

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعة جيجل
Université de Jijel

M.MB.10/16

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية
و علوم التغذية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Recherche des bactéries tolérant ou dégradant les
pesticides**

Membres de Jury

Président : Dr. Khennouf T.

Examinatrice : Dr. Benali S.

Encadreur : Dr. Sifour M.



Présenté par:

Abdelli Madiha

Meribai Noura

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier Dieu le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage et la volonté pour élaborer ce modeste travail.

En second lieu, nous adressons nos remerciements et reconnaissances à nos parents qui nous ont toujours soutenu, et aussi à tous ceux qui ont attribué de prêt ou de loin pour que ce modeste travail puisse voir le jour.

*C'est avec une profonde reconnaissance et considération particulière que nous remercions notre encadreur **Dr. Sifour Mohamed** pour avoir accepté de nous prendre en charge.*

Nous saisissons également cette opportunité pour remercier :

Dr. Khennouf, maître de conférences à l'Université de Jijel, de nous avoir honoré ce travail en acceptant de présider le jury;

Dr. Benali, Maître de conférences à l'université de Jijel, d'avoir accepté d'examiner ce Travail ;

Le chef du département Dr. Roula, pour son aide et sa disponibilité.

Nos remerciements spéciaux à M^{me}. Salima Aissaoui, les mots ne sauraient exprimer notre profonde gratitude pour son aide, ses encouragements....

Enfin, nous ne voudrions pas terminer sans remercier l'ensemble du personnel de laboratoire de Microbiologie pour leur entière disponibilité, coopération ainsi que pour l'ambiance et les bonnes conditions qu'ils nous ont assuré et tous les autres binomes.

ABDELLI MADIHA

MERIBAI NOURA

Sommaire

Introduction.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I.GENERALITES SUR LES PESTICIDES	
I.1. Définition de pesticide.....	2
I.2. La composition et mode de formulations d'un pesticide.....	2
I.3. Les propriétés physicochimiques.....	3
I.4. la classification des pesticides.....	4
I.4.1 .Selon leur cible.....	4
I.4.2. selon leur mode d'action.....	5
I.4.3. Selon leur groupe chimique.....	5
I.5 .la persistance des pesticides.....	8
I.6. Le devenir des pesticides dans l'environnement.....	8
I.7. Processus de transfert des pesticides dans l'environnement.....	9
I.7.1. Transfert des pesticides dans le sol.....	9
I.7.2. Transfert des pesticides vers les eaux.....	10
I.7.3. Transfert des pesticides vers l'atmosphère.....	10
I.8. Problèmes des pollutions par les pesticides.....	11
I.8.1. Impact toxicologique.....	11
I.8.2. Impact éco- toxicologique.....	11
I.9. Gestion des problèmes liés aux pesticides.....	12
II LA DEGRADATION DES PESTICIDES	
II.1. La dégradation abiotique.....	13
II.1.1. La Photodégradation des pesticides.....	13
II.1.2. Hydrolyse.....	13
II.1.3. L'oxydoréduction.....	14
II.2. La dégradation biotique des pesticides.....	14
II.2.1. Aspects cinétiques de la dégradation biologique.....	14
II.2.2. La biodégradation accélérée des pesticides.....	15
II.2.3. Adaptation de la microflore a la dégradation des pesticides.....	15

II .3. La biodégradation de quelques familles des pesticides.....	16
Partie II: Matériels et Méthodes	
I. Matériels.....	19
I .1. Les souches bactériennes.....	19
I.2. Les milieux de culture.....	19
I.3. Appareillage.....	20
I.3. Produits chimiques et réactifs.....	20
II. Méthodes	
II.1. Enrichissement et Isolement des souches résistantes aux pesticides.....	21
II. 2. Purification des souches.....	21
II .3. La Tolérance des souches bactériennes au chlorpyrifos.....	21
II.4. Préparation de l'inoculum bactérien.....	21
II.5. La sélection de souches tolérantes au chlorpyrifos.....	22
II.6. Identification des souches sélectionnées.....	22
II.7. Effet des différentes concentrations du chlorpyrifos sur la croissance.....	23
II.8. Effet de l'addition de glucose sur la biodégradation	23
II.9. Analyse du chlorpyrifos par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)...	23
II.10. Calcul du taux de croissance.....	24
Partie III. Résultats et discussions	
I. Isolement des bactéries.....	25
II. La Tolérance des souches bactériennes au chlorpyrifos.....	25
III. La sélection des souches tolérantes au chlorpyrifos.....	26
VI. Identification des souches sélectionnées.....	27
V. Effet des différentes concentrations du chlorpyrifos sur la croissance.....	28
IV. Effet de l'addition du glucose sur la biodégradation.....	31
Conclusion	34
Références	35
Annexes	

Numéro	Titre	Page
Figure 1	La structure chimique de quelques groupes d'organochlorés	6
Figure 2	structure chimique de quelques groupes d'organophosphorés	7
Figure 3	La structure chimique de quelques groupes de Carbamates	7
Figure 4	la structure chimique de quelques groupes de pyréthriinoïdes	8
Figure 5	Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans l'environnement	9
Figure 6	La dégradation aérobie de chlorpyrifos en TCP, DEP et DETP	18
Figure 7	La déchloration réductrice du TMP	18
Figure 8	La Cinétique de croissance de la souche B 3-1 sur milieu MMM en présence d'une différente concentration de chlorpyrifos	29
Figure 9	La Cinétique de croissance de la souche B 5-2 sur MMM en présence de différente concentration de chlorpyrifos	29
Figure 10	La Cinétique de croissance de la souche S4 sur MMM en présence de différente concentration de chlorpyrifos	30
Figure 11	La croissance de la souche B 3-1 sur milieu MMM avec ou sans glucose	31
Figure 12	La croissance de la souche B5-2 sur milieu MMM avec ou sans glucose	32
Figure 13	La biodégradation du chlorpyrifos en présence et en absence de glucose	32

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Classification des pesticides en fonction de leur cible	5
Tableau 2	Les modes d'action des pesticides sur leur cibles	5
Tableau 3	La persistance de pesticide	8
Tableau 4	les souches bactériennes utilisées et leurs sources	19
Tableau 5	La tolérance de diverses souches aux différentes concentrations de la chlorpyrifos	26
Tableau 6	La croissance de diverses souches en présence du chlorpyrifos (50mg /L)	27
Tableau 7	Les caractéristiques morphologique et biochimique des souches bactériennes	28

BDA: biodégradation accélérée

BN: bouillon nutritif

CO: carbone organique

CP: chlorpyrifos

DEP: Diethyl phosphate

DETP: Diethyl thiophosphate

DDT: dichlorodiphényltrichloroéthane

DO: densité optique

FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

GN: Gélose Nutritive

HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance

H₂S: Sulfure d'hydrogène

K_d: Coefficient de distribution solide-eau

K_H: Constante de Henry

K_{oc}: Coefficient de partage entre la fraction de carbone organique et l'eau

K_{ow}: Coefficient de partage octanol-eau

MMM: Milieu Minéral Minimum

ONPG: Ortho-nitrophényl- β -galactoside

OPD: organophosphorés-dégradants

OPH: organophosphate hydrolase

RM: Rouge de Méthyle

TC: Taux de Croissance

TCP: 3-5-6-trichloro-2-pyridinol

TMP: 3-5-6-trichloro-2- méthoxy-pyridine

VP: Voges Proskauer

Introduction

1

Les pesticides sont des substances chimiques, naturelles ou de synthèse utilisées en agriculture pour lutter contre les différentes sortes de nuisibles (**Zhang et al., 2011**). Leur composition et leur structure sont très variées, de sorte que leurs propriétés physique, chimique et biologique le sont aussi, ce qui explique leurs multiples usages, leur dangers, ainsi que les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols (**Calvet et al., 2005**).

L'utilisation des pesticides en agriculture présente deux aspects aux conséquences totalement opposées. Le premier concerne la réduction des dégâts causés aux cultures par des organismes phytopathogènes et le développement des adventices pour maintenir la productivité alors que le deuxième tient à la nature même des pesticides qui en fait, dans certaines conditions, de possibles polluants (**Marouane, 2014**). Les pesticides sont fréquemment détectés dans tous les compartiments de l'environnement, à savoir les sols, l'atmosphère, les organismes vivants, les eaux de surface et les eaux souterraines. Cette contamination massive par les pesticides menace grandement l'état de santé des écosystèmes, ainsi que la qualité de la ressource en eau et la santé humaine et requiert de ce fait une attention toute particulière (**Maillard, 2014 ; Schulz, 2004**).

Une fois libérés dans l'environnement, tous les pesticides sont susceptibles d'être dégradés et/ou métabolisés. Les taux de dégradation et de dissipation varient beaucoup selon les pesticides et les situations (**Marouane, 2014**).

La dégradation est un processus fondamental pour diminuer la quantité de résidus de pesticide dans le sol. Elle est contrôlée par des facteurs abiotiques et biotiques et implique des interactions entre les différents constituants du sol, les microorganismes présents et les molécules de pesticides (**Maillard, 2014**).

La biodégradation des pesticides appliqués au sol empêche l'accumulation de ces produits chimiques dans l'environnement. Toutefois, les microorganismes dégradant les pesticides sont en majorité des bactéries. Ce sont elle qui le plus souvent sont isolées et caractérisées lors des études sur la dégradation (**Jean-Pascal, 2007**).

Notre travail s'inscrit dans ce contexte et concerne en particulier l'étude de la cinétique de la croissance de quelques bactéries isolées d'un sol agricole et exposées aux différents pesticides. Ce substrat est utilisé dans notre étude comme seule source de carbone et d'énergie. La biodégradation des bactéries sera également testée.

I. GENERALITES SUR LES PESTICIDES

I.1. Définition de pesticide

Un pesticide est une substance émise dans une culture pour lutter contre des organismes nuisibles. C'est un terme générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications (Gdoura, 2013). Ils englobent donc les produits phytosanitaires qui sont utilisés en milieu végétal, agricole le plus souvent, et les produits biocides qui sont utilisés en milieu non agricole pour détruire ou repousser les nuisibles, notamment dans le domaine de la conservation du bois, la désinfection d'objets en milieu hospitalier ainsi que dans certains usages domestiques (Maysaloun, 2008).

I.2. La composition et mode de formulations d'un pesticide

I.2.1. La composition d'une formulation

La formulation est un mélange de matières actives et de produits de formulation permettant de créer un produit efficace. Le fabricant de pesticides élabore la formulation de manière à la rendre sécuritaire, pratique et efficace (Martnez-Carballo et al., 2009).

I.2.1.1. Matière active

Une matière active est la partie de la formulation d'un pesticide qui produit les effets Souhaités (l'effet toxique), un pesticide peut contenir plusieurs matières actives (Kumar et al., 2014).

I.2.1.2. Produit de formulation

Un produit de formulation est une matière inerte (non active) qui est ajoutée à la matière active. Il facilite l'entreposage, la manipulation ou l'application du produit. Le produit de formulation se présente sous forme liquide ou solide (Martnez-Carballo et al., 2009).

- **Un diluant** : qui est une matière solide ou un liquide incorporé à une préparation et destiné à en abaisser la concentration en matière active. L'eau, l'huile, les solvants ou l'argile sont des exemples de diluant (support). Certains pesticides ne requièrent aucun support. On les appelle des formulations prêtes à l'emploi (Gdoura, 2013).

- **Adjuvant** : qui sont des substances dépourvues d'activité biologique, mais susceptibles de modifier les caractéristique physique ou chimique du pesticide, Il peut s'agir des émulsifiants, d'adhésifs, Tampons, stabilisants (Gdoura, 2013).

I.2.2. Mode de formulations

Les formulations de pesticides peuvent se présenter sous deux formes : d'une part, les solutions solides, avec les poudres mouillables, les granulés à disperser et les micro-granulés et, d'autre part, les solutions liquides, avec les concentrés solubles, les suspensions concentrées, les concentrés émulsionnables et les émulsions concentrées. Au-delà des spécificités de ces préparations liquides, il s'agit de solutions de matière active à diluer dans l'eau. De nos jours, les solutions liquides sont préférées du fait qu'elles présentent un risque moins important de contamination pour l'applicateur, notamment lors de la phase de mélange, que les solutions en poudre (James-Tano, 2011 ; Kumar et al., 2014).

I.3. Les propriétés physico-chimiques

La grande variété structurale des pesticides est à l'origine d'une grande diversité de propriétés physico-chimiques dont dépend leur comportement dans les différents compartiments de l'environnement, le sol, les eaux et l'atmosphère. Les principales propriétés physico-chimiques sont présentées ci-dessous (Maillard, 2014).

I.3.1. Solubilité

La solubilité d'une molécule dans l'eau ou dans les solvants organiques traduit son aptitude à se solubiliser (en mg/L). Les valeurs de solubilité des pesticides dépendent de la composition et de la structure chimique des molécules. Comme elles sont très diverses, les valeurs de solubilité le sont aussi (Arias-Estévez et al., 2008; Marouane, 2014). L'importance de solubilité des pesticides dans l'environnement est qu'un pesticide qui est très soluble dans l'eau ne pas accumuler dans le sol en raison de sa forte nature polaire. Cela donne à penser qu'il va se dégrader par hydrolyse qui est une réaction favorisée dans l'eau (James-Tano, 2011).

I.3.2. Le coefficient de partage

Le coefficient de partage d'un composé organique entre l'octanol et l'eau est défini par le rapport de ses concentrations dans les deux phases à l'équilibre (coefficient sans dimension) (Diop, 2013).

$$\text{Log } K_{ow} = \text{Log} (C_{oct}/C_{eau})$$

Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. Quand le log K_{ow} est positif, le soluté est dit lipophile (hydrophobe), à l'inverse si K_{ow} est négatif, le soluté est dit hydrophile. Le K_{ow} rend compte de la tendance d'un polluant à se solubiliser et s'accumuler dans les membranes des organismes vivants (Marouane, 2014).

I.3.3. Constante de Henry (KH)

Elle correspond au rapport, à l'équilibre, des concentrations d'un composé organique dans l'air et dans une solution aqueuse en $\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ (Diop, 2013). La constante de Henry peut servir à estimer la tendance d'un produit à se volatiliser et donc à passer dans l'atmosphère à partir de la phase aqueuse du sol. Il a été montré que les pesticides ayant une pression de vapeur très élevée se volatilisent plus facilement (James-Tano, 2011).

I.3.4. Coefficient d'adsorption (K_d)

Le coefficient de distribution solide/liquide (K_d) est le ratio entre la quantité de pesticide adsorbée sur le sol et la concentration en pesticide en solution à l'équilibre (Diop, 2013).

$$K_d = \frac{\text{Quantité de pesticide adsorbée par unité de masse}}{\text{Concentration de pesticide de la solution à l'équilibre}}$$

Un coefficient de distribution basse indique que plus du pesticide est en solution; une valeur plus élevée indique que le pesticide est plus fortement adsorbé au sol. Il est possible de calculer un coefficient normalisé pour le contenu en carbone organique (CO) de sol (James-Tano, 2011).

$$K_{oc} = (K_d / \text{CO}) \cdot 100$$

Plus la valeur du K_d (ou du K_{oc}) est grande, plus l'adsorption du pesticide est importante, plus sa mobilité est faible et moins les risques de contamination des eaux souterraines seront élevés (Mamy et al, 2008).

I.4. la classification des pesticides

Une grande variété de pesticides est offerte. On peut les classer de plusieurs façons. Les groupements les plus courants sont basés sur les éléments suivants (Maele-Fabry et al., 2013):

- les organismes nuisibles cibles;
- le mode d'action;
- la famille chimique.

I.4.1. Selon leur cible

La façon la plus courante de regrouper les pesticides est en fonction de l'organisme nuisible qu'ils doivent maîtriser. Les types de pesticides courants et les groupes d'organismes nuisibles qu'ils contrôlent sont présentés au tableau (1) (James-Tano, 2011).

Tableau 1. Classification des pesticides en fonction de leur cible (Arias-Estévez et al., 2008).

Classification du pesticide	Cibles
Les insecticides	Les insectes
Les herbicides	Les mauvaises herbes
Les rodenticides	Les rongeurs
Les fongicides	Les champignons
Les molluscicides	Les limaces et les escargots
Les bactéricides	Les bactéries
Les virucides	les virus

I.4.2. Selon leur mode d'action

Dans ce type de classification, les pesticides sont classés en fonction de la manière dont ils agissent pour obtenir l'effet désiré, le tableau (2) résume bien les différents types d'activité existants (Gdoura, 2013).

Tableau 2. Les modes d'action des pesticides sur leur cibles (Bonneyoy, 2012).

Herbicides	
de contact	Agit sur les parties de la plante avec lesquelles il entre en contact.
Systématique	Absorbé par la plante, se déplace à l'intérieur de celle-ci.
Sélectif	Ne contrôle que certaines plantes traitées.
No-sélectif	Contrôle toutes les plantes traitées.
Fongicide	
Préventif	Protège la plante en empêchant que la maladie ne se développe.
Curatif	Réprime une maladie qui est déjà développée.
Insecticide	
De contact	Agit lorsque l'insecte entre en contact avec le produit.
D'inhalation	Agit lorsque l'insecte respire le produit.
D'ingestion	Agit lorsque l'insecte se nourrit du produit.

I.4.3. Selon leur groupe chimique

Les pesticides peuvent être classés de différentes façons, mais l'un des plus utilisés est fonction de leur composition chimique (nature chimique des ingrédients actifs), les matières actives des pesticides sont regroupées en deux catégories: inorganique et organique. Les pesticides inorganiques ne contiennent pas de carbone. Ils sont habituellement composés de minéraux comme

le cuivre ou le soufre, ou encore des sels de ces minéraux. Les pesticides organique sont classés en quatre groupes principaux à savoir; organochlorés, organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes (Shekhar-Pundir et Chauhan, 2012 ; Ortiz-Henandez et al., 2013). Il faut noter que plusieurs familles chimiques peuvent être utilisées pour une même cible et qu'une même famille chimique peut regrouper des substances dont les cibles, les modes et les mécanismes d'action sont différents : par exemple les carbamates peuvent être des insecticides, des herbicides ou des fongicides (Maele-Fabry et al., 2013).

L4.3.1. Pesticides organochlorés

Les pesticides organochlorés sont des composés organiques avec cinq ou plusieurs atomes de chlore. Les organochlorés ont été les premiers pesticides organiques synthétiques utilisés depuis 1950 (Agarry et al., 2013). La plupart d'entre eux ont été largement utilisés comme insecticides pour le contrôle d'une large gamme des insectes, et ils ont un effet résiduel à long terme dans l'environnement car ils sont résistants à la plupart des dégradations biotique et abiotique. Les insecticides organochlorés agissent comme perturbateurs du système nerveux conduisant à des convulsions et une paralysie de l'insecte et sa mort éventuelle. Certains exemples représentatifs des pesticides organochloré couramment utilisées (Figure1) sont le DDT, le lindane, l'endosulfan, aldrine, dieldrine et le chlordane (James-Tano, 2011).

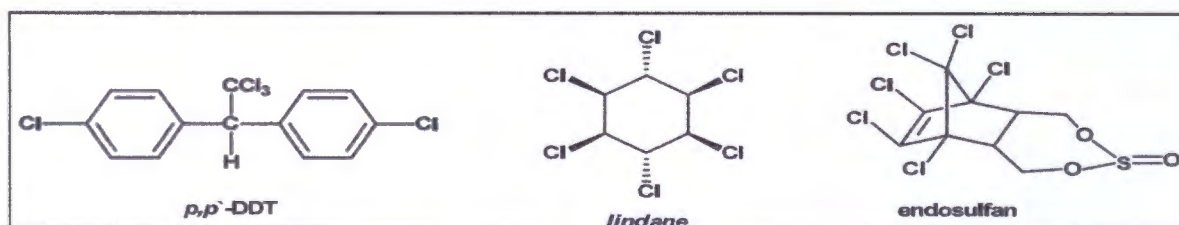


Figure 1. La structure chimique de quelques groupes d'organochlorés (James-Tano, 2011).

L4.3.2. Organophosphorés

Les organophosphorés ont été développés à partir des années 1970, pour remplacer les organochlorés désormais interdits. Les organophosphorés incluent tous les insecticides contenant du phosphore (structure générale incluant un groupe P=O ou P=S). Généralement les plus toxiques de tous les pesticides mais le moins persistants. Leur toxicité est basée sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7), (la famille des carbamates agit également sur cette enzyme mais selon un mécanisme différent) (Gdoura, 2013) qui est essentiel pour le fonctionnement du système nerveux central (SNC), des humains et des insectes. Cela se traduit par l'accumulation de l'acétylcholine, neurotransmetteur, qui interfère avec les réponses musculaires et provoque les

dysfonctionnements des voies respiratoires (Shekhar-Pundir et Chauhan, 2012). Les organophosphorés largement utilisés comprennent le parathion, le chlorpyrifos, le malathion (Figure 2), et le diaznon (James-Tano, 2011).

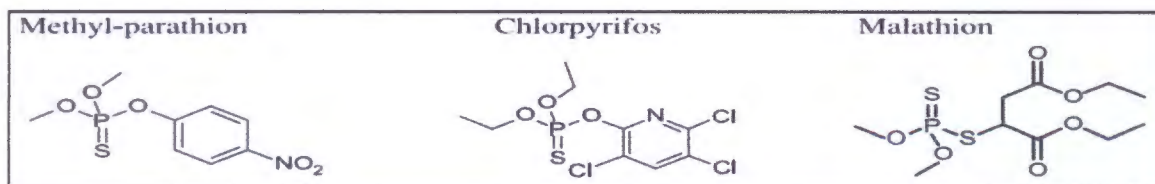


Figure 2. La structure chimique de quelques groupes d'organophosphorés (Sutherland et al., 2004).

L4.3.3. Carbamates

Les carbamates sont des esters de N-méthyl carbamate (Figure 3), un groupe de pesticides qui agit principalement par inhibition de l'enzyme acetylcholinestrase (Gdoura, 2013). Les carbamates sont utilisés pour lutter contre les insectes et les nématodes dans le sol. Leur toxicité pour les mammifères est très élevée même s'ils ne sont pas aussi persistants que les organochlorés (Ortiz-Henandez et al., 2011).

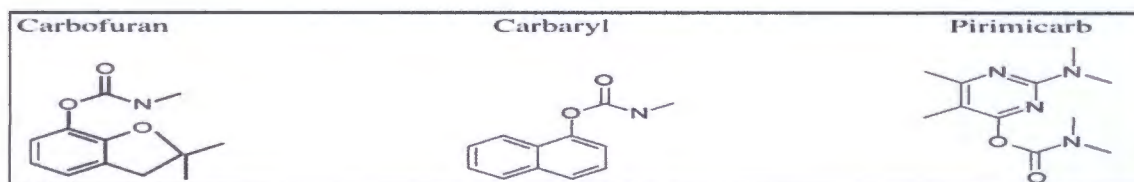


Figure 3. La structure chimique de quelques groupes de Carbamates (Sutherland et al., 2004).

L4.3.4. Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des analogues synthétiques des pyréthrines naturelles; un produit de fleurs de plantes de pyrèthre (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Le pyrèthrine est instable à la lumière solaire tandis que les pyréthrinoïdes sont assez stables et sont efficaces contre un large spectre d'insectes. Les composants insecticides des fleurs de pyrèthre sont les esters optiquement actifs dérivés de (+) - acide trans-chrysanthémique et (+) - acide trans-perméthrine (Savadog, 2001; Grant et al., 2002). Les analogues synthétiques des pyréthrines naturelles (pyréthroïdes) ont été développés par la modification de la structure de pyrèthrine en introduisant un groupement phénoxy et son remplacement par des hydrogènes avec des halogènes, afin de conférer une stabilité dans le même temps en conservant les propriétés de base de pyréthrines. Les pyréthroïdes synthétiques les

plus couramment utilisés comprennent la perméthrine, la cyperméthrine et la deltaméthrine (James-Tano, 2011).

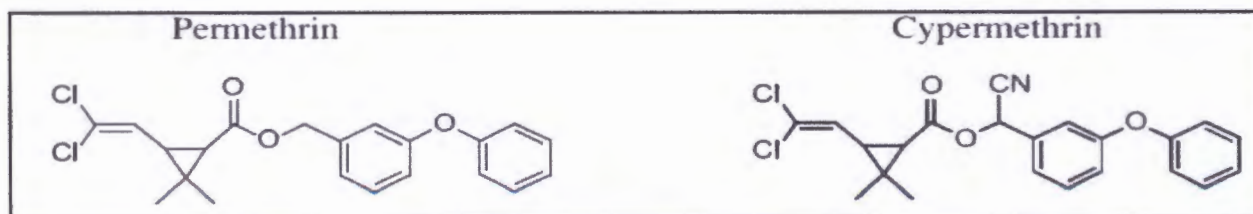


Figure 4. La structure chimique de quelques groupes de pyrèthrinoïdes (Sutherland et al., 2004).

I.5. la persistance des pesticides

Initialement, la notion de persistance a été utilisée pour les pesticides; elle reflète la capacité de la substance à ne pas être décomposée ou transformée par des processus physiques, chimiques et biologiques. La persistance d'un pesticide est mesurée en termes de demi-vie, ou le temps en jours requis pour un pesticide à se dégrader dans le sol à la moitié de sa quantité appliquée. Les pesticides peuvent être divisés en trois catégories basées sur des demi vies : non persistant, modérément persistant, pesticides persistants (tableau 3) (Gavrilescu, 2005; Navarro et al., 2007).

Tableau 3. La persistance de pesticides (Gavrilescu, 2005).

degré de persistance	demi-vie
Non persistant	moins de 30 jours
modérément persistant	30 à 100 jours
pesticides persistants	plus de 100 jours

I.6. Le devenir des pesticides dans l'environnement

Arrivés au sol, les pesticides peuvent être retenus par les minéraux et la matière organique, transporté dans l'eau et dans l'air, et transformé à des degrés divers. Ces processus contribuent au devenir des pesticides et sont le résultat de plusieurs phénomènes intervenant simultanément ou successivement. A leur tour ces phénomènes mettent en jeu plusieurs propriétés de façon plus au moins complexes selon leurs nombre et leurs interactions mutuelles (Arias-Estévez et al., 2008). Le devenir d'un pesticide dans le sol dépend de 4 facteurs essentiellement: le climat, le sol, les propriétés moléculaires et les pratiques agricoles (Gdoura, 2013). Les pesticides peuvent alors être soumis à différents processus (Van der Werf, 1996):

- dégradation par les micro-organismes ;
- dégradation chimique (p. ex. par hydrolyse) ;

I.7.2. Transfert des pesticides vers les eaux

I.7.2.1. La lixiviation

La lixiviation est un mode de transport vertical des intrants chimiques vers les horizons profonds du sol qui peuvent même atteindre la nappe phréatique. Ce type de transport est fortement influencé par la pluviométrie et la structure du sol (Navarro et al., 2007). Le transfert par lixiviation peut causer la pollution des eaux souterraines. L'importance de cette pollution dépendra entre autres des propriétés du pesticide, de celles du sol, de la vitesse d'infiltration et de l'épaisseur de la zone non saturée (Van der Werf, 1996).

I.7.2.2. Le ruissellement

Le ruissellement peut être défini comme le mouvement à la surface du sol de l'eau et des matières dissoutes et suspendues qu'elle contient éventuellement. Cet écoulement peut entraîner des pesticides dissous, en suspension ou adsorbés sur les sédiments (Van der Werf, 1996). L'importance du phénomène varie selon la précipitation (intensité, durée), le sol (stabilité structurale), la pente et le couvert végétal de celle-ci (Marouane, 2014).

I.7.3. Transfert des pesticides vers l'atmosphère

I.7.3.1. Volatilisation

C'est l'une des causes principales de fuites de pesticides hors de la zone cible, notamment quand les traitements visent la surface du sol ou celle des végétaux (Van der Werf, 1996). La durée et l'intensité des émissions vers l'atmosphère sont très variables selon des facteurs qui se regroupent en trois catégories: caractéristiques aérosols, à savoir la volatilité et la viscosité du produit formulé; techniques et équipements d'application; conditions climatiques lors de l'application (la vitesse et la direction du vent, la température, l'humidité du sol) (Marouane, 2014).

I.7.3.2. L'érosion éolienne

Sa contribution à la contamination de l'atmosphère n'est pas la plus importante ni la plus étudiée. Cependant, certains pesticides peuvent être soumis à ce processus bien que les quantités émises soient faibles par rapport aux pertes par volatilisation (Maillard, 2014).

I.8. Problèmes des pollutions par les pesticides

l'utilisation des pesticides engendre un certain nombre de risques à l'égard de la composition chimique de l'air, de l'eau et du sol qui se traduisent par des pollutions dont les conséquences toxicologiques (pour l'homme) et écotoxicologiques (pour les organismes vivants autres que l'homme) peuvent être préjudiciables à la qualité de l'environnement (Mamy et al., 2008).

I.8.1. Impact toxicologique

Les pesticides peuvent se retrouver dans l'organisme humain directement par ingestion, inhalation ou pénétration cutanée ou indirectement par l'intermédiaire des sols, des poussières, d'eau ou d'aliments contaminés. La toxicité, et notamment la toxicité chronique, se manifeste par des effets très divers (Diop, 2013). Pour ce qui est de l'impact sur l'homme, on doit prendre en compte, outre la toxicité proprement dite (Van der Werf, 1996) :

- pathologies affectant certains organes (foie, reins, poumons),
- allergies,
- effets neurotoxiques (Parkinson, Alzheimer)
- diminution de l'immunité,
- effets cancérogènes,
- effets tératogènes (malformations des embryons) et mutagènes (transformation du matériel génétique),
- impact sur la fécondité,
- troubles hormonaux.



I.8.2. Impact éco- toxicologique

I.8.2.1. Contamination des eaux

Les pesticides entrent dans l'eau par ruissellement à partir des surfaces traitées, lixiviation au cours des infiltrations, ou par l'application directe dans les eaux de surface, dans certains cas, comme pour le contrôle des moustiques. Les eaux superficielles étaient généralement plus polluées que les eaux souterraines surtout près des sites agricoles ou urbaines. L'eau contaminée par les pesticides constitue une grande menace à la forme de vie aquatique. Elle peut affecter les plantes aquatiques, réduire l'oxygène dissous dans l'eau et peut provoquer des changements physiologiques chez les populations de poissons (Van der Werf, 1996; Isra et al., 2016).

I.8.2.1. Contamination des sols

Même si la plupart des traitements sont appliqués sur les parties aériennes des plantes, une bonne part du produit atteint toujours le sol, où vivent des bactéries, des champignons, des algues, des vers de terre et des insectes, entre autres. On doit faire particulièrement attention aux effets nocifs des pesticides sur la microflore du sol, de très nombreux travaux ont montré que les traitements faits correctement ont un effet limité sur le métabolisme microbien du sol, car les espèces les plus sensibles peuvent être remplacées par de plus résistantes. L'exposition aux pesticides peut également causer des effets sur les plantes terrestres en plus de tuer les plantes non ciblées (**Van der Werf, 1996; Isra et al., 2016**).

I.9. Gestion des problèmes liés aux pesticides

Les initiatives de lutte contre les problèmes liés aux pesticides et autres produits chimiques ne datent pas d'hier. Ainsi, elles ont précédé l'émergence du mouvement environnementaliste du début des années 1970. Les pesticides ont occupé une place centrale dans ces premières initiatives, suite à la mise en évidence des risques qu'ils provoquent sur l'environnement. Les années 1970 et 1980 ont vu l'adoption d'un certain nombre de conventions et d'initiatives concernant les produits chimiques en général et les pesticides en particulier, tant au niveau international que régional (**Konradsen et al., 2003; Ait kaki, 2014**). Parmi ces codes et conventions internationaux, on peut citer :

- Le Code de conduite international pour la distribution et l'utilisation des pesticides, élaboré par la FAO et adopté en 1985. Il demeure après sa révision le plus important en matière de gestion des pesticides (**Konradsen et al., 2003**)
- la Convention de Rotterdam , sur la procédure de consentement préalable en connaissance de cause applicable à certains produits chimiques et pesticides dangereux qui font l'objet d'un commerce international, adoptée en 1998 et entrée en vigueur en 2004 (**OMS, 2013**).
- la Convention de Stockholm, sur les polluants organiques persistants, adoptée en 2001 et entrée en vigueur en 2004. Pour éliminer progressivement la production et l'utilisation, ou autrement éliminer, 12 polluants organiques persistants, Neuf d'entre eux sont des pesticides : aldrine, chlordane, DDT, dieldrine, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène, mirex et toxaphène (**Konradsen et al., 2003**).

II. LA DEGRADATION DES PESTICIDES

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

II.1. La dégradation abiotique

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

II.1.1. La Photodégradation des pesticides

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

II.1.2. Hydrolyse

L'hydrolyse est la rupture des liaisons dans une molécule par réaction avec l'eau. Typiquement un composé est modifié par une réaction hydrolytique, par le remplacement de certains groupes chimiques d'un composé avec un groupe hydroxyle. Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par la présence d'ions hydrogène ou hydroxyde, et par conséquent la vitesse de réaction est fortement dépendante du pH du système (Gavrilescu, 2005). La plupart des organophosphorés et les carbamates se sont très sensibles à une réaction d'hydrolyse dans des conditions alcalines.

Un pesticide qui est très soluble dans l'eau aura tendance à ne pas accumuler dans le sol en raison de sa nature polaire plus importante (**James-Tano, 2011**).

II.1.3. L'oxydoréduction

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

II.2. La dégradation biotique des pesticides

II.2.1. Aspects cinétiques de la dégradation biologique

La dégradation biotique des pesticides dans le sol et dans les eaux, est réalisée par la microflore présente dans ces milieux (notamment des bactéries) et consiste en des transformations chimiques dues à leurs systèmes enzymatiques (**Jean-Pascal, 2007**). Dans le premier cas, on parle de métabolisme direct. Le composé organique est utilisé par les microorganismes comme source de carbone et d'énergie à des fins de croissance. Le stade ultime correspond à une minéralisation du composé organique (atrazine, organophosphorés...) se traduisant généralement par l'apparition de CO₂, d'H₂O (**Kaufmann, 2004; Guimont, 2005**).

Dans le second cas, la transformation partielle de la substance active ne permet pas de récupérer l'énergie nécessaire à la croissance des souches microbiennes. On parle alors de Co-métabolisme. (**Gdoura, 2013**) La dégradation ultime de la molécule nécessite la présence d'un consortium microbien composé par des populations spécialisées chacune dans une étape métabolique bien spécifique (**Calvet et al., 2005**). Cependant, ce mécanisme reste partiel et entraîne par la suite une accumulation de métabolites qui peuvent être plus toxiques et plus mobiles que le pesticide (**Soulas, 1985**).

D'autre part, la conjugaison est un processus au cours duquel des pesticides interagissent entre eux ou avec d'autres molécules (sucre ou acide aminé), pour la désintoxication, la compartimentation, et ou la minéralisation (**Van Eerd et al., 2003; Ortiz-Henandaz et al., 2013**). Les réactions

chimiques étant catalysées par des enzymes exocellulaires. Lorsque la conjugaison réunit plus de deux molécule on parle de condensation (**Jean-Pascal, 2007**).

La cinétique de dégradation est sous la dépendance de différents paramètres : (i) les facteurs climatiques, (ii) la taille initiale de la microflore dégradante, (iii) la dose de pesticide appliquée, (iiii) la fréquence et le nombre des apports du produit phytosanitaire. (**Aislabie et Lloyd-Jones, 1995**).

II.2.2. La biodégradation accélérée des pesticides

L'application répétée de pesticides sur les parcelles agricoles peut conduire à l'adaptation de la microflore du sol qui acquiert les gènes codant les enzymes cataboliques spécifiques responsables de la dégradation des pesticides (**Arbeli et Fuentes, 2007**). L'adaptation de la microflore du sol conduit à la mise en place du phénomène de biodégradation accélérée (BDA) qui se caractérise par la diminution de la demi-vie des molécules actives (**Rouchaud et al., 2000**). Du point de vue agronomique, la BDA peut, dans certains cas, être dommageable en diminuant l'efficacité du traitement phytosanitaire. Du point de vue environnemental, la BDA est par contre intéressante parce qu'elle réduit la persistance du produit phytosanitaire dans le sol et limitant ainsi son transfert vers les autres compartiments de l'environnement, notamment les eaux de surface et souterraines. La BDA représente donc à la fois un enjeu agronomique et environnemental (**Calvayrac, 2001; Yadav et al., 2015**).

II.2.3. Adaptation de la microflore a la dégradation des pesticides

La biodégradation d'un grand nombre de composés chimiques de synthèse est très souvent accomplie par des voies métaboliques préexistantes qui permettent aux microorganismes d'utiliser des substrats naturels. Cette prédisposition enzymatique reposerait sur la similitude de certains composés naturels d'origine végétale avec certaines molécules phytosanitaires, appelées molécules analogues (**Calvayrac, 2011**), certains pesticides sont des répliques synthétiques de substances naturelles à activité biologique; c'est le cas des acides phénoxyacétiques herbicides dont la structure simule celle d'une hormone végétale (auxine ou acide indolacétique). C'est aussi le cas des pyréthroides de synthèse insecticides qui sont des substances synthétiques plus stables que leurs analogues naturels pyréthrines et cinérines (**Soulas, 1985**). Globalement, trois mécanismes fondamentaux peuvent décrire de façon satisfaisante ce mécanisme adaptatif des populations microbiennes a la dégradation des pesticides: (i) transfert de gènes ou mutation dans un gène, (ii) induction enzymatique (s'accompagnerait d'une aptitude chimiotactique des microorganismes), (iii) soit l'apparition de mutations ponctuelles des gènes structuraux

précédée d'une amplification du ou des gènes correspondants, à l'origine de la production de protéines enzymatiques dotées de fonctions catalytiques nouvelles ou améliorées (Soulas,1985; Calvayrac, 2011).

II.3. La biodégradation de quelques familles des pesticides

II.3.1. Organochlorés

L'application des pesticides organochlorés est interdite dans des nombreux pays, ils représentent toujours un problème de pollution, puisque ce groupe de pesticides est le plus persistant (malheureusement, le DDT organochlorés et ses résidus demeurent dans les sols plus de 20 ans après l'arrêt de son utilisation. Par conséquence les résidus de DDT seront transportés à l'eau et aux sédiments par ruissellement, et s'accumulés dans les chaînes alimentaires) (Aislabie et Lloyd-Jones, 1995; Ortiz-Henandez et al., 2013). Plusieurs genres bactériens peuvent dégradés le DDT y compris *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, et *Pseudomonas* (Singh et al., 1999 ; Ortiz-Henandez et al., 2013). Le DDT oxydé par une dioxygénase pour donner un dérivé hydroxy-DDTs en raison de l'instabilité de l'hydroxy-DDT, un dihydrodiol peut être formé. Ceci a été métabolisé en 2,3-dihydroxy-DDT par une déshydrogénase; 2,3-dihydroxy-DDT qui subit meta clivage, en fin de compte donner de l'acide 4-chlorobenzoïque (Aislabie et Lloyd-Jones ,1995; Kumar, et al., 1996).

II.3.2. Carbamates

Ce groupe de pesticides est constitué d'esters de quatre classes utilisées ; carbamates de méthyle, thiocarbamates, carbamates phényle et dithiocarbamates. Les carbmates Hydrolases et les amidases sont les enzymes responsables des étapes initiales de dégradation (Chen et Mulchandani ,1998). Une grande variété de bactéries pourrait dégrader les carbamates sont *Achromobacter sp.* *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Bacillus* sont les plus connus (Aislabie et Lloyd-Jones ,1995; Ortiz et al., 2011). Une étape hydrolytique unique est suffisante pour inactiver les carbamate de méthyle (carbofuran), et le métabolisme du carbofuran est le plus souvent initié par le méthyl-carbamate-hydrolase, ce qui donne carbofuran-7-phénol (2,3-dihydro-2, 2-diméthyl-7, benzofurane) et de méthylamine. La croissance se produit généralement à la dépens de la méthylamine (Aislabie et Lloyd-Jones, 1995; Kumar et al., 1996). Le méthyl-carbamate-hydrolase qui a été isolé à partir *Achromobacter sp.* catalyse l'hydrolyse des carbamates de méthyle, mais pas les carbamates de phényle et les thiocarbamates (Chen et Mulchandani, 1998).

II.3.3. Organophosphorés

La dégradation des pesticides organophosphorés est généralement plus rapide que celle des organochlorés. La dégradation microbienne par hydrolyse des liaisons P-O-aryle et PO-alkyle est considérée comme l'étape la plus importante dans la détoxification des composés organophosphorés (Singh et al., 1999). L'enzyme capable d'hydrolyser les pesticides organophosphorés est l'organophosphate hydrolase(OPH), qui est codée par le gène OPD (organophosphorés-dégradants) de *Flavobacterium sp.* ATCC 27551 et de *Pseudomonas diminuta MG*, les enzymes de ces deux bactéries sont très différentes dans leur spécificité, même bien que les deux hydrolyser la même liaison phosphodiester (Kumar et al., 1996; Singh et Walker, 2006).

Le chlorpyrifos se caractérise par la liaison P-O-C comme dans l'autre pesticide organophosphorés, comme le diazinon, parathion, méthyle parathion. la souche Enterobacter B-14 isolé à partir de sol agricole a été trouvé pour être plus efficace pour la dégradation de CP par rapport aux autres espèces bactériennes qui hydrolyse CP en diethylthiophosphate (DETP) et TCP (Rani et al., 2008; Chishti et al., 2013).

D'autre part, *Paracoccus sp.* PRT dégrade à 100% le CP en 4 jours tandis que *Serratia sp.* est capable de dégrader le même dans les 18 heures. Un grand nombre de communautés bactériennes ont été rapportées à dégrader les : CP et TCP dans une culture liquide, ainsi que dans le sol. y compris: *Arthrobacter sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus* et *Pseudomonas aeruginosa*, deux récemment isolées bactéries dégradant CP, *Stenotrophomonas sp.* Et *Sphingomonas sp.*, CP pourrait être utilisé comme source unique de carbone et de phosphore, mais ils ne se dégradent pas en TCP (Chishti et al., 2013; Yadav et al., 2015).

La biodégradation du CP est effectuée par des micro-organismes dans des conditions aérobies, le CP subit une désulfuration par oxydation ou pour former désarylation intermédiaires, CP-oxon ou TCP et DETP, respectivement. En outre, la désintoxication du CP-oxon se produit par hydrolyse, ce qui entraîne la formation de phosphate de diéthyle (DEP) et TCP. Le CP est métabolisé par hydroxylation dans le sol pour générer TCP qui forme en outre 3,5,6-trichloro-2- méthoxy-pyridine (TMP)(Figure 6). Alors que l'hydrolyse de DETP produit de l'acide phosphorothioïque et l'éthanol, qui agissent comme une source de soufre, de phosphore et carbone pour les micro-organismes dégradant le CP (Rani et al., 2008 ;Yadav et al., 2015).

Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Université de Jijel, durant la période Avril– Juin de l'année 2016. Ces expérimentations ont pour but (1) de rechercher des bactéries tolérantes aux pesticides (2) et d'étudier leur capacité à les biodégrader.

I. Matériel

I.1. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de deux zones agricoles d'Elkannare (l'Est de Jijel) (E1) et d'Alaounna (l'Ouest de Jijel) (E2), avec une longue histoire d'application des pesticides. Les sols ont été recueillis, placés dans des flacons stériles, puis transportés très rapidement au laboratoire et stockés à 4 ° C jusqu'à l'analyse.

D'autres souches bactériennes isolées à partir de la boue activée de la station d'épuration des eaux (RABTA) et d'un compost ménager (tableau 4), ont été fournies par M^{me} Salima Aissaoui.

Tableau 4. Souches bactérienne utilisée et leurs sources.

Code	Souche	Origine	Méthode d'identification	Numéro d'accession	Score
S ₂	<i>Arthrobactér nicociauae</i>	Compost	16S (99%)	KJ740438	-
S ₄	<i>Pseudomonas aerugeunosa</i>	Boue activée	16S (97%)	KJ740439	-
I ₄	<i>Enterobacter cloacae</i>	Boue activée	Maldi Tof	-	2.17
I ₁₁	<i>Enterobacter cloacae</i>	Boue activée	Maldi Tof	-	2.21
D ₁	-	Compost	-	-	-
D ₅	<i>Enterobacter cloacae</i>	Boue activée	Maldi Tof	-	2.11
D ₆	<i>Enterobacter cloacae</i>	Boue activée	Maldi Tof	-	2.26
D ₁₅	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Boue activée	16S (99%)	KJ863539	-
D ₁₆	<i>Enterobacter cloacae</i>	Compost	16S (82 .50%)	-	-

I.2. Les milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés pour isoler et caractériser les bactéries sont :

-Milieu Le milieu minéral minimum (MMM) préparé au laboratoire dont la composition est la suivante : FeSO₄.7H₂O (0.013g), CaCl₂.2H₂O (0.013g), MgSO₄.7H₂O (0.25g), KH₂PO₄ (7.5g), Na₂HPO₄ (5g), NH₄NO₃ (5g), Extrait de levure (0.25g). Le pH est ajusté à 7.0 ± 0.2, et Autoclaver 15 min à 120 °C

II. Méthodes

II.1. Enrichissement et isolement des souches résistantes aux pesticides

Les échantillons de sol prélevés au mois d'Avril (2016) ont été préalablement séchés, broyés et calibrés par tamisage. 20g du broyat sont transférés dans 100ml de bouillon nutritif dans un Erlenmeyer de 250 ml. Le mélange est ensuite mis en agitation pendant la nuit à 30°C pour obtenir une bonne dilacération des particules. Après une décantation, le surnageant a été filtré sur papier Whatman. 10 ml de filtrat a été utilisée pour l'inoculation de 100 ml de bouillon nutritif enrichie par 50mg/L du chlorpyrifos pendant 3 jours à 30°C. Le milieu minéral minimum (MMM) solide contenant le chlorpyrifos (50mg/L) préalablement coulé et séché estensemencé par étalement de quelques gouttes à partir de chaque échantillon. Les boites ont été incubées à 37°C pour 72h (Rani et al., 2008).

II. 2. Purification des souches

L'ensemencement des souches est effectué par la méthode de stries serrées à la surface de la gélose nutritive, l'incubation est faite à 37°C pendant 24h. Le repiquage se poursuit sur le même milieu, jusqu'à l'obtention de souches pures (colonies avec le même aspect macroscopique: la couleur, la forme, le diamètre, la taille et l'opacité). En parallèle, on faites une revivification des souches testées, elles sont activées et maintenues par repiquage sur gélose nutritive. Les boites ont été cultivées à 37°C pendant 24h.

II .3. La Tolérance des souches bactérienne au chlorpyrifos

Pour étudier l'effet du pesticide sur la croissance des bactéries, nous avons utilisé une gamme variée de concentrations de chlorpyrifos, l'ensemencement a été effectué sur le milieu MMM solide additionné par 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L, 400mg /L, 600mg/L ,800mg/L ou 1000mg/L du chlorpyrifos. Le pesticide à été ajouté avant l'ensemencement des boites. Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24h, les souches bactériennes présentant une bonne croissance sont sélectionnées (Anwar et al., 2009).

II .4. Préparation de l'inoculum bactérien

Pour chaque souche, des cultures jeunes sont préparées dans 50ml de bouillon nutritif. Après 18 h d'incubation à 37°C, le culot est récupéré par centrifugation (6000rpm/15min), le culot et ensuite remis en suspension dans 2 ml d'eau physiologique pour une deuxième centrifugation (6000rpm/5min), le surnageant est éliminé et le culot est additionné par 1ml d'eau physiologique (Cycon et al., 2009).

II.5. La sélection des souches tolérantes au chlorpyrifos

Le test de biodégradation du pesticide a été effectué dans des flacons de 250 ml contenant 40ml de milieu MMM, ensemencé par 4 ml des cultures bactériennes en présence de 50 mg/L de chlorpyrifos, les flacons exempts des cultures bactériennes ont été utilisés comme témoins. Les flacons sont couverts par le papier aluminium pour éviter l'effet de la photodégradation, et incubés à 37°C sous agitation. Au cours de l'incubation, la croissance bactérienne a été estimée par mesure de la DO à 600nm (prélèvements de 1 ml d'échantillon chaque jour) (Youness, 2014).

II.6. Identification des souches sélectionnées

L'identification des souches bactériennes se fait par l'ensemencement d'une galerie biochimique classique. L'ensemencement se fait à partir d'un tube contenant 5ml de bouillon nutritif additionné d'une colonie bactérienne prélevée à l'aide d'une anse de platine, et après une incubation pendant 24 h à 37°C.

- Chaque colonie purifiée est prélevée et diluée dans 1ml d'eau physiologique. A partir de cette suspension bactérienne, on procède à une observation microscopique après coloration de Gram.

- L'étude de la voie d'attaque des glucides: ce test est effectué sur le milieu MEVAG afin de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentation ou oxydative). La lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C.

- La mise en évidence de l'utilisation du mannitol: le milieu utilisé est le mannitol-mobilité. C'est une gélose permettant de rechercher la fermentation du mannitol et de la mobilité. L'obtention des résultats nécessite un temps d'incubation de 24h à 37°C.

- La mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et production d'H₂S: cette mise en évidence est réalisée sur le milieu TSI. On ensemence la surface de la pente de gélose par stries serrées et le culot par piqure centrale. La lecture se fait après 24h d'incubation.

- La mise en évidence de la production d'acétyl-méthyl-carbinol : cette mise en évidence est effectuée sur le milieu Clark et Lubs. l'incubation se fait à 37°C pendant 24h. La révélation se fait après l'ajout de 0,5ml d'une solution alcoolique d'*a*-naphtol (VP1) et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16% (VP2).

- La mise en évidence de la production d'acide mixtes: ce test effectué sur le milieu Clark et Lubs. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. La lecture se fait après l'addition de quelques gouttes de rouge de méthyle.

- La mise en évidence de la réduction des nitrates : l'ensemencement est effectué sur le bouillon nitraté. Incuber à 37°C pendant 24h, en ajoutant une goutte de réactif Nitrate1 et une goutte du réactif Nitrate 2

- Utilisation du Citrate comme seule source de carbone: ce test réalisé sur le milieu de Simmons. La lecture se fait après incubation à 37°C pendant 24h. Une culture bactérienne abondante avec bleuissement du milieu démontre l'utilisation de citrate.

- La recherche de la catalase prélevée par une pipette pasteur dans une goutte de peroxyde d'hydrogène déposée sur une lame en verre. La présence de catalase s'exprime aussitôt par un dégagement gazeux (O₂).

- La recherche de β-galactosidase (Réaction O.N.P.G) : certaines bactéries qui acidifient le milieu lactosé possèdent l'enzyme qui scinde le lactose en glucose et galactose. Le disque d'O.N.P.G est incolore. Cette molécule est scindée par β-galactosidase, qui libère l'orthonitrophénol, jaune en solution.

II.7. Effet des différentes concentrations du chlorpyrifos sur la croissance

Le même test a été effectué avec les souches bactériennes qui ont une bonne croissance sur milieu MMM (additionné par 50mg/L du chlorpyrifos), mais dans ce cas l'ensemencement est fait par les cultures bactériennes en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos (100mg/L, 200mg/L, 400 mg/L, 600mg/L).

II.8. Effet de l'addition de glucose sur la biodégradation

Les isolats bactériens ont été cultivés dans 40ml de milieu MMM avec 200mg/L de chlorpyrifos et 1g de glucose contenus dans des flacons de 250ml, les flacons sont couverts par le papier aluminium pour éviter l'effet de la photodégradation et incubés à 37 °C. Chaque jour, 1ml de la culture a été prélevé pour évaluer la croissance des bactéries dégradant les pesticides et la densité optique à 600nm a été prise à l'aide d'un spectrophotomètre (Anwar et al., 2009).

Parallèlement et à partir de chaque flacon des échantillons de 1ml ont été prélevés pendant trois temps différents (t0, t48), centrifugés à une vitesse de 6000rpm pendant 15min. Les surnageants sont filtrés à l'aide des micro-filtres de 0.22µm, ensuite conservés au congélateur pour le dosage des pesticides ultérieur par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Youness, 2014).

II.9. Analyse du chlorpyrifos par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Pour l'analyse des échantillons, la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée. Cette dernière comporte une colonne C-18 apolaire inversée, une pompe (LC-20 AT), un dégazeur (DGU -20A3), un détecteur UV-visible (SPD- 20AV) et un enregistreur. La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange d'acétonitrile (90%), l'eau distillée

205nm. Les filtrats sont injectés à l'aide d'une seringue spécifique de 20µl et le chlorpyrifos (sigma) est utilisé comme étalon (Youness, 2014).

II.10.Calcul du taux de croissance

Pour calculer le taux de croissance nous avons utilisé l'équation suivante (Wei et al., 2009):

$$\text{Taux de croissance } (\mu) = \frac{1}{DO_0} \times \frac{(DO_t - DO_0)}{(T_t - T_0)}$$

μ : le taux de croissance.

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.

Résultats et Discussion

I. Isolement des bactéries

Les bactéries dégradant les pesticides ont été isolées et identifiées à partir des échantillons de sol d'El-kannare à pH 5,80 (déjà exposées aux différentes classes chimiques de pesticides). A partir du premier échantillon et après 72h, 15 souches bactériennes différentes nommées (B1-1, B1-2, B1-3,..... B5-3) ont été isolées sur la gélose MMM contenant le chlorpyrifos (50mg /L) comme seule source de carbone et d'énergie. Tandis que pour le deuxième échantillon, aucune souche n'a été trouvée. La capacité des ces isolats à se développer sur le milieu minéral (MMM) contenant le chlorpyrifos comme seule source de carbone est un indicateur sur la capacité de ses souches à tolérer et probablement à utiliser ou dégrader ce pesticide.

II. La Tolérance des souches bactérienne au chlorpyrifos

Ce test vise à sélectionner les souches de bactéries qui ont la capacité de croître sur la gélose MMM en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos (25mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L, 400mg/L, 600mg/L, 800mg/L et 1000mg/L). La croissance des cellules bactériennes a été déterminée après 24h d'incubation à 37°C, les résultats sont montrés dans le tableau (5).

D'après les résultats présentés dans le tableau (5), une faible croissance est remarquée avec la concentration 25 mg/L (cette concentration n'est pas suffisante pour la croissance) pour la plupart des isolats. Ils ont montré une diminution respective de la croissance avec l'augmentation des concentrations du chlorpyrifos, et ont été incapable de croître à des concentrations plus élevées de 800 mg/L, donc ces souches sont moins résistantes au chlorpyrifos.

Par contre les souches: B2-3, B3-1, B5-1, B5-2, S2, S4 et I11 ont été capables de poursuivre leur croissance en présence du chlorpyrifos dans le milieu jusqu'à une concentration de 1000mg/L. Aucun effet toxique du pesticide n'a été remarqué sur la croissance de ces bactéries, elles sont probablement munies d'une capacité de résister/tolérer le chlorpyrifos. Par conséquent, la tolérance des bactéries pourrait être due à une exposition antérieure au pesticide des souches B2-3, B3-1, B5-1 et B5-2 ou en raison de son aptitude à hydrolyser un substrat supplémentaire pour les souches S2, S4, I11.

Rani et al, (2008) ont rapporté que, la souche du *Providencia stuartii* MS09 isolée à partir des sols agricoles peut tolérer jusqu'à 700mg /L du chlorpyrifos, la concentration optimale qui a soutenue la croissance bactérienne pendant 24 h était entre 50 et 200mg/L de chlorpyrifos et une faible croissance a été observé à des concentrations élevées du chlorpyrifos (300-700mg /L).

Dans notre travail, les souches B2-3, B3-1, B5-1, B5-2, S2, S4, I11 ont résisté jusqu'à 1000mg/L du chlorpyrifos, avec une faible croissance à des concentrations de 800mg/L et de 1000mg/L. Ces souches ont été sélectionnées pour réaliser les testes de biodégradation.

Tableau 5. La tolérance de diverses souches aux différentes concentrations de la chlorpyrifos

[chlorpyrifos] Souches	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L	400 mg/L	600 mg/L	800 mg/L	1000 mg/L
B ₁₋₁	+	+	+	+	+	+	+	-
B ₁₋₂	+	+	+	+	+	+	+	-
B ₁₋₃	++	++	++	++	++	+	+	-
B ₂₋₁	+	+	++	++	++	+	+	-
B ₂₋₂	++	++	++	++	++	+	+	-
B ₂₋₃	++	++	++	++	++	++	+	+
B ₃₋₁	+	++	++	++	++	++	+	+
B ₃₋₂	+	+	+	+	+	+	+	-
B ₃₋₃	+	++	++	++	+	+	-	-
B ₄₋₁	+	+	+	+	+	+	+	+
B ₄₋₂	+	++	++	+	+	+	+	-
B ₄₋₃	+	+	++	++	++	+	+	-
B ₅₋₁	++	++	++	++	++	++	+	+
B ₅₋₂	++	++	++	++	++	++	++	+
B ₅₋₃	++	++	++	++	++	++	+	-
S ₂	+	+	++	++	++	++	+	+
S ₄	+	+	++	++	++	+	+	+
L ₄	+	++	++	++	++	+	+	-
I ₁₁	+	+	++	++	++	++	+	+
D ₁	+	++	++	+	+	+	+	-
D ₅	+	+	+	+	+	+	+	-
D ₆	+	+	+	+	+	+	+	-
D ₁₅	+	+	++	++	++	+	+	-
D ₁₆	+	+	+	+	+	+	+	-

(++) Résistante au pesticide, (+): Faiblement résistante au pesticide, (-) Sensible au pesticide

III. La sélection des souches tolérantes au chlorpyrifos

Ce test vise à sélectionner des souches bactériennes qui ont la capacité de croître sur le bouillon MMM contenant le chlorpyrifos (50mg/L). La croissance des cellules bactériennes a été déterminée en mesurant la densité optique à 600 nm chaque 24h, les résultats sont montrés dans le tableau (6).

Tableau 6. La croissance de diverses souches en présence du chlorpyrifos (50mg /L)

D.O (600nm) Souches	T= 0	T =24 h	T= 48h	T =72h	T =96 h
B ₂₋₃	0.085	0.327	0.626	0.575	0.344
B₃₋₁	0.079	0.320	0.577	0.547	0.396
B ₅₋₁	0.082	0.652	0.673	0.660	0.390
B₅₋₂	0.076	0.231	0.267	0.709	0.474
S ₂	0.070	0.212	0.506	0.178	0.163
S₄	0.078	0.313	0.523	0.418	0.408
I ₁₁	0.069	0.073	0.590	0.445	0.166

La croissance maximale bactérienne a été obtenue après 48h d'incubation sauf pour la souche B5-2 qui a atteint une croissance maximale après 72h d'incubation. Les cinétiques de la croissance de la souche B 3-1, B 5-2 et S4 sont meilleures que la cinétique de la croissance des souches B2-3, B5-1, S2, I11. Ces trois souches sont sélectionnées pour la suite de notre travail.

IV. Identification des souches sélectionnées

Cette étape a permis une identification préliminaire des souches sélectionnées par des tests morphologiques et biochimiques. L'observation macroscopique des cellules bactériennes a été effectuée après 24h d'incubation à 37 °C. Les cellules des B 3-1 et B 5-2 se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif, ces cellules sont pigmentées en verts. Les résultats des tests obtenus sont résumés dans le tableau (7).

Selon Bergey's Manuel (1986), nous pouvons probablement attribuer les souches B 3-1 et B 5-2 au genre *Pseudomonas* sp. Alors que la souche S4 a été identifiée auparavant comme *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 7. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches bactériennes.

Caractéristique	B5-2	B3-1
Gram	-	-
Morphologie	Bacille	Bacille
Motilité	+	+
Voie respiratoire	aérobie	Aérobie
RM	+	+
VP	-	-
Citrate	-	-
H₂S	-	-
Nitrate réduction	+	+
Catalase	-	-
ONPG	-	-
Gaz	+	+
Glucose	-	-
Lactose	-	-
Saccharose	-	-

(+) réaction positive, (-) réaction négative

V. Effet de différentes concentrations du chlorpyrifos sur la croissance

Selon les résultats présentés dans les figures (08) et (09), la croissance des bactéries isolées du sol, en présence du chlorpyrifos comme source de carbone à différentes concentrations, est similaire. La souche B3-1 (Figure 8) a une croissance plus rapide et maximale en présence de 100mg/L et 200mg/L du chlorpyrifos après 24h d'incubation (Taux de Croissance (TC) = 0.26h⁻¹, Taux de Croissance (TC) = 0.24h⁻¹ respectivement), et nous remarquons une longue phase stationnaire en présence de 200mg/L par rapport à 100 mg/L du chlorpyrifos, puis une diminution de la croissance à partir de 48h jusqu'à 96h.

La croissance de la souche B 5-2 (Figure 9) est aussi rapide et maximale à 100mg/L (TC = 0.21h⁻¹), suivie d'une augmentation de la croissance qui atteint son maximum après 24 heures d'incubation. Cependant une courte phase de latence a été remarquée pour la concentration 200mg/L. Au-delà de 48h, une diminution de la croissance a été observée, par la suite une stabilisation jusqu'à 96h pour les deux concentrations.

Une croissance lente pour la concentration de 400mg/L et 600mg/L pour les deux souches B 3-1 et B 5-2 à été remarquée, sachant que à 400mg/L la croissance est meilleur qu'à 600mg /L.

Pour la souche S4, une phase de latence a été remarquée dans toutes les concentrations utilisées, suivie d'une augmentation de la croissance qui atteint le maximum après 48h d'incubation (figure 10), une meilleur croissance a été observée avec la concentration 200mg/L, alors que cette souche tolère même une concentration de 600 mg/L. Une diminution du taux de croissance est observée après 96h d'incubation.

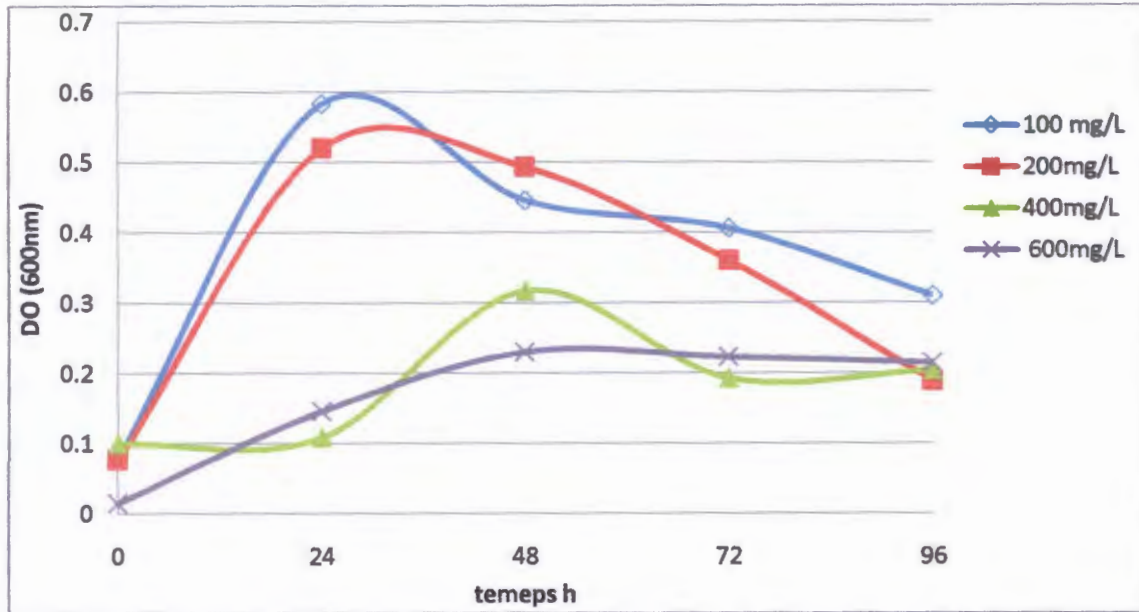


Figure 8. La cinétique de croissance de la souche B 3-1 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos.

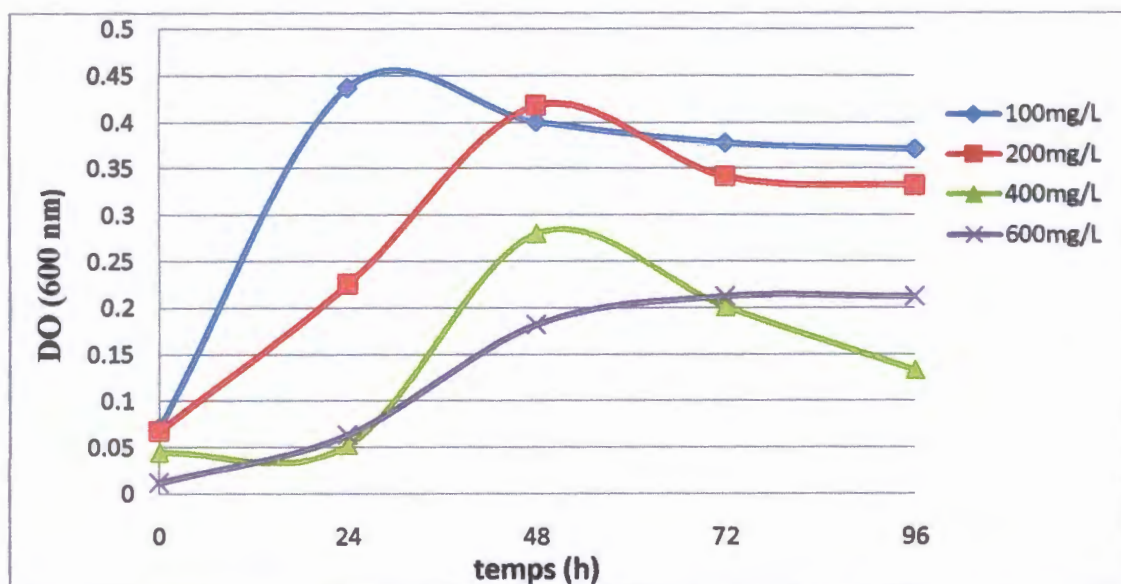


Figure 9. La cinétique de la croissance de la souche B 5-2 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos.

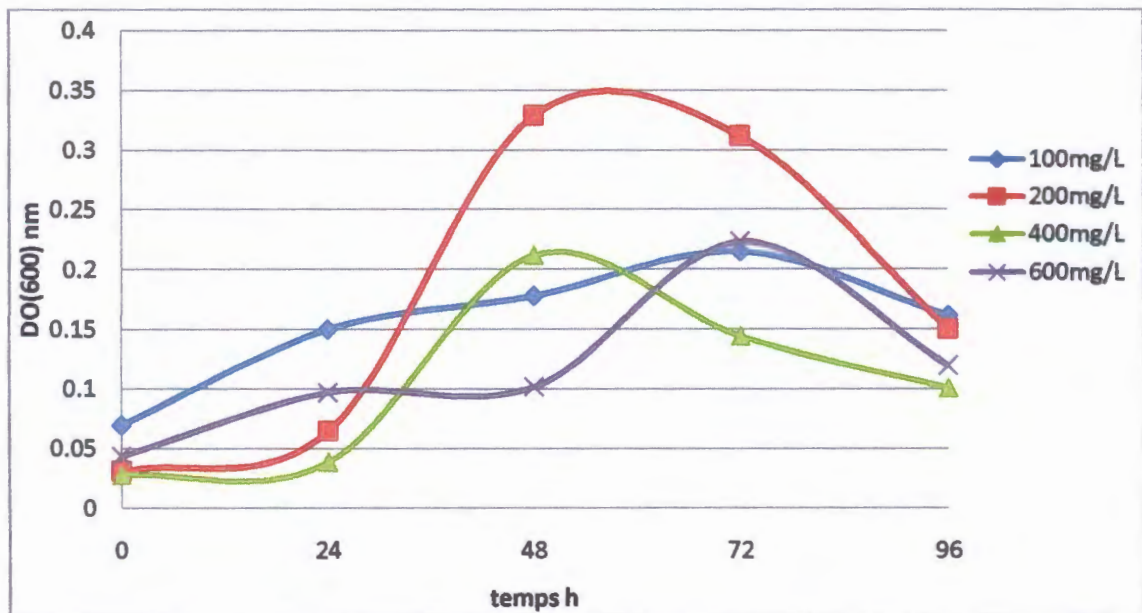


Figure 10. La cinétique de croissance de la souche S4 sur milieu MMM en présence de différentes concentrations de chlorpyrifos.

La croissance des cellules bactérienne B3-1 et B5-2 a commencé dans les premières heures d'incubation avec la concentration 100mg/L et 200mg/L du chlorpyrifos (absence d'une phase de latence), cela est probablement dû à l'origine de ces bactéries, qui ont été isolées à partir d'un sol agricole contaminé par plusieurs type de pesticide. Par contre avec une concentration de 400mg/L et 600mg/L, elle a commencé après 24h d'incubation, donc les souches avaient besoin d'une phase de latence, peut être que les micro-organismes ont besoin d'une période d'adaptation pour produire les enzymes de dégradation nécessaires. Cela peut expliquer la phase de latence et la croissance ralentie à des concentrations élevées de chlorpyrifos (Rani et al., 2008).

Pour la souche S4 isolée à partir de la boue activée, elle nécessite une phase de latence en présence de différentes concentrations du chlorpyrifos. Cela peut être expliqué par la nécessité de produire des enzymes de biodégradation pour permettre à la souche de s'adapter aux conditions de culture en présence du pesticide. Sachant que cette souche est douée d'une capacité de dégrader les médicaments et d'accumuler les métaux lourds.

L'allure des courbes de la croissance des souches B3-1, B5-2 et S4 en présence du chlorpyrifos ne montrent pas d'effets toxiques du pesticide sur la croissance bactérienne. Le taux de croissance de ces dernières est plus important en présence du chlorpyrifos, ce qui suggère qu'en dépit de la résistance au pesticide, les isolats B3-1, B5-2 et S4 sont probablement capables d'hydrolyser le chlorpyrifos et de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie. Ces bactéries semblent être

capables de métaboliser le pesticide via un système enzymatique. En effet, *Pseudomonas* sp. et *P. aeruginosa* sont capables de minéraliser les pesticides organophosphorés tel que le chlorpyrifos et l'utilisent comme source de carbone et de phosphore (Lakshmi et al., 2008; Latifi et al., 2012).

VI. Effet de l'addition du glucose sur la biodégradation

Selon les résultats présentés dans les figures (11) et (12), les deux souches testées (B5-2, B3-1) sont capable de croître sur les deux milieux (absence et présence de glucose) enrichis par le chlorpyrifos (200mg/l). Une meilleure croissance est remarquée dans les échantillons contenant le glucose. La croissance en présence du glucose, atteint son maximum après 48h d'incubation pour les deux souches avec une DO de 1.940 pour la souche B5-2. Il est claire que la présence du glucose améliore la croissance des souches bactériennes, cela est peut être du au fait que le glucose est un substrat simple et facile à assimiler.

D'autre part, on remarque une faible croissance en absence du glucose comme co-substrat. Le co-substrat améliore la croissance bactérienne en présence du pesticides, mais sa présence n'est pas nécessaire (Anwar et al., 2009). En présence d'autres sources de carbone, la dégradation du chlorpyrifos, s'arrête et lorsque ces dernières sont épuisées, les bactéries utilisent le chlorpyrifos comme source de carbone, à cause de l'adaptation aux conditions environnementales. Dans le milieu naturel, la concurrence pour les sources de carbone est immense et l'utilisation du chlorpyrifos comme une source d'énergie par cette bactérie lui confère un avantage concurrentiel et substantiel sur les autres micro-organismes. Le repiquage, en particulier dans le milieu riche en nutriments, a abouti à une perte permanente de la capacité des bactéries à utiliser le chlorpyrifos comme source d'énergie, mais dans certains cas, la souche a conservé la capacité à hydrolyser ce substrat (singh et al., 2004).

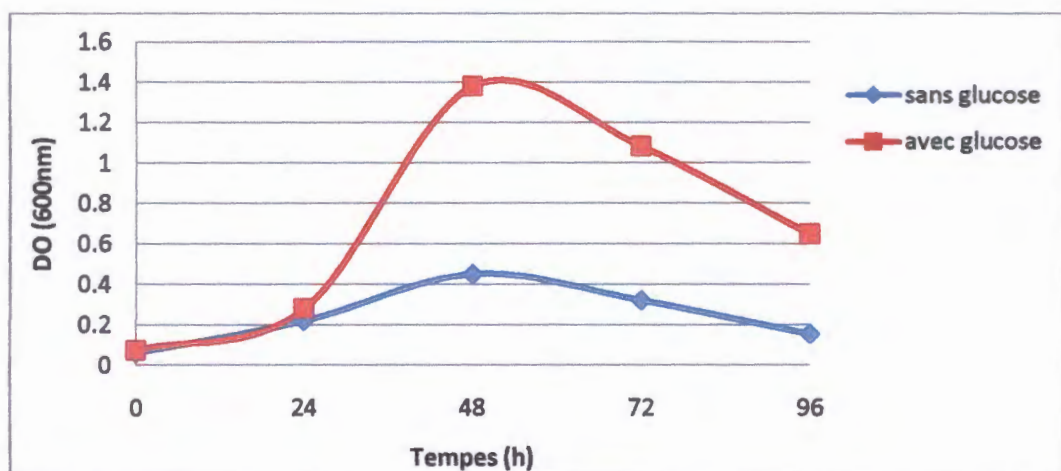


Figure 11. La croissance de la souche B3-1 dans le milieu MMM avec ou sans glucose.

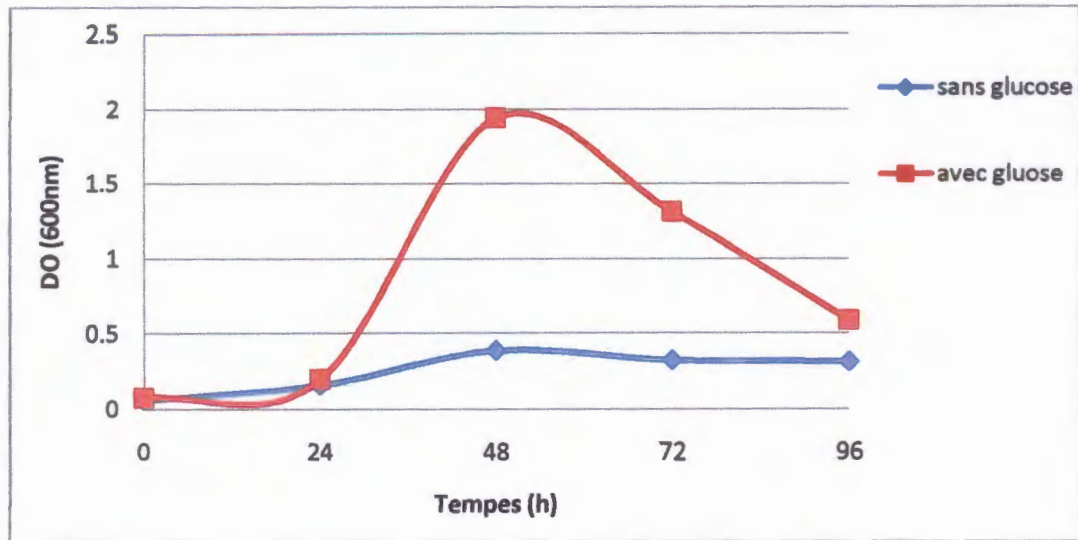
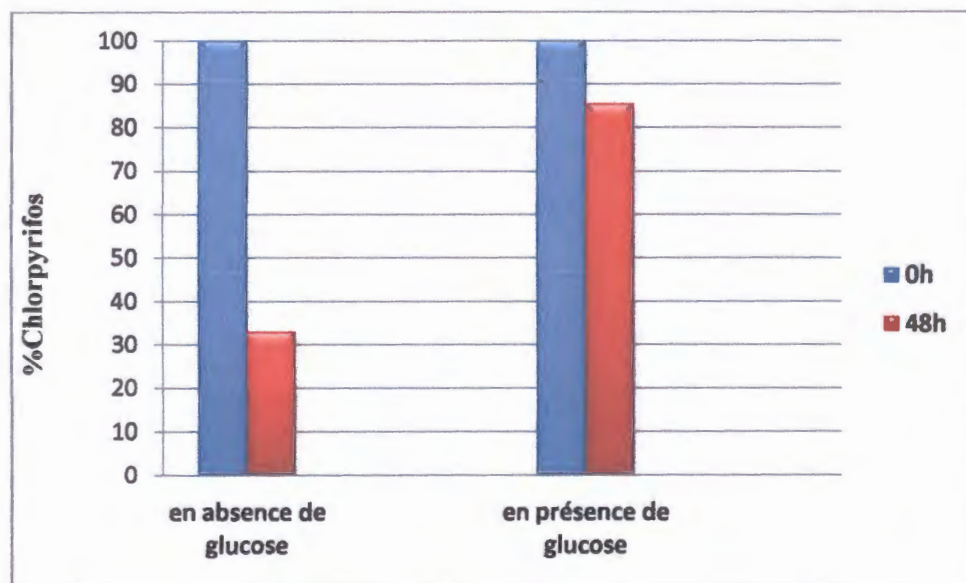


Figure 12. La croissance de la souche B5-2 dans le milieu MMM avec ou sans glucose.

Dans le but d'évaluer le taux de biodégradation du chlorpyrifos par la souche sélectionnée (B5-2) après 48h d'incubation en présence et en absence du glucose, l'HPLC a été utilisée (voir les chromatogrammes dans l'annexe). D'après les résultats obtenus (Figure13) nous pouvons observer que la biodégradation a été fortement influencée négativement en présence du glucose. On a une disparition du chlorpyrifos de l'ordre de 14.61 % après 48h on présence du glucose alors qu'en absence du glucose on a une réduction remarquable de la concentration qui est de l'ordre de 67.06 %.



Figures13. La biodégradation du chlorpyrifos en présence et en absence du glucose.

Nos résultats peuvent être confirmés par ceux obtenus par **singh et al, (2004)** qui ont signalé que, l'addition d'une autre source de carbone, à une souche d'*Enterobacter* inhibe la dégradation du chlorpyrifos et après trois jours d'incubation elle a commencé à utiliser de nouveau le chlorpyrifos.

Contrairement à nos résultats, **Anwar et al, (2009)** ont démontré que *Bacillus pumilus* préfère l'utilisation du chlorpyrifos même en présence des autres nutriments et sa capacité de dégradation a été positivement influencée par la présence des sources d'éléments nutritifs supplémentaires. Cela pourrait être expliqué, du fait que les enzymes dégradantes le chlorpyrifos sont exprimées dans *B. pumilus*, même en présence de sources de carbone facilement assimilés.

Conclusion

Notre étude a porté principalement sur l'étude de la résistance aux pesticides notamment au chlorpyrifos, de bactéries isolées et sélectionnées à partir du sol, ainsi que l'étude de leur biodégradabilité par ces souches.

Les résultats du screening ont montré que les souches isolées présentaient une résistance remarquable aussi bien qu'un potentiel de biodégradabilité du pesticide variable selon les souches bactériennes testées. En effet certaines souches semblent être munies d'une résistance importante aux pesticides et montrent un potentiel dégradant important comme le cas de la souche B5-2. L'identification a montré que B5-2 appartient au genre *Pseudomonas* sp. D'après les résultats obtenus par HPLC, le taux d'élimination du chlorpyrifos (200mg/L) par la souche B5-2 est de 14,61% en présence de glucose (1g) comme co-substrat et de 67,06% en absence de ce dernier.

Au terme de cette étude, on peut conclure que les réactions de dégradation du chlorpyrifos par *Pseudomonas* sp. sont remarquables. Il est donc importante de l'utiliser dans la biorémediation afin d'éliminer les résidus de chlorpyrifos dans l'environnement.

Références
bibliographique

A

Aislabie J., Lloyd-Jones G., 1995, a Review of Bacterial Degradation of Pesticides, Aust. J. Soil Res., 33, 925-42.

Ait Kaki A., 2014, Recherche De Nouvelles Potentialités De Bactéries Du Genre *Bacillus* Pour L'agriculture Et L'agroalimentaire, Thèse De Doctorat, Université De Constantine Et Université De Liège.

Agarry S.E., Olu-Arotiowa O.A., Arem M.O, Jimoda L.A., 2013, Biodegradation Of Dichlorovos (Organophosphate Pesticide) In Soil By Bacterial Isolates, J.Nat. Sci. Res., 3(8) P: 12.

Andreu V., Pico Y., 2004, Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods, Trends Anal. Chem., 23, 10-11.

Anwar S., LiaquatF., Khan Q.M.,Khalid Z. M., IqbalS., 2009, Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol By *Bacillus Pumilus* Strain C2A1, J. Hazard.Mater., 168, 400–405.

Arbeli Z., Fuentes C.L., 2007, Accelerated Biodegradation of Pesticides: an Overview of The Phenomenon, Its Basis And Possible Solutions; and A Discussion on The Tropical Dimension, Crop Protection 2, 1733–1746.

Arias –Estévez M., Lopez -Piagoer E., Martinez-Carballo E., Simal-Gandara J., Mejuto J.C., Garcia Rio L., 2008, The Mobility and Degradation of Pesticides in Soils and The Pollution of Groundwater Resources, Agric. Ecosystems Environ. 123, 247–260.

B

Bertrand J.C., Doumenq P., Guyoneaud., Marrot B., Martin-Laurent F., Matheron R., Moulin P., Soulas G., 2015, Microorganisms As Major Actors of Pollution Elimination in The Environment :Appl. Microb. Ecol. Bioremediation, DOI: 10.1007/978-94-017-9118-2 -16.

Bonnefoy N., 2012, Au Nom De La Mission Commune D'information Sur Les Pesticideset Leur Impact Sur La Santé Et L'environnement, Rapport D'Information, N° 42.

Burrows H.D.,CanleL.M., Santaballa J.A., SteenkenS., 2002, reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 67, 71–108.

C

Calvayrac C., 2011, Dégradation Biologique de La Sulcotrione Dans un Sol Agricole : Recherche D'une Eventuelle Biodégradation Accélérée et Caractérisation De Souches Bactériennes Potentiellement Dégradantes, Thèse De Doctorat, Université De Perpignan Via Domitia.

Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.P., Coquet Y. 2005, Les Pesticides Dans Le Sol - Conséquences Agronomiques et Environnementales: Dégradation de Pesticide P : 255-261, Editions France Agricole.

Chen W., Mulchandani A., 1998, The Use of Live Biocatalysts For Pesticide Detoxification, Elsevier Science Ltd., 16-0167 -7799.

Chishti Z., Hussain S., Arshad K.R., Khalid A., Arshad M., 2013, Microbial Degradation of Chlorpyrifos in Liquid Media and Soil, *J. Environ. Manag.* 114, 372-380.

Cycon M., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z., 2009, Biodegradation of the Organophosphorus Insecticide Diazinon by *Serratia Sp.* and *Pseudomonas Sp.* and Their Use in Bioremediation of Contaminated Soil, *Chemosphere* 76-494–501.

D

Diop A., 2013, Diagnostic des Pratiques D'utilisation et Quantification des Pesticides Dans La Zone des Niayes de Dakar, Université Du Littoral Cote d'Opale, France.

G

Gavrilescu M., 2005, Fate of Pesticides in the Environment and Its Bioremediation, *Eng. Life Sci.*, 5(6), P: 510-513, DOI: 10.1002/Elsc.200520098.

Gdoura M., 2013, Amélioration de La Capacité de Biodégradation de deux Pesticides (Methylparathion, Méthomyl) Par des Bactéries Irradiées, Diplôme National d'Ingénieur, Université De Carthage.

Grant R.J., Daniell T.J., Betts W.B., 2002, Isolation and Identification of Synthetic Pyrethroid-Degrading Bacteria, *J. Appl. Microbiol.*, 92, 534-540.

Guimont S., 2005, Devenir des Pesticides Dans Les Sols En Fonction de L'état D'humidité et du Mode de Circulation de L'eau Dans Le Sol, Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine.

I

Isra M., Sameen R. L., Kanwal S., Alvina G., and Khalid R. H., 2016, Effects of Pesticides on Environment, Springer International Publishing Switzerland, DOI 10.1007/978-3-319-27455-3-13.

J

James-Tano Z., 2011, Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides: Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-437-5, Intech.

Jean-Pascal L.D., 2007, Impact Des Résidus De Pesticides Sur Les Micro-Organismes Des Sols Dans Les Agrosystemes Cotonniers Du Burkina Faso, Université Polytechnique De Bobo-Dioulasso.

Juricek L., Coumoul X., 2014, Alimentation, Pesticides Et Pathologies Neurologiques, Cahiers De Nutrition Et De Diététique, Elsevier Masson, 49, 74-80.

K

Katagi T., 2004, Photodegradation of Pesticides on Plant and Soil Surfaces, *Rev. Environ. Contam.Toxicol.* 182:1–195.

Kaufmann K. 2004, Assessment of Microbial Community Changes and Limiting factors during Bioremediation of Hydrocarbon-Polluted Soil with New Miniaturized Physiological Methods, *École Polytechnique Fédérale De Lausanne*.

Konradsen F., van der H. W., Donald C.C., Hutchinson G., Daisley H., Singh S., Eddleston M., 2003, Reducing Acute Poisoning in Developing Countries-Options For Restricting the Availability of Pesticides, *Toxicol.* 192 -249–26.

Kumar A., DeArnaB, Bose R., Mozumdar S., 2014, Pesticide Formulations: Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles, *Springer Briefs in Molecular Science*, DOI: 10.1007/978-81-322-1689-6-5, ISBN 978-81-322-1688-9.

Kumar S., Muketji K.G., Lal R., 1996, Molecular Aspects of Pesticide Degradation by Microorganisms, *Cri. Rev. Microbiol.* 22(1): 1-26.

L

Lakshmi C.V., Kumar M., Khanna S., 2008, Biotransformation of Chlorpyrifos and Bioremediation of Contaminated Soil, *Int. Biodeterioration Biodegradation* 62.204–209.

Latifi A.M., Khodi S., Mirzaei M., Miresmaeili M., Babavalian H., 2012, Isolation and Characterization of Five Chlorpyrifos degrading Bacteria, *Afr. J. Biotechnol.*, 11(13), 3140-3146.

M

Maele-Fabry G.V., Baldi L., Cordier S., Coumoul X., Elbaz A., Gamet-Payrastr L., Bailly P., Multigner L., Rahmani R., Spinosi J., 2013, Pesticides-Effets Sur La Santé, *Editions Inserm*, Isbn 978-2-85598-905-1.

Maillard E., 2014, Transport and Degradation of Pesticides in Wetland Systems: a Downscaling Approach, *These De Doctorat, Université De Strasbourg, France*.

Mamy L., Barriuso E., 2008, Gabrielle B., *Evaluer Les Risques Environnementaux Des Pesticides, Innovations Agronom.*, 3. 121-143.

Marouane B., 2014, Transfert Des Nitrates et des Pesticides Dans Les Sols de La Région du Gharb- Etude a L'échelle de La Parcelle, *Thèse de Doctorat, Université Mohammed V*.

Martnez-Carballo E., Pose-Juan E., Rial-Otero R., Lopez-Periago E., Simal-Gándara J., 2009, Determination of Metalaxyl And Identification of Adjuvants in Wetttable Powder Pesticide Technical Formulas, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394:1535–1544.

Maysaloun M., 2008, Etude de L'impact De L'exposition a des Mélanges de Pesticides a Faibles Doses: Aractérisation Des Effets Sur Des Lignées Cellulaires Humaines et Sur Le Système Hématopoïétique Murin, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

N

Navarro S., Vela N., Navarro G., 2007, Review. an Overview on the Environmental Behaviour of Pesticide Residues in Soils, Spanish J. Agric. Res., 5(3), 357-375.

Nayarisseri A., Suppahia A., Nadh A. G., Nair A. S., 2014, identification and characterization of a pesticide degrading *flavobacterium* species embs0145 by 16s rRNA Gene Sequencing, Interdiscip Sci.Comput Life Sci, 6: 1–7, DOI: 10.1007/s12539-012-0068-2.

O

Odukkathil G., Vasudevan N., 2013, Toxicity and Bioremediation of Pesticides in Agricultural Soil, Rev. Environ.Sci. Biotechnol., 12:421–444 ,DOI 10.1007/s11157-013-9320-4.

OMS, 2013, Code de Conduite International sur La Gestion des Pesticides, EB134/22.

Ortiz-Hernández M. L., Sanchez-Salinas E., Dantan-González, E., Castrejon-Godínez M.L., 2013, Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process, Biotechnology Research Center, Autonomous University of State of Morelos, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P., Mexico.

Ortiz-Hernández M.L., Sánchez-Salinas E., Olvera-Velona A., FolchMallo L., 2011, Pesticides in the Environment: Impacts and their Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment: Pesticides - Formulations, Effects, Fate, Margarita Stoytcheva, ISBN 978-953-307-532-7, InTech.

P

Panuwet P., Siri Wong W., Prapamontol T., Ryan P. P., Fiedler N., Robson M. G., Barr D.B., 2012, Agricultural Pesticide Management in Thailand: Status and Population Health Risk, Environ.Sci.Policy, 17:72–81.

R

Rani M.S., Lakshmi K.V., Devi P.S., Madhuri R.J., Aruna S., Jyothi K., Narasimha G., Venkateswarlu K., 2008, Isolation and Characterization of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium from Agricultural Soil and its Growth Response, Afr. J.Microbiol. Res., 2:26-31.

Rouchaud J., Neus O., Bulcke R., Cools K., Eelen H., Dekkers T., 2000, Soil Dissipation of Diuron, Chlorotoluron, Simazine, Propyzamide, and Diflufenican Herbicides after Repeated Applications in fruit tree orchards, Arch. Environ. Contam.Toxicol. 39, 60 – 65, DOI: 10.1007/s002440010080.

S

Sarwar M., 2015, the Dangers of Pesticides Associated with Public Health and Preventing of the Risks, Int. J. Bioinformatics Biomed. Eng. 1(2): 130-136.

Savadog P. W., 2001, Etude de la Biodegradation anaerobie des Pesticides Utilises en Agriculture au Burkina Faso, thèse de doctorat, Université de Ouagadougou.

Schulz R., 2004, Field Studies on Exposure, Effects, and Risk Mitigation of Aquatic non point-Source Insecticide Pollution, *J. Environ. Quality*, 33.

Shekhar-Pundir C., Chauhan N., 2012, Acetylcholinesterase Inhibition-based Biosensors for Pesticide Determination: a review, *Anal. Biochem.*, 429 19–31.

Singh B.K., Kuhad C.R., Singh A., Lal R., Tripathi K.K., 1999, Biochemical and Molecular basis of Pesticide Degradation by Microorganisms, *J. Biotechnol.*, 19(3):197–225.

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, *Appl. Environ. Microbiol.*, 270(8):4855.

Singh B.K., Walker A., 2006, microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiol Rev* 30 - 428–471.

Soulas G. 1985, La Degradation des Pesticides dans Le Sol Aspects Microbiens et Cinétiques, *Science Du Sol*, pp. 43, Plaisir-France.

Sutherland T.D., Horne I., Weir K.M., Coppin C.W., Williams M.R., Selleck M., Russell R.J., Oakshott J.G., 2004, Enzymatic Bioremediation: From Dnzyme discovery to Applications, *Clinic Experim. Pharma. Physiol.*, 31:817–821

V

Van der Werf H.M.G., 1996, Assessing the Impact of Pesticides on the Environment, *Agric. Ecosystems Environ.*, 60:81-96.

Van Eerd L.L., Hoagland R.E, Zablotowicz R.M., Hall J.C., 2003, Pesticide Metabolism in Plants and Microorganisms, *Weed Sci.*, 51:472–495.

Vymazal J., Březinová T., 2015, the use of Constructed Wetlands for Removal of Pesticides From Agricultural Runoff and Drainage, *Environ. Int.*, 75:11–20.

W

Wei G., Fan L., Zhu W., Fu Y., Yu J., Tang M., 2009, Isolation and Characterization of the Heavy Metal Resistant Bacteria CCNWR33-2 isolated from root nodule of *lespedeza Cuneata* in Gold mine tailings in China, *J. Hazardous Mater.*, 162:50–56.

Y

Yadav M., Kumar Shukla A., Srivastva N., Nath Upadhyay S., Kumar Dubey S., 2015, Utilization of Microbial Community Potential for Removal of Chlorpyrifos, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1-16.

Youness M., 2014, Impact de La Formulation et du Mélange de deux Pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur Biodégradation et La Croissance de Microorganismes, Université Blaise Pascal- Clermont-Ferrand, France.

Z

Zeng T., Chin Y.P., Arnold W.A., 2012, Potential for Abiotic Reduction of Pesticides in Prairie Pothole Porewaters. *Environ. Sci. Technol.*, 46:3177–3187.

Zhang W.J., Jiang F., Ou j., 2011, Global Pesticide Consumption and Pollution: with China as a Focus, *Proceeding. Int. Academy Ecol. Environ. Sci.*, 1(2):125-144.

Annexes

Annexe 1: Les composants de milieu MMM**Milieu MMM :** (bouillon et gélose)

FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.013g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.013g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25g
KH ₂ PO ₄	7.5g
Na ₂ HPO ₄	5g
NH ₄ NO ₃	5g
Extrait de levure	0.25g
Agar-agar (dans le cas de gélose)	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7.0 ± 0.2

Autoclaver 15min à 120°C

Annexe 2: Les composants du bouillon et de la gélose nutritive.**Milieu nutritif :** (bouillon et gélose)

Peptone	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Extrait de viande	03g
Agar-agar (dans le cas de gélose)	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7.0 ± 0.2

Autoclaver 20min à 120 °C

Annexe 3: Evolution de la souche bactérienne (B3-1) dans le milieu MMM additionné des différentes concentrations du chlorpyrifos.

[CP]	T=0h	T=24h	T=48h	T=72h	T=96h
100mg/l	0,079	0,583	0,446	0,406	0,309
200mg/l	0,076	0,52	0,493	0,36	0,188
400mg/L	0,099	0,108	0,316	0,192	0,203
600mg/L	0,014	0,145	0,229	0,222	0,214

Annexe 4: Evolution de la souche bactérienne (B5-2) dans le milieu MMM additionné des différentes concentrations du chlorpyrifos.

[CP]	T=0h	T=24h	T=48h	T=72h	T=96h
100mg/L	0,071	0,437	0,401	0,378	0,371
200mg/l	0,067	0,225	0,418	0,341	0,331
400mg/L	0,044	0,052	0,28	0,201	0,133
600mg/L	0,012	0,063	0,182	0,212	0,212

Annexe 5: Evolution de la souche bactérienne (S4) dans le milieu MMM additionné des différentes concentrations du chlorpyrifos.

[CP]	T=0h	T=24h	T=48h	T=72h	T=96h
100mg/l	0,07	0,15	0,178	0,215	0,161
200mg/l	0,031	0,065	0,329	0,312	0,15
400mg/l	0,028	0,039	0,212	0,144	0,101
600mg/l	0,044	0,097	0,102	0,223	0,12

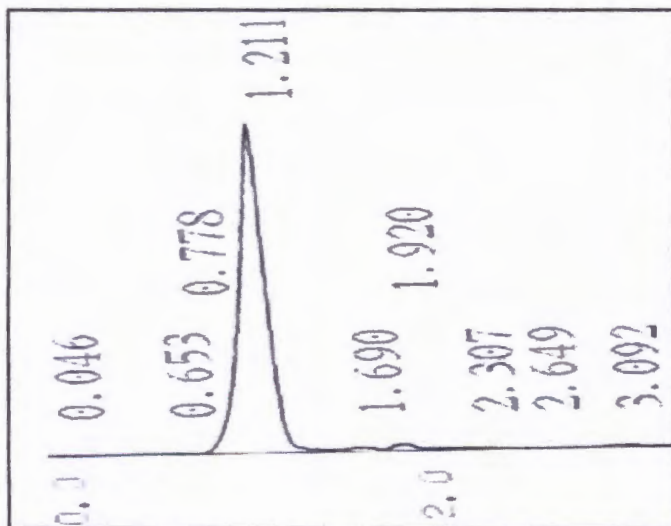
Annexe 6: Evolution de la croissance de la souche bactérienne (B3-1) dans le milieu MMM additionné de 200 mg/L du chlorpyrifos en présence et en absence de glucose.

	T=0h	T=24h	T=48h	T=72h	T=96h
sans glucose	0,061	0,22	0,453	0,321	0,154
avec glucose	0,072	0,279	1,38	1,08	0,648

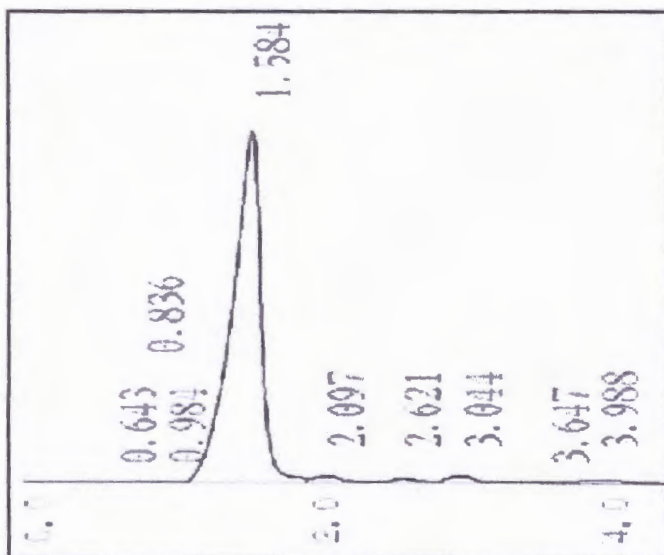
Annexe 7: Evolution de la croissance de la souche bactérienne (B5-2) dans le milieu MMM additionné de 200mg/L du chlorpyrifos en présence et en absence de glucose.

	T=0h	T=24h	T=48h	T=72h	T=96h
sans glucose	0,061	0,16	0,389	0,327	0,314
avec glucose	0,076	0,197	1,94	1,31	0,587

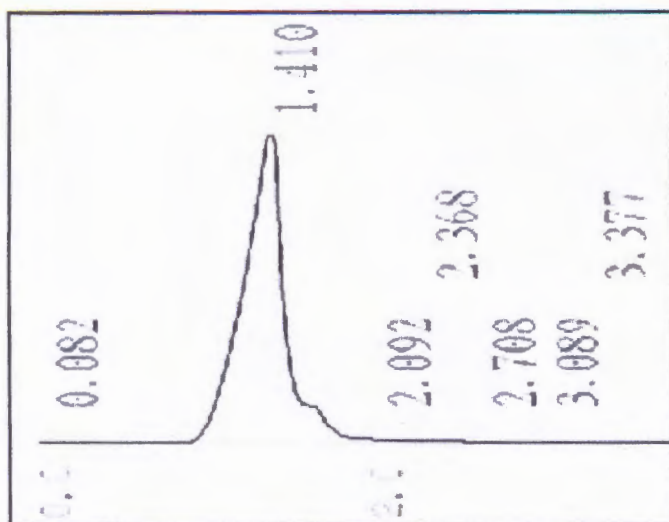
Annexe 8 : Chromatogramme d'HPLC obtenue avec le test de biodégradation du chlorpyrifos en présence et en absence de glucose.



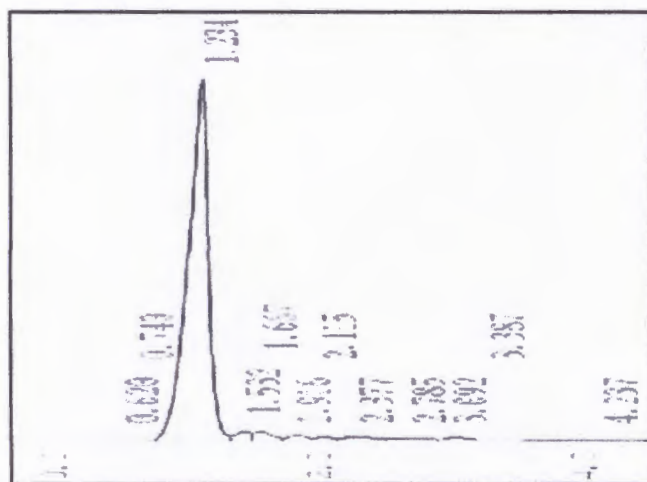
Biodégradation en présence du glucose à t_0



Biodégradation en présence de glucose en t_{48}



Biodégradation en absence du glucose t_0



Biodégradation en absence de glucose en t_{48}

Présenté par :
Meribai Noura
Abdelli Madiha

Président : Dr. Khennouf T.
Examinatrice : Dr. Benali S.
Encadreur: Dr. Sifour M.

Thème

Recherche des bactéries tolérantes ou dégradantes des pesticides

Résumé

Les pesticides sont les principaux contaminants actuels, fréquemment détectés dans tous les compartiments de l'environnement, et qui provoquent de graves inquiétudes sur la sécurité alimentaire et la pollution environnementale. L'objectif de ce travail est d'isoler des bactéries capables de tolérer ou d'utiliser le chlorpyrifos (pesticide organophosphoré) comme seule source de carbone et d'énergie. 15 souches bactériennes ont été isolées à partir d'un sol agricole de El-kannar sur le milieu minéral minimal gélosé contenant le chlorpyrifos (50mg /l). Les résultats obtenus révèlent la capacité des isolats de croître dans le milieu minéral minimum en présence de différentes concentrations du chlorpyrifos avec une meilleure croissance des souches B 3-1, B 5-2 et S4. Selon les chromatogrammes d'HPLC, la souche sélectionnée B 5-2 a été capable de dégrader jusqu'à 67% de chlorpyrifos à une concentration de 200mg/l après 48h d'incubation. L'addition d'une autre source de carbone (glucose) a ralenti la vitesse de dégradation du chlorpyrifos. L'identification préliminaire de la souche sélectionnée a révélé qu'elle appartient probablement au genre *Pseudomonas* sp.

Mots-clés: Pesticides, Pollution Environnementale, Chlorpyrifos, Biodégradation

Abstract

Pesticides are current major contaminants frequently detected in all compartments of the environment, causing serious concerns on food safety and environmental pollution. This study aimed to isolate bacterial strain able to tolerate or use the chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) as sole source of carbon. A total of 15 bacterial isolates were isolated from an El-kannar agricultural soil sample on a minimal mineral agar medium containing chlorpyrifos (50mg/l). The results show the ability of the isolates to grow in minimal mineral medium in the presence of different concentrations of chlorpyrifos with better growth in the case of the strains B 3-1, B 5-2 and S4. According to the HPLC chromatograms, the selected strain B5-2 was able to degrade about 67% of chlorpyrifos at a concentration of 200 mg/l after 48h of incubation. The addition of another source of carbon (glucose) resulted in a slowed the degradation rate of chlorpyrifos. A preliminary identification of the selected strain revealed that it can probably belong to the genus *Pseudomonas* sp.

Keywords: Pesticides, Environmental Pollution, Chlorpyrifos, Biodegradation

المخلص

تعتبر المبيدات حاليًا من الملوثات الرئيسية والتي كثيرا ما يتم الكشف عنها في جميع أجزاء البيئة، وتسبب مخاوف جدية حول سلامة الغذاء وتلوث البيئة. هدفت هذه الدراسة إلى عزل سلالات بكتيرية قادرة على استخدام الكلوربيريفوس كمصدر وحيد للكربون وتقييم نموها والتحلل البيولوجي. تم عزل 15 عزلة بكتيرية من التربة الزراعية من منطقة القنار باستخدام الوسط المعدني الصلب الذي يحتوي على 50مغ/ل من الكلوربيريفوس. وظهرت النتائج قدرة العزلات على النمو في الوسط المعدني في وجود تراكيز مختلفة مع نمو أفضل في حالة السلالات B 3-1, B 5-2 S4. أظهرت تحليل HPLC، ان العزلة البكتيرية المختارة B 5-2 قادرة على تحليل حوالي 67 % من الكلور بيريفوس بتركيز 200مغ/ل بعد 48 ساعة من الحضانة. اذت اضافة مصدر كربوني آخر (الجلوكوز) إلى تباطؤ معدل تحلل الكلوربيريفوس. وتم تعريف بدائي للسلالة المختارة حيث تبين أنها ربما تنتمي لجنس *Pseudomonas* sp. الكلمات المفتاحية: المبيدات، التلوث البيئي، الكلوربيريفوس، التحلل البيولوجي

