les microorganismes présents dans l'environnement en tant que source de phosphore et / ou de carbone **(Porto *et al.*, 2011)**.

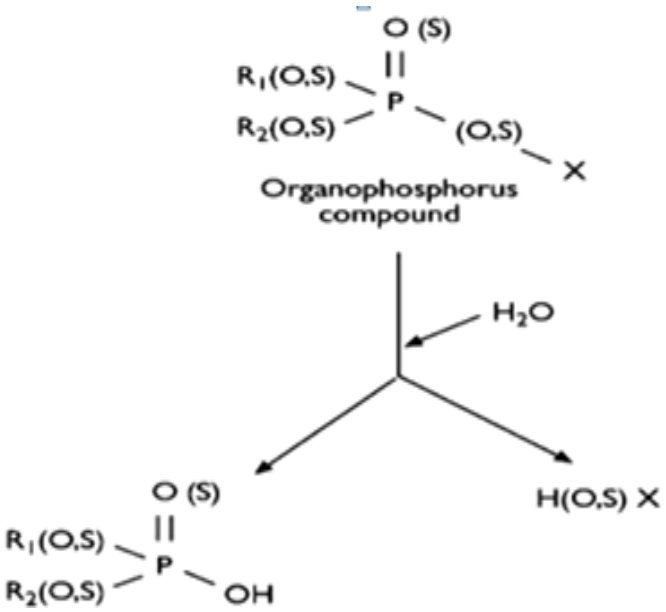


Figure 02: Formule générale des composés organophosphorés et les voies major de leur dégradation **(Singh et Walker, 2006)**.

I.6.1.Chlorpyrifos

Le chlorpyrifos ou O,O-diéthyl-O- (3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate est un composé organophosphoré (**Figure 03)** utilisé comme insecticide, acaricide et nématicide **(Singh *et al.*, 2003; CCME, 2008; Chishti *et al.*, 2013)**, et qui représente l'un des insecticides commerciaux les plus largement utilisés dans le monde depuis 1965 (**CCME, 2008)**. Ce pesticide est efficace par contact, ingestion et action des vapeurs mais n'est pas actif de manière systémique **(Chishti *et al.*, 2013)**, agissant comme inhibiteur de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), ce qui induit

une accumulation d'acétylcholine (ACh) au niveau des récepteurs de la choline chez les ravageurs **(Richards et Kendall, 2002; Li *et al.*, 2019)**.

Le produit majoritaire de la biodégradation de chlorpyrifos est le 3, 5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP). Ce dernier est un composé toxique et soluble dans l'eau **(Singh *et al.*, 2003; Maya *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2019)**.

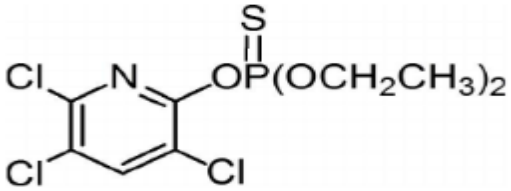


Figure 03 : Formulation générale de chlorpyrifos **(Eissa *et al.*, 2014)**.

I.6.1.1. Propriétés physico-chimiques et éco-toxicologiques de chlorpyrifos

- Soluble dans la plupart des solvants organiques (méthanol : 450 g l^{-1} à 25°C ; acétone > 400 g l^{-1} à 20°C) **(Chishti *et al.*, 2013)** ;
- Faible solubilité dans l'eau (1,4 à 2 mg l^{-1} à 25°C) avec un haut coefficient d'adsorption au sol (log Koc =3,78) **(Chishti *et al.*, 2013)** ; Il s'adsorbe donc à la plupart des sols et peu mobile ;
- Haut coefficient de partage octanol-eau (log Kow = 3,31 à 5,27) indique une affinité du chlorpyrifos pour les lipides et une possibilité de bioaccumulation chez les organismes aquatiques **(CCME, 2008)** ;
- Le point de fusion du chlorpyrifos est compris entre 42°C à 43,5°C **(Chishti *et al.*, 2013)** ;
- Peu volatile à partir des sols secs, mais très volatile à partir du sol humide et de la surface de l'eau, avec une pression de vapeur est égale à 3,33 x 10^{-6} kPa **(CCME, 2008)**, et une constante de la loi d'Henry est égale à 2,9x10^{-6} atm m^{-3} $mole^{-1}$ à 25°C **(Chishti *et al.*, 2013)** ;
- Les demi-vies du chlorpyrifos sont comprises entre 10 à120 jours. Cette variation de demi-vie dépend des conditions environnementales **(Singh et Walker, 2006; Chishti *et al.*, 2013)**;
- Agent modérément toxique pour les organismes aquatiques et les mammifères (DL_{50} :135 à 163 mg kg^{-1}) **(Singh et Walker, 2006)**.

I.6.1.2. Microorganismes dégradant le chlorpyrifos

Il existe plusieurs microorganismes qui peuvent décomposer le chlorpyrifos, la différence entre eux réside dans le type de mécanisme par lequel ces microorganismes décomposent ce pesticide.

Le **tableau 03** représente certains microorganismes isolés des sites contaminés capables de dégrader le chlorpyrifos.

Tableau 03 : Microorganismes isolés de sites contaminés dégradant le chlorpyrifos **(Singh et Walker, 2006)**.

Compound	Microorganisms	Mode of dégradation
Chlorpyrifos	Bacteria	
	Enterobacter sp	Catabolic (C, P)
	Flavobacterium sp.ATCC27551	Co-metabolic
	Pseudomonas diminuta	Co-metabolic
	Micrococcus sp.	Co-metabolic
	Fungi	
	Phanerochaete chrysosporium	Catabolic (C)
	Hypholama fascicularae	ND
	Coriolus versicolor	ND
	Aspergillus sp.	Catabolic (P)
	Trichoderma harzianum	Catabolic (P)
	Pencillium brevicompactum	Catabolic (P)

I.6.1.3. Voies proposées pour la biodégradation du chlorpyrifos

La biodégradation du chlorpyrifos s'effectue par une diversité des microorganismes (bactéries, champignons) et elle suit plusieurs voies différentes **(Singh et Walker, 2006**) comme le montre la **figure 04**.

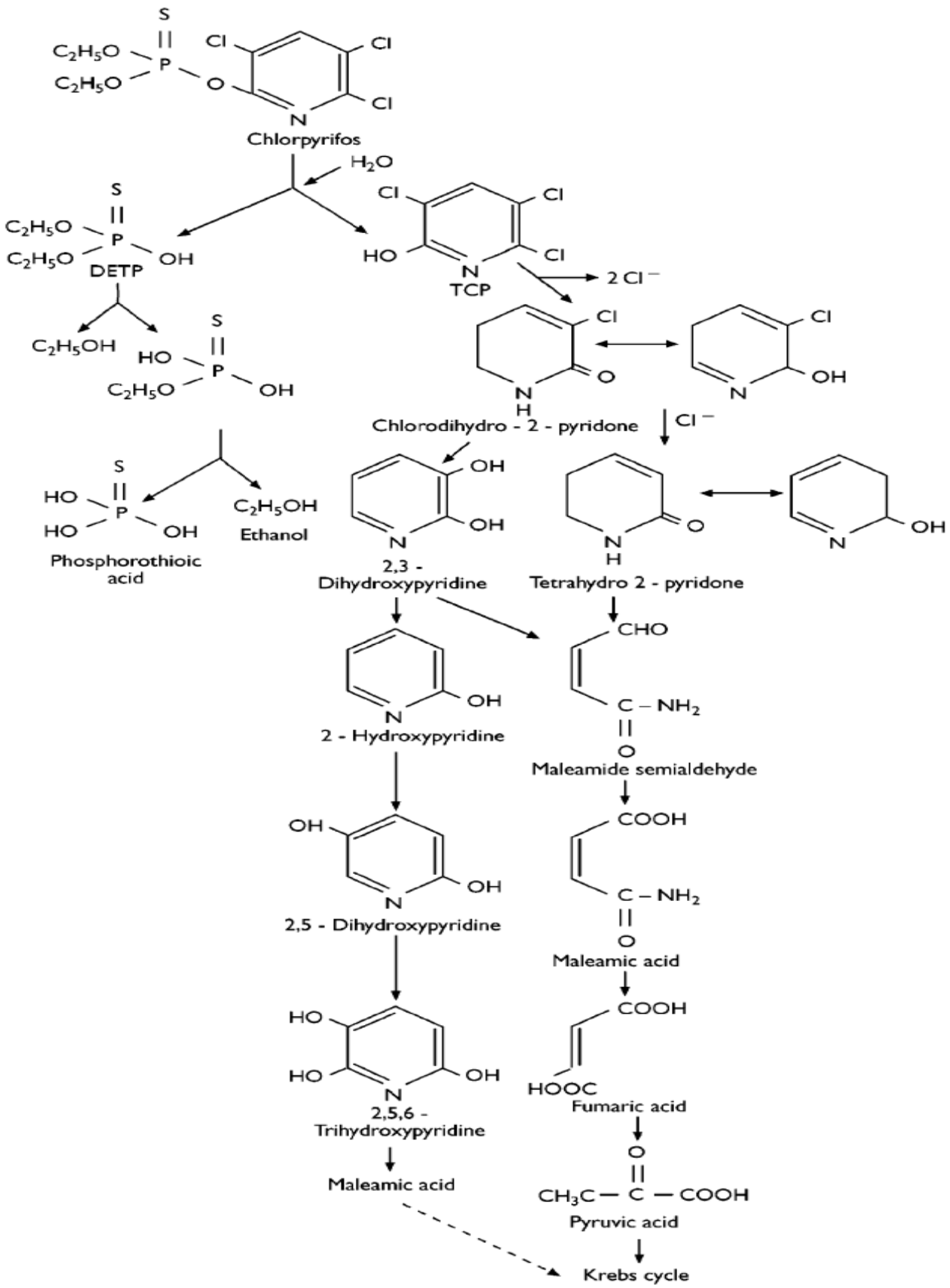


Figure 04: Voies proposées pour la biodégradation du chlorpyrifos **(Singh et Walker, 2006)**.

I.7. Flint

Flint est un nouveau fongicide à base de trifloxystrobine fait parti de la famille chimique des strobilurines. Il est actif de manière systémique contre un large spectre de phytopathogènes fongiques et agit principalement sur la germination des spores par inhibition de leur respiration cellulaire.

Ce fongicide est facilement biodégradé avec une demi-vie de moins de 2 jours dans les conditions aérobies dont le principal métabolite de leur dégradation est l'acide trifloxystrobine, qui est très persistant dans l'environnement avec une demi-vie compris entre 100 à 493 jours **(Cahill, 2000 ; Reuveni, 2001)**.

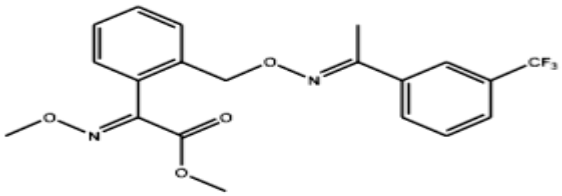


Figure 05 : Formulation générale du trifloxystrobine (**Cahill, 2000)**.

I.7.1. Propriétés physico-chimiques et éco-toxicologiques du trifloxystrobine le principe actif du flint (Cahill, 2000)

- Faible solubilité dans l'eau (610 µg/l à 25°C) ;
- Soluble dans la plupart des solvants organiques (acétone >500 g l^{-1}, dichloromethane >500 g l^{-1}, hexane 11 g l^{-1}à 20°C) ;
- Le trifloxystrobine a une pression de vapeur est égale à 3.4 x 10^{-6} Pa à 25°C ;
- Le coefficient de partage octanol-eau (log Kow) du trifloxystrobine est égale à 4,5 à 25°C ;
- Le point de fusion du trifloxystrobine est égal à 72.9°C ;
- Extrêmement toxique chez les poissons et les invertébrés aquatiques d'eau douce avec une CL_{50} est égale à 0,012 mg l^{-1} ,mais non toxique chez les oiseaux et les abeilles (DL_{50} supérieure à 200 µg/abeille).

I.7.2. Microorganismes dégradant le fongicide flint

Plusieurs microorganismes sont connus par leurs capacités de dégrader le fongicide flint (**Tableau 04)**, la différence entre eux réside dans le type de mécanisme par lequel ces microorganismes décomposent ce pesticide.

Tableau 04 : Microorganismes isolés des sites contaminés dégradant le fongicide flint **(Clinton *et al*.,2011; Howell *et al*., 2014)**.

compound	Microorganismes
Flint	*Stenotrophomonas maltophilia* *Bacillus flexus* *Bacillus amyloliquefaciens* *Arthrobacter oxydans* *Rhodanobacter sp.* *Cupriavidus sp.*

I.7.3. Voies de la biodégradation du trifloxystrobine

Flint peut subir dans le sol une dégradation microbienne, cette dégradation peut être prend lieu en anaérobiose ou en aérobiose **(Howell *et al*., 2014)** comme le montre **la figure 06**.

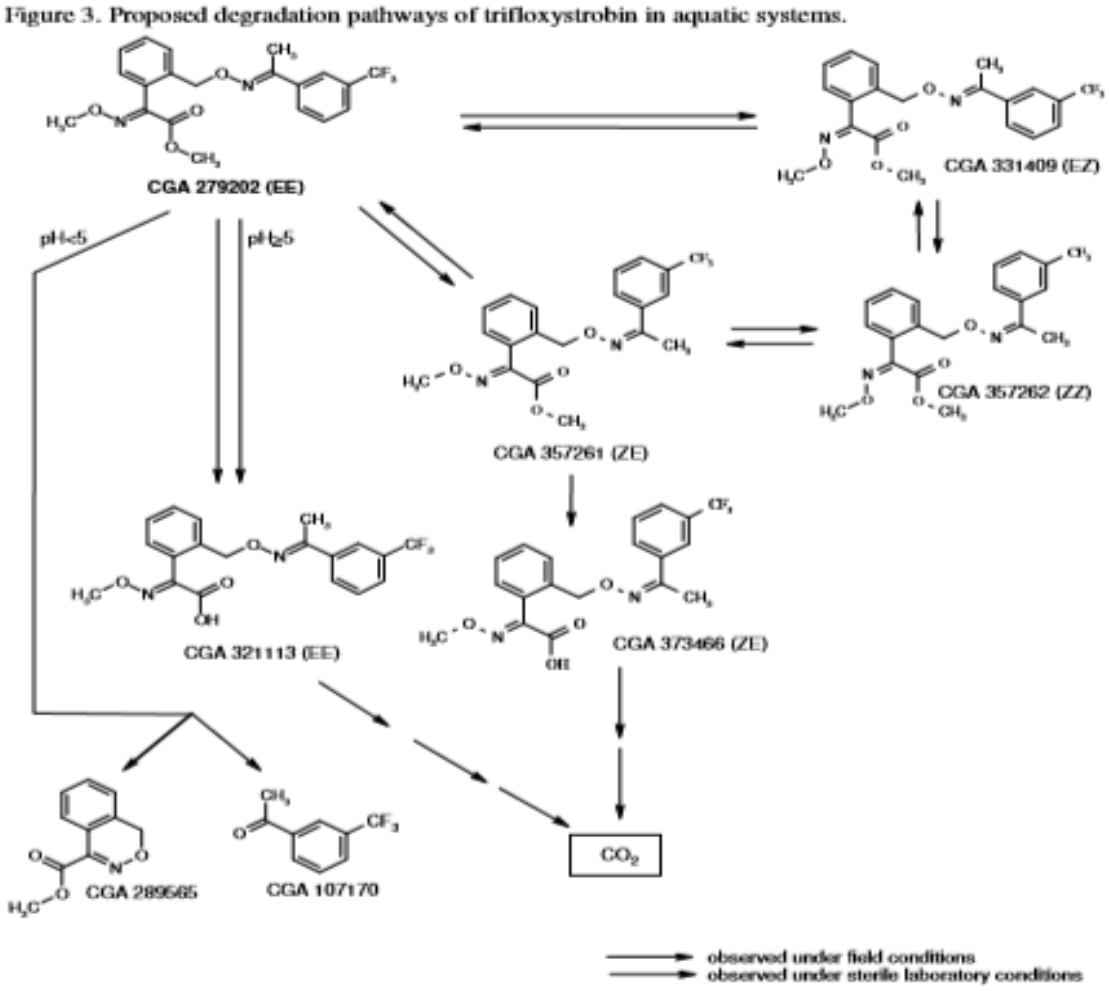


Figure 06 : Voies de dégradation abiotique et biotique de la trifloxystrobine dans les systèmes aquatiques **(Banerjee *et al*., 2006)**.

II. Enzymes microbiennes impliquées dans la biodégradation des pesticides

La biodégradation des pesticides fait intervenir une grande diversité de microorganismes ce qui signifie l'implication d'une large gamme d'activités enzymatiques (**Singh et Walker, 2006)**. Les principales enzymes microbiennes impliquées dans la biodégradation des pesticides sont présentées dans le **tableau 05**.

Tableau 05 : Principales enzymes microbiennes impliquées dans la biodégradation des pesticides **(Singh et Walker, 2006 ; Jiang *et al*., 2018)**.

Enzyme	Origin
Bacterial	
OPH	*Pseudomonas diminuta*
OPAA	*Alteromonas spp*
OPDA	*A.radiobacter*
ADPase	*Nocardia sp.*
AMPP	*Escherichia coli*
HOCA	*Pseudomonas monteilli*
NS-OPH	*Nocardiodes simplex*
PEH	*Burkholderia caryophilli*
C–P lyase	*Pseudomonas spp.*
Phosphonatase	*Bacillus cereus*
Carbofuran hydrolase	*Ralstonia spp.*
	Rhodococcus sp.
Pyretroide hydrolase	*Serratia sp.*
Carboxylesterase	*Methylobacterium sp strain A-1*
Estérase	*Hansschlegelia zhihuaiae S113*
Fungal	
A-OPH	*Aspergillus niger*
P-OPH	*Penicillium lilacinum*
Laccase	*Pleurotus ostreatus*

ADPase : Aryldialkylphosphatase de *Nocardia sp* , **AMPP** : Aminopeptidase P, **A-OPH** : Organophosphate hydrolase d' *Aspergillus niger*, **HOCA** : Phosphotriestérase de *Pseudomonas monteilii* , **MPH** : Méthyl-parathion hydrolase, **NC-OPH** : Organophosphate hydrolase de *Nocardiodes simplex* , **OPAA** : Organophosphorus acid anhydrolase d'*Alteromonas sp* , **OPDA** : Organophosphosphate *hydrolase* d'*Agrobacterium radiobacter*, **OPH** : Organophosphosphate hydrolase, **PEH:** Phosphonate ester hydrolase de *Burkholderia caryophilli*, **POP** : Pesticides organophosphorés, **P-OPH** : Organophosphate hydrolase de *Penecillium lilacinum* , **SC-OPH** *:* Organophosphate hydrolase de *SC* strain.

III. Microorganismes génétiquement modifiés et la biodégradation des pesticides

La réussite de la technologie de l'ADN recombinant dans la construction de nouvelles souches microbiennes dotées de nouvelles caractéristiques a permis d'améliorer l'efficacité de la dégradation microbienne des pesticides et de résoudre le problème de la persistance de certains d'entre eux dans l'environnement **(Singh, 2008)**. Le **tableau 06** représente certains microorganismes recombinants utilisés dans la biodégradation des pesticides.

Tableau 06 : MGM utilisés dans la biodégradation des pesticides.

MGM	Pesticides dégradés	Le gène introduit	Références
***Sphingomonas* CDS-1 sp**	**Méthyle parathion et le carbofuran ;**	**Gène (*mpd*) codant pour l'MPH cloné avec le régulateur de la dégradation du méthyl-parathion (MP), de la souche *Pseudomonas putida* DLL-1**	**(Liu *et al.*, 2006).**
***E. coli* DH5α**	**Chlorpyrifos**	**Gène (*mpd*) de la souche *Stenotrophomonas* YC-1 ;**	**(Yang *et al.*, 2006).**
***Pseudomonas putida* KT2440**	**Chlorpyrifos et carbofuran**	**Le gène (*mpd*), (*mcd*), et (*gfp*) ;**	**(Gong *et al.*, 2016).**
***Stenotrophomonas* YC-1**	**Une grande diversité des pesticides Organophosphorés (paraoxon, parathion, méthyle parathion, fenitrothion, diazinon, chlorpyrifos…etc.) ;**	**Deux gènes un codant pour un système d'ancrage de surface dérivé de la protéine de nucléation de la glace tronquée (INPNC) de *Pseudomonas syringae* et l'autre codant pour l'organophosphate hydrolase (OPH) ;**	**(Yang *et al.*, 2010).**
***Sphingomonas paucimobilis* UT26**	**La dégradation simultanée de méthyle-parathion et de γ-HCH**	**Introduction d'un gène codant pour le parathion hydrolase dans la souche *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (dégrade initialement le y-hexachlorocyclohexane (γ-HCH),**	**(Lan *et al.*, 2014).**
***Sphingobium japonicum* UT26**	**La dégradation simultanée des pesticides organophosphorés et organochlorés**	**Introduction des gènes codant pour l'INPNC et l'OPH dans la souche *Sphingobium japonicum* UT26 (dégrade initialement le γ-HCH),**	**(Cao et al., 2013).**
***Pseudomonas putida* JS444**	**La dégradation Simultanée des pesticides organophosphorés (paraoxon, parathion, méthyle parathion) et le p-nitrophenol**	**Un vecteur navette, pPNCO33, codant pour l'INPNC-OPH**	**(Lei *et al.*, 2005).**
***Moraxella* sp**	**La dégradation Simultanée des pesticides organophosphorés et de p-nitrophenol**	**Un vecteur navette, pPNCO33, codant pour l'INPNC-OPH**	**(Shimazu *et al.*, 2001).**
***Yarrowia lipolytica* Polg**	**Pesticides organophosphorés (méthyle parathion)**	**Gène codant pour l'organophosphate hydrolase OPHC2**	**(Li *et al* ., 2015).**
***Saccharomyces cerevisiae* BY4741**	**Herbicide sulfonylurée**	**Gene (sulE) de la souche *Hansschlegelia zhihuaiae* S113 codant pour l'estérase**	**Hang *et al* ., 2012)**

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels

II.1. 1. Matériel biologique

Les neuf souches bactériennes (SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7, SB8 et SB9) utilisées dans cette étude ont été fournis par le laboratoire de recherche en Toxicologie Moléculaire– Université de Jijel. Elles ont été précédemment isolées à partir des terres agricoles exposées en continue à l'application des pesticides ; et elles ont été conservées par congélation en présence de **30%** du glycérol.

II.1. 2. Pesticides

Les pesticides utilisés dans cette étude sont : le chlorpyrifos sous leur forme commerciale le dursban (480 g/l de chlorpyrifos/ethyl) et le fongicide flint (50% trifloxystrobine), qui ont été fournis par le laboratoire de recherche en Toxicologie Moléculaire – Université de Jijel. Ils ont été achetés auprès d'un fournisseur (Bayar cropscience Allemagne) des produits phytosanitaire.

II.1.3. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés au cours de cette étude sont :

- La gélose nutritive qu'a été utilisée pour la revivification et la purification (le repiquage) des souches.
- Le bouillon nutritif qu'a été utilisé pour la préparation de l'inoculum bactérien et la caractérisation des souches.
- Le milieu minimum minéral (MMM) additionné du pesticide qu'a été utilisé pour l'étude de la tolérance et de la dégradation des pesticides par les souches bactériennes à tester. La composition d'un litre de ce milieu est comme suit : 1000 ml d'eau distillée, $FeSO_4.7H_2O$ (0.013 g), $CaCl_2$, $2H_2O$ (0.013 g), $MgSO_4.7H_2O$ (0.25 g) , KH_2PO_4 (7,5 g), NH_4NO_3 (5 g), Na_2HPO_4 (5g),extrait de levure (1g), agar agar 16 g. Après l'ajustement du pH à 7,0 ± 0.2, le milieu de culture a été autoclavé 20 minutes à 120°C **(Aissaoui *et al.*, 2017)**.

II.1.4. Produits chimiques et réactifs

- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour la recherche de la catalase.
- Hydroxyde du potassium pour piéger l'anhydride carbonique formé lors de la mesure de la DBO_5.
- Safranine, Alcool-acétone, violet de gentiane et lugol, pour la coloration de Gram.
- Réactifs de Voges-Proskauer : VP1 et VP2, réactif TDA et réactif de Kovacs pour la lecture de la galerie API 20E.

II.1.5. Appareillages

Les appareillages utilisés tout au long de ce travail sont :

Autoclave (pbi brand), Plaque chauffant (Stuart), Etuve (Memmert), Spectrophotomètre optique (JASCOV-630 Spectrophotomètre), Bain marie (Gerhardt Bonn), Incubateur agitateur (Infors HT Ecotron), Centrifugeuse (Hettich EBA 20), Balance (KERN EMB 600-2), Balance analytique (KERN ALS 220-4N), Agitateur magnétique chauffant (Heidolph MR 3002), Vortex (VWR VV3), Microscope optique(OLYMPUS), DBO mètre (WTW OXITOPIS6).

II.2.Méthodes

II.2.1.Préparation des milieux de culture et les solutions

Les milieux de culture et les solutions utilisés dans cette étude ont été préparés au sein du laboratoire selon la composition qu'a été mentionnée dans la partie Annexes. L'autoclavage des milieux et des solutions a été réalisé à 120°C pendant 20 minutes.

II.2.2.Revivification et purification des souches bactériennes

Les aliquotes des souches bactériennes à tester ont été ensemencés sur la gélose nutritive, et incubés à 37°C pendant 24 h. Pour s'assurer de leur vivacité et de leur pureté, toutes les colonies qui sont proches par leur aspect macroscopique sont repiquées par la méthode des stries serrées à la surface de la gélose nutritive jusqu'à l'obtention des souches pures, qui ont été soumises aussi à une série d'observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram pour les identifier.

II.2.3.Conservation des souches bactériennes

A partir des cultures jeunes (incubation pour 18h à 24h) sur gélose nutritive, les souches bactériennes à tester ont été repiquées sur gélose inclinée à l'aide d'une lance de platine stérile, puis ont été incubées à 37°C pendant 24h. Après l'incubation les cultures bactériennes ont été maintenues à 4°C.

II.2.4. Préparation de l'inoculum bactérien

Des précultures ont été effectuées en bouillon nutritif à partir de chaque souche bactérienne testée. Après l'incubation à 37°C pendant 18h, ces précultures ont été centrifugées (60000 rpm/15min) dont les culots obtenus ont été ensuite remis en suspension dans 2ml d'eau physiologique pour une deuxième centrifugation (60000rpm/5min). Après la deuxième centrifugation, les surnageants obtenus sont été éliminés tandis que les culots résultant ont été

dissous dans environ de 1ml (plus ou moins) d'eau physiologique pour l'utiliser dans l'inoculation des milieux de culture (**El-Helow *et al*., 2013)**.

II.2.5. Identification des isolats

II.2.5.1. Par l'étude des caractères culturaux des souches à tester

L'identification des souches bactériennes a été réalisée sur la base de leurs caractères culturaux (l'aspect macro et microscopique). Pour l'identification, les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été ensemencées par stries sur la gélose nutritive, ensuite ont été incubées à 37°C pendant 24h. Après l'incubation l'aspect microscopique et macroscopique des colonies sont étudiés :

- **Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies à l'oïl nu (la taille, la forme, la couleur et l'aspect) pour effectuer une première caractérisation des souches bactériennes à tester.

- **Aspect microscopique**

L'observation de l'aspect microscopique des souches à tester a l'état frais et après coloration de Gram pour observer la morphologie, la mobilité des souches et aussi pour distinguer entre les souches à Gram+ et à Gram-.

II.2.5.2.Par l'utilisation de la galerie API 20E

La galerie API 20E est un système standardisé comportent 25 microtubes contenant des milieux de culture déshydratés. Elle permet l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif non fastidieux en recherchant les caractères biochimiques de ces souches.

Les tests conventionnels ont été inoculés à l'aide d'une seringue stérile par une suspension bactérienne préparée en dissolvant une colonie bactérienne dans de l'eau physiologique stérile qui reconstitue les milieux. Après l'inoculation, la galerie API 20E a été incubée à 37°C pendant 24h à 72h. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduits par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs dont chaque profil produit a été décodé en utilisant le kit d'identification BioMériux SA (France) **(Bodering *et al*., 2017)**.

Les tests conventionnels du système API 20 E (kit d'identification BioMériux SA (France))

- **Test d'ONPG** : Ce test permet de mettre en évidence la production de la béta-galactosidase par les souches utilisées dont la présence de cette enzyme est révélée par la variation de la couleur du milieu de culture vers le jaune (orthonitrophénol).

- **Test de LDC, ODC, ADH :** Ces tests permettent de mettre en évidence la production de trois enzymes bactériennes (lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase et l'arginine dihydrolase, respectivement).Les réactions positives sont révélées par une variation de la couleur du milieu vers le rouge ou l'orange.

- **Test de citrate :** Ce test permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie par les souches testées. Les réactions positives sont révélées par une alcalinisation du milieu suivi par une variation de sa couleur vers le bleu.

- **Test de H_2S :** Ce test permet de mettre en évidence la production de sulfure par les souches testées. Ce test permet de déterminer si le microorganisme est capable de réduire les composés soufrés en sulfures au cours du processus de métabolisme ou non. Les résultats positifs sont révélés par l'apparition d'un précipité noire de sulfure de fer.

- **Test d'uréase :** Ce test permet de mettre en évidence la production d'une enzyme microbienne l'uréase, la production de cette enzyme permet de faire la différentiation des espèces appartenant aux familles suivantes: *Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae*… etc. La variation de la couleur du milieu vers le rouge ou le rose indique que le microorganisme est uréase+.

- **Test TDA:** Ce test permet de fournir un ensemble de résultats utiles pour l'identification de nombreux germes bactériens, notamment les *Enterobacteriacea* où il permet de mettre en évidence la production d'une enzyme bactérienne le tryptophane désaminase. Les résultats positifs sont révélés par l'apparition d'un précipité marron foncé en présence d'acide indole pyruvique.

- **Test Indole :** Le test d'indole est un test biochimique réalisé afin de déterminer la capacité du microorganisme à convertir le tryptophane en indole par l'enzyme

tryptophanase. L'apparition d'un anneau rose après l'addition du réactif de Kovacs indique que le microorganisme est indole+.

- **Test VP** (Voges-Proskauer) **:** Ce test permet de mettre en évidence par une réaction colorée, la production d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol) et de butanediol à partir du glucose par le microorganisme dont la variation de la couleur du milieu vers le rouge après l'addition des réactifs VP1et VP2 indique que ce microorganisme est VP+.

- **Test de gélatinase:** Ce test permet de mettre en évidence la production d'une enzyme microbienne le gélatinase, dont la présence de cette enzyme est révélée par l'apparition d'un noircissement du milieu de culture.

- **Test de fermentation des sucres :** la fermentation des sucres par le microorganisme est révélée par une acidification du milieu suivi par une variation de sa couleur vers le jaune.

II.2.5.3. Par la recherche des cytochromes respiratoires (catalase)

La recherche de la catalase a été réalisée à partir des colonies obtenues sur gélose nutritive après l'étape de la purification des souches bactériennes.

II.2.6. Sélection des souches résistantes aux pesticides (chlorpyrifos et flint)

Ce screening qualitatif consiste à évaluer la capacité de neuf souches bactériennes à croitre sur le milieu MMM additionné par l'un des deux pesticides (chlorpyrifos ou flint) à une concentration de 50 mg/l. Ces pesticides constituent les seules sources de carbone et d'énergie présentent dans ce milieu.

Ces pesticides sous la forme commerciale liquide (ou après leur dissolution dans de l'eau distillée cas du flint) ont été stérilisés par filtration sur membrane millipore (0,22 µm) avant d'être mélangés avec le milieu de culture.

II.2.6.1.Sur milieu solide

La gélose MMM additionnée par les pesticides (50mg/l) a été coulée dans des boites de Pétri puis ensemencée à la surface par des stries serrées. Après l'incubation à 37°C pendant 24h, le résultat a été évalué par une croissance positive ou négative dont les souches présentant une bonne croissance ont été sélectionnées.

II.2.6.2. Sur milieu liquide

Le bouillon MMM a été utilisé pour sélectionner les souches bactériennes qui ont la capacité de croitre en présence des pesticides (50mg/l) comme seule source de carbone et d'énergie. La croissance de ces souches bactériennes a été déterminée en mesurant la densité optique à 660 nm chaque 24h jusqu'à 96h d'incubation à 37°C, sous agitation (150rpm), dont les souches présentant une bonne croissance ont été sélectionnées.

II.2.7. Effet de différentes concentrations des pesticides sur la croissance bactériennes

Ce test vise à sélectionner les souches bactériennes qui ont la capacité de croitre dans le milieu MMM en présence des différentes concentrations (50mg/l, 100mg/l, 200mg/l, 400mg/l et 800mg/l) de chaque pesticide et aussi de déterminer la concentration de chaque pesticide auquel la croissance des souches bactériennes a été optimale. La croissance des souches bactériennes (SB1, SB4 et SB8) a été déterminée en mesurant la densité optique à 660 nm chaque 24h jusqu'à 72h d'incubation à 37°C, sous agitation (150rpm) (**Anwar *et al*., 2009)** (avec quelques modifications). La souche qui donne une meilleure croissance en présence des deux pesticides sera sélectionnée.

II.2.8. Caractérisation de la souche sélectionnée

La souche SB8 qui a donné une meilleure croissance en présence des deux pesticides a été sélectionnée pour le reste du travail. Dans le but de caractériser cette souche l'effet de quelques paramètres physicochimiques sur sa croissance a été étudié **(Malviya *et al*., 2015)**.

II.2.8.1. Effet du pH sur la croissance de la souche sélectionnée (SB8)

Pour tester l'effet du pH sur la croissance de la souche sélectionnée, des suspensions bactériennes à différents pH (pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8) ont été aseptiquement préparées dans le BN à partir des cultures jeunes (10% d'inoculum v/v).

II.2.8.2. Effet de la concentration de NaCl sur la croissance de la souche sélectionnée(SB8)

Afin d'évaluer l'effet de la concentration de NaCl sur la croissance de la souche SB8, des BN ont été préparés avec les concentrations salines suivantes (0,5% ,1%,2%,3% et 4%) puis ont été inoculés avec 10% d'inoculum (v/v).

II.2.8. 3. Effet de la température sur la croissance de la souche sélectionnée (SB8)

La souche SB8 a été inoculée dans le BN puis incubée à différentes températures (28°C, 37°C et 44°C), pour tester l'effet de ce paramètre sur sa croissance.

- Pour les trois tests la croissance de la souche bactérienne a été déterminée en mesurant la densité optique à 660 nm après 24 h d'incubation à 37°C dans l'incubateur agitateur (150rpm). Les trois tests ont été réalisés en double.

II.2.9.Calcul du taux de croissance (µ)

Après la mesure des valeurs de l'absorbance de chaque expérience le taux de croissance de chaque souche testée a été calculé selon l'équation suivant :

Taux de croissance (µ) = $1/DO_0 \times (DO_t - DO_0)/ T_t - T_0$

DO_t : densité optique dans une valeur du temps.

DO_0 : densité optique du temps initial.

T_t : le temps après l'incubation.

T_0 : le temps initial.

II.2.10. Evaluation de la biodégradabilité par la mesure de la DBO_5

Afin d'évaluer la capacité de la souche SB8 de dégrader les pesticides utilisés, un volume de 100 ml du milieu MMM a été préparé avec les concentrations des pesticides auxquels la souche SB8 présentée une bonne croissance (la concentration du 200mg/l pour le chlorpyrifos et 50 mg/l pour le flint). Les milieux ensemencés avec 10% d'inoculum (v/v) de cette souche ont été placés dans des flacons ambrés en verre hermétiquement fermées, ces dernières ont été maintenus dans une enceinte thermostatée et ont été ensuite mis à incuber à la température ambiante, pendant 5 jours sous agitation constante. Les valeurs de la DBO et la quantité d'oxygène présent ont été mesurées au début et à la fin de la période d'incubation.

Figure 07 : DBO mètre.

- Pour les valeurs de la DBO qui dépassent la gamme de mesure (>50 mg d'O_2/l) une dilution de l'ordre de 1/10eme des milieux de culture a été réalisée. Après la dilution, les milieux de cultures ont été reincubés pendant cinq jours avec la mesure des valeurs de la DBO et la quantité d'oxygène présent au cours de la période d'incubation.

II.2.11. Criblage des facteurs affectant la croissance par la matrice de Plackett-Burman

Pour évaluer l'effet de quelques paramètres physicochimiques (agitation, concentration du pesticides, pH, volume de l'inoculum, concentration de l'extrait de levure , la quantité du Na_2HPO_4 et la période d'incubation) sur la dégradation de chlorpyrifos et la croissance de la souche SB8, nous avons utilisés le plan de criblage de Plackettet-Burman, ce dernier est un plan factoriel fractionné permet de repérer rapidement, dans un grand nombre (k) de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur la biodégradation de ce pesticide ou la croissance de la souche. Le nombre de facteurs doit être inférieur au nombre d'essais.

Le plan de Plackett-Burman utilise deux niveaux pour chaque facteur (**Tableau 07)**, le niveau le plus élevé noté par '+1' et le niveau bas noté par '-1' et entre ces deux niveau le niveau moyen '0', l'effet des variables sur la croissance sera par la suite calculé **(Fadil *et al*., 2014)**.

Puisque nous avons au cours de ce test 7 facteurs, le plan d'expérience est une matrice de 8 expériences. Le **tableau 08** contient des données qui représentent l'ensemble des expériences qui ont été réalisées. Chaque ligne d'un plan d'expérimentation représente les conditions expérimentales d'une expérience.

Tableau 07: Différents niveaux de chaque facteur étudié.

Facteurs / **Niveau**	**(-1)**	**(+1)**
pH	**5**	**7**
Agitation (150 rpm)	**Sans**	**Avec**
[pesticide] (mg/l)	**150**	**250**
Inoculum (% v/v)	**8**	**12**
Na_2HPO_4(g)	**5**	**7**
Incubation (h)	**48**	**72**
Extrait de levure (g)	**0,5**	**1**

-1 : Niveau bas ; +1 : Niveau élevé

Les huit expériences ont été réalisées dans des flacons de 200ml, contenant 42ml du milieu MMM. Le milieu MMM a été préparé, autoclavé, inoculé et par la suit incubé, selon les différentes conditions de chaque expérience. L'incubation a été réalisée à 37°C.

Tableau 08 : Conditions expérimentales utilisées pour l'estimation de l'influence de sept facteurs sur la biodégradabilité de chlorpyrifos par la souche SB8 en appliquant un modèle pilote de Plackett-Burman.

Facteurs / Expérience	pH	Agitation	[pesticide]	Inoculum	Extrait de levure	Na_2HPO_4	Période d'incubation
1	-	+	+	-	+	+	-
2	-	-	+	+	-	+	+
3	+	-	-	+	+	-	+
4	+	+	-	-	+	+	-
5	-	+	+	-	-	+	+
6	+	-	+	+	-	-	+
7	+	+	-	+	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Identification des isolats

Après coloration de Gram et observation microscopique des souches testées il s'est avéré que les souches (SB1), (SB2), (SB3), (SB4), (SB5) et (SB7) sont des bacilles à Gram positif, tandis que les souches (SB6), (SB8) et (SB9) sont des bacilles à Gram négatif sauf la dernière souche qui est une coccus (**Tableau 09)**.

Les souches SB8 et SB6 appartiennent aux espèces *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement, tandis que les trois souches SB3, SB4 et SB5 appartiennent au genre *Bacillus*. Cette identification a été réalisée en utilisant le logiciel APIDENT (un logiciel qui permet l'identification des bactéries à Gram négatif) ainsi que l'étude des caractères culturaux, la réalisation d'une série de tests biochimiques et la recherche de la production des spores (pour toutes les souches) **(Tableau 09)**. Concernant les autres souches nous n'avons pas pu les identifier à cause du manque de moyens. D'autres teste sont nécessaires pour compléter l'identification de ces souches.

III.2. Sélection des souches résistantes aux pesticides sur milieu solide

Après 72 heures d'incubation à 37°C, il s'est avéré que toutes les bactéries testées ont la capacité de croitre sur la gélose minimale MMM en présence des deux pesticides (chlorpyrifos ou flint) à une concentration de 50 mg/l, leurs croissances maximales apparaissait après 48 heures d'incubation.

Parmi les neuf souches testées, les deux souches (SB7 et SB8) sont les seules souches qui poussent mieux en présence du chlorpyrifos avec une croissance modérée, tandis qu'en présence du flint la plupart des souches testées (SB3, SB5, SB6, SB7 et SB8) avaient donné une bonne croissance ce qui signifie que la résistance des souches testées au flint était plus importante par rapport à leur résistance au chlorpyrifos. Le **tableau 10** résume ces résultats.

Tableau 09 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches bactériennes testées.

Souches / Caractères	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7	SB8	SB9
Morphologie	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Coccus
Gram	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Spore	-	-	+	+	+	-	-	-	-
OMPG	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ODC	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Citrate de Simmons	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	+	+	+	+	-	-	-	+
TDA	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Indole	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VP	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Gélatinase	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Glucose	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Manitole	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inorbitole	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Saccharose	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Mélibiose	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Amylose	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Arabinose	+	+	-	+	+	+	-	+	+

Tableau 10 : Croissance des souches testées en présence de chlorpyrifos et du flint.

Les souches	Chlorpyrifos	Flint
SB1	+	+
SB2	+	+
SB3	+	+++
SB4	+	+
SB5	+	+++
SB6	+	+++
SB7	++	+++
SB8	++	+++
SB9	+	+/-

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

III.3. Sélection des souches résistantes aux pesticides sur milieu liquide

L'étude de la croissance de neuf souches bactériennes sur milieu liquide a pour but de sélectionner celles qui ont donné une meilleure croissance en présence des deux pesticides (flint et chlorpyrifos) afin d'évaluer par la suite leur capacité de dégradation de ces pesticides.

III.3.1. Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence et en absence des deux pesticides

D'après les résultats présentés dans la **figure 08** nous remarquons qu'il y'a une faible croissance après 72 heures d'incubation pour la majorité des souches, sauf pour les souches SB8 et SB4 où nous avons observé une augmentation dans leurs taux de croissance(µ) $0.011h^{-1}$ et $0.012\ h^{-1}$ **(Annexe II)**, respectifs. Après 96 heures d'incubation, un ralentissement de la croissance est observé et qui est expliqué par l'épuisement des substrats nutritifs et énergétiques (extrait de levure) présents dans le milieu MMM avec une faible concentration. Cependant, cette croissance était faible par rapport à celle remarquée en présence des pesticides dans la même période d'incubation **(Figures 09 et 10)** ce qui signifie que cet épuisement en substrat nutritif a été compensé par les pesticides qu'ont été utilisés par les neuf souches comme alternatifs de ces substrats dans les milieux contenant les pesticides.

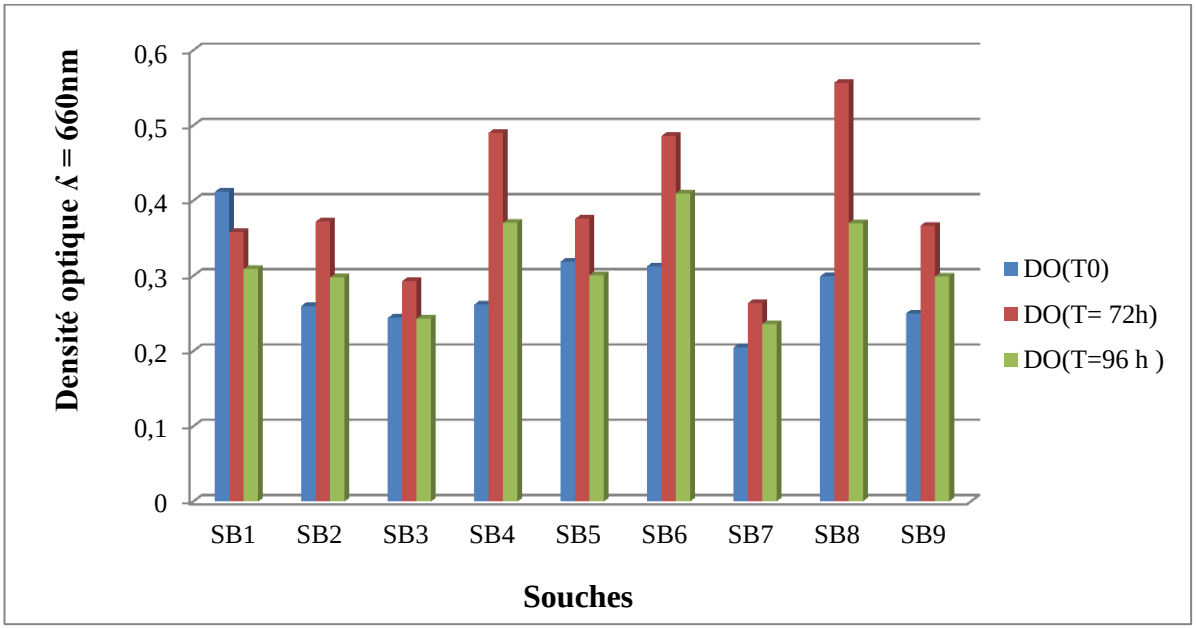


Figure 08 : Cinétique de croissance des souches bactériennes en absence des deux pesticides (Témoins).

La **figure 09** présente la cinétique de croissance de neuf souches testées dans le milieu MMM en présence de 50 mg/l de chlorpyrifos. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches testées avaient la capacité de croitre sur ce milieu en présence de cette concentration en pesticide, la meilleure croissance des souches a été observée après 72 heures d'incubation. D'après l'analyse de ces résultats on a observé que les souches (SB1, SB7, SB8 t SB9) sont les souches ayant données la meilleure croissance avec des taux de 0.040 h^{-1}, 0.041 h^{-1}, 0.029 h^{-1} et 0.044 h^{-1} **(Annexe III)**, respectivement, suivies par les souches (SB3 et SB5) qui ont montré une croissance modérée. La faible croissance a été observée avec les souches SB2, SB4 et SB6 avec des taux de 0.015 h^{-1}, 0.018 h^{-1} et 0.017 h^{-1}**(Annexe III)**, respectivement.

Puisque ces souches ont été isolées à partir des terres agricoles exposées en continu à l'application des pesticides et ont donné une croissance dans un milieu minimum on peut suggérer que ces isolats bactériens utilisent ce pesticide comme source de carbone et d'énergie pour survivre sur ce milieu et qu'elles ont la capacité de développer un système de résistance à ces pesticides. **Singh *et al.* (2004)** ont testé la capacité de la souche *Enterobacter* B-14 à tolérer et à dégrader le chlorpyrifos pendant 24h d'incubation à une concentration de 35mg/l pour utiliser le produit de sa dégradation, le diethylthiophosphate (DETP), comme seule source de carbone et d'énergie en absence d'un autre substrat nutritif simple. Le même résultat a été obtenu par **Rayu *et al.* (2017)** avec les trois souches *Xanthomonas* sp, *Pseudomonas* sp, et *Rhizobium* sp, où ils ont trouvé que ces souches utilisent le chlorpyrifos comme source de carbone et de nitrogène pour assurer leur croissance. De même, **Khalid *et al.* (2016)** ont montré

que la souche *P. putida* peut se développer efficacement sur un milieu sans phosphore, tout en utilisant ce pesticide comme source unique de ce minéral.

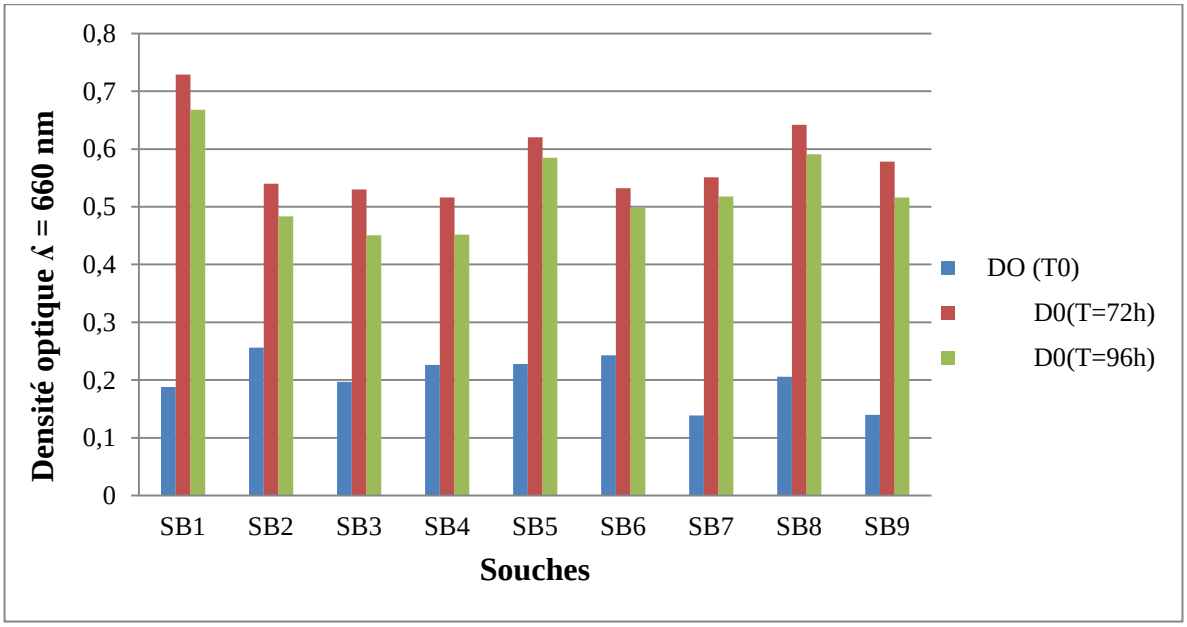


Figure 09 : Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence de chlorpyrifos (50 mg/l).

La cinétique de croissance de neuf souches testées dans le milieu MMM en présence de 50mg/l du flint est présentée dans la **figure 10**. D'après les résultats montrés dans la **figure 10,** nous constatons que cette concentration du flint n'altère pas la croissance des souches bactériennes testées où toutes les souches ont pu croitre sur ce milieu, la différence entre elles réside dans le taux de croissance et la capacité de résister. D'après les résultats montrés par les histogrammes de cette figure, la croissance maximale pour toutes les souches testées a été observée après 72 heures d'incubation, dont les quatre souches (SB4, SB7, SB8 et SB9) ayant données une bonne croissance avec des taux de 0.023 h^{-1}, 0.021 h^{-1}, 0.031 h^{-1} et 0.025 h^{-1}, respectivement **(Annexe IV)**, par contre les faibles taux de croissances ont été remarquées avec les autres souches (SB1, SB2, SB3, SB5 et SB6).

La croissance des souches sur milieu MMM en présence de ce pesticide comme seule source de carbone et d'énergie indique que nos souches ont probablement la capacité de dégrader et d'utiliser ce fongicide pour leur croissance. **Wu *et al*. (2016)** ont trouvé que la souche *Shinella* NJUST26 peut tolérer (jusqu'à 320mgl/l) et utiliser le fongicide 1H-1, 2,4-triazole (TZ) comme seule source de carbone et de nitrogène dans sa croissance. *Enterobacter sakazakii* et *Serratia* sp ont la capacité de croitre et de dégrader jusqu'à la concentration de 42.76 mg/l de fongicide tebuconazole **(Sehnem *et al*., 2009)**.

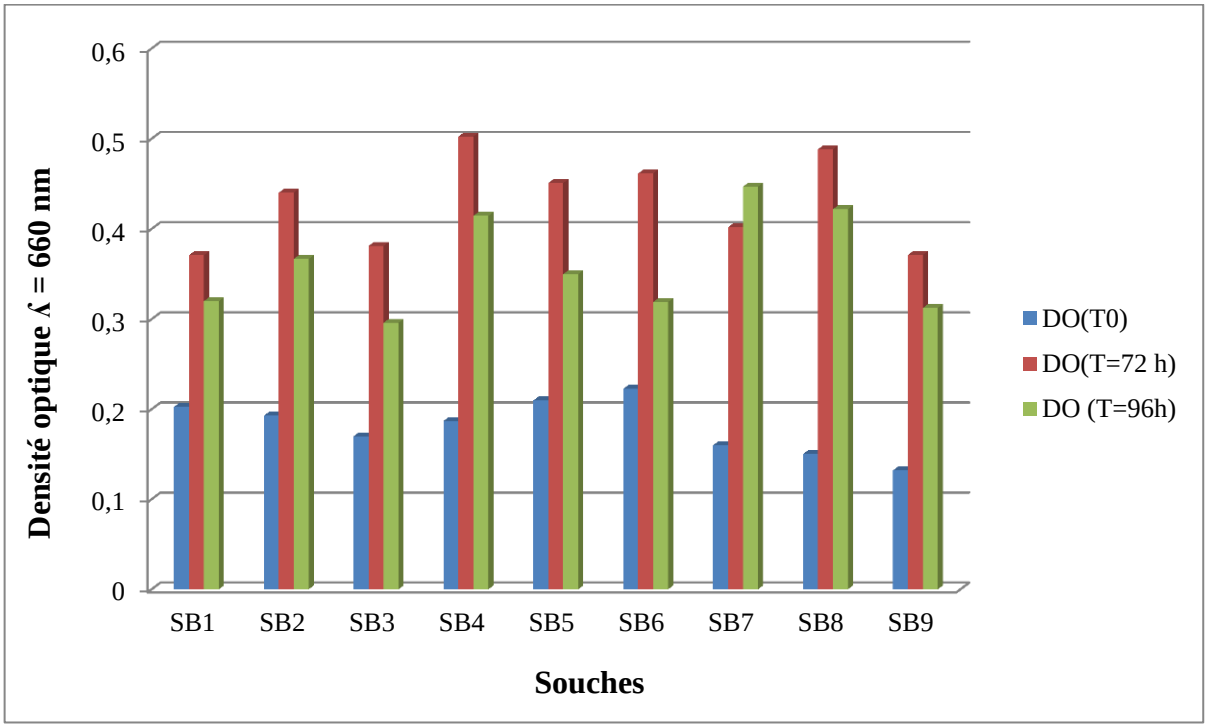


Figure 10 : Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence du flint (50 mg/l).

III.4. Effet de différentes concentrations en pesticides

Les souches sélectionnées pour l'étude de l'influence de la variation des concentrations initiales de l'insecticide chlorpyrifos sont SB1 et SB8, et du fongicide flint sont SB4 et SB8. Elles ont été choisies pour leurs aptitudes à croitre sur milieu solide et liquide en présence des pesticides cités précédemment.

III.4.1. Cinétique de croissance en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos

La **figure 11** présente l'évaluation de la croissance de la souche SB1 en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos par mesure de l'absorbance à 660 nm après 48h et 72h d'incubation. La croissance maximale de cette souche a été observée après 48h d'incubation à la concentration de 400mg/l par un taux de 0.301h^{-1}**(Annexe V)**, la même cinétique a été observée pour la concentration de 200mg/l mais à un moindre degré avec un taux de 0.220 h^{-1}**(Annexe V)**, Pour les concentrations 50mg/l, 100 mg/l et 800mg/l, il y a un ralentissement de la croissance par rapport à celles observées en présence des deux premières concentrations. Nos résultats sont dans la même direction que les résultats de **El-Sayed *et al.* (2018)** qui ont signalé que quatre souches bactériennes isolées à partir d'un sol égyptien contaminé par les pesticides ont la capacité de dégrader les deux pesticides organophosphorés : diazinon et chlorpyrifos à forte concentration (600mg/l et 480mg/l, respectivement), ce résultat est correspondant avec ceux de **Yang *et al.* (2005)** également**,** qui ont trouvé que *Alcaligenes faecalis* isolée des sols contaminés a la capacité de dégrader le chlorpyrifos et le 3,5,6-trichloro-2-pyridinol avec des concentrations

relativement élevées (500mg/l, plus de 800 mg/l, respectivement). Par ailleur, ces résultats sont contradictoires avec ceux de **Vijayalakshmi et Usha (2012)** qui avaient suggéré qu'une concentration de 20000mg/l du chlorpyrifos assurera une meilleure dégradation de ce pesticide par *P. putida*, et à ceux de **Farhan *et al.* (2012)** qui ont montré que la croissance de *Pseudomonas* sp, était importante avec les concentrations du chlorpyrifos comprise entre 100mg/l à 300mg/l avec un optimum à 100mg/l et au-delà de la concentration de 300mg/l, il y aurait un ralentissement de la croissance, ce qui signifie que les fortes concentrations de ce pesticide inhibent la croissance des microorganismes.

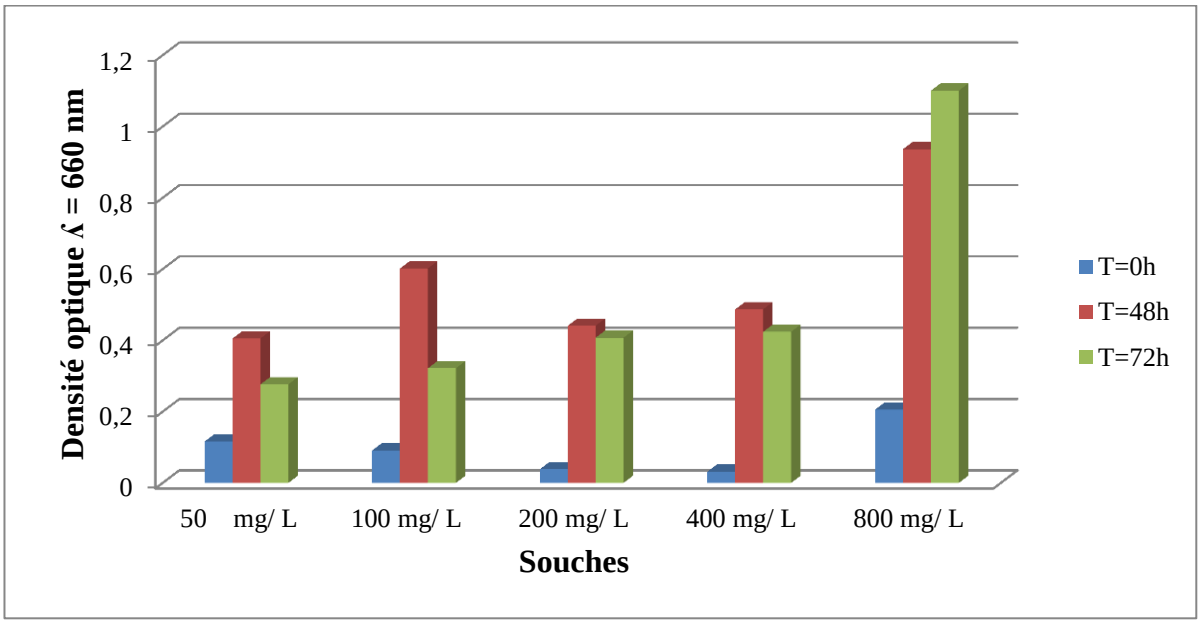


Figure 11 : Cinétique de croissance de la souche SB 1 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos.

La **figure 12** présente l'évaluation de la croissance de la souche SB8 en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos par la mesure de l'absorbance à 660 nm après 48 h et 72 h d'incubation. Les résultats montrent que les meilleures croissances de la souche SB8 ont été observées après 48h d'incubation. Cette souche avait une croissance maximale avec un taux de 0.225 h^{-1} à une concentration de 200mg/l et pouvait tolérer jusqu'à 800mg/l de chlorpyrifos dans le milieu MMM **(Annexe VI)**. Ces résultats correspondent avec ceux de **Singh *et al.* (2004)** qui ont rapporté que la souche d'*Enterobacter* sp, est capable de dégrader des concentrations élevées en chlorpyrifos avec un optimum à 250mg/l. **Sharma *et al.* (2016)** avaient indiqué que la croissance de la souche *P. resinovarans* AST2.2 isolée de cultures enrichies a été optimale à une concentration de 400mg/l de chlorpyrifos qui est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, de plus cette souche pouvait tolérer jusqu'à une concentration de 800mg/l de ce pesticide. **Anwar *et al.* (2009)** ont montré que la croissance de la souche *Bacillus pumilus* C2A1

augmentait avec l'augmentation de la concentration du chlorpyrifos jusqu'à atteinte d'une concentration relativement élevée (500mg/l et 1000mg/l) où la croissance était lente et la dégradation commençait après 7 à10 jours d'incubation. **Pailan *et al.* (2015)** ont indiqué que la souche de *B. aryabhattai* dégradait et tolèrait des concentrations élevées (500mg/l) en chlorpyrifos. D'autre part, des souches de *Klebsiella* sp isolées d'un échantillon de boues activées d'après **Ghanem et Shamma (2007)** peuvent tolérer plus de 17300mg/l de chlorpyrifos. Par contre, **Fulekar et Geetha (2008)** ont montré que la croissance de *P. aeruginosa* diminuait avec l'augmentation de la concentration du chlorpyrifos et que la croissance optimale de cette souche est observée avec des concentrations inferieures à 75 mg/l dont l'optimale est à 50 mg/l.

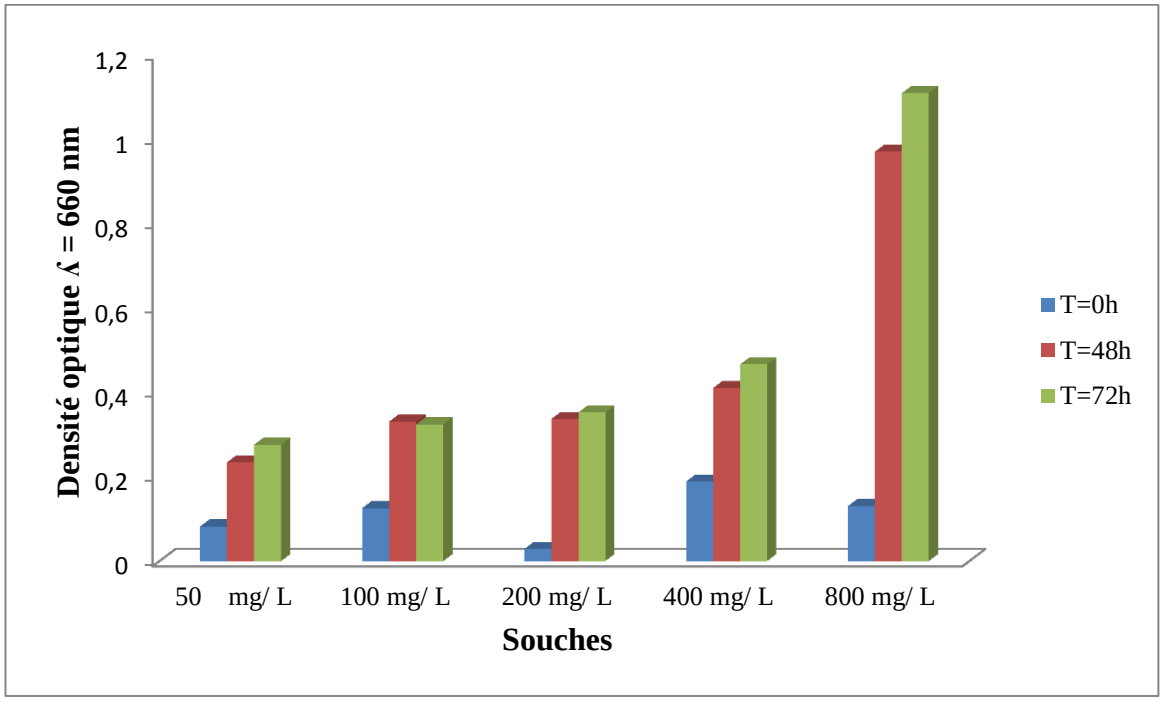


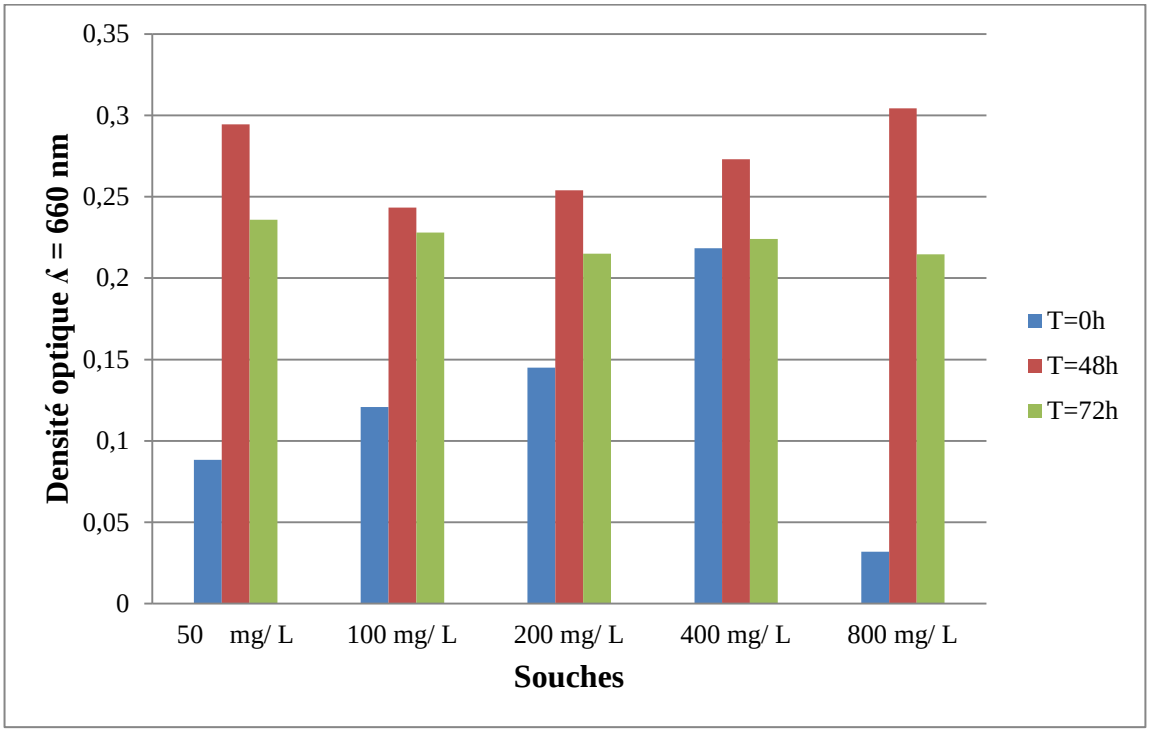
Figure 12: Cinétique de croissance de la souche SB8 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos.

III.4.2. Cinétique de croissance en présence de différentes concentrations en flint

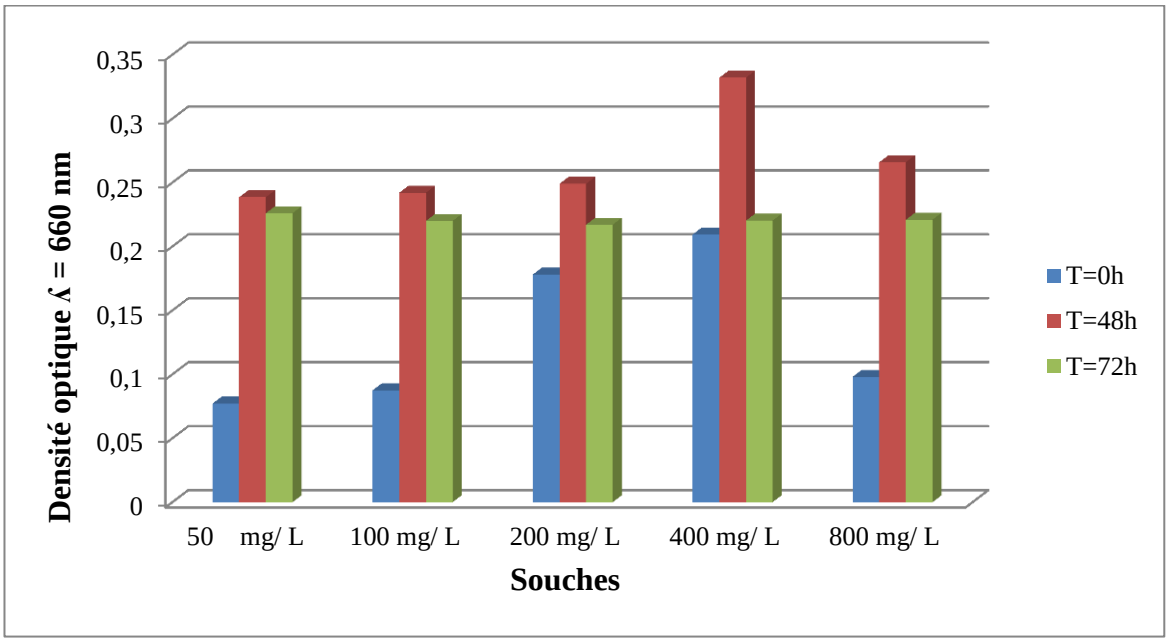
Les **figures 13 et 14** montrent l'évaluation des variations de la croissance des souches SB4 et SB8 en fonction de la concentration initiale du fongicide flint dans le milieu MMM par la mesure de l'absorbance à 660 nm après 48h et 72h d'incubation. D'après les résultats présentés par la **figure 13** nous remarquons qu'il y a une croissance de la souche SB4 dans les différentes concentrations du pesticide où la croissance maximale est atteinte après 48h d'incubation avec un optimum observé à 800mg/l avec un taux de 0.179 h^{-1} **(Annexe VII)**, suivi par une croissance modérée avec un taux de 0.049 h^{-1} **(Annexe VII)** à une concentration de 50mg/l, pour les autres

concentrations 100mg/l, 200mg/l et 400mg/l, la croissance était faible avec des taux de 0.021h^{-1}, 0.016 h^{-1} et 0.005 h^{-1}**(Annexe VII)**, respectivement.

La croissance de la souche SB4 à une concentration de 800mg/l signifie que les concentrations élevées du flint n'aient aucun effet d'inhibition sur cette souche car elle a pu développer un système de résistance à ce pesticide étant donné qu'elle a été isolée à partir des terres agricoles exposées en continu à l'application des pesticides, de plus d'après ce résultat on peut suggérer que cette bactérie dégrade ce pesticide afin de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie pour sa croissance dans le bouillon MMM car sa croissance dans les faibles concentrations n'est pas importante ce qui signifie que ces concentrations ne sont pas suffisantes pour la croissance. Pour la souche SB8 **(figure14)** la croissance maximale a été observée après 48 h d'incubation, avec un optimum à 50 mg/l (taux de croissance 0.044 h^{-1}) **(Annexe VIII)**, pour les autres concentrations les croissances remarquées ont été faibles ce qui indique que les fortes concentrations du fongicide flint inhibent la croissance de la souche SB8. Le ralentissement de la croissance des deux souches est dû soit à l'épuisement des substrats énergétiques et nutritifs présents dans le milieu MMM soit à l'accumulation des produits de la dégradation qui peuvent être toxiques pour ces souches. **Crouzet *et al.* (2010**) ont rapporté que la croissance des souches microbiennes avec des concentrations élevées des pesticides est due à une résistance acquise par le microorganisme et que le microorganisme utilise ces polluants comme source de carbone et d'énergie pour sa croissance. Ces résultats sont similaires aux résultats de **Araújo *et al.* (2003)** qui ont rapporté que l'augmentation de la concentration du glyphosate est suivi par une augmentation de la croissance des actinomycètes et à ceux de **Hocinat et Boudemagh (2015)** qui ont montré que les neuf isolats d'actinomycètes isolés à partir de boues activés avaient la capacité de dégrader des concentrations élevées (500 mg/L) du fongicide de la famille chimique de strobilurines : ortiva. Par contre, **Baćmaga *et al.* (2015)** ont prouvé que les fortes concentrations en azoxystrobine inhibaient la croissance microbienne. Des doses élevées (1000 à 2000 mg /l) en fongicide mancozeb avaient montré un effet néfaste sur la microflore du sol où elles inhibaient leur croissance d'après **Walia *et al.* (2014)**.



La figure 13 : Cinétique de croissance de la souche SB 4 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en flint.



La figure 14 : Cinétique de croissance de la souche SB 8 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en flint.

III.5.Caractérisation de la souche sélectionnée

D'après les résultats montrés dans la **figure 15** nous constatons que la souche SB8 est une souche mésophile, sa croissance a atteint ses valeurs maximales à une température de 28°C et 37°C avec un optimum à 28°C, puis elle ralentit avec l'augmentation de la température

(croissance faible à 44°C). **Jaouen *et al.* (2004)** ont indiqué que la température optimale de croissance de *Pseudomonas fluorescens* est 28°C.

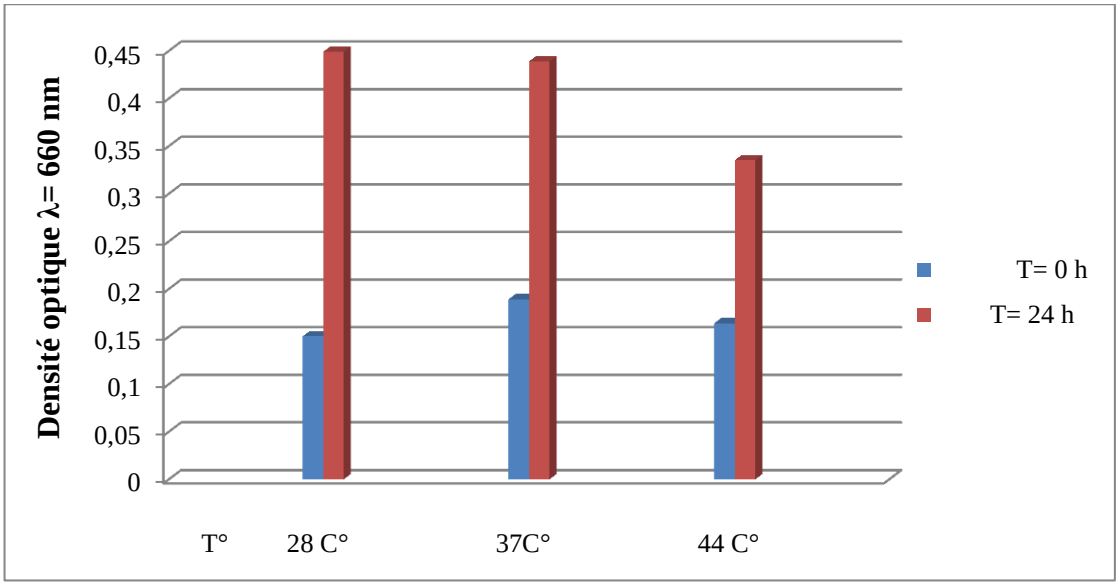


Figure 15 : Croissance de la souche SB8 à différentes températures.

Pour le pH **(figure 16)** on a remarqué que la croissance de la souche est optimale à pH 9 et que cette souche peut tolérer et croitre dans une gamme de pH comprise entre 5 à 9 avec une faible croissance à pH 4.

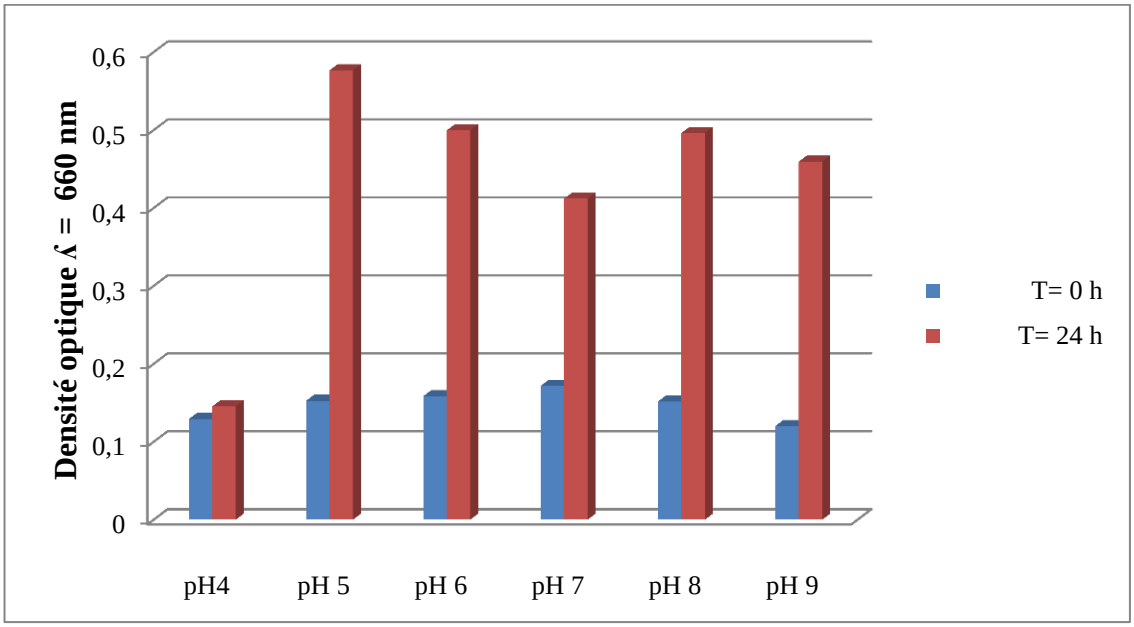


Figure 16 : Croissance de la souche SB8 à différentes valeurs du pH.

Concernant la salinité **(figure 17)**, il est remarquable que la souche tolère les concentrations de NaCl utilisées (jusqu'à 3%), cependant, une croissance faible a été observée à 4% .Ces résultats

sont en accord avec ceux de **Diaw *et al.* (2018)** qui ont prouvé que les souches de *P. fluorescens* isolée de la rhizosphère d'aubergine sont capables de croitre dans des concentrations de 0,51 M en NaCl avec des taux de croissance relativement élevés (environ 300 colonies sur milieu King B solidifié). Par contre, **Deshwal et Kumar (2013)** ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* sp ont une tolérance au sel pour des teneurs ne dépassant pas 0,2 M. D'après **Kushner (1993)** notre souche est une bactérie faiblement halophile.

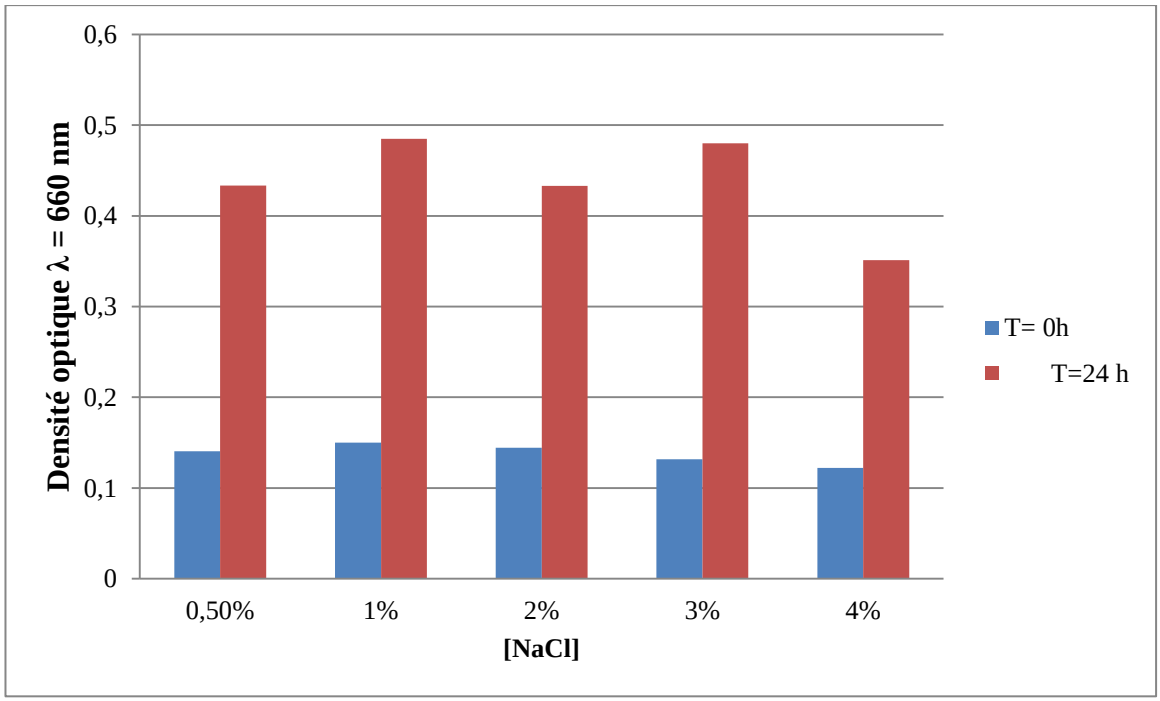


Figure 17 : Croissance de la souche SB8 à différentes concentrations de **Na Cl**.

III.6. Evaluation de la biodégradabilité par mesure de la DBO_5

La demande biologique en oxygène ou DBO_5, représente la quantité d'oxygène consommée par le microorganisme aérobie pendant 5 jours d'incubation à l'obscurité pour dégrader le polluant présent dans le milieu MMM. La quantité d'oxygène consommée pendant la période d'incubation est proportionnelle à la concentration du pesticide oxydé et la charge organique est en relation étroite avec la valeur de la DBO_5 **(Idrissi *et al*., 2015)**.

D'après la **figure 18**, on remarque qu'il y a une augmentation de la valeur de la DBO au cours du temps d'incubation suivie par une diminution de la quantité d'oxygène dissout **(Figure 19)**. La réduction de la quantité d'oxygène après la période d'incubation (6,57 mg/l pour le chlorpyrifos et 6,26 mg/l pour le flint) a montré qu'il y a utilisation de l'oxygène par la souche SB8 pour la dégradation (oxydation) des deux pesticides afin de les utiliser comme substrat nutritif et énergétique dans sa croissance. Cette croissance a été traduite donc par une augmentation de la demande biologique en oxygène (DBO_5) qui atteint une valeur maximale

après 5 jours d'incubation (160 mg d'O_2/l pour le chlorpyrifos et 49 mg d'O_2/l pour le flint). **Kayeye (2014)** et **Idrissi *et al*. (2015)** ont trouvé qu'une augmentation de la croissance du microorganisme en présence des polluants assure une augmentation dans la demande biologique en oxygène.

La variation observée dans les valeurs de la DBO_5 dans le cas du fongicide flint est faible par rapport à celle observée avec l'insecticide chlorpyrifos ce qui signifie que la croissance et la résistance de la souche SB8 en présence du chlorpyrifos sont plus importantes qu'en présence du flint.

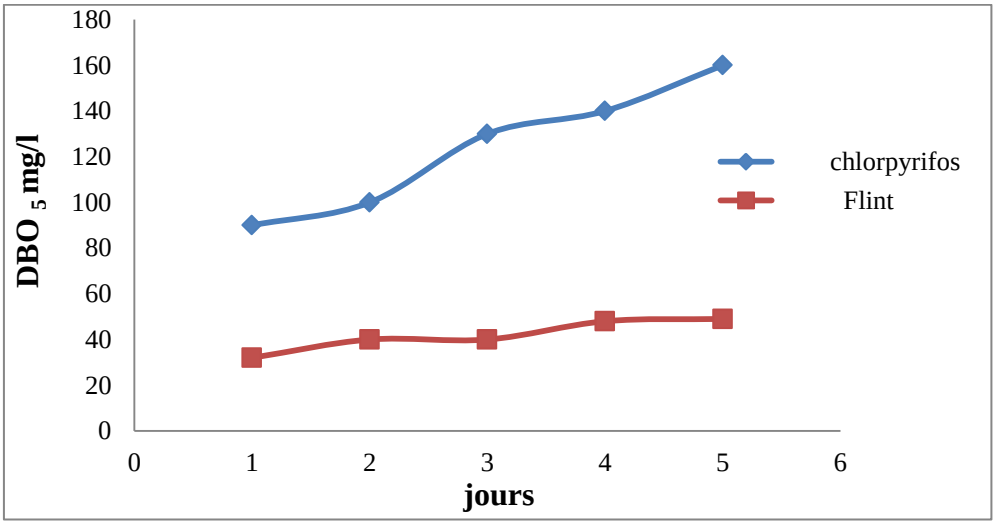


Figure 18 : Variation de la DBO_5 (mg d'O_2/l)

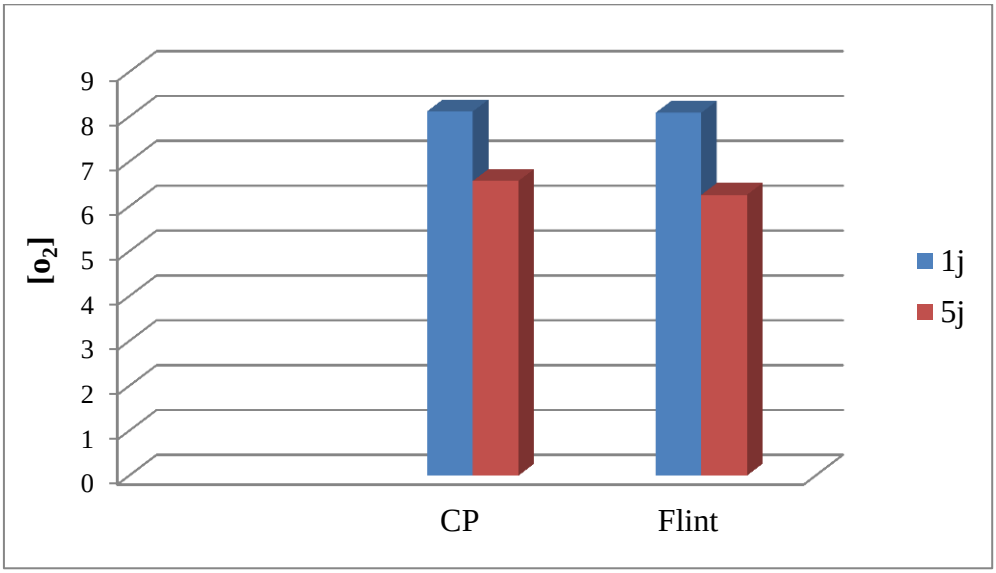


Figure 19 : Quantité d'oxygène dissout en mg/l.

III.7. Criblage des facteurs affectant la croissance par la matrice de Plackett-Burman

Afin d'améliorer la biodégradation du chlorpyrifos et la croissance de la souche SB8, des expériences ont été conçues pour sélectionner les facteurs influant sur cette dégradation en utilisant le design expérimental de Plackett-Burman. Le **tableau 11** présente la conception de Plackett-Burman pour sept variables de culture et leur réponse correspondante en termes de biodégradation du pesticide et/ou croissance de la souche **(Figure 20)**. Le **tableau 12** présente l'analyse de régression de l'effet de chaque variable.

Tableau 11 : Conception de Plackett-Burman pour la biodégradation du CP par la souche SB8.

expérience	pH X1	Agitation X2	[Pesticide] mg/L X3	L'inoculum % X4	Na2 HPO_4 (g/L) X5	Extrait de levure (g/L) X6	Période d'incubation (h) X7	Croissance
1	-1	1	1	-1	1	1	-1	0,2995
2	-1	-1	1	1	1	-1	1	0,3222
3	1	-1	-1	1	-1	1	1	0,4045
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	0,3636
5	-1	1	1	-1	1	-1	1	0,3042
6	1	-1	1	1	-1	-1	1	0,368
7	1	1	-1	1	-1	1	-1	0,3586
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,2985

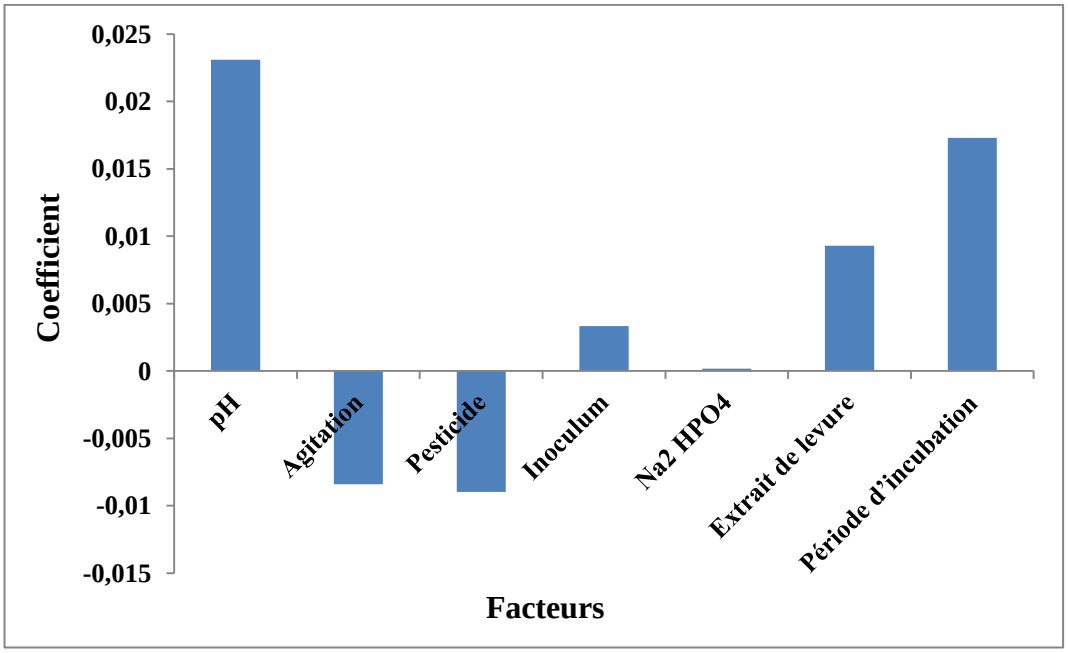


Figure 20 : Effet de différents facteurs sur la croissance de la souche SB8 en présence de chlorpyrifos.

Tableau 12 : Analyse de régression de l'effet de chaque variable avec le coefficient, la valeur t et la valeur p.

Variables	*Coefficients*	*Statistique t*	*Probabilité*
Constante	**0,3398875**	**69,3611097**	**0,0091777**
Variable X 1	**0,02308333**	**2,88466242**	**0,21243819**
Variable X 2	**-0,0084125**	**-0,57591143**	**0,58561224**
Variable X 3	**-0,00896667**	**-1,12054035**	**0,46385078**
Variable X 4	**0,00334167**	**0,41759914**	**0,74816252**
Variable X 5	**0,00018333**	**0,02291068**	**0,98541716**
Variable X 6	**0,00928333**	**1,16011333**	**0,45289819**
Variable X 7	**0,01729167**	**2,16089333**	**0,2759262**

Lorsque l'effet de la variable testée est positif, l'influence des variables est plus grande avec les niveaux élevés testés et si elle est négative, l'influence des variables était plus grande avec les niveaux bas. La croissance de la souche et donc la dégradation dans les différents ensembles variait de 0,2985 à 0,4045, rappelant l'importance de la sélection et de l'identification des facteurs importants, le graphique de Pareto a été tracé pour montrer l'effet de toutes les variables sur la dégradation du chlorpyrifos **(Figure 21)**.

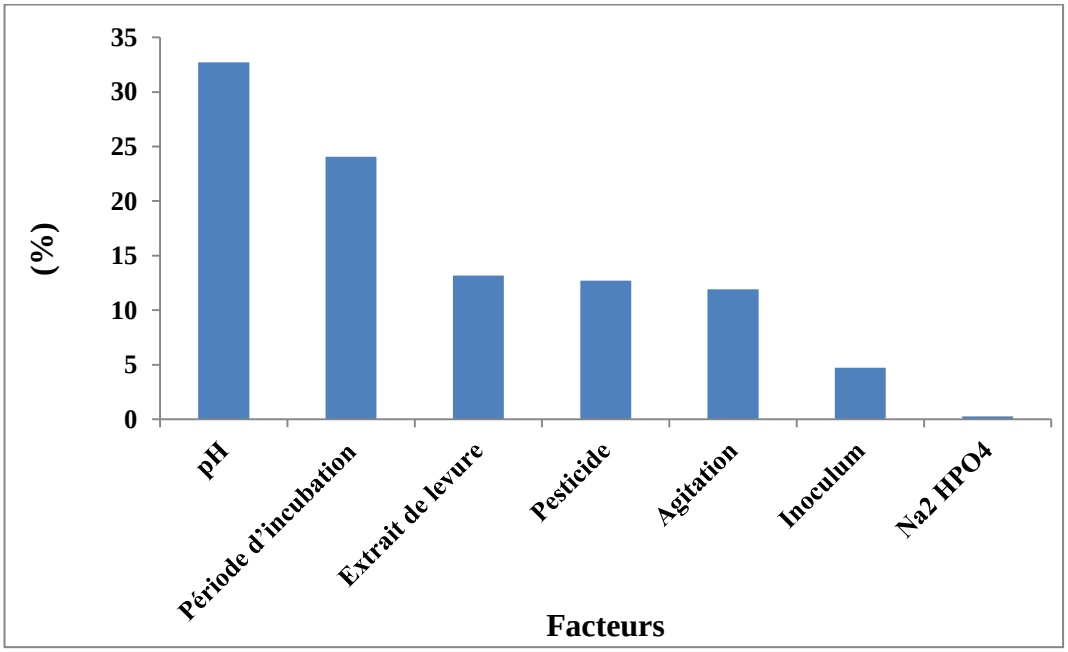


Figure 21 : Diagramme de Pareto rationalisant l'effet de chaque variable sur la croissance.

Comme il est clairement montré **(figure 20)**, le pH et la période d'incubation avaient l'influence majeure sur la dégradation du chlorpyrifos, suivis par l'extrait de levure et le volume

d'inoculum. La concentration du pesticide et l'agitation, en revanche, avaient une influence négativement significative.

Le pH est le principal facteur affectant la croissance de la souche SB8/ biodégradation chlorpyrifos avec un coefficient de 0,0230 et une contribution de 33%, ce qui signifie que les enzymes dégradant le CP nécessitent un pH optimum (pH 7.0 environ) pour être fonctionnel et qu'en dehors de cette valeur l'activité de ces enzymes diminue probablement à cause de la détérioration de leurs structures perdant ainsi leur affinité pour le substrat. **Singh *et al*. (2003)** ont observé qu'à un pH compris entre 6,7 et 8,4 les souches de *Pseudomona* sp, maintiennent une capacité de dégradation du chlorpyrifos élevée. **Liu *et al*. (2012)** ont montré que le pH optimum pour une meilleure dégradation du CP par *Bacillus cereus* était à pH 7.

La période d'incubation vient en seconde place avec un coefficient de 0,0173 et une contribution de 25%, ce qui indique que les longues périodes d'incubation (72h) assurent une meilleure dégradation du chlorpyrifos. Ce phénomène peut être expliqué par le temps que nécessite la souche pour l'adaptation et pour commencer la biodégradation. **John *et al*. (2016)** ont prouvé que la période d'incubation est l'un des principaux facteurs affectant la dégradation du chlorpyrifos par un consortium bactérien renfermant *Staphylococcus warneri* CPI 2, *Pseudomonas putida* CPI 9 et *Stenotrophomonas maltophilia* CPI 15.

L'extrait de levure, d'après le tableau, influence aussi positivement sur la biodégradation avec un coefficient de 0,0093 et une contribution de 13.16%. Donc on peut déduire que cette souche l'utilise comme source moins complexe en nitrogène et en carbone pour sa croissance avant de commencer la biodégradation (utilisation) du chlorpyrifos. Il a été montré que la dégradation du chlorpyrifos par *P. putida* est très rapide en présence de 300 mg/l d'extrait de levure **(Vijayalakshmi et Usha, 2012)**.

La concentration du pesticide et l'agitation sont des facteurs qui affectent négativement la croissance de la souche SB8 et donc la biodégradation du CP avec des coefficients de -0,0089et -0,0084, respectivement, et des contributions de 13% et 12%, respectivement. Ces résultats ont montré que les fortes concentrations en pesticide affectent la croissance et la dégradation du chlorpyrifos et que l'agitation n'a pas d'effet important sur la croissance/dégradation. **Vijayalakshmi et Usha (2012)** ont trouvé que l'agitation et la concentration du pesticide sont des facteurs limitant la biodégradation du chlorpyrifos par *Pseudomonas* sp.

Le volume d'inoculum et le Na_2HPO_4 sont des facteurs qui affectent positivement la biodégradation du CP par la souche SB8 mais leur influence n'est pas significative.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L'objectif de notre travail est d'identifier puis d'évaluer la capacité de neuf souches bactériennes, précédemment isolées à partir des terres agricoles exposées en continu à l'application des pesticides, de résister et/ou d'utiliser des différents pesticides (chlorpyrifos ou flint) comme seule source de carbone et d'énergie. L'effet de quelques paramètres physicochimiques sur la croissance de ces souches bactériennes en présence de ces pesticides est également étudié.

Dans un premier temps il s'est avéré que les neuf souches bactériennes testées avaient la capacité de croitre sur le milieu MMM liquide et solide en présence de 50mg/l de chaque pesticide à la fois comme seule source de carbone et d'énergie. Parmi ces isolats les souches SB1 et SB4 ont donné une bonne croissance en présence de l'insecticide chlorpyrifos et le fongicide flint, respectivement, tandis que la souche SB8 a donné une bonne croissance en présence des deux pesticides. La croissance de ces isolats a été évaluée en présence de différentes concentrations de chaque pesticide, dont la meilleure croissance a été observée à la concentration de 400mg/l de chlorpyrifos pour la souche SB1 qui peut tolérer jusqu'à 800mg/l, et à la concentration de 800mg/l du flint pour la souche SB4. Tandis que la souche SB8 a montré une bonne croissance en présence des deux pesticides (optimum à 200mg/l pour le chlorpyrifos et à 50mg/l pour le flint).

La biodégradation des deux pesticides par la souche SB8, qui a l'aptitude à dégrader les deux pesticides à la fois, a été confirmé par le test de la DBO_5, où on a observé une augmentation des valeurs de la DBO, suivi par une réduction de la concentration résiduelle de l'oxygène dans les milieux MMM inoculés avec cette souche et contenant les pesticides.

La dernière partie a concerné l'étude des facteurs qui influençant la croissance de la souche SB8/ la biodégradation de l'insecticide chlorpyrifos à l'aide d'une matrice de criblage de Plackett-Burman. En effet, on a trouvé que certains d'entre eux ayant un effet positif significatif et qui sont le pH, la période d'incubation et l'extrait de levure avec des valeurs de contributions de 33%, 25% et 13.16%, respectivement. La concentration du pesticide et l'agitation ayant un effet négatif significatif avec des valeurs de contribution de 13% et 12% respectivement.

Perspectives

L'évaluation de la dégradation de ces pesticides par ces souches *in vivo* ou *in situ* sous les conditions auxquels la biodégradation a été optimale *in vitro*, l'étude de la cinétique de

dégradation des pesticides par ces souches soit seule ou en consortium et l'évaluation d'autres conditions influençant la biodégradation seraient des compléments importants à notre étude.

Puisque les trois souches ont l'aptitude de dégrader ces deux pesticides, il est important de faire une caractérisation de ces souches afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de la biodégradation des pesticides testés.

Enfin, nous suggérons la combinaison entre la conception de Plackett-Burman et d'autres approches d'optimisation telle que Response Surface Methodology (Box-Behnken design) pour cribler efficacement les facteurs qui influant plus sur la biodégradation et optimiser leur concentration.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Adamou, R., Abdoulaye, A., Soumaïla, M., Moussa, I., Coly, A., Tine, A., & Ikhiri, K. (2010). Dégradation abiotique de la Deltaméthrine et de l'Etofenprox dans les eaux naturelles du Niger. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 29: 45-54.

Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Harrouche, K., &Sghaier, H. (2017). Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge. *Current Microbiology*, 74(3): 381-388.

Alix, A., Barriuso, E., Bedos, C., Bonicelli, B., Caquet, T., Dubus, I., & Voltz, M. (2005). Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques. In : Aubertot J.N., J.M. Barbier, A. Carpentier, J.J. Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, I. Savini, M. Voltz (Eds). *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective*, INRA et Cemagref (France) : 219.

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.

Ajaz, M., Jabeen, N., Akhtar, S., & Rasool, S. A. (2005). Chlorpyrifos resistant bacteria from pakistani soils: isolation, identification, resistance profile and growth kinetics. *Pakistan Journal of Botany*, 37(2): 381-388.

Araújo, A. S. F., Monteiro, R. T. R., & Abarkeli, R. B. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soil. *Chemosphere*, 52: 799–804.

-B-

Baćmaga, M., Kucharski, J., & Wyszkowska, J. (2015). Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(10): 615.

Banerjee, K., Ligon, A. P., & Spiteller, M. (2006). Environmental fate of trifloxystrobin in soils of different geographical origins and photolytic degradation in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25): 9479-9487.

Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., & Soulas, G. (1996). Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et Gestion des Sols*, 3(4) : 279-296.

Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., & Gabrielle, B. (2002). Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie*, 22(1): 21-33.

Bodering, A., Ndoutamia, G., Ngandolo, B. N., & Ngakou, A. (2017). Utilisation des antibiotiques et profil de résistance des souches de *Salmonella* spp. et *Escherichia coli* isolées des exploitations avicoles des villes de N'Djaména et Doba au Tchad. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(4): 1669-1684.

Bonnard, N., Falcy, M., Fastier, A., Jargot, D., Oudar, S., Pillière, F., … & Robert, S. (2018). *Fiche toxicologique* synthétique *n° 273(2éme) : Glyphosate. Edition INRS. Disponible sur :* www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_273-1/FicheTox_273.pdf.

Bordjiba, O., & Ketif, A. (2009). Effet de Trois Pesticides (Hexaconazole, Bromuconazole et Fluazifopp-butyl) sur quelques Métabolites Physio-Biochimiques du Blé dur: Triticum durum. Desf. *European Journal of Scientific Research*, 36(2): 260-268.

Borggaard, O. K., & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64(4): 441-456.

Bouziani, M. (2007). L'usage immodéré des pesticides : De graves conséquences sanitaires. Le guide de la médecine et de la santé en Algérie. Disponible sur : http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm.

-C-

Cahill, L. (2000). *Evaluation of the new active trifloxystrobin in the product flint fungicide*. Canberra, Australia: Edition NRA.

Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.P., & Coquet, Y. (2005). Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. Paris, France : Editions France Agricole : 637.

Cao, X., Yang, C., Liu, R., Li, Q., Zhang, W., Liu, J., ...& Mulchandani, A. (2013). Simultaneous degradation of organophosphate and organochlorine pesticides by *Sphingobium japonicum* UT26 with surface-displayed organophosphorus hydrolase. *Biodegradation*, 24(2): 295-303.

Cardeal, Z. L., Souza, A. G., & Amorim, L. C. (2011). Analytical methods for performing pesticide degradation studies in environmental samples. In: Stoytcheva, M (Ed). *Pesticides-formulations, effects, fate*. Rijeka, Croatia: Edition IntechOpen: 595-618.

CCME (Conseil canadien des ministres de l'environnement) (2008). Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux visant la protection de la vie aquatique – chlorpyrifos. Dans : Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 1999, Conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg.

Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A., & Arshad, M. (2013). Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *Journal of Environmental Management*, 114: 372-380.

Clinton, B., Warden, A. C., Haboury, S., Easton, C. J., Kotsonis, S., Taylor, M. C., ... & Scott, C. (2011). Bacterial degradation of strobilurin fungicides: a role for a promiscuous methyl esterase activity of the subtilisin proteases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 29(4): 119-129.

Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J., & Mallet, C. (2010). Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:193–202.

-D-

Deravel, J., Krier, F., & Jacques, P. (2014). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 18(2): 220-232.

Derkaoui, A., Elbouazzaoui, A., Elhouari, N., Achour, S., Labib, S., Sbaï, H., ... & Kanjaa, N. (2011). Severe acute poisoning by organophosphorus pesticides: report of 28 cases. *The Pan African Medical Journal*, 8(1):16-16.

Deshwal VK., Kumar P. (2013). Effect of salinity on growth and PGPR activity of *Pseudomonads*. *Journal of Academia Industrial Research*, 2: 353 – 356.

Diaw, D., Fall-Ndiaye, M. A., Ali, O. Y., Sare, I. C., & Diop, T. A. (2018). Effet de la salinité sur la densité des isolats de *Pseudomonas fluorescents* de rhizosphère de plants de tomate, d'aubergine et d'oignon au Sénégal. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(4): 1914-1919.

Diop, A. (2013). Diagnostic des pratiques d'utilisation et quantification des pesticides dans la zone des Niayes de Dakar (Sénégal). Thèse de doctorat: Université du Littoral Côte d'Opale.

Doolotkeldieva, T., Konurbaeva, M., & Bobusheva, S. (2018). Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32): 31848-31862.

-E-

Eissa, F. I., Mahmoud, H. A., Massoud, O. N., Ghanem, K. M., & Gomaa, I. M. (2014). Biodegradation of chlorpyrifos by microbial strains isolated from agricultural wastewater. *Journal of American Science*, 10(3): 98-108.

El-Helow, E. R., Badawy, M. E., Mabrouk, M. E., Mohamed, E. A., & El-Beshlawy, Y. M. (2013). Biodegradation of chlorpyrifos by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain, Y242. *Bioremediation Journal*, 17(2): 113-123.

El Mrabet, K. (2007). Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la références bibliographiques 50 spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé. Thèse de doctorat: Université pierre et marie curie.

El-Sayed, G. M., Abosereh, N. A., Ibrahim, S. A., AbdEl-Razik, A. B., Hammad, M. A., & Hafez, F. M. (2018). Identification of Gene Encoding Organophosphorus Hydrolase (OPH) Enzyme in Potent Organophosphates-degrading Bacterial Isolates. *Science and Technology*, 11(4): 175-189.

Erguvena, G. O., Yildirima, N., & Adarb, E. (2017). The ability of *Phanerochaete chrysosporium* (ME446) on chemical oxygen demand remediation in submerged culture medium supplemented with malathion insecticide. *Desalination and Water Treatment*, 94: 231-235.

-F-

Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., & Rachiq, S. (2014). Application de plan de Plackett Et Burman dans le criblage des paramètres agissants sur le processus d'hydrodistillation de Thym du Maroc (*Thymus vulgaris* L.). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6(3): 530-540.

Fang, L., Shi, T., Chen, Y., Wu, X., Zhang, C., Tang, X., ... & Hua, R. (2019). Kinetics and catabolic pathways of the insecticide chlorpyrifos, annotation of the degradation genes and

characterization of enzymes TcpA and Fre in *Cupriavidus nantongensis* X1T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (8): 2245–2254.

Farhan, M., Khan, A., Wahid, A., Ahmad, M., & Ahmad, F. (2012). Biodegradation of chlorpyrifos using indigenous *Pseudomonas* sp. isolated from industrial drain. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11: 1183-1189.

Février, L., Martin-Garin, A., & Leclerc, E. (2007). Variation of the distribution coefficient (Kd) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity*, 97(2-3): 189-205.

Fulekar, M. H., & Geetha, M. (2008). Bioremediation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* using scale up technique. *Journal of Applied Biosciences*, 12: 657-60.

-G-

Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6): 497-526.

Ghanem, I., Orfi, M., & Shamma, M. (2007). Biodegradation of chlorphyrifos by *Klebsiella* sp. isolated from an activated sludge sample of waste water treatment plant in damascus. *Folia Microbiologica*, 52(4): 423-427.

Ghosh, S., Das, S. K., Guha, A. K., & Sanyal, A. K. (2009). Adsorption behavior of lindane on *Rhizopus oryzae* biomass: Physico-chemical studies. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1): 485-490.

Gong, T., Liu, R., Che, Y., Xu, X., Zhao, F., Yu, H., … & Yang, C. (2016). Engineering *Pseudomonas putida* KT 2440 for simultaneous degradation of carbofuran and chlorpyrifos. *Microbial Biotechnology*, 9(6): 792-800.

Grebil, G., Novak, S., Perrin Ganier, C., & Schiavon, M. (2001). La dissipation des produits phytosanitaires appliqués au sol. In : Gouy, V., & Carluer, N (Eds). *Ingénieries, Eau, Agriculture, Territoire. Phytosanitaires : transferts, diagnostic et solutions correctives. N° spécial* (2001). France : Edition Cemagref: 197-216.

-H-

Hang, B. J., Hong, Q., Xie, X. T., Huang, X., Wang, C. H., He, J., & Li, S. P. (2012). SulE, a sulfonylurea herbicide de-esterification esterase from *Hansschlegelia zhihuaiae* S113. *Applied* and *Environmental Microbiology*, 78(6): 1962-1968.

Hocinat, A., & Boudemagh, A. (2016). Biodegradation of commercial Ortiva fungicide by isolated actinomycetes from the activated sludge. *Desalination and Water Treatment*, 57(13): 6091-6097.

Howell, C. C., Semple, K. T., & Bending, G. D. (2014). Isolation and characterisation of azoxystrobin degrading bacteria from soil. *Chemosphere*, 95: 370-378.

Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: a review. *Molecules*, 23(9): 2313.

-I-

Idrissi, Y. A., Alemad, A., Aboubaker, S., Daifi, H., Elkharrim, K., & Belghyti, D. (2015). Caractérisation physico-chimique des eaux usées de la ville d'Azilal-Maroc-/ [Physico-chemical characterization of wastewater from Azilal city-Morocco-]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11(3): 556-566.

-J-

Jaouen, T., Dé, E., Chevalier, S., & Orange, N. (2004). Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. *Applied* and *Environmental Microbiology*, 70(11): 6665-6669.

Jiang, B., Jin, N., Xing, Y., Su, Y., & Zhang, D. (2018). Unraveling uncultivable pesticide degraders via stable isotope probing (SIP). *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7): 1025-1048.

John, E. M., Sreekumar, J., & Jisha, M. S. (2016). Optimization of Chlorpyrifos Degradation by Assembled Bacterial Consortium Using Response Surface Methodology. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 25(6): 668-682.

Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. In: Chamy, R., & Rosenkranz, F (Eds). *Biodegradation-life of science*. Rijeka, Croatia: Edition InTechOpen: 290-320.

-K-

Kayeye, D. B. (2014). Caractérisation physico-chimique des eaux usées d'abattoir en vue de la mise en œuvre d'un traitement adéquat: cas de «elakat» bukavu RD Congo. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 12(2): 491-498.

Keum, Y. S., Kim, J. H., Kim, Y. W., Kim, K., & Li, Q. X. (2002). Photodegradation of diafenthiuron in water. *Pest Management Science*, 58(5): 496-502.

Khalid, M., Rasul, S., Hussain, J., Ahmad, R., Zia, A., Bilal, M., ... & Naqvi, T. A. (2016). Biodegradation of Organophosphorus Insecticides, Chlorpyrifos, by *Pseudomonas putida* CP-1. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(5):1453-1458.

Kushner, D. J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In: Hochstein L.I., &Vreeland. *The biology of halophilic bacteria*. Boca Raton, États-Unis : Edition: CRC Press: 87-103.

-L-

La Jeunesse, I., Amiot, A., Landry, D., Jadas-Hécart, A., Communal, P. Y., Ballouche, A., & Mounereau, L. (2015). Transferts de pesticides dans un petit bassin versant viticole des coteaux du Layon: importance des pics lors du ruissellement. *Norois*, 2015/2(235): 67-86.

Landry, D., Dousset, S., & Andreux, F. (2006). Leaching of oryzalin and diuron through undisturbed vineyard soil columns under outdoor conditions. *Chemosphere*, 62(10): 1736-1747.

Lan, W. S., Lu, T. K., Qin, Z. F., Shi, X. J., Wang, J. J., Hu, Y. F., ... & Liu, Z. (2014). Genetically modified microorganism *Spingomonas paucimobilis* UT26 for simultaneously degradation of methyl-parathion and γ-hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology*, 23(5): 840-850.

Lei, Y., Mulchandani, A., & Chen, W. (2005). Improved degradation of organophosphorus nerve agents and p-nitrophenol by *Pseudomonas putida* JS444 with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology Progress*, 21(3): 678-681.

Li, M., Yu, X., Wang, F., Zhai, C., Shen, W., Yu, X., ... & Ma, L. (2015). Secretory expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Yarrowia lipolytica Polg*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(10): 691-697.

Li, S., Zhao, J., Huang, R., Santillo, M. F., Houck, K. A., & Xia, M. (2019). Use of high-throughput enzyme-based assay with xenobiotic metabolic capability to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphorous pesticides. *Toxicology in Vitro*, 56: 93-100.

Liu, Z., Hong, Q., Xu, J. H., Jun, W., & Li, S. P. (2006). Construction of a genetically engineered microorganism for degrading organophosphate and carbamate pesticides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58(2): 65-69.

Liu, Z. Y., Chen, X., Shi, Y., & Su, Z. C. (2012). Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Advanced Materials Research*, 356: 676-680.

Luo, W., Zhao, Y., Ding, H., Lin, X., & Zheng, H. (2008). Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 158(1): 208-214.

-M-

Malviya, B. J., Jadeja, V. J., Sherathiya, H. M., Parakhia, M. V., Tomar, R. S., Vaja, M. B., & Sherathia, D. N. (2015). Bioremediation of glyphosate by bacteria isolated from glyphosate contaminated soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(4): 3315-3320.

Maya, K., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., & Dubey, S. K. (2011). Kinetic analysis reveals bacterial efficacy for biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP. *Process Biochemistry*, 46(11): 2130-2136.

McGrath, J. W., Chin, J. P., & Quinn, J. P. (2013). Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6): 412-419.

-N-

Navarro, S., Vela, N., & Navarro, G. (2007). An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(3): 357-375.

-O-

Observatoire Régional de la Santé Rhône-Alpes(ORS). (2016). Les pesticides. Disponible sur :https://www.cancerenvironnement.fr/Portals/0/Documents%20PDF/ORS%20Pesticides.pdf.

Ortiz Hernandez, M. L., Sanchez-Salinas, E., Castrejon Godinez, M. L., Dantan Gonzalez, E., & Popoca Ursino, E. C. (2013). Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: opportunity for waste, soils and water cleaning. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 85-104.

-P-

Pailan, S., Gupta, D., Apte, S., Krishnamurthi, S., & Saha, P. (2015). Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhattai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103: 191-195.

Porto, A. L. M., Melgar, G. Z., Kasemodel, M. C., & Nitschke, M. (2011). Biodegradation of pesticides. In: Stoytcheva, M (Ed). *Pesticides in the modern world-pesticides use and management*. Rijeka, Croatia: Edition IntechOpen: 408-438.

-R-

Rahmoune, H., Mimeche, F., Guimeur, K., & Cherif, K. (2018). Utilisation des pesticides et perception des risques chez les agriculteurs de la région de Biskra (Sud Est d'Algérie). *International Journal of Environmental Studies*, 75: 1-12.

Rayu, S., Nielsen, U. N., Nazaries, L., & Singh, B. K. (2017). Isolation and molecular characterization of novel chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol-degrading bacteria from sugarcane farm soils. *Frontiers in Microbiology*, 8: 518.

Reuveni, M. (2001). Activity of trifloxystrobin against powdery and downy mildew diseases of grapevines. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23(1): 52-59.

Rezaie, E., Latifi, A. M., & Mirzaei, M. (2018). Activity improvement of organophosphorus hydrolase enzyme by error prone PCR method. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 5(3): 100-104.

Richards, S. M., & Kendall, R. J. (2002). Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(9): 1826-1835.

-S-

Sarwar, M. (2015). Commonly available commercial insecticide formulations and their applications in the field. *International Journal of Materials Chemistry and Physics*, 1(2): 116-123.

Schrack, D., Coquil, X., Ortar, A., & Benoit, M. (2009). Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l'Agriculture Biologique. *Innovations Agronomiques*, 4: 259-268.

Sehnem, N. T., Souza-Cruz, P., Peralba, M. D. C. R., & Ayub, M. A. Z. (2009). Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(1): 67-72.

Sharma, A., Pandit, J., Sharma, R., & Shirkot, P. (2016). Biodegradation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas Resinovarans* Strain AST2. 2 Isolated from Enriched Cultures. *Current World Environment*, 11(1): 267.

Sharma, A. K., Pandit, J., Gautam, V., & Shirkot, P. (2019). Optimization of culture conditions for maximizing Extracellular Organophosphorus hydrolase activity in *Pseudomonas* strains with Chlorpyrifos degradation potential. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1): 322-326.

Sharma, T., Rajor, A., & Toor, A. P. (2014). Degradation of imidacloprid in liquid by *Enterobacter* sp. strain ATA1 using co-metabolism. *Bioremediation Journal*, 18(3): 227-235.

Shimazu, M., Mulchandani, A., & Chen, W. (2001). Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(4): 318-324.

Simunic, I., Mesic, M., Sraka, M., Likso, T., & Coga, L. (2011). Influence of drainpipe spacing on nitrate leaching and maize yield. *Cereal Research Communications*, 39(2): 273-282.

Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3): 428-471.

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, D. K. (2008). Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1): 35-40.

Syakti, A. D. (2018). Marine Bioremediation in Indonesia: Die Before Blossom. *Omni-Akuatika*, 14(3): 117-127.

-T-

Ternan, N. G., Mc Grath, J. W., Mc Mullan, G., & Quinn, J. P. (1998). Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5): 635-647.

-V-

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.

Vijayalakshmi, P., & Usha, M. S. (2012). Optimization of chlorpyrifos degradation by *Pseudomonas putida*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(5): 2532-2539.

-W-

Walia, A., Mehta, P., Guleria, S., Chauhan, A., Shirkot, C.K. (2014). Impact of fungicide mancozeb at different application rates on soil microbial populations, soil biological processes and enzyme activities in soil. *The Scientific World Journal*, 2014: 1–9.

Wu, H., Shen, J., Wu, R., Sun, X., Li, J., Han, W., & Wang, L. (2016). Biodegradation mechanism of 1H-1, 2, 4-triazole by a newly isolated strain *Shinella* sp. NJUST26. *Scientific Reports*, 6: 29675.

-Y-

Yang, C., Liu, N., Guo, X., & Qiao, C. (2006). Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiology Letters*, 265(1): 118-125.

Yang, C., Song, C., Mulchandani, A., & Qiao, C. (2010). Genetic engineering of *Stenotrophomonas* strain YC-1 to possess a broader substrate range for organophosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11): 6762-6766.

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.

Yarou, B. B., Silvie, P., Komlan, F. A., Mensah, A., Alabi, T., Verheggen, F., & Francis, F. (2017). Plantes pesticides et protection des cultures maraichères en Afrique de l'Ouest (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 21(4): 288-304.

-Z-

Zheng, Y., Long, L., Fan, Y., Gan, J., Fang, J., & Jin, W. (2013). A review on the detoxification of organophosphorus compounds by microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20): 2127-2134.

Zhu, H., & Selim, H. M. (2002). Retention and mobility of deltamethrin in soils: 1. Adsorption-desorption 1. *Soil Science*, 167(8): 513-523.

ANNEXES

Annexe I

Composition de l'eau physiologique

Eau physiologique	
NaCl	9 g
Eau distillée	1000ml

Gélose nutritive (GN)

GN	
Agar agar	**16 g**
Eau distillé	**1000 ml**

Bouillon nutritif (BN)

BN	
Bouillon nutritive déshydraté	**20 g**
Eau distillé	**1000 ml**

Annexe II

Cinétique de croissance des souches bactériennes en absence des deux pesticides (Témoin)

Souches	DO (T=0h)	DO(T=72h)	DO(T=96h)	Taux de croissance(µ) h^{-1}/72h
SB_1	**0.412**	**0.3579**	**0.3090**	**-**
SB_2	**0.2600**	**0.3722**	**0.2980**	**0.006**
SB_3	**0.2441**	**0.2930**	**0.2432**	**0.003**
SB_4	**0.2617**	**0.4903**	**0.3704**	**0.012**
SB_5	**0.3190**	**0.3758**	**0.3010**	**0.002**
SB_6	**0.3127**	**0.4859**	**0.4096**	**0.008**
SB_7	**0.2047**	**0.2636**	**0.2359**	**0.004**
SB_8	**0.299**	**0.5565**	**0.3700**	**0.011**
SB_9	**0.2500**	**0.3665**	**0.2988**	**0.006**

Annexe III

Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence de chlorpyrifos (50 mg/l)

Souches	DO(T= 0h)	DO(T=72h)	DO(T=96h)	Taux de croissance(µ) h^{-1}/72h
SB_1	0.1882	0.7290	0.6680	0.040
SB_2	0.2562	0.5400	0.4836	0.015
SB_3	0.1969	0.5300	0.4509	0.023
SB_4	0.2261	0.5160	0.4520	0.018
SB_5	0.2277	0.6200	0.5846	0.024
SB_6	0.2430	0.5322	0.4986	0.017
SB_7	0.1386	0.5512	0.5179	0.041
SB_8	0.2060	0.6417	0.5911	0.029
SB_9	0.1396	0.5783	0.5160	0.044

Annexe IV

Cinétique de croissance des souches bactériennes en présence du flint (50 mg/l)

Souches	DO(T= 0h)	DO(T=72h)	DO(T=96h)	Taux de croissance(µ) h^{-1}/72h
SB_1	0.2026	0.3710	0.3200	0.012
SB_2	0.1928	0.4402	0.3667	0.018
SB_3	0.1700	0.3812	0.2960	0.017
SB_4	0.1870	0.5025	0.4145	0.023
SB_5	0.2098	0.4509	0.3500	0.016
SB_6	0.2226	0.4615	0.3190	0.015
SB_7	0.1600	0.4020	0.4470	0.021
SB_8	0.1502	0.4883	0.4219	0.031
SB_9	0.1320	0.3712	0.3124	0.025

Annexe V

Cinétique de croissance de la souche SB1 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos

[CP]	T=0h	T=48h	T=72h	Taux de croissance(µ) h^{-1}/48h
50 mg/ L	0.1161	0.4052	0.2764	0.052
100 mg/ L	0.0911	0.6019	0.3217	0.117
200 mg/ L	0.0382	0.4407	0.4073	0.220
400 mg/ L	0.0315	0.4870	0.4240	0.301
800 mg/ L	0.2054	0.9363	1.1005	0.074

Annexe VI

Cinétique de croissance de la souche SB8 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en chlorpyrifos

[CP]	T=0h	T=48h	T=72h	Taux de croissance(µ) h^{-1}/48h	Taux de croissance(µ) h^{-1}/72h
50 mg/ L	0.0822	0.2343	0.2760	0.039	0.033
100 mg/ L	0.1255	0.3307	0.3240	0.034	0.022
200 mg/ L	0.0286	0.3369	0.3523	0.225	0.157
400 mg/ L	0.1887	0.4103	0.4662	0.024	0.020
800 mg/ L	0.1304	0.9703	1.1092	0.134	0.104

Annexe VII

Cinétique de croissance de la souche SB4 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en flint

[Flint]	T=0h	T=48h	T=72h	Taux de croissance(µ) h^{-1}/48h
50 mg/ L	0.0884	0.2944	0.2358	0.049
100 mg/ L	0.1207	0.2434	0.2280	0.021
200 mg/ L	0.1450	0.2540	0.2151	0.016
400 mg/ L	0.2183	0.2730	0.2240	0.005
800 mg/ L	0.0318	0.3044	0.2146	0.179

Annexe VIII

Cinétique de croissance de la souche SB8 dans le milieu MMM en présence de différentes concentrations en flint

[Flint]	T=0h	T=48h	T=72h	Taux de croissance(µ) h^{-1}/48h
50 mg/ L	0.0771	0.2385	0.2260	0.044
100 mg/ L	0.0875	0.2420	0.2200	0.037
200 mg/ L	0.1780	0.2490	0.2170	0.008
400 mg/ L	0.2094	0.3320	0.2202	0.012
800 mg/ L	0.0980	0.2658	0.2209	0.036

Annexe IX

Croissance de la souche SB8 dans le milieu MMM à différentes concentrations de NaCl

[NaCl]	T= 0 h	T=24 h	Taux de croissance(µ) h^{-1}
0.5%	0.1407	0.4335	0.086
1%	0.1499	0.4848	0.093
2%	0.1443	0.4330	0.083
3%	0.1316	0.4800	0.110
4%	0.1223	0.3510	0.008

Annexe X

Croissance de la souche SB8 dans le milieu MMM à différentes valeur du pH

pH	T= 0 h	T= 24 h	Taux de croissance(µ) h^{-1}
pH4	0.1292	0.1455	0.005
pH 5	0.1526	0.5767	0.116
pH 6	0.1586	0.4996	0.090
pH 7	0.1717	0.412	0.058
pH 8	0.1517	0.4963	0.095
pH 9	0.1202	0.4596	0.118

Annexe XI

Croissance de la souche SB8 dans le milieu MMM à différentes températures (T°C)

T(°C)	T= 0 h	T= 24 h	Taux de croissance(µ) h^{-1}
28 C°	0.1502	0.4490	0.083
37C°	0.1890	0.4389	0.055
44 C°	0.1639	0.3352	0.044

Annexe XII

Variation de la DBO_5 (mg d'O_2/l)

DBO (mg d'O_2/l)	Chlorpyrifos	Flint
1j	90	32
2j	100	40
3j	130	40
4j	140	48
5j	160	49

Annexe XIII

Quantité d'oxygène dissout (mg/l)

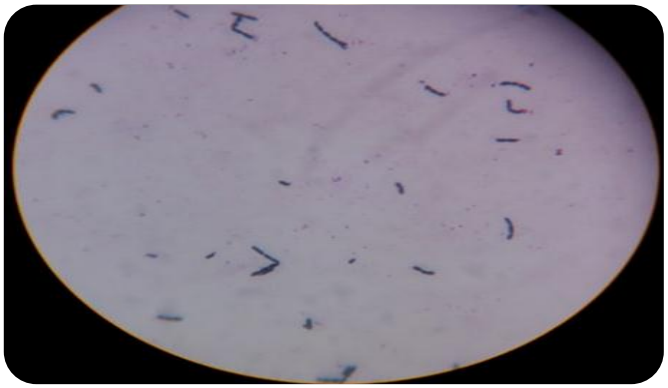
[o_2] mg/l	Chlorpyrifos	Flint
1 j	8,12	8,09
5 j	6,57	6,26

Annexe XIV

Lecture des résultats de la galerie API 20E inoculée par la souche SB8

Annexe XV

Souche SB8 après la coloration de Gram



Présenté par :	Présidente : Dr. LAGGOUNE Souheila
Melle BOUAMOUCHA Ghaniyya	Examinatrice : Mme AMIRA Samiya
Melle BOUDJERIDA Hassiba	Encadreur : Pr. SIFOUR Mohamed

Thème

Effet de quelques paramètres physico-chimiques sur la croissance des souches bactériennes en présence de chlorpyrifos ou du flint

Résumé

Les pesticides sont largement utilisés comme des produits phytosanitaires dans le monde, leurs persistances dans l'environnement après l'application constituent un problème majeur. L'objectif de ce travail est d'identifier puis d'évaluer la capacité de neuf souches isolées de résister et/ou d'utiliser le flint et le chlorpyrifos comme seule source de carbone et d'énergie et de déterminer les facteurs influençant la biodégradation. Après un screening sur le milieu minimum minéral, les souches (SB1, SB4 et SB8) ont révélées capable de dégrader, d'utiliser et de croitre mieux en présence des deux pesticides (50 mg/l). Les souches SB4 et SB1 ont donné une bonne croissance en présence du flint (optimum à 800mg/l) et du chlorpyrifos (optimum 400mg/l), respectivement. D'après les caractères morphologiques et biochimiques, la souche SB8 appartient à l'espèce *Pseudomonas fluorescens* et elle a montré une bonne croissance en présence des deux pesticides. La mesure de la DBO_5 a confirmé qu'il ya une dégradation et une utilisation des deux pesticides par la souche SB8. Le criblage des paramètres à l'aide de la matrice de Plackett-Burman a montré que la biodégradation du chlorpyrifos est affectée positivement par le pH, la période d'incubation et l'extrait de levure et négativement par l'agitation et la concentration du pesticide.

Mots clés : Biodégradation, Chlorpyrifos, DBO_5, Flint, Pesticides, Plackett-Burman.

Abstract

Pesticides are widely used as phytosanitary products in the world, their persistence after their application in the environment represent a major problem .The objective of this work is to identify and then evaluate the ability of nine isolated strains to resist and /or use flint and chlorpyrifos as sole source of carbon and energy and to determine the factors influencing their biodegradation . After a screening on minimum mineral media, the strains SB1, SB4 and SB8 were found to be able to degrade, use and grow better in the presence of both pesticides (50 mg/l). Strains SB4 and SB1 presented better growth in the presence of flint (optimum at 800mg/l) and chlorpyrifos (optimum 400mg/l), respectively. The morphological and biochemical characters of the strain SB8 indicated that it belongs to the species *Pseudomonas fluorescens* and it gave a good growth in the presence of both pesticides. Measurement of BOD_5 confirmed that there is degradation and the use of both pesticides by the SB8 strain. The screening of different parameters using the Plackett-Burman design indicated that the degradation of chlorpyrifos is positively affected by pH, incubation period and yeast extract and negatively by agitation and pesticide concentration.

Key words: Biodegradation, BOD_5, Chlorpyrifos, Flint, Pesticides, Plackett-Burman.

الملخص

تستخدم المبيدات على نطاق واسع كمنتجات للصحة النباتية في العالم، حيث يمثل استمرارها (مقاومتها) في البيئة مشكلة كبيرة. الهدف من هذا العمل هو تحديد ثم تقييم قدرة تسع سلالات معزولة على مقاومة و/أو استخدام مبيد الكلوربيريفوس أو فلينت كمصدر وحيد للكربون والطاقة بالإضافة إلى تحديد العوامل التي تؤثر على تحللهما الحيوي. بعد العزل على وسط الحد الأدنى (معدني) وجد بان السلالات (SB1, SB4, SB8) قادرة على تحليل و استخدام هذه المبيدات بتركيز 50 ملغ / لتر و النمو في وجودها بشكل أفضل. السلالات (SB4 و SBl) أعطت نموا مثاليا في وجود مبيد فلينت (بتركيز 800 ملغ/لتر) و الكلوربيريفوس (بتركيز 400 ملغ/لتر) على التوالي. بعد دراسة الخصائص المورفولوجية و الكيميائية الحيوية للسلالة SB8 التي أظهرت قدرة كبيرة على النمو في وجود كلا المبيدين وجد بانها تنتمي إلى النوع *Pseudomonas fluorescens*. أكد قياس DBO_5 أن هناك تحليلا و استخداما للمبيدين كلوربيريفوس و فلينت من قبل السلالة SB8. ووفقا لفحص المعلمات باستخدام تصميم Placktt-Burman تبين بان تحليل الكلوربيريفوس يتأ ثرايجابيا بالرقم الهيدروجيني و فترة الحضن ومستخلص الخميرة و سلبيا بتركيزالمبيد و الإهتزاز.

الكلمات المفتاحية: التحلل الحيوي، المبيدات، تصميم Plakett-Burman, DBO_5، فلينت، كلوربيريفوس.