



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THÈSE

PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES

OPTION : BIOLOGIE VEGETALE

Intitulé

Effet des pesticides sur la microflore des eaux dans la région du Nord-Est algérien. Biodégradation par les souches isolées

Presentée par : Mme : AIMEUR Nadjette

Devant le Jury:

Pr. TAHAR Ali

Président

Université de Annaba

Pr. BORDJIBA Ouahiba

Directrice de thèse

Université de Annaba

Pr.GHEID Abdelhak

Examineur

Université de Souk Ahras

Dr. DJAHRA Ali Boutlelis

Examineur

Université de d'El Oued

Année universitaire: 2016-2017

Le véritable voyage de découverte ne consiste pas à chercher de nouveaux paysages mais à avoir de nouveaux yeux

Marcel Proust

Remerciements

Après avoir remercié ALLAH Le tout puissant.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au professeur BORDJIBA Ouahiba pour avoir dirigé ma thèse au cours de ces longues années avec beaucoup de patience. Elle fut pour moi une directrice de thèse attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Monsieur le Professeur TAHAR Ali, je tiens à vous remercier chaleureusement pour votre soutien scientifique et moral. Puissiez-vous trouver ici ma plus profonde reconnaissance pour votre aide concernant l'étude statistique de ce travail et pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Que le Professeur GHEID Abdelhak et Docteur DJAHRA Ali Boutlelis veuillent trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de bien vouloir examiner ce travail malgré leurs diverses préoccupations. Qu'ils soient assurés de ma vive reconnaissance.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, HASSAINE Amina, SALEMCOUR Nora, Mme TLILI Nadia, Mme Atab Saliha ; MORGAD Faten , NECIBE Asma, GOURI Saida , GUERGEB Saliha, HABACHI Wafa, MERAGNI Messaouda, TAHAR Wafa, MEKSEM Nabila.

Mes remerciements vont également à mon cher époux pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman pour leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses ? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je vous aime.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

Résumé Français.

Résumé Anglais

Résumé Arabe.

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1. APERCU BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. LESPESTICIDES.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Classification.....	4
1.2.1. Premier système de classification.....	5
1.2.2. Deuxième système de classification.....	6
1.3. Principales familles de pesticides.....	6
1.3.1. Les organochlorés.....	6
1.3. 2. Les organophosphorés.....	7
1.3.3. Les urées.....	8
1.3.4. Les carbamates.....	8
1.3.5. Les triazines.....	9
1.3.6. Les pyréthrinoïdes.....	9
1.4. Utilisation.....	9
1.5. Formulation.....	10
1.6. Modes d'action des pesticides.....	10
1.7. Doses admissibles et normes.....	13
1.8. Devenir des pesticides dans l'environnement.....	13

1.8.1. Le transfert des pesticides vers les eaux superficielles et souterraines.....	14
1.8.1. Le transfert des pesticides vers les eaux superficielles et souterraines.....	15
1.10. Persistance.....	15
1.11. Formation de résidus liés.....	17
1.13. Toxicité des pesticides sur l'homme.....	17
2. LA BIOREMEDIATION.....	18
2.1. Introduction	18
2. 2. Définition.....	18
2.3. Les différentes techniques utilisées dans les processus de bioremédiation.....	18
2.3.1. La bioaugmentation.....	19
2.3.2. La biofiltration.....	19
2.3.3. La biostimulation.....	20
2.3.4. Le compostage.....	20
2.3.5. La biolixiviation.....	20
2.4. Les critères de sélection des souches microbiennes aptes pour la biorémediation.....	21
2.4.1. Adaptation et phase de latence.....	21
2.4.2. Spécificité et non spécificité polluant/ genre microbien.....	22
2.4.3. Seuils inférieurs et supérieurs.....	22
2.5. Facteurs qui influencent le processus de biodégradation d'un matériau.....	22
2.5.1. La température.....	22
2.5.2. L'humidité.....	23
2.5.3. L'oxygène.....	23
2.5.4. Le pH.....	23

2.5.5. Influence du nombre de substituants halogénés sur la biodégradation.....	23
2.5.6. Les adjuvants des produits phytosanitaires.....	24
2.5.7. Présence d'accepteurs d'électrons.....	24
2.6. Principales réactions de la biodégradation.....	24
2.6.1. Hydrolyse.....	25
2.6.2. Hydroxylation.....	25
2.6.3. Déhalogénéation.....	25
2.6.4. Déméthylation et autres déalkylations	25
2.6.5. Méthylation.....	25
2.6.6. Réduction d'une fonction NO ₂	26
2.6.7. Désamination.....	26
2.6.8. Clivage d'une liaison éther (C-O-C).....	26
2.6.9. Conversion d'un nitrile en amide.....	26
2.6.10. Conjugaison.....	26
2.6.11. Ouverture de cycles (composés benzéniques) par Clivage ortho et méta.....	26
2.7. Intérêts économiques de la bioremédiation.....	26
2.8. Limites techniques.....	27
CHAPITREII: MATERIEL ET METHODES	
1. Présentation de la zone d'étude.....	29
1.1. Situation géographique.....	29
1.2. Hydrographie	30
1.3. Les caractéristiques climatiques.....	30
1.4. Prélèvements des échantillons d'eau	31

2. Analyse physico chimique des eaux superficielles agricoles.....	31
2.1. La température.....	31
2.2. Le pH.....	31
2.3. La Conductivité (CE).....	32
2.4. L'oxygène dissous.....	32
2.5. La demande biologique en oxygène (DBO5).....	32
2.6. La demande chimique en oxygène (DCO).....	33
2.7. Le rapport DCO / DBO5.....	33
2.8. Les ions ammonium NH_4^+	33
2.9. Les chlorures.....	34
2.10. Les orthophosphates.....	34
2.11. Les phénols.....	34
2.12. Les Nitrites.....	34
2.13. Les Nitrates.....	34
3. Analyses des paramètres physico-chimiques des pesticides.....	34
3.1. La solubilité (S)	35
3.2. La pression de vapeur (P)	35
3.3. La constante de Henry (H)	35
3.4. Les coefficients de rétention : K_{oc} et K_d	35
3.5. Mobilité.....	35
3.6. Persistance en plein champ	35
3.7. Coefficients de partage octanol-eau : K_{ow}	36
3.8. Stabilité dans l'eau.....	36

4. Méthodes d'analyse statistique.....	36
4.1. Description des données.....	36
4.2. Comparaison entre les sites : Analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA).....	36
4.3. Test de TUCKEY	37
5. Etude de la microflore microbienne totale des eaux superficielles agricoles.....	37
5.1 Dénombrement de la microflore microbienne.....	37
5.1.1. Isolement, purification et conservation des souches.....	37
5.1.2. Comptage et expression des résultats	39
5.2. Identification de la microflore fongique isolée des eaux agricoles superficielles.....	39
5.2.1. Identification macroscopique.....	39
5.2.2. Identification microscopique.....	39
5.3. Identification de la microflore bactérienne.....	40
5.3.1. Identification macroscopique	40
5.3.2. Détermination des principaux types de bactéries.....	40
5.3.3. Observation microscopique	40
5.3.4. La coloration de Gram.....	42
5.3.5. Test oxydase.....	42
5.3.6. Test catalase.....	43
5.3.7. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 ^E	43
5.3.8. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 NE.....	44
5.3.8.1. Test NO ₃	45

5.3.8.2. Test TRP.....	45
5.3.8.3. Test d'assimilation.....	45
5.3.8.4. Interprétation	45
6. Etude de la biodégradation des deux pesticides (mancozèbe et méthomyl)par les souches microbiennes isolées	47
6.1. Les souches microbiennes.....	47
6.2. Les milieux de culture.....	47
6.3. Les produits chimiques ou pesticides.....	47
6.3.1. Le mancozèbe.....	47
6.3.2. Le méthomyl.....	48
6.4. Les précultures et les cultures.....	49
6.5. Détermination de la tolérance des souches microbiennes vis-à-vis du pesticide à travers leur croissance en mode batch (culture discontinu).....	51
6.5.1. Mesure du pH.....	51
6.5.2. Détermination de la densité optique.....	51
6.5.3. Détermination du taux d'oxygène nécessaire à la dégradation des composés organiques du milieu (DCO).....	51
6.5.4. Calcul du poids sec de l'inoculum.....	52
7. Evaluation des taux de biodégradation des deux pesticides après 5 jours à partir des cultures batch en mode discontinu.....	52
7.1. Conditions chromatographiques	52
7.2. Le dosage.....	53
CHAPITREIII: RESULTATS ET DISCUSSION.....	54

1. Analyses physicochimiques des eaux superficielles agricoles.....	54
2-Analyses physico-chimiques des molécules de pesticides étudiées.....	62
3. Evaluation de la microflore totale des eaux superficielles agricoles.....	64
3.1. Les bactéries.....	65
3.2. Les champignons.....	67
4. Evaluation de la croissance des souches microbiennes sous l'effet des pesticides (Tolérance de la souche vis-à-vis du pesticide).....	74
4.1. Densité optique.....	74
4.2. p H.....	77
4.3. Taux d'oxygène.....	80
4.4. Poids sec de l'inoculum.....	82
5. Evaluation des taux de biodégradation du mancozèbe par CPG.....	94
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	109
ANNEXES.....	146

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Devenir des pesticides dans l'environnement.....	14
Figure 2. Carte de localisation géographique des sites étudiés.....	29
Figure 3. Diagramme climatique de la région d'El Taref.....	30
Figure 4. Courbe de température de la région d'El Taref.....	30
Figure 05. Méthode d'isolement de la microflore totale microbienne.....	38
Figure 6. Structure chimique du mancozèbe.....	48
Figure 7. Structure chimique du méthomyl.....	49
Figure 8. Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradabilité des molécules de pesticides.....	50
Figure 9. La température des eaux superficielles agricoles.....	54
Figure 10. pH des eaux superficielles agricoles.....	55
Figure 11. Conductivité électrique des eaux superficielles agricoles.....	56
Figure 12. Taux d'oxygène dissous des eaux superficielles agricoles.....	56
Figure 13. Teneurs de la DBO5 des eaux superficielles agricoles.....	57
Figure 14. Teneurs de la DCO des eaux superficielles agricoles.....	58
Figure 15. Rapport DCO/DBO5 des eaux superficielles agricoles.....	58
Figure 16. Teneurs de NH ₄ des eaux superficielles agricoles.....	59
Figure 17. Teneurs des chlorures (Cl ⁻) des eaux superficielles agricoles.....	60
Figure 18. Teneurs de la PO ₄ ³⁻ des eaux superficielles agricoles.....	60
Figure 19. Teneurs des phénols des eaux superficielles agricoles.....	61

Figure 20. Teneurs NO_2^- des eaux superficielles agricoles.....	62
Figure 21. Teneurs NO_3^- des eaux superficielles agricoles.....	62
Figure 22. Pourcentage de la microflore microbienne totale des sites étudiés.....	64
Figure 23. Microflore microbienne totale dénombrée au niveau des sites étudiés.....	65
Figure 24. La microflore bactérienne totale des sites étudiés.....	65
Figure 25. Pourcentage d'isolats bactériens des des eaux superficielles agricoles.....	66
Figure 26. La microflore fongique totale des sites étudiés.....	67
Figure 27. Pourcentage d'isolats fongiques des eaux superficielles agricoles.....	68
Figure 28. Densité optique des souches bactériennes en absence du pesticide.....	75
Figure 29. Densité optique des souches bactériennes en absence du pesticide.....	75
Figure 30. Densité optique des souches bactériennes en présence de mancozèbe.....	76
Figure 31. Densité optique des souches bactériennes en présence de mancozèbe.....	76
Figure 32. Densité optique des souches bactériennes en présence de méthomyl.....	76
Figure 33. Densité optique des souches bactériennes en présence de méthomyl.....	77
Figure 34. pH des cultures en présence des souches bactériennes et en absence du pesticide.....	77
Figure 35. pH des cultures en présence des souches bactériennes et en absence du pesticide.....	78
Figure 36. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du mancozèbe.....	78
Figure 37. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du mancozèbe.....	79
Figure 38. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du méthomyl.....	79

Figure 39. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du méthomyl.....	80
Figure40. Taux d'oxygène du milieu en présence des souches bactériennes en absence du pesticide.....	81
Figure 41. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches bactériennes en présence du mancozèbe.....	81
Figure 42. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches bactériennes en présence du méthomyl.....	82
Figure 43. Poids sec de l'inoculum bactérien en absence et en présence du mancozèbe.....	83
Figure 44. Poids sec de l'inoculum bactérien en absence et en présence du méthomyl.....	83
Figure45. Densité optique des souches fongiques en absence du pesticide.....	84
Figure46. Densité optique des souches fongiques en absence du pesticide.....	84
Figure47. Densité optique des souches fongiques en présence de mancozèbe.....	85
Figure 48. Densité optique des souches fongiques en présence de mancozèbe.....	85
Figure 49. Densité optique des souches fongiques en présence duméthomyl.....	86
Figure 50. Densité optique des souches fongiques en présence duméthomyl.....	86
Figure 51. Evaluation du pH des souches fongiques en absence du pesticide.....	87
Figure 52. Evaluation du pH des souches fongiques en absence du pesticide.....	87
Figure53. Evaluation du pH des souches fongiques en présence du mancozèbe.....	88
Figure54. EvaluationdupH des souches fongiques en présence du mancozèbe.....	88
Figure 55. Evaluation de p Hdes souches fongiques en présence du méthomyl.....	89
Figure 56. Evaluation de p H des souches fongiques en présence du méthomyl.....	89
Figure 57. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches fongiques en absence du pesticide.....	90

Figure 58. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches fongiques en présence du mancozèbe.....	90
Figure 59. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches fongiques en présence du méthomyl.....	91
Figure 60. Poids sec de l'inoculum fongique en absence et en présence du mancozèbe.....	92
Figure 61. Poids sec de l'inoculum fongique en absence et en présence du méthomyl.....	92
Figure 62. Pourcentage de biodégradation du mancozèbe par les souches bactériennes.....	95
Figure 63. Pourcentage de biodégradation du mancozèbe par les souches fongiques.....	95
Figure 64. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96
Figure 65. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Pasteurella pneumotropica</i>	97
Figure 66. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Aeromonas hydrophila</i>	97
Figure 67. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Serratia marcescens</i>	98
Figure 68. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Burkholderia cepacia</i>	98
Figure 69. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Chryseomonas luteola</i>	99
Figure 70. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Aspergillus flavus</i>	99
Figure 71. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par <i>Aspergillus niger</i>	100

Figure 72. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozébe par

Penicillium citreonigrum.....100

Figure 73.Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozébe par

Penicillium chrysogenum.....101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principale familles des insecticides herbicides fongicides.....	6
Tableau 2. Modalités d'utilisation des pesticides.....	11
Tableau 3. Modes d'action des insecticides et acaricides.....	11
Tableau 4. Modes d'action des fongicides.....	12
Tableau 5. Modes d'action des herbicides.....	12
Tableau6. Les différents sites de prélèvement	31
Tableau 7. Tableau de lecture des tests du système API 20 E.....	44
Tableau 8. Tableau de lecture des tests du système API 20 NE.....	46
Tableau 9. Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées.....	63
Tableau10. La liste des espèces bactérienne identifiées.....	66
Tableau 11. Taxonomie des espèces bactérienne isolées.....	67
Tableau 12. La liste des espèces fongiques identifiées dans chaque site.....	68
Tableau13. Liste et taxonomie des espèces bactérienne identifiées au niveau des eaux.....	69

LISTE DES ABREVIATIONS

(H): constante de Henry

(P): pression de vapeur

2,4 D: acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

ACCase: acétyl-CoA carboxylase

ADEME: Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

AIA: acide indol-acétique

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

CA: Chemical abstract name

CE: conductivité électrique

DBO5: demande biologique en oxygène

DCBN: 2, 6-Dichlorobenzonitrile

DCO: demande chimique en oxygène

DCPBA: 2,6-dichloro-benzamide.

DDT: dichlorodiphényltrichloroéthane

DGCCRF: Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

DJA : dose journalière admissible

DMSO: diméthylsulfoxyde

DT₅₀: temps de dégradation de 50 % de la substance active

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

GGPP: géranylgéranyl-pyrophosphate

GS : Milieu Gazy et Slonimski

HPPD: 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase

IUPAC: International Union of Pure and Applied chemistry

K_d: coefficient de rétention

KMNO₄: permanganate de potassium

K_{oc}: coefficient de rétention

K_{ow} : coefficient de partage octanol-eau

MBC: carbendazime

MCPA : acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique

MEA: extrait de malt-agar

MMO : méthane-mono-oxygénases
MMO: méthane-mono-oxygénase
NADD: News Agriculture et développement durable
NDPD :N diméthyl-paraphénylène -diamine.
nm: nanomètre
OMS: Organisation mondiale de la santé
ORP: observatoire des résidus de pesticides
Pa: unité de pression (Pascal)
PBS (Phosphate - Buffered Saline)
PDA :Pomme de terre-dextrose-agar
PDA: N-diméthyl paraphénylène diamine
PDO :phénylène –diamine- oxydase
PDS : phytoène-désaturase
PSI : Photosystème I
PSII: photosystème II
TCA:trichloroacétique
UFC :Unités Formant Colonies
UPDS: Union professionnelle de la dépollution des sites

RESUME

Les pesticides sont les polluants majeurs des eaux superficielles, souterraines et des nappes phréatiques. Du fait de leur toxicité et de leurs effets cancérigènes, ils représentent une préoccupation majeure pour les autorités publiques et sanitaires. La restauration des sites contaminés est possible par des techniques de dépollution biologique impliquant les microorganismes (biodégradation microbienne). Cependant, la réussite des traitements dépend à la fois des conditions physicochimiques du site pollué et des capacités de dégradation de la microflore indigène.

Notre travail est fondé sur l'élaboration d'une collection de souches isolées à partir des eaux superficielles polluées par les pesticides dans une région à vocation agricole (Ben M'Hidi-Echatt) soumise à l'effet de pesticides pendant plusieurs années, et l'implication de ces souches dans la biodégradation de deux pesticides (mancozèbe et méthomyl).

La pollution des eaux superficielles agricoles a été appréciée à travers plusieurs paramètres physicochimiques. L'effet de la pollution par les pesticides sur la biomasse microbienne a été déterminé. L'évaluation qualitative et quantitative la microflore microbienne a permis ensuite de dresser un inventaire de souches microbiennes résistantes.

La biodégradation de deux pesticides par les souches sélectionnées a été étudiée en cultures batch sous des conditions anéorobiques pendant une période de 120 heures au cours de laquelle, les cinétiques de croissance des souches testées ont été déterminées à travers plusieurs paramètres chimiques et physiques. Le pourcentage de bioremédiation a été également évalué à partir des extraits de cultures de 120 heures par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse physicochimique des eaux analysées a montré que la plupart des paramètres étudiés au cours de l'expérimentation, en particulier la conductivité électrique, les chlorures, les nitrites, l'ammonium et le ratio DCO/DB05 dépassent les normes admissibles signalées par les organisations mondiales. Une microflore importante composée de plusieurs espèces bactériennes et fongiques dont les plus prépondérantes sont : *Chryseomonas luteola*, *Sténotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus niger* *Penicillium citreonigrum*.

Les cinétiques de croissance ont montré un bon développement et une tolérance de la plupart des souches testées et une biomasse microbienne en augmentation durant toute la période d'incubation, et ce, pour les deux pesticides étudiés. Les meilleurs résultats sont obtenus à partir des cultures pures individuelles par comparaison à ceux des cultures mixtes en

consortium. Par ailleurs, les taux de pesticides disparus montrent que les souches: *Chryseomonas luteola*, *Aspergillus niger* sont celles qui possèdent des pouvoirs de biodégradation non négligeables avec des pourcentages respectifs de 56,36% et 54,03%, lorsque le pesticide est ajouté aux cultures au début de la phase exponentielle. Les pics majeurs et/ou mineurs révélés par les chromatogrammes lors de la disparition et la transformation du pesticide laissent supposer la présence des mêmes métabolites secondaires.

Mots clés : mancozèbe, méthomyl, eaux superficielles agricoles, microflore bactérienne et fongique, croissance, biodégradation.

Abstract

Pesticides are the major pollutants of surface water, groundwater and groundwater. Because of their toxicity and carcinogenic effects, they represent a major concern for public and health authorities. The restoration of contaminated sites is possible by biological depollution techniques involving microorganisms (microbial biodegradation). However, the success of treatments depends on both the physicochemical conditions of the polluted site and the degradation capacities of the native microflora.

Our work is based on the development of a collection of strains isolated from surface water polluted by pesticides in an agricultural region (Ben M'Hidi-Echatt) pesticides for several years, and the involvement of these strains in the biodegradation of two pesticides (mancozeb and methomyl). The pollution of agricultural surface waters was assessed through several physicochemical parameters. The effect of pesticide pollution on microbial biomass was determined. The qualitative and quantitative assessment of the microbial microflora resulted in an inventory of resistant microbial strains.

The biodegradation of two pesticides by the selected strains was studied in batch cultures under anoxic conditions for a period of 120 hours during which the growth kinetics of the strains tested were determined through several chemical and physical parameters. The percentage of bioremediation was also evaluated from the 120-hour culture extracts by gas chromatography.

Physicochemical analysis of the analyzed waters showed that most parameters studied during the experiment, in particular electrical conductivity, Chlorides, nitrites, ammonium and COD / DB05 ratio, exceeded the permissible standards reported by the world organizations. An important microflora composed of several bacterial and fungal species, the most predominant being: *Chryseomonasluteola*, *Stenotrophomonasmaltophilia*, *Serratiamarcescens*, *Aspergillusniger* *Penicilliumcitreonigrum*.

The growth kinetics showed good development and tolerance of most of the strains tested and an increasing microbial biomass throughout the incubation period for the two pesticides studied. The best results are obtained from individual pure cultures compared to those of mixed cultures in consortium. Moreover, the disappearance of pesticides shows that the strains: *Chryseomonasluteola*, *Aspergillusniger* are those with significant biodegradation powers with 56.36% and 54.03%, respectively, when the pesticide is added to culture medium

at the beginning of the exponential phase. The major and / or minor peaks revealed by the chromatograms during the disappearance and transformation of the pesticide suggest the presence of the same secondary metabolites.

Key words: mancozeb, methomyl, agricultural surface waters, bacterial and fungal microflora, growth, biodegradation.

الملخص

تعتبر المبيدات من الملوثات الرئيسية للمياه السطحية والجوفية. وبسبب سميتها واثارها المسرطنة نالت اهتمام كبير من طرف السلطات العمومية و الصحية. من الممكن استصلاح المناطق الملوثة باستعمال تقنيات إزالة التلوث البيولوجي بالكائنات المجهرية (التحلل الحيوي الجرثومي).

يرتبط نجاح المعالجة بالشروط الفيزيوكيميائية للمنطقة الملوثة والقدرة على التحلل البكتيري في آن واحد.

تعتمد دراستنا على تطوير مجموعة من السلالات المعزولة من مواقع مختلفة ملوثة في منطقة زراعية (بن مهدي- الشط) خضعت لتأثير التلوث بالمبيدات لعدة سنوات، واستعمال هذه السلالات في التحلل البيولوجي للمبيدات (مبيد فطري: mancozeb ومبيد حشري: méthomyl) .

قد تم تقدير تلوث المياه الجوفية من خلال العديد من المعايير الفيزيوكيميائية. وتم تحديد تأثير التلوث بالمبيدات على الكتلة الحيوية الجرثومية. كما سمح بعد ذلك التقدير النوعي والكمي للكائنات المجهرية الميكروبية بجدد قائمة من السلالات المقاومة.

تمت دراسة التحلل الحيوي (البيولوجي) لمبيدات (mancozeb و méthomyl) باستعمال السلالات المختارة في أوساط زرع batch في ظروف لاهوائية لمدة خمسة أيام، وتم خلالها تحديد حركية النمو للسلالات المختبرة من خلال العديد من المعايير الكيميائية والفيزيائية. وتم أيضا تقدير نسبة المعالجة البيولوجية من خلال مستخلصات الزرع 120 ساعة بواسطة التحليل الكروماتوغرافي المرحلة الغازية.

أظهر التحليل الفيزيوكيميائي للمياه السطحية الزراعية أن معظم المعايير المدروسة خلال التجربة، لا تتجاوز المعايير المسموح بها من طرف DCO/DB05 سيما الناقلية الكهربائية، الأمونيوم ونسبة المنظمات العالمية. تتكون مجموعة الكائنات الدقيقة الهامة من عدة أنواع بكتيرية وفطرية
Chryseomonas luteola, Stenotrophomonas maltophilia, Serratia marcescens,

Penicillium citreonigrum. Aspergillus niger

كما أظهرت حركية النمو تطور جيد ومقاومة من معظم السلالات المختبرة وكتلة حيوية ميكروبية في تزايد طوال فترة الحضانة، وهذا لكل من المبيدات المدروسين.

إن أفضل النتائج المتحصل عليها كانت من الزرع النقي الفردي مقارنة بالزرع المختلط. بالإضافة إلى ذلك، فإن نسبة المبيدات المختفية أثناء الاختبارات البيولوجية تبين أن السلالات: *Chryseomona*, *Aspergillus niger sluteola*, هي التي تملك القدرة على التحلل البيولوجي بدرجة كبيرة بالنسب المئوية 56.36% و 54.03%، عندما يضاف المبيد في بداية مرحلة النمو السريع.

إن الذروات الرئيسية المبينة بالكروماتوغرام أثناء اختفاء وتحويل المبيد تتشكل نتيجة لوجود مركبات الأيض الثانوية.

الكلمات المفتاحية: méthomyl، mancozèbe، المياه السطحية الزراعية، مجموعة الكائنات الدقيقة البكتيرية و الفطرية، النمو، التحلل البيولوجي.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les années 1950, le développement de l'agriculture et la volonté d'augmenter les rendements ont conduit à une utilisation croissante des pesticides. La lutte chimique qui, jusqu'alors, était limitée à l'emploi de deux ou trois fongicides et insecticides utilisés contre les ravageurs des plantes, utilise aujourd'hui des milliers de matières actives de produits-pesticides. Ces substances phytosanitaires sont commercialisées un peu partout dans le monde. Environ 25% actuellement consommés dans le monde, le sont dans des pays en développement. La consommation de pesticides progresse parallèlement au développement, on passe progressivement à des quantités plus importantes de produits plus variés (insecticides, fongicides et herbicides) pour toute une série de cultures.

Dans le cadre de l'agriculture intensive, la tendance actuelle consiste à optimiser la production par rapport à la surface cultivée. Ainsi dans certains pays en développement, les quantités de pesticides utilisées sont sans doute nettement supérieures aux quantités correspondant aux besoins phytosanitaires (OMS, 1991). la consommation annuelle est estimée à environ 4 millions de tonnes au niveau mondial. Le marché mondial phytosanitaire a connu depuis 1994 une réelle augmentation pour atteindre 25,38 milliards de dollars, le marché américain restant le premier suivi du Japon et de la France. Le budget recherche-développement représente de 7 à 13 % du chiffre d'affaires global selon les firmes, le coût de commercialisation d'un produit phytosanitaire étant estimé à 80 millions de dollars, dont 20 pour l'homologation.

Plusieurs auteurs ont démontré que les pesticides mal employés peuvent être toxiques pour toutes les composantes de l'environnement, aussi bien pour les animaux, les hommes, les plantes que pour les microorganismes (Renner et Hopfer, 1987; Huynt, 1990; Ramade, 1992). Si la toxicité de ces produits est effectivement indéniable, l'agriculture ne peut, dans l'état actuel des connaissances, s'en passer. En revanche, de nombreux progrès restent à faire pour les utiliser au mieux et limiter les risques qu'ils font courir aux populations et à la nature. Pour cela, les pesticides restent donc une arme à double tranchant car selon l'utilisation qui en est faite, ils peuvent être bénéfiques ou dangereux. Ils provoquent l'augmentation des rendements d'une part, et l'augmentation de la toxicité sur les différentes composantes de l'environnement avec l'installation d'une résistance irréversible des agents pathogènes d'autre part.

Certes l'introduction massive de ces molécules dans l'environnement, a induit de graves conséquences et une problématique de pollution potentielle a été alors soulevée et prend de plus en plus d'ampleur. Les pesticides contaminent les eaux de surface ainsi que les eaux souterraines. Désormais la contamination des eaux par les produits phytosanitaires est un fait, de nombreuses matières actives sont détectées à des concentrations très variables dans l'espace et dans le temps qui peuvent atteindre des valeurs critiques pour la santé des écosystèmes et les ressources en eau (Andral, 1996). Si l'intérêt s'est porté en premier temps sur la contamination par les pesticides des différents compartiments du sol en raison de fortes concentrations détectées précocement, le problème des eaux superficielles et souterraines du réseau de surface est aujourd'hui pertinent. Leur complexité, les multiples conditions d'emploi, la spécificité des milieux où ils sont épanchés et les nombreux mécanismes biotiques et abiotiques qui agissent sur leur devenir et leurs interactions rendent difficile l'évaluation des risques liés à leur utilisation. Les données ne sont pas toujours disponibles pour des raisons de confidentialité ou à défaut d'une législation harmonisée concernant la santé humaine.

Selon l'OMS (2012), les pesticides seraient responsables du décès de 20.000 personnes environ chaque année, dans le monde. Ils ont été mis évidence dans le sol, les eaux, les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale (les œufs, le lait, la viande, le poisson). A peu près 45% des aliments européens contiennent des résidus de pesticides (N.A.D.D, 2015). Ils existent sous leur forme initiale mais ils peuvent aussi être dégradés, on parle alors de résidus ou de métabolites. La contamination de l'environnement expose tout un chacun à des niveaux de pesticides variables et souvent difficiles à apprécier.

En effet, tous les milieux ne sont pas correctement renseignés et il n'est pas toujours possible d'établir les niveaux d'expositions des populations pour chacun d'entre eux.

L'Algérie à elle seule, utilise environ 6 000 à 10 000 tonnes de pesticides par an (Moussaoui et *al.*, 2001; Bouziani, 2007). Environ 400 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Protection Phytosanitaire J.O, 1991). Dans notre pays, les analyses des résidus de pesticides pour évaluer le degré de contamination des milieux naturels (le sol, les cultures, les aliments, les eaux superficielles, eaux souterraines) ne sont pas faites systématiquement. Il y a quelques années déjà, dans certaines régions du pays (Staoueli, Annaba, les concentrations de pesticides dans les aliments, les eaux superficielles, souterraines et dans les fruits étaient élevées. Des doses d'organochlorés et d'organophosphorés (Lindane, Glyphosates) dépassant

les normes admissibles ont été détectées. De surcroît, selon le cadastre national des déchets dangereux, il existe plus de 2300 tonnes de pesticides périmés répartis sur 500 sites (sites agricoles, Onapsa, Asmidal...).

Devant l'ampleur de la situation, il est donc de notre devoir de rechercher des solutions pour diminuer ou éliminer les risques de l'utilisation de ces produits phytosanitaires. L'utilisation des méthodes biologiques reste l'alternative la plus employée. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail consiste en l'utilisation des microorganismes dotés de pouvoirs de biodégradation vis-à-vis des pesticides. En effet, l'équipement enzymatique des microorganismes leur permet de métaboliser les substrats y compris les composés-pesticides. Ces microorganismes constituent selon la plupart des chercheurs, un moyen sûr et peu coûteux, voire même unique (Ala-AI, 1992b; Stamper et Tuovinen, 1998 in Savadogo, 2001).

Le but principal de ce travail était d'isoler les espèces microbiennes des eaux superficielles agricoles polluées par les pesticides, de sélectionner les plus significatives et de tester leurs potentialités de bioremédiation. Pour ce faire, nous avons structuré notre travail comme suit:

- dans le premier volet, nous avons évoqué l'état des connaissances bibliographiques se rapportant au thème étudié.
- le second volet, a été consacré à la présentation de la région d'étude, le matériel utilisé et les méthodes employées afférentes à l'appréciation de la pollution par les pesticides sur les caractéristiques des eaux contaminées, l'isolement, l'identification et la sélection des souches microbiennes et l'évaluation de leurs capacités de biodégradation dans des microcosmes « *In vitro* » en culture batch.
- dans le troisième volet, nous avons présenté les résultats et leur discussion.
- enfin, nous avons terminé cette étude par une conclusion générale et dégagé les perspectives.

CHAPITRE I
APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. APERCU BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES PESTICIDES

1.1. Définition

Le terme pesticide désigne toute substance ou mélange servant à empêcher, détruire, repousser des organismes indésirables pour l'agriculture ou l'hygiène publique. Il s'agit d'un terme général englobant une grande variété de produits : herbicides, fongicides, insecticides.

Un pesticide peut être une substance chimique, un agent biologique (tel qu'un virus ou une bactérie), un désinfectant ou tout autre produit luttant contre des « nuisibles » tels que les insectes, les mauvaises herbes, ou les microbes. Les pesticides peuvent être classés en fonction de leurs familles chimiques.

Selon l'OMS, les pesticides sont des produits chimiques utilisés en agriculture pour détruire les ravageurs, les plantes adventices et les agents phytopathogènes. Ces produits peuvent être extraits de végétaux ou obtenus par synthèse. Dans le présent travail, on s'intéresse aux pesticides chimiques de synthèse qui présentent un risque pour l'environnement et la santé publique.

Selon la FAO (1986 a), un pesticide est une substance ou un mélange de substances, utilisé pour empêcher d'agir, détruire ou neutraliser un ravageur, un vecteur de maladie humaine ou animale, une espèce végétale ou animale nocives ou gênantes au cours de la production, de la transformation, de l'entreposage, du transport ou de la commercialisation de denrées alimentaires, de produits agricoles. Le terme de pesticide désigne aussi des produits utilisables comme régulateurs de la croissance végétale, défoliants, dessicants, agents d'éclaircissage contre la chute prématurée des fruits ou encore des produits appliqués avant la récolte pour empêcher la détérioration des denrées en cours d'entreposage ou de transport.

1.2. Classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités que leur classification est complexe. Devant le nombre considérable de pesticides (plus de 1000 matières actives différentes dans près de 7000 formulations commerciales), (Kesraoui+, 2008).

D'une manière générale, les substances actives peuvent être classées soit en fonction de la nature de l'espèce à combattre (1^{er} système de classification), soit en fonction de la nature chimique (2^{ème} système de classification)

1.2.1. Premier système de classification

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles d'activités que sont les herbicides, les fongicides et les insecticides.

- **Les insecticides** : La lutte contre les ravageurs est indispensable. Les insectes nuisibles sont en effet responsables des pertes de rendement et d'une baisse de qualité de la production viticole (Kreiter *et al.*, 2008).

Les insecticides sont destinés à détruire les insectes nuisibles ; ils se répartissent en trois grands groupes selon leur nature chimique : substances minérales, molécules organiques d'origine naturelle ou produits organiques de synthèse qui sont de loin les plus utilisés actuellement. Autres que les organochlorés (DDT, dieldrin, ...) qui sont bannis actuellement dans la plupart des pays du nord, les insecticides appartiennent à trois grandes familles chimiques : les organophosphorés (diméthoate, malathion, ...), les carbamates (aldicarbe, carbofuran, ...) et les pyréthrinoides de synthèse (bifenthrine, perméthrine, ...)

- **Les fongicides** : Les fongicides servent à combattre la prolifération des champignons phytopathogènes. Ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés. Le mildiou de la pomme de terre, celui de la vigne, les charbons et les rouilles des céréales, représentait autrefois de véritables fléaux. Ces affections sont provoquées par l'invasion des divers tissus des plantes par le mycélium de champignons microscopiques. Les plus anciens fongicides connus sont des sels cupriques, le soufre et certaines de ses dérivés minéraux. Les composés organiques représentent la part la plus importante: carbamates (carbendazine, mancozèbe, ...), triazoles (bromuconazole, triticonazole,...), dérivés du benzène (chlorothalonil, quintozone), dicarboximides (flopel, iprodione,...). Il est intéressant de signaler que le soufre et le cuivre demeurent d'excellents fongicides utilisés jusqu'à nos jours (Calvet *et al.*, 2005).

- **Les herbicides** : Ce sont les plus utilisés des pesticides, ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Ils appartiennent à plus de 35 familles chimiques différentes. Les plus représentées sont les carbamates (chlorprophame, triallate,...), les urées substituées (diuron, chlortoluron,...), les triazines (atrazine, simazine,...), les chlorophenoxyalcaniques (MCPA,...), les amides (alachlore, propyzamide,...).

Tableau 1. Principales familles des insecticides herbicides fongicides

Insecticides	Herbicides	Fongicides
Minéraux		
Composés arsenicaux Soufre Composés fluorés Dérivés de mercure Dérivés de Sélénium Composés à base de silice Quartz, magnésie Huiles de pétrole	Sels de NH ₄ , de Ca, de Fe de Mg, K, Na Sous forme de sulfates, de nitrates Chlorures, Chlorates,...	Sels de Cuivre A base de soufre Composés arsenicaux Huiles minérales
Organiques		
Organochlorés Organophosphorés Carbamates	Phytohormones Dérivés de l'urée Carbamates Triazines et Diazines Dérivés de pyrimidines Dérivés des dicarboximides Dérivés de l'oxyquinoleine Dérivés des thiadiazines et Thiadiazoles	Carbamates et Dithiocarbamates Dérivés du benzène Dérivés des quinones Amides Benzonitriles Toluidines organophosphorés
Divers		
Pyréthroïde de synthèse Produits bactériens Répulsifs	Dicamba Pichlorame Paraquat	Carboxines Chloropicrine Doguanide Formol

1.2.2. Deuxième système de classification

Un produit phytosanitaire tel qu'il est présenté, est une spécialité formulée homologuée pour le traitement d'une culture précise (maïs, blé, tomate, pomme de terre, pois, fraise, etc...). La spécialité formulée est composée d'une ou plusieurs matières actives et d'un ou plusieurs additifs.

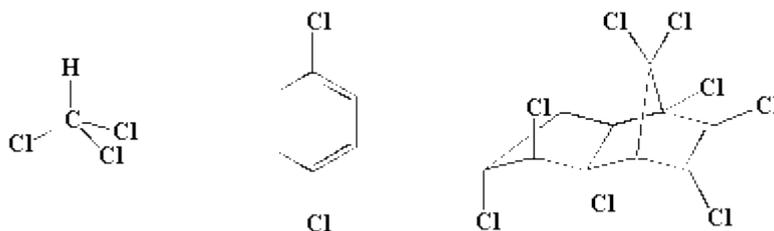
Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les produits phytosanitaires. Compte tenu de la variété des propriétés physico-chimiques des pesticides disponibles sur le marché, il existe un très grand nombre de familles chimiques. Les plus anciens et principaux groupes chimiques sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines et les urées substituées. Les structures chimiques caractéristiques de certaines de ces familles sont présentées dans le tableau 1.

1.3. Principales familles de pesticides

1.3.1. Les organochlorés

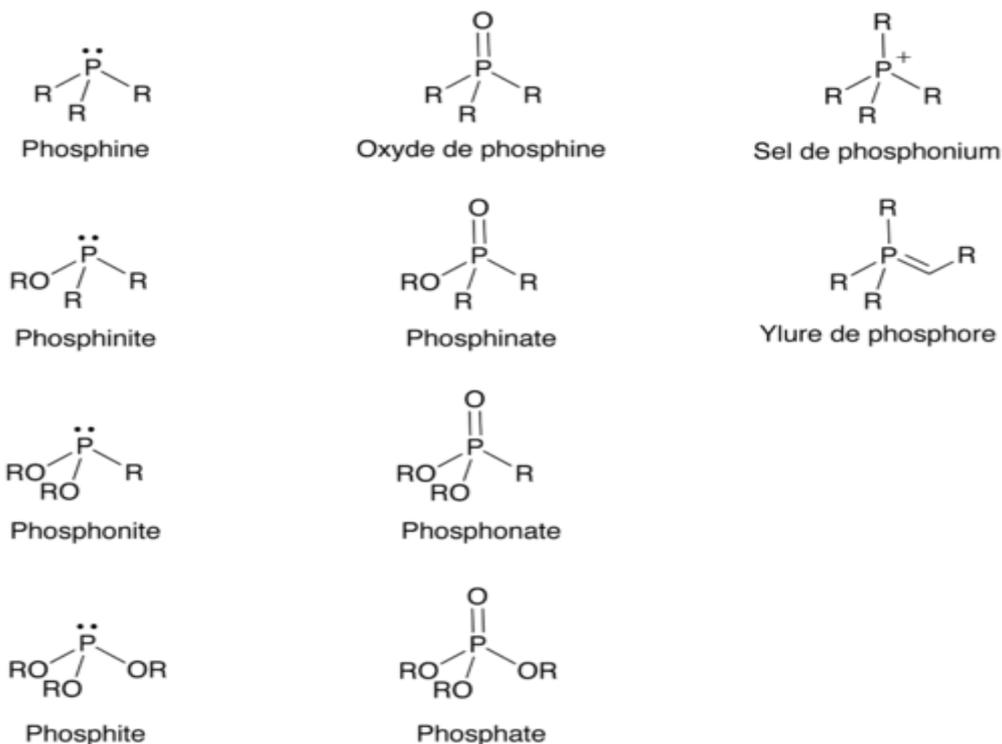
Cette famille comprend un grand nombre de composés chimiques contenant du chlore et quelquefois d'autres éléments.

Les insecticides les plus puissants et les plus efficaces sont des organochlorés. On trouve dans cette famille le DDT, le chlordane, ou en encore le pentachlorophenol. Ils sont très persistants dans les sols, et ils se concentrent également dans les tissus biologiques. Beaucoup de composés de cette famille sont interdits en raison de leur neurotoxicité.



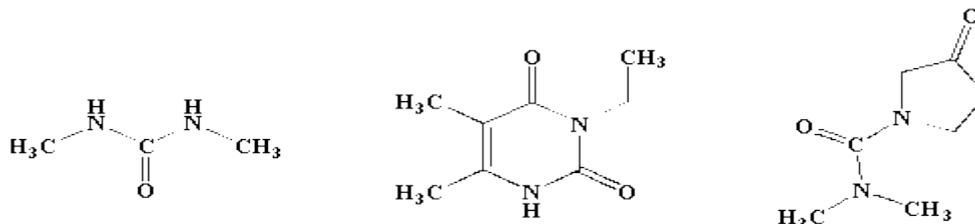
1.3. 2. Les organophosphorés

Les composés organophosphorés se répartissent en différentes classes selon le degré d'oxydation du phosphore et la nature des substituants, notamment la présence d'un atome d'oxygène ou d'un autre chalcogène. Les composés organophosphorés sont rapidement dégradés par le rayonnement solaire, dans l'air, et dans les sols, bien que de petites quantités puissent subsister et se retrouver dans la nourriture et l'eau. Le fait qu'ils se dégradent facilement fait de cette famille une alternative intéressante aux pesticides organochlorés persistants. Cependant, bien que les organophosphorés se dégradent plus rapidement, ils sont plus toxiques, ce qui représente un risque pour les utilisateurs de ces composés.



1.3.3. Les urées

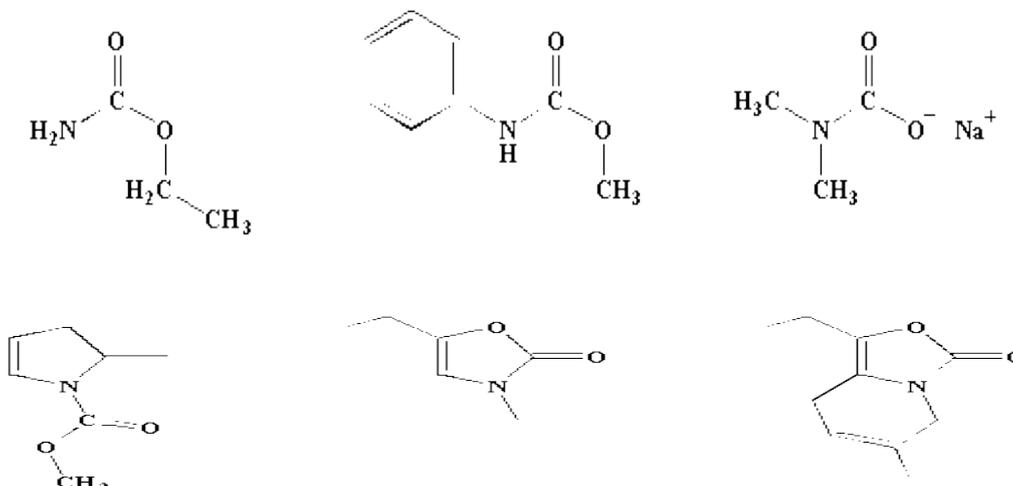
Les urées représentent les molécules renfermant un groupe urée (NH_2CONH_2). Ce groupe peut se trouver à l'intérieur d'un cycle (Forgacz, 2011). Les atomes d'hydrogène liés aux atomes d'azote peuvent être substitués par d'autres atomes, par des chaînes ou par des cycles où constituer un cycle. Les sulfonylurées répondent également à la définition des urées. Cependant, comme la priorité de ce groupe est supérieure à celle des urées, les molécules répondant aux deux définitions seront classées dans les sulfonylurées.



1.3.4. Les carbamates

Les carbamates présentent les mêmes caractéristiques que les organophosphorés, mais avec une toxicité moins importante. Ces composés constituent une famille de pesticides agissant sur l'enzyme acétylcholinestérase (la famille des carbamates agit également sur cette enzyme mais selon un mécanisme différent) (Anne-Antonella, 2015).

Ils opèrent en bloquant irréversiblement l'acétylcholinestérase, essentielle aux transferts nerveux chez les insectes, les humains, ainsi que chez la plupart des animaux. La capacité à bloquer l'acétylcholinestérase (et donc la toxicité) peut varier de façon importante d'un composé à l'autre. Par exemple, le parathion, un des premiers organophosphorés, est beaucoup plus puissant que le malathion, un insecticide utilisé pour combattre la mouche du fruit méditerranéenne et les moustiques dans la vallée du Nil.



1.3.5. Les triazines

Cette famille couvre un grand champ d'utilisation. La plupart sont utilisés comme herbicides sélectifs. Les triazines peuvent être utilisés seuls ou combinés avec d'autres composés afin d'augmenter leur efficacité. Le caractère sélectif des triazines vient du fait que certaines plantes peuvent métaboliser ces composés tandis que d'autres ne le peuvent pas. Les triazines comptent parmi les plus anciens herbicides.

1.3.6. Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides de synthèse dérivés du pyrèthre (molécule naturelle). Le pyrèthre est instable à la lumière solaire tandis que les pyréthrinoïdes sont assez stables à la lumière solaire et sont efficaces contre un large spectre d'insectes (Tomlin, 1994). Les pyréthrinoïdes sont classés en générations (Ware, 1994) :

-La 1^{ère} génération est apparue en 1949. Un exemple type en est l'allethrine ;

-La 2^{ème} génération est apparue vers 1967. On peut citer parmi eux la tétraméthrine et la resmethrine ;

-La 3^{ème} génération est apparût vers 1972-1973. Un exemple type est la fenvalérate qui est une molécule très active sur les insectes. Elle est également photostable ;

-La 4^{ème} génération de pyréthrinoïdes apparue après les années 1975 est constituée de pesticides tels que le bifenthrin, la lambdacyhalothrine, la cyperméthrine, la cyfluthrine, la deltaméthrine, l'esfenvalérate, la fenpropathrine et la fluvalinate.

Tous ces derniers sont photostables et peu volatils. Le mode d'action des pyréthrinoïdes ressemble à celui du DDT, mais ils sont en plus des poisons de la cellule nerveuse.

1.4. Utilisation

Les tonnages de pesticides ont constamment augmenté en soixante ans. Toutefois, la tendance semble s'inverser dans certains pays européens. Il faut également considérer qu'à quantité égale, les substances actives actuelles sont beaucoup plus efficaces qu'il y a plusieurs décennies. En 2006, la France restait le troisième plus gros consommateur de pesticides au monde derrière les Etats-Unis et le Japon (Respectivement premier et second). Régulièrement, les substances commercialisées doivent être modifiées afin de contourner la résistance aux produits des organismes cibles, ou pour remplacer des substances interdites en raison de leur toxicité. Les pesticides les plus utilisés (en termes de quantité) sont les herbicides. Le composé le plus utilisé au monde est le glyphosate.

1.5. Formulation

Un pesticide est constitué de nombreuses molécules comprenant :

- Une (ou plusieurs) substance active responsable de l'effet du pesticide.
- Un solvant; Ces solvants sont souvent des huiles végétales dans le cas des liquides, de l'argile ou du talc dans le cas des solides.
- Des additifs n'ayant pas d'activité biologique, mais pouvant modifier les propriétés du pesticide et faciliter son utilisation. Il y a plus de 100000 pesticides commercialisés, fabriqués à partir de 900 substances actives différentes. Chaque année, entre 15 et 20 nouvelles substances actives sont créées.

1.6. Modes d'action des pesticides

Les produits phytosanitaires constituent une catégorie de substances très hétérogène regroupant un grand nombre de molécules qui peuvent être regroupées en familles chimiques et classées selon des critères très rigoureux permettant d'identifier jusqu'à la molécule ou l'isomère actif. C'est ainsi que sur ces critères, on distinguera par exemple les produits minéraux des produits organiques, parmi ces derniers les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates, eux-mêmes subdivisés en méthyl ou phényl-carbamates et ainsi de suite jusqu'à la molécule et ses isomères.

Cette hétérogénéité chimique s'explique par la diversité des ravageurs visés (insectes, acariens et espèces voisines, végétaux herbacés ou ligneux, champignons, parasites, bactérie virus et autres micro-organismes, vers, rongeurs et autres prédateurs) et par la multiplication des cibles biologiques susceptibles d'être atteintes (système nerveux, voies métaboliques, synthèse des protéines et des acides nucléiques, noyau, génome, etc.). Dès lors on pressent que les modes d'action de ces substances seront extrêmement divers et en faire une synthèse exhaustive sera très difficile.

Il arrive souvent qu'à l'intérieur d'une même famille chimique (exemple : les carbamates) certains représentants ont une activité sur le système nerveux et s'attaqueront aux insectes et espèces voisines et seront qualifiés d'insecticides, alors que d'autres pourront inhiber certaines voies métaboliques existant à la fois chez les insectes, les végétaux et les champignons et seront considérés comme des herbicides dédiés aux végétaux verts.

Par mode d'action, on entend généralement le mécanisme par lequel la substance va exercer son effet sur la cible biologique du ravageur visé ; mais cette cible peut exister aussi chez

d'autres individus non-cibles. Si on prend par exemple les insecticides carbamates, ils inhibent l'acétylcholinestérase qui est une enzyme intervenant dans le processus de la neurotransmission, cette cible existe aussi chez les mammifères, homme compris, qui sont des organismes non-cibles mais dont le fonctionnement du système nerveux pourra être perturbé lors d'exposition à ces produits peu spécifiques. Il faut noter aussi que chez les organismes cibles et non cibles, ces produits peuvent entraîner d'autres effets sans lien avec le mécanisme d'action principal, mais on ne parle pas dans ce cas de mode d'action, ces effets étant qualifiés de secondaires, ce terme ne préjugant en rien de leur importance biologique (Calvet *et al.*, 2005)

Tableau 2. Modalités d'utilisation des pesticides (Calvet *et al.*, 2005).

Insecticides	
Modalités d'utilisation	Exemples de substances actives
Traitement des parties aériennes des végétaux	Deltaméthrine, parathion, pyrimicarbe
Traitement des semences	Carbofurane, fipronyl
Traitement des sols	Chlorméphos, diazinon
Traitement des locaux de stockage	Dichlorvos, perméthrine
Traitement des bâtiments d'élevage	Cyperméthrine, trichlorfon
Fongicides	
Modalités d'utilisation	Exemples de substances actives
Traitement des parties aériennes des végétaux	Mancozèbe, bénomyl, éthyrimol, tébuconazol, cuivre, soufre
Traitement des semences et des plants	Captane, iprodione
Traitement des denrées entreposées	Diphénylamine, thiabendazol
Traitement des sols	Carbendazime, métalaxyl, manèbe
Traitement des locaux et du matériel	Ammonium quaternaire
Herbicides	
Modalités d'utilisation	Exemples de substances actives
Désherbage des cultures	Simazine, trifluraline, isoproturon, chlorprophame
Défanage	Diquat
Débroussaillage	2,4-D, piclorame, tricopyr
Désherbage des zones non-cultivées	Glyphosate, aminotriazole, diuron
Destruction des mauvaises herbes aquatiques et semi-aquatiques	Chlorthiamide, dichlobényl

Tableau 3. Modes d'action des fongicides

<p>Action sur les processus respiratoires</p> <p>Inhibition des complexes II et III</p> <p>Phosphorylation oxydative</p> <p>Inhibition de la germination</p>	<p>Action sur les biosynthèses</p> <p>Biosynthèse des stérols</p> <p>Biosynthèse de l'ARN et l'ADN</p> <p>Biosynthèse des mélanines</p>
---	--

<p>Action sur les microtubules Combinaison avec la tubuline</p>	<p>Autres modes d'action Action sur les membranes et la croissance Inhibition de germination Modification de la perméabilité cellulaire Inhibition de l'élongation des tubes Germinatifs</p>
--	---

Tableau 4. Modes d'action des insecticides et acaricides

<p>Action sur le système nerveux Action sur les synapses et les Neuromédiateurs Action sur la transmission axonale</p>	<p>Action sur la cuticule Inhibition de la chitine</p>
<p>Action sur la respiration Inhibition du transport des électrons dans les Mitochondries Inhibition de la phosohorylation oxydative</p>	<p>Perturbateurs de mue Action sur l'ecdysone Action sur l'hormone juvénile</p>

Tableau 5. Modes d'action des herbicides

<p>Inhibition de la photosynthèse Inhibition du PSI et PSII</p>	<p>Inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes Inhibition de la PDS et de la HPPD</p>
<p>Inhibition de la synthèse des lipides Inhibition de l'enzyme ACCase, des élongases et des enzymes de cyclisation du GGPP</p>	<p>Inhibiteurs de la synthèse des chlorophylles</p>
<p>Inhibition de la synthèse des acides aminés (chloroplastes) Inhibition de la synthèse de la glutamine, des AA aromatiques et des AA ramifiés.</p>	<p>Découplants</p>
<p>Perturbation de la régulation de l'auxine AIA Inhibiteurs de la division cellulaire, blocage de la tubuline, du fuseau achromatique, blocage de la synthèse de l'acide folique.</p>	<p>Perturbateurs de croissance Inhibition du transport auxinique et de la synthèse de la cellulose.</p>

1.7. Doses admissibles et normes

Le décret du 3 Janvier 1989 définit le taux maximum admissible de divers polluants dans les eaux de consommation. La plupart des pesticides ne doivent pas dépasser 0,1 µg par litre, la tolérance étant abaissée à 0,03 µg pour l'aldrine et la dieldrine et 0,01 µg pour l'hexachlorobenzène. Par comparaison la plupart des pesticides qui ont une structure d'hydrocarbures polycycliques sont tolérés jusqu'à 0,2 µg par litre. Ces valeurs ont été choisies avec l'objectif d'assurer la protection de la santé publique

1.8. Devenir des pesticides dans l'environnement

Emportés par les eaux de ruissellement ou diffusés dans les eaux souterraines, volatilisés dans l'atmosphère ou stockés dans les sols, les pesticides se retrouvent dans de nombreux écosystèmes voire dans les aliments. Aujourd'hui de nombreuses recherches s'attèlent à comprendre comment les pesticides contaminent l'environnement et ce qu'ils deviennent au cours du temps, pour évaluer les expositions des populations et des écosystèmes à ces substances. Les matières actives phytosanitaires sont appliquées le plus souvent sous la forme de liquides pulvérisés sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas, elles sont incorporées au sol ou y sont injectées ou sont déposées sous forme de granulés, ou encore les graines en sont enrobées.

Le produit de traitement, lors d'une application, se trouve réparti en proportion variant avec le stade de la culture, la formulation, la cible, la technique d'application et les conditions météorologiques entre le sol, le feuillage de la plante ou les résidus de culture et des pertes dues à la « dérive ». Lors des traitements par aéronef, jusqu'à la moitié du produit peut être entraîné par le vent en dehors de la zone à traiter (Pimentel et Levitan, 1986).

Connaître le devenir des produits phytosanitaires après leur épandage en zone agricole est une nécessité car la pollution engendrée par ces matières actives peut avoir des conséquences graves sur la santé et l'environnement. L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur le danger et la nocivité des produits phytosanitaires et de leurs métabolites sur l'environnement. La contamination s'effectue à tous les niveaux : de l'air à l'eau en passant par les aliments.

Le devenir des pesticides dans l'environnement, c'est à dire leur rétention, leur transport et leur dégradation, dépend de leurs propriétés ainsi que de celles des différents compartiments concernés, le sol, les eaux et l'atmosphère. (Calvet et *al.*, 2005).

Les recherches consacrées à la dispersion des pesticides dans l'environnement ont prouvé la présence de ces produits dans plusieurs points de la biosphère qui n'ont subi aucun traitement (Schomburget *al.*, 1991). Les phénomènes de transfert qui affectent les produits phytosanitaires sont très complexes et les réactions possibles de l'écosystème à leur présence sont largement méconnues (Weber, 1991).

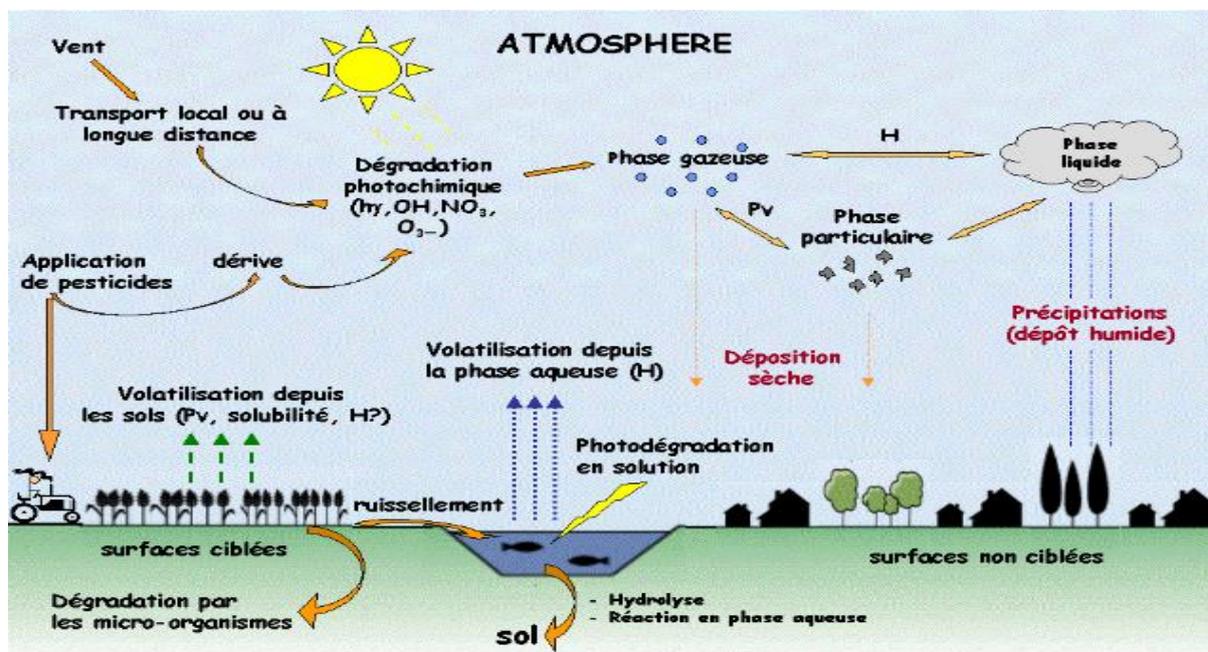


Figure 1. Devenir des pesticides dans l'environnement (El Rachidi, 2012).

1.8.1. Le transfert des pesticides vers les eaux superficielles et souterraines

Le transfert des pesticides vers les eaux de surface et souterraines est réalisé sous forme dissoute et sous forme particulaire. A la surface du sol, le ruissellement qui est responsable de ce transfert peut-être déclenché lorsque la pluie dépasse la capacité d'infiltration au sol ou bien par le débordement de la nappe. Dans ce cas, le transfert s'effectue sous forme dissoute et particulaire (Guigon-Moreau, 2006). Dans le sol, il peut également y avoir un écoulement horizontal de subsurface (hypodermique). La présence d'une couche relativement imperméable à faible profondeur favorise ce genre d'écoulement et les caractéristiques du sol déterminent l'importance de cet écoulement (Musy, 2005).

L'eau est le principal vecteur des produits phytosanitaires dans le sol. En effet, le transport des pesticides dans la phase liquide du sol a lieu *via* trois principaux phénomènes (Calvet et *al.*, 2005).

- La diffusion moléculaire : c'est le mouvement des molécules dissoutes, créé par un gradient de concentration existant dans l'espace poral du sol. Ce phénomène correspond à

un déplacement du pesticide de la zone où sa concentration est élevée vers la zone où elle est moins élevée.

- La convection : le transport du pesticide se fait au moyen d'un seul déplacement d'une phase liquide : l'eau du sol. Ce type de transport obéit aux lois qui régissent l'écoulement de l'eau dans le sol.
- La dispersion hydrodynamique est la résultante de la combinaison de la diffusion moléculaire dans la phase liquide en déplacement (l'eau du sol) et de la variation spatiale de la vitesse d'écoulement de l'eau dans l'espace poral. Ainsi, la dispersion traduit la répartition des molécules dans le milieu poreux où la convection a eu lieu (Pot *et al.*, 2005)

Le transport des pesticides concerne généralement les espèces dissoutes mais peut également avoir lieu quand les molécules sont associées aux colloïdes du sol (particules de 1 nm à 1 µm de taille comprenant les argiles, la matière organique et la biomasse microbienne). On parle dans ce cas de transport particulaire. Les particules colloïdales se comportent comme une phase solide mobile qui adsorbe les polluants organiques et qui peut migrer dans le sol de façon similaire ou parfois supérieure à la phase aqueuse (Jacobsen *et al.*, 1997 ; Hesterberg, 1998 ; MacGehan et Lewis, 2002 ; Pot *et al.*, 2005).

1.9. Facteurs influençant le transfert des pesticides vers les eaux souterraines

Les quantités de pesticide transférées vers les eaux souterraines dépendent de divers facteurs relatifs aux propriétés physico-chimiques des produits phytosanitaires et des sols, ainsi que des pratiques culturales et des conditions climatiques (Beigel et Di Pietro, 1999).

1.10. Persistance

Initialement, la notion de persistance a été utilisée pour les pesticides ; elle reflète la capacité de la substance à ne pas être altérée par des processus physiques, chimiques et biologiques. « La persistance correspond donc à la stabilité des composés dans l'environnement, à leur résistance à une décomposition ou à une transformation dans la nature ». Il est important de souligner que les composés issus de la dégradation d'une substance initiale et ne pouvant être détruits dans la nature sont aussi considérés comme persistants mais persistants secondaires voire tertiaires.

On fait par ailleurs une différence entre la persistance voulue et non désirée, dans le sens où la persistance non désirée induit un effet au-delà du temps prévu initialement (typiques des composés organochlorés comme le DDT). Cependant « il n'existe pas de mesure absolue

de la persistance des composés. » On s'appuie plus sur des comparaisons entre différents composés. On s'aide alors des caractéristiques physicochimiques liées à la stabilité ou la réactivité des substances (comme la vitesse de réaction, le temps de demi-vie) (Bliefert et Perraud, 2001).

1.11. Formation de résidus liés

Avec l'augmentation du temps de résidence, des liaisons se forment entre la matrice et les molécules et entraînent une diminution de la désorption voire l'irréversibilité de l'adsorption (Barriuso et *al.*, 2008). Les résidus liés sont en partie à l'origine des phénomènes d'hystérèse.

Les résidus liés sont définis comme : « des composés dans le sol, la plante ou un animal qui restent dans la matrice sous la forme originelle ou de métabolite après extraction »(Führ et *al.*, 1998). De manière générale, la présence de résidus liés est considérée comme un processus de stabilisation, cependant ils peuvent être remobilisés sous certaines conditions (Barriuso et Houot, 1996).

1.13. Toxicité des pesticides sur l'homme

Les pesticides ne sont pas seulement nocifs sur les animaux et les plantes mais ils sont également sur l'homme. Ainsi, 15 à 20% de ces produits chimiques sont cancérigènes et la plupart d'entre eux sont des perturbateurs endocriniens. (Meyer et *al.*, 2003)

C'est une biologiste américaine, Rachel Carson, qui en 1962 tire pour la première fois la sonnette d'alarme avec la publication de son livre Printemps silencieux. L'ouvrage montre alors l'effet délétère des pesticides sur l'environnement et particulièrement chez les oiseaux.

Le DDT (insecticide interdit par la suite en 1972) amincirait les coquilles d'œuf chez les oiseaux entraînant une hausse de la mortalité et des problèmes de reproduction. Les chercheurs s'aperçoivent également que des pesticides modifient le sexe de certains batraciens ou provoquent des difficultés de reproduction d'invertébrés.

L'homme et les animaux en général, absorbent les pesticides et leurs produits dérivés via la nourriture, l'eau, l'air respiré ou par contact avec la peau ou les cuticules. Les agriculteurs et les ouvriers qui préparent les mélanges et réalisent les traitements ont plus de risque que le reste de la population d'être atteints par contact de la peau ou par inhalation. Ainsi, chez les agriculteurs, malgré une espérance de vie plutôt supérieure à la moyenne du fait d'une sous-mortalité par maladies cardiovasculaires et par cancers en général (Viel et *al.*, 1998), il a été remarqué que la mortalité et l'incidence de certains types de cancers ont augmentés. Il s'agit

en général de cancers peu fréquents voire rares tels que les cancers des lèvres, de l'ovaire, ducerveau, de mélanome cutané et de la plupart des cancers du système hématopoïétique(leucémies, myélomes, lymphomes). Le cancer de la prostate et de l'estomac, cancers nettement plus fréquents, seraient également concernés (Meyer et *al.*, 2003).

Il s'est également avéré que des produits de dégradation des pesticides peuvent être aussi toxiques, ou même plus toxiques, que la molécule d'origine (Guillard et *al.*, 2001 ; Forman et *al.*, 2002).

Les pesticides et leurs sous-produits ont été également identifiés en tant qu'agents susceptibles de porter atteinte au processus de fertilité masculine, via une toxicité testiculaire (Sanchez-Pena et *al.*, 2004). Des études faites sur des rats ont clairement montré les effets nocifs du méthyl-parathion sur le système de reproduction (Joshi et *al.*, 2003). Il a été remarqué que chez des femmes exposées à des pesticides, le risque de mortalité intra-utérin augmentait et que la croissance fœtale diminuait. A noter aussi que des pesticides ont été retrouvés dans le cordon ombilical mais aussi dans le lait maternel, ce qui pourrait expliquer le mauvais développement du fœtus, les malformations congénitales et les anomalies du système nerveux central (Levario-Carillo et *al.*, 2004).

Mais tous ces liens entre les produits phytosanitaires et certains cancers ne sont que des suppositions. De nombreuses études toxicologiques se contredisent à ce sujet. Il n'est pas exclu que d'autres facteurs de risque présents en milieu agricole (comme le tabagisme, le rayonnement solaire, l'alimentation...) puissent jouer un rôle important dans le déclenchement de ces cancers (Kelley et *al.*, 2003).

Le plus souvent, le toxique est ingéré sous forme de résidus présents dans la nourriture ; mais l'absorption peut se faire dans l'eau de boisson, par l'air inhalé ou par contact de la peau avec le produit (Spear, 1991). Les agriculteurs et les ouvriers qui préparent les mélanges et réalisent les traitements risquent plus que le reste de la population d'être atteints par contact de la peau ou par inhalation. Aux États-Unis, 99% des gens stockent du DDT (ou des dérivés de cet organochloré) dans leurs tissus adipeux, et ce à raison de 4 ppm. On a trouvé beaucoup de pesticides dans le lait humain, parfois en quantité supérieure à la DJA pour le nourrisson (Jensen, 1983).

2. LA BIOREMEDIATION

2.1. Introduction

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Certains de ces polluants ont contaminé les sols et proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison de pratiques agricoles (Abdelli (2007)

2. 2. Définition

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol (Abdelli, 2007).

Selon Roger et Jacq (2000), la bioremédiation désigne un ensemble de techniques mettant en œuvre des procédés de biodépollution des sites contaminés (sol, sédiments, eaux de surface, ou souterraines). Ces techniques sont utilisées pour réduire la toxicité, la mobilité ou le volume d'un contaminant dans le milieu, et font appel à l'utilisation de champignons, de bactéries en inoculant des micro-organismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes, par biostimulation, par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité).

La bioremédiation ne peut être utilisée pour confiner un volume d'eau ou de sol pollué. Elle peut s'effectuer directement dans l'environnement pollué (in situ) ou après transfert de l'agent polluant (ex situ).

La bioremédiation est donc réalisée par de multiples réactions de dégradation de la part de la microflore microbienne présente dans le milieu (Roger et Jacq (2000),

2.3. Les différentes techniques utilisées dans les processus de bioremédiation

La bioremédiation est un ensemble de techniques mettant en œuvre des procédés de biodépollution, utilisables pour réduire la toxicité, la mobilité ou le volume d'un contaminant

dans les sols, le sous-sol, les eaux et les effluents gazeux. Elle ne peut être utilisée pour confiner un volume d'eau ou de sol pollué. Elle peut s'effectuer directement dans l'environnement pollué (*insitu*) ou après transfert de l'agent polluant (*ex situ*). *Ex situ* La mise en œuvre de ces techniques passe par l'extraction soit du polluant, soit du polluant et du matériau contaminé, et leur traitement dans des dispositifs clos ou semi-clos.

Les effluents liquides ou gazeux pollués sont traités dans des bioréacteurs (réacteurs, digesteurs, biofiltres, biolaveurs, etc...)

Les sols contaminés sont excavés, puis traités suivants des procédés adaptés (compostage, traitement sous forme de boues, etc.).

Les principalestechnologies utilisées dans la bioremédiation sont les suivantes :

2.3.1. La bioaugmentation

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des contaminants organiques. Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes. Des éléments nutritifs sont généralement apportés dans la solution contenant les microorganismes. Cette suspension de microorganisme est apporté à la surface du sol dans les conditions naturelles ou injecte dans le site contaminé sous pression (Davet, 1998)

2.3.2. La biofiltration

Elle consiste à l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l'air à traiter : la phase aqueuse (l'air contaminé) est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne, connue aussi sous le nom de la biomasse.

Dans une unité de biofiltration, l'air à épurer (à dépolluer) traverse d'abord un filtre et un humidificateur afin de supprimer les particules (poussières, graisses) présentes dans le gaz et d'amener le niveau d'humidité à 100%. L'air est ensuite introduit dans un réacteur (une cuve) contenant un garnissage formé de matériaux très poreux (très avide pour l'humidité). A la surface des particules qui constituent le garnissage se trouve un biofilm qui correspond à une pellicule d'eau contenant des microorganismes (bactéries et champignons) dont la fonction est de dégrader les polluants présents dans l'air à traiter. Cette technologie est par exemple

utilisée pour traiter l'air pollué par le xylène ou par des composés azotés (Roger et Jacq (2000).

2.3.3. La biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité).

2.3.4. Le compostage

Le compostage peut être défini comme un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques le compost. C'est la fermentation des ordures ménagères organiques (résidus alimentaires) et des déchets verts (feuillages, résidus de jardinage) afin de produire un compost réutilisable en agriculture ou dans le jardin pour fertiliser la terre. L'aération et l'humidité sont deux éléments indispensables pour entretenir les conditions d'une bonne fermentation. Le compostage peut se faire chez soi ou collectivement par des procédés industriels (Abdelli, 2007).

2.3.5. La biolixiviation

Il s'agit de la lixiviation favorisée par la voie biologique (généralement bactérienne). Elle correspond à une méthodologie de solubilisation des métaux lourds grâce à des bactéries acidophiles fonctionnant en présence ou en l'absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation : la température qui doit être comprise entre 25 et 35 °C. La taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries.

De nombreux agents polluants et pesticides peuvent être transformés ou décomposés à la fois par des réactions physico-chimiques et biologiques. Toutefois décomposition et transformations sont généralement plus rapides dans des environnements comportant une microflore que dans les environnements stériles. Les méthodes biologiques faisant appel aux microorganismes dépolluants ont prouvé leur efficacité pour les polluants organiques : dépollution biologique de l'air, des eaux usées, des milieux marins et des sites pollués par les hydrocarbures polycycliques, les composés chlorés ou les explosifs.

2.4. Les critères de sélection des souches microbiennes aptes pour la biorémediation

L'intervention des microbiologistes tend à augmenter les populations de microorganismes dégradant l'agent polluant pour en accélérer la dégradation et peut prendre deux formes :

Le renforcement des populations autochtones aptes à dégrader l'agent polluant par apport d'éléments nutritifs et modification des conditions de milieu, afin de diminuer la durée de la phase d'acclimatation (ou de latence) et leur permettre de dégrader plus rapidement le contaminant. Cette optimisation repose sur plusieurs critères:

2.4.1. Adaptation et phase de latence

L'implication des microorganismes dans la dégradation des polluants est indirectement établie par l'existence d'une phase de latence suivie d'une disparition plus rapide correspondant à une adaptation de la microflore et au fait que l'application répétée d'un polluant ou d'un pesticide provoque assez fréquemment un raccourcissement de la phase de latence.

Avant le démarrage de la dégradation d'un polluant, on note généralement une période de latence qui correspond à une phase d'adaptation de la microflore. La liste des composés pour lesquels une telle phase a été rapportée est longue et comprend des herbicides (2,4-D, MCPA,

Mecoprop, TCA, amitrole, dalapon, monuron, chlorpropham...), des insecticides (methyl parathion, azinphosmethyl), des aromatiques polycycliques (naphtalène, anthracène), et des produits divers tels que le phénol, des chlorophénols, des chlorobenzènes etc.

La durée de la phase de latence peut varier dans de larges limites entre une heure et plusieurs mois. Elle varie avec la nature des produits mais également avec leur concentration et les conditions environnementales. Elle est souvent très longue pour les molécules chlorées en anaérobiose.

Actuellement il n'existe aucune méthode permettant de prédire la durée de la phase de latence de la biodégradation d'un composé dans un environnement donné.

Lors d'une seconde addition de polluant on observe généralement une diminution ou même une disparition de la phase de latence mais ceci n'est pas une règle absolue. Un aspect important de cette adaptation de la microflore est une diminution de l'efficacité de certains pesticides.

2.4.2. Spécificité et non spécificité polluant/ genre microbien

Les données actuelles identifiant les microorganismes dégradant un polluant ou les différents polluants pouvant être dégradés par un même microorganisme ne sont pas extrêmement nombreuses. Les données disponibles indiquent cependant que la spécificité polluant /espèce ou genre microbien n'est, dans certains cas, pas très marquée. Par exemple, un même pesticide peut être dégradé par différents microorganismes et réciproquement un même microorganisme peut dégrader un nombre élevé de substrats.

La spécificité microbienne est bien entendu corrélée avec la spécificité enzymatique. Un cas bien étudié de faible spécificité enzymatique est celui des méthane-mono-oxygénases (MMO). Des préparations brutes de la MMOs de *Methylococcus capsulatus* catalysent l'incorporation d'un oxygène diatomique dans un spectre très large de substrats, permettant à cet organisme de dégrader des alcanes, haloalcanes, alcènes, éthers et autres composés alicycliques, aromatiques et hétérocycliques (Lotto *et al.*, 2004).

Les MMO solubles et membranaires des bactéries méthanotrophes peuvent dégrader des hydrocarbures saturés, insaturés, linéaires, branchés ou cycliques (benzène, toluène, styrène, naphthalène) et jusqu'à environ 8 atomes de carbone, des alcools et des crésols

2.4.3. Seuils inférieurs et supérieurs

De nombreux polluants sont présents à de très faibles concentrations dans les sols et les eaux. Ils n'en restent pas moins dangereux, en particulier en raison des phénomènes de bioconcentration. L'étude des problèmes liés à la dégradation de composés présents à de très faibles concentrations est relativement récente et a mis en évidence l'existence d'un seuil inférieur en deçà duquel la microflore ne peut plus se multiplier et aucune dégradation n'est observée. A l'opposé, une concentration trop élevée en polluants peut causer une inhibition de la microflore (Agarwal *et al.*, 1998).

2.5. Facteurs qui influencent le processus de biodégradation d'un matériau

Les facteurs influençant le processus de biodégradation d'un matériau sont d'ordre physique et chimique et biologique

2.5.1. La température

Certains facteurs sont déterminants non seulement pour la croissance des micro-organismes intervenant dans la dégradation mais aussi pour le matériau amené à être dégradé. Citons notamment la température (Lotto *et al.*, 2004 Agarwal *et al.*, 1998). C'est un facteur qui

a un rôle très important en raison de son effet sur l'activité microbienne, puisqu'elle détermine la vitesse de métabolisation des nutriments. Le métabolisme de nombreux microorganismes (mésophiles) est ralenti à des températures, soit supérieures à 40°C, soit inférieures à 5°C.

2.5.2. L'humidité

C'est la disponibilité en eau plutôt que la quantité d'eau présente dans un environnement donné qui est le facteur critique. Les champignons sont favorisés quand le potentiel hydrique est inférieur à $-15,8 \cdot 10^5$ Pa.

L'activité de tous les microorganismes cesse lorsque le potentiel devient très faible (Calvet et al., 2005 ; Copinet et al., 2004).

2.5.3. L'oxygène

lorsque l'oxygénation du milieu est importante (potentiel rédox de l'ordre de 750 à 800 mV), elle favorise le développement d'une population aérobie susceptible de dégrader de nombreux pesticides. Quand l'oxygène vient à manquer, le milieu devient anoxique et d'autres population microbiennes aérobies facultatives, voire anaérobies strictes prennent le relais. L'activité de ces microorganismes capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que l'oxygène est particulièrement importante dans le cas de la dégradation de composés halogénés (Hagblom et Bossert, 2003).

2.5.4. Le pH

Le pH affecte la diversité, l'activité et la taille des populations microbiennes. Le pH optimal de développement des bactéries se situe entre 5 et 8,5 alors que les champignons sont favorisés dans les milieux plus acides. Le pH agit également sur l'état d'ionisation des enzymes, ce qui modifie leur affinité pour les substrats (Li et al., 1999).

2.5.5. Influence du nombre de substituants halogénés sur la biodégradation

Les polluants présentant une structure chimique électroniquement stable ou ayant de nombreux substituants halogénés sont généralement les plus difficiles à dégrader (Sims et al., 1986 ; Scheneurt et al., 1993). Dans ce cas, la stratégie communément retenue par la microflore peut consister en l'introduction de groupes polaires qui ont pour effet d'accroître le caractère hydrophile et de faciliter ainsi leur dégradation ultérieure.

2.5.6. Les adjuvants des produits phytosanitaires

ils entraînent des modifications des populations microbiennes, de l'activité globale de la microflore du sol et de l'activité spécifique de la microflore dégradante (Rouse et *al.*, 1994 ; Sanchez-Camazano et *al.*, 1995 ; Beigel et *al.*, 1999 ; Charnay et *al.*, 2000). Soit ils stimulent la dégradation du pesticides par un accroissement des populations microbiennes, due à la source additionnelle de carbone résultant des cellules microbiennes tuées par les adjuvants et facilement assimilable par la microflore survivante, ou à certains adjuvants de formulations facilement assimilables, soit ils ralentissent la dégradation du pesticides en raison de l'altération des microorganismes dégradant et du piégeage de la matière active à l'intérieur de micelles de composés tensioactifs (Calvet et *al.*, 2005).

2.5.7. Présence d'accepteurs d'électrons

Les microorganismes assurent une fonction essentielle grâce à leur grande diversité (Topp, 2003). Cette diversité des communautés microbiennes telluriques jouerait un rôle important dans la dégradation des pesticides (Entry et Emmingham, 1995 ; Voos et Groffman, 1997). Cependant. Une des conditions fondamentales à la dégradation biologique est la présence d'accepteurs d'électrons. Dans les systèmes aérobies, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène moléculaire (Castillo et Tortensson, 2007) alors qu'en conditions anaérobies, les accepteurs d'électrons inorganiques sont très majoritairement le NO_3^- , SO_4^{2-} , S, CO_2 ou Fe^{3+} . Les premières étapes de la dégradation provoquent les transformations de la structure moléculaire du pesticide avec l'apparition de métabolites pouvant, dans certains cas, être plus toxiques que la molécule mère. La minéralisation de la substance active, avec la transformation du carbone organique en CO_2 est le processus ultime. Il n'y a pas de relation univoque entre la stabilité chimique d'une molécule et sa stabilité biologique (Charnay et *al.*, 2000)

2.6. Principales réactions de la biodégradation

Les réactions de transformation ou de dégradation des pesticides par les populations microbiennes telluriques sont essentiellement des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les réactions d'oxydation sont majoritairement représentées par les mécanismes d'hydroxylation, déalkylation, époxydation et sulfoxydation. Ces systèmes réactionnels sont généralement catalysés par les familles d'enzymes suivantes : les mono et di-oxygénases, les laccases et les peroxydases (Voos et Groffman, 1997).

2.6.1. Hydrolyse

Le clivage d'une liaison par addition d'eau est une réaction fréquente effectuée par les microorganismes et qui inactive un certain nombre de substances toxiques.

Ces réactions peuvent consister en la simple hydrolyse microbienne d'une liaison ester par unecarboxylase microbienne telle que dans le cas de l'inactivation de l'insecticide Malathion.

Une réaction identique peut causer le clivage d'une anilide par une amidase.

2.6.2. Hydroxylation

L'addition d'un ion OH à une molécule aromatique ou aliphatique la rend généralement moins toxique. Par exemple, le simple remplacement d'un H par OH inactive le fongicide carbendazime (MBC) et l'herbicide 2,4-D.

2.6.3. Déhalogénéation

De nombreux pesticides et des polluants industriels contiennent du chlore ou d'autres halogènes. L'enlèvement de l'halogène détoxifie généralement ces composés. Les enzymes impliqués sont appelés déhalogénases. Ces réactions peuvent consister dans le remplacement de l'halogène: soit par un ion H, soit par un ion OH, Elles peuvent également résulter dans l'enlèvement de l'halogène et d'un H adjacent (deshydrodéhalogénéation)

2.6.4. Déméthylation et autres déalkylations

De nombreux pesticides contiennent des radicaux méthyl ou alkyl liés à un N- ou un O-. Une déalkylation du N- ou du O- généralement inactive ces pesticides. Dans le cas du Diuron, l'enlèvement d'un premier radical méthyl conduit au dérivé monométhylé nettement moins actif comme herbicide que le Diuron. L'enlèvement du second radical méthyl rend la molécule complètement inefficace. Une transformation du même type se produit avec l'atrazine et d'autres herbicides du groupe des triazines par perte d'un groupement N-éthyl.

2.6.5. Méthylation

La réaction inverse (addition d'un groupe méthyle peut inactiver les phénols toxiques. Par exemple les fongicides penta- et tétra-chlorophénols peuvent être inactivés par l'addition d'un o-méthyl. D'autres exemples de détoxification par méthylation sont ceux du penta-chloronitrobenzène (fongicide) transformé en pentachloroaniline et du parathion (insecticide) transforméenamino-parathion.

2.6.6. Réduction d'une fonction NO₂

Les composés organiques comportant un radical NO₂ sont toxiques pour de nombreux organismes supérieurs et inférieurs. Le remplacement du radical NO₂ par un radical NH₂ diminue généralement la toxicité du produit.

2.6.7. Désamination

Exemple de L'herbicide Metamitron est inactivé par l'enlèvement du radical NH₂.

2.6.8. Clivage d'une liaison éther (C-O-C)

Les phénoxy herbicides contiennent des liaisons éther (C-O-C) dont le clivage inactive la molécule. Un exemple surprenant est celui du 2,4-D pour lequel la transformation microbienne demande la fourniture d'énergie par le microorganisme (l'énergie de liaison C-O est de 85,5 kcal/mole).

2.6.9. Conversion d'un nitrile en amide

L'herbicide sélectif 2-6-dichloro-benzonitrile est inactivé par la microflore du sol qui le transforme en 2,6-dichloro-benzamide.

2.6.10. Conjugaison

Ce sont des réactions qui associent un composé courant des voies métaboliques à un composé toxique dont elles provoquent l'inactivation. Par exemple *Cunninghamella elegans* peut conjuguer le pyrène avec du glucose. Certains organismes peuvent conjuguer un fongicide de la famille des dithiocarbamates avec de l'acide butyrique produisant une conjugaison moins toxique que le fongicide.

2.6.11. Ouverture de cycles (composés benzéniques) par Clivage ortho et méta

Les bactéries méthanogènes peuvent dégrader un certain nombre de composés benzéniques polycycliques. Les microorganismes ont la possibilité de dégrader les polluants aromatiques par ortho ou métaclivage. La position des substituants a également un impact important sur la biodégradation de la molécule (Baker et Woods, 1977, Baker et Mayfield, 1980). Les microorganismes ont la possibilité de dégrader les polluants aromatiques par ortho ou métaclivage.

2.7. Intérêts économiques de la bioremédiation

Le marché de la dépollution est estimé à un chiffre d'affaire en France de 138 milliards de francs en 1996 et près de 300000 emplois, les activités de protection de l'environnement sont

devenues une véritable industrie. Au niveau communautaire, le marché de l'environnement était estimé en 1994 à 580 milliards de francs. Selon l'UPDS (2000) Le marché français de la dépollution des sols, hors incinération et mise en décharge, se chiffrait en 1995 à 350 millions de francs qui se décomposent en 150 millions pour la partie ingénierie (diagnostic et maîtrise d'œuvre) et 200 millions pour la réalisation des travaux proprement dite (U.N.,1997).

La bioremédiation est souvent applicable sur le site (bioremédiation in situ) ou à proximité immédiate (quand des installations ex situ sont nécessaires), ce qui réduit les coûts de transport et de manutention. Par contre, la bioremédiation est une technologie qui demande une approche scientifique multidisciplinaire. Elle doit être adaptée cas par cas aux différentes situations. Pour cette raison, le coût des études préliminaires pour la caractérisation du site à dépolluer, et les études de faisabilité sont généralement nettement plus élevés que ceux des méthodes conventionnelles. Comme pour toutes les techniques de dépollution, il convient de effectuer un suivi du procédé. Par rapport aux méthodes classiques, le suivi de la bioremédiation doit ajouter des études microbiologiques qui en augmentent le coût.

2.8. Limites techniques

La bioremédiation se heurte à des difficultés techniques multiples liées :

- à la nature, la concentration et le volume des produits à traiter. Les microflores sont plus efficaces à des dilutions relativement faibles, situées entre un seuil minimum nécessaire pour induire l'activité enzymatique (ou un cométabolisme) et un seuil maximum inhibiteur de l'activité microbienne.
- à la non existence ou aux difficultés d'adaptation des souches indigènes et/ou à l'obtention de souches efficaces in situ.
- à l'hétérogénéité de la dispersion du polluant dans le biotope, liée elle-même à la nature du sous-sol et à la porosité de celui-ci. Dans certains sols très hétérogènes sur le plan granulométrique, la circulation (naturelle ou forcée) des fluides (gaz et eaux) utilisés pour une dépollution in situ se fait uniquement par les zones de grande perméabilité, excluant de la dépollution une grande masse de sol.
- aux modifications physico-chimiques qui surviennent dans ce biotope, modifications des teneurs en oxygène et variations de température saisonnières qui rendent la bioremédiation inefficace en hiver, dilution due aux pluies, etc. à des effets négatifs possibles sur l'environnement. Par exemple, la transformation microbienne de polluants peut produire des composés plus toxiques que le composé d'origine. Les bioremédiations sont impossible à

mettre en œuvre pour les composés récalcitrants, en particulier certains polymères et composés organiques dont des halogénés riches en chlore (<http://www.techniques-ingenieur.fr/>). Les xénobiotiques accessibles aux seules microflore aérobie et ayant atteint une nappe anaérobie profonde ne peuvent être traités in situ. Les bioremédiations sont peu performantes vis-à-vis de certains produits à forte concentration, qui nécessitent une dilution importante pour descendre en-dessous du seuil de toxicité. Ceci complique la bioremédiation dans les zones arides. Elles sont difficiles à mettre en œuvre dans le cas de pollution multiforme massive (Roger et Jacq, 2000).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

1. Présentation de la zone d'étude

Les eaux superficielles agricoles étudiées ont été prélevées à partir des régions de Ben M'Hidi-Echatt. Plusieurs sites ont été choisis au niveau de ces deux régions (5 sites). C'est une zone à vocation agricole et qui constitue la zone polluée par les pesticides. La zone témoin choisie est une zone forestière; il s'agit de El-Aioun, située à la frontière Algéro-Tunisienne) loin de toute contamination par les différents polluants y compris les pesticides.

1.1. Situation géographique

La daïra de Ben M'hidi est située au Nord-Est algérien, elle est limitée au Nord par la mer méditerranée, à l'Est par Berrihane et Boutheldja. Au Sud par les massifs gréseux qui surplombent les localités de Besbes et Zerizer et à l'Ouest par la wilaya d'Annaba. Elle appartient à la wilaya d'El Tarf qui est située à l'extrême Nord-Est du pays et couvre une superficie de 2892km². Sa surface agricole est de 71000 ha dont 13500 sont irrigués.

La plaine Ouest d'El Taref s'inscrit dans un quadrilatéral délimité approximativement par les méridiens 7°45' et 8°00' Est et par les parallèles 36°41' et 36°50' Nord. Elle est comprise dans la zone littorale de la région d'Annaba et d'El Taref entre le cordon dunaire au Nord et les monts de Chefia au Sud.



Figure 2. Carte de localisation géographique des sites étudiés (google earth).

1.2. Hydrographie

La plaine est traversée par deux principaux oueds, oued Seybouse à l'Ouest et oued Bounamoussa à l'Est. Entre ces deux principaux cours d'eau, plusieurs prennent naissance tels que oueds Khalid de Boukhamira, et oued Bou Hallal.

1.3. Les caractéristiques climatiques

La région d'étude est soumise à un climat méditerranéen. Les températures hivernales varient entre 6,9 à 7,8 en moyenne, elles atteignent 30°C aux mois de juin et juillet.

La région compte parmi les régions les plus arrosées d'Algérie, ainsi les précipitations enregistrées est de 2,8mm au mois d'Août et atteint 95.5 mm au mois de décembre. L'humidité de l'air est de 64.6% (moyenne annuelle) et une élévation du degré hygrométrique en période hivernale. D'autres données climatiques sont présentées dans l'annexe n°1

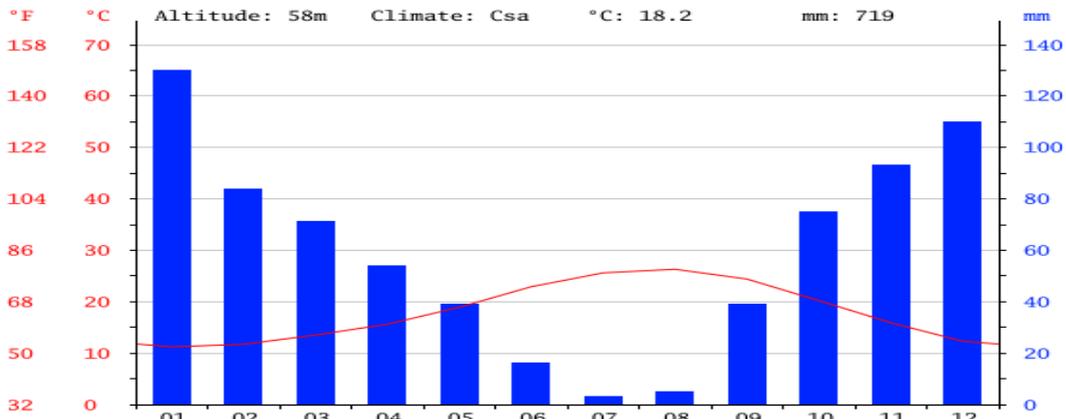


Figure 3. Diagramme climatique de la région d'El Taref (année 2009).

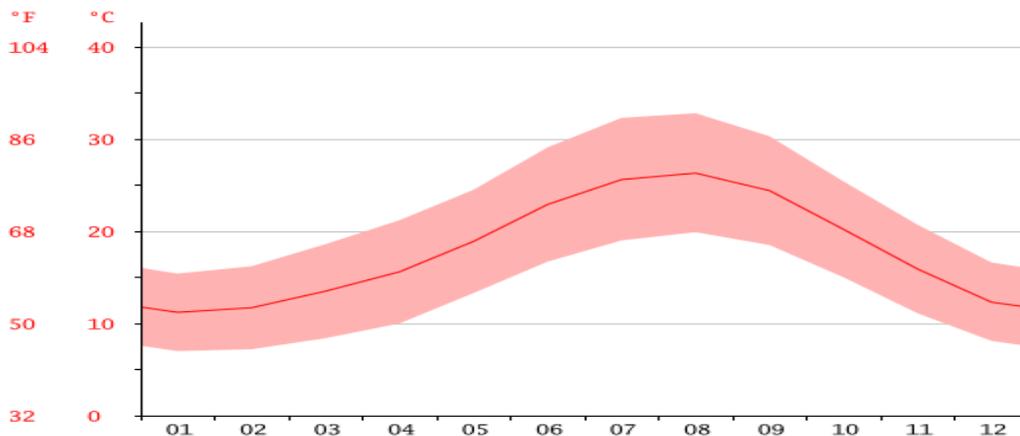


Figure 4. Courbe de température de la région d'El Taref (année 2009).

1.4. Prélèvements des échantillons d'eau

Dans le cadre de notre étude, nous avons effectué des prélèvements à différents endroits de la zone d'étude pour qualifier et quantifier leur pollution en pesticides. Les échantillons d'eau sont collectés à partir des eaux stagnées au niveau des champs, mis dans des bouteilles de verre ambré bien propres et rincées avec cette même eau (Rodier, 1996). Une feuille d'aluminium est placée sur le goulot afin d'empêcher tout contact entre l'échantillon et le bouchon de plastique. Les différents échantillons ont été conservés dans des glacières à des températures inférieures à 4 degrés jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils sont rapidement analysés. La localisation des points de prélèvement sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau6. Les différents sites de prélèvement

N° Sites	Localisation des sites
1	Parcelle de blé située au niveau d'Echatt
2	Parcelle de Tomate, située au niveau de l'Institut national de la protection des végétaux (INPV)
3	Parcelle de Pomme de terre, située à 0.5 km de l'INPV
4	Parcelle de concombre, située à 1km à gauche de l'INPV
5	Puits situé à 2 km de l'INPV
6	Site témoin : zone forestière située au niveau de l'El-Aioun

2. Analyse physico chimique des eaux superficielles agricoles

2.1. La température

Elle a été mesurée à l'aide d'un thermomètre au 1/100 de degré, trempé dans l'échantillon pendant cinq (5) minutes. Nous avons mesuré la température au lieu de prélèvement (in situ). On lit directement la température exprimée en degré Celsius (°C).

2.2. Le pH

C'est un paramètre chimique caractérisant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Il résulte de la composition ionique de l'eau, (Aminot et Kérrouel, 2004). En théorie, le pH est défini comme le cologarithme décimal de l'activité de l'ion H⁺. Le pH dépend de la teneur en dioxyde de carbone ; c'est à dire une modification de CO₂ (Respiration, photosynthèse, échange air- eau) entraînera donc une modification du pH (Ramade, 2000).

Le calcul du pH des échantillons d'eau a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre de type Wagtech 525043. La méthode a consisté à plonger l'électrode dans l'échantillon contenu dans un bêcher dans lequel le barreau d'un agitateur magnétique homogénéise l'échantillon. Après stabilisation de l'affichage sur le cadran du pH mètre, nous avons noté le pH.

2.3. La Conductivité (CE)

La détermination de la conductivité se fait par la mesure de la résistance. Un voltage est appliqué entre deux électrodes plongées dans l'échantillon et la chute du voltage due à la résistance de la solution est utilisée pour calculer la conductivité par centimètre.

La conductivité de l'eau est une mesure de sa capacité à conduire le courant électrique. Elle permet d'apprécier rapidement mais très approximativement la minéralisation de l'eau et de suivre son évolution. La conductivité électrique des échantillons d'eau a été mesurée à l'aide d'une sonde multi paramètres de type WTW 197i. Celui-ci mesure le passage de l'électricité entre deux électrodes plongées dans l'eau. La mesure peut s'effectuer à 20° C avec un conductimètre avec compensateur automatique de température. La mesure de la conductivité est un moyen assez simple de détection d'une anomalie indiquant la présence probable d'une pollution, par comparaison de la valeur norme admissible. Les charges importantes de pollution organique augmentent la conductivité.

2.4. L'oxygène dissous

L'oxygène dissous dans les eaux de surface provient essentiellement de l'atmosphère et de l'activité photosynthétique des algues et des plantes aquatiques. La concentration en oxygène dissous varie de manière journalière et saisonnière car elle dépend de nombreux facteurs tels que la pression partielle oxygène de l'atmosphère, la température de l'eau, la salinité....

La teneur en oxygène dissous a été mesurée *in situ* à l'aide de l'oxymètre de type 340i Multi / SET.

2.5. La demande biologique en oxygène (DBO5)

La DBO5 exprime la consommation naturelle d'oxygène en gramme/litre des composés organiques dans l'eau, dégradée par les bactéries du milieu par une oxydation. L'oxydation des composés organiques biodégradables par les microorganismes entraîne une consommation de dioxygène (O₂). La mesure de cette demande en oxygène permet d'évaluer le contenu d'une eau en matières organiques biodégradables, donc son degré de pollution ou sa qualité. Cette technique permet de mesurer au laboratoire sur 5 jours (à 20° C dans l'obscurité), la

quantité d'oxygène consommée par le processus naturel de décomposition de la matière organique décomposable présente dans un litre d'eau.

Pour mesurer la DBO5, on réalise une première mesure de la concentration en dioxygène dans l'échantillon d'eau. On répète cette mesure 5 jours plus tard. La DBO5 représente la différence entre les deux concentrations mesurées.

2.6. La demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation par voie chimique, effectuée à l'aide d'un oxydant puissant, des composés organiques présents dans l'eau. Elle permet de mesurer la teneur en matières organiques totales, y compris celles qui ne sont pas dégradables par les bactéries. Il s'agit donc d'un paramètre important permettant de caractériser la pollution globale d'une eau par des composés organiques.

Cette technique a été réalisée par oxydation chimique à chaud des matières organiques ou minérales présentes dans l'eau à l'aide d'un oxydant puissant, le permanganate de potassium (KMnO_4) pendant 2 heures.

2.7. Le rapport DCO / DBO5

Le rapport DCO/DBO5 donne une première estimation de la biodégradabilité d'un échantillon donné (Rodier, 2005). Le rapport DCO / DBO5 donne une indication sur l'origine de la pollution organique. Plus il se rapproche de 1, plus le rapport DCO / DBO5, indique la biodégradabilité d'un milieu. Lorsque le rapport est supérieur à 2, ceci indique que l'échantillon analysé est difficilement biodégradable ; Lorsque le rapport est $<$ à 2 : l'échantillon analysé est facilement biodégradable ; lorsqu'il est $>$ à 3 : l'échantillon n'est pas biodégradable.

2.8. Les ions ammonium NH_4^+

Les concentrations d'ammonium sont mesurées par une méthode de normalisation internationale (ISO 715/1-1998). Les ions NH_4^+ ont été dosés par colorimétrie suite à une catalyse en milieu alcalin par une solution de nitroprussiate de sodium.

2.9. Les chlorures

Les ions chlorures sont dosés par la méthode volumétrique, dans un milieu neutre (pH=6,7 ou 7) par une solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent. (Rodier, 1996).

2.10. Les orthophosphates

Les concentrations des ortho phosphates ont été déterminées par spectrophotométrie à absorption moléculaire en utilisant une longueur d'onde $\lambda=700$ nm selon la méthode de normalisation internationale (ISO 6878/1-1998).

2.11. Les phénols

Détermination photométrique des phénols et d'autres composés de manière oxydative par formation de colorantes antipyrine sa l'aide du 4-aminoantipyrine. Réaction chimique conforme aux méthodes normées DIN 38409-H 16-3. La longueur d'onde utilisée est égale à 520nm. La méthode détaillée est présentée en annexe.

2.12. Les Nitrites

Nous avons utilisé la méthode au Réactif de Zambelli pour le dosage des nitrites (NO_2^-) (Rodier, 1987), l'acide sulfanilique en milieu chlorhydrique et en présence d'ions ammonium et de phénol, forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré en jaune dont la densité est proportionnelle à la concentration en nitrites. Les lectures sont effectuées au spectrophotomètre à la longueur d'onde 435nm.

2.13. Les Nitrates

Les nitrates (NO_3^-) ont pour principale origine le lessivage des terres agricoles et la dégradation de la matière organique. Les variations saisonnières des teneurs en nitrates sont importantes et liées au développement du phytoplancton et au débit des cours d'eau.

Pour le dosage des nitrates, nous avons utilisé la méthode au Salicylate de sodium indiquée par Rodier (1987). En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent le paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique.

3. Analyses des paramètres physico-chimiques des pesticides

Il y a une relation étroite entre les caractéristiques physico-chimiques des pesticides, celles de la matrice (eau, sol, air) et les facteurs climatiques. Cette relation influe d'une manière

importante sur la contamination des milieux et la biodégradabilité du polluant ou pesticide (Bordjiba, 2003).

3.1. La solubilité (S)

Les substances ayant une solubilité élevée sont rapidement distribuée par le cycle de l'eau, ces substances sont peu absorbées sur les particules solides et tendent à être plus facilement dégradées à la fois par les phénomènes biotiques. Aucune substance n'est complètement insoluble dans l'eau.

3.2. La pression de vapeur (P)

La pression de vapeur permet d'évaluer le taux d'évaporation d'une substance. Il est nécessaire d'ajuster la pression de vapeur d'une substance à une température donnée différente de la température normale.

3.3. La constante de Henry (H)

Elle représente le coefficient de partage à l'équilibre d'une substance entre l'air et l'eau. Plus la valeur est forte, plus la substance aura tendance à passer dans l'air sous forme gazeuse au lieu de rester sous dissoute dans l'eau.

3.4. Les coefficients de rétention : Koc et Kd

La rétention des pesticides par les sols est classiquement caractérisée à l'aide du coefficient de partage Kd ou de distribution du pesticide entre les phases liquide et solide.

Ce coefficient déterminé à l'équilibre traduit l'affinité du sol pour le pesticide. Comme la matière organique est considérée comme le constituant du sol majoritairement responsable de l'adsorption des pesticides. Le coefficient Kd est fréquemment normalisé par rapport à la teneur en carbone organique du sol, pour donner ainsi le coefficient Koc.

3.5. Mobilité

La mobilité d'une substance est évaluée par sa constante de sorption. Elle évalue les risques de contamination des eaux souterraines par des tests sur colonne.

3.6. Persistance en plein champ

La persistance d'une substance active est l'évaluation du risque d'accumulation dans les sols et de dispersion dans l'environnement dans les conditions réelles.

3.7. Coefficients de partage octanol-eau : K_{ow}

Le K_{ow} ou le coefficient de partage octanol-eau. C'est une grandeur sans dimension, définie à une température et à un pH donné. Il est souvent exprimé en logarithme décimal : \log de P. \log P est un indicateur de liposolubilité d'une substance. Si \log P est supérieur ou égal à 3, la substance est susceptible de bioaccumulation.

3.8. Stabilité dans l'eau

Elle est évaluée par le temps de dégradation de 50 % de la substance active (DT 50) dans l'eau et exprimée en jours ou en heures à un pH donné.

4. Méthodes d'analyse statistique

Toute étude statistique peut être décomposée en deux phases au moins : le rassemblement ou la collecte des données, d'une part, et leur analyse ou leur interprétation, d'autre part.

Les données collectées sont des caractéristiques physicochimiques mesurées dans chaque échantillon d'eau superficielle agricole prélevée par site.

La statistique descriptive a pour but de mesurer et de présenter les données observées d'une manière telle qu'on puisse en prendre connaissance aisément, par exemple sous la forme de tableaux ou de graphiques.

L'inférence statistique permet d'étudier ou de généraliser dans certaines conditions les conclusions ainsi obtenues à l'aide de tests statistiques en prenant certains risques d'erreur qui sont mesurés en utilisant la théorie des probabilités.

Concernant notre travail, tous les calculs ont été réalisés pour chaque variable et pour chacun des 6 sites, à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données minitab version 14.1(X, 2003).

4.1. Description des données

Pour mieux décrire les différentes caractéristiques obtenues par site, nous avons calculés certains paramètres statistiques de base tels que la moyenne arithmétique (\bar{x}) qui est un paramètre de position et de tendance centrale, l'écart type (s) qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne, les valeurs minimales (x_{\min}) et maximales (x_{\max}) qui donnent toutes les deux une idée sur l'étendue des données, et enfin l'effectif (n) qui nous renseigne sur l'importance des données traitées.

4.2. Comparaison entre les sites : Analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA)

Pour comparer, entre les 6 sites, nous avons utilisé le test d'analyse de la variance à un critère ou à un facteur de classification modèle fixe.

L'analyse de la variance (ANOVA) du modèle linéaire général (GLM) du logiciel Minitab d'analyse statistique des données (MinitabInc, 2014) est utilisée pour comparer les moyennes, entre elles, des 6 sites et ceci pour chaque caractéristique étudiée (Dagnelie, 2009). On considère qu'il existe des différences significatives entre les moyennes des quatre doses quand la valeur de la probabilité (p) est inférieure ou égale au risque $\alpha = 0,05$ ($p \leq \alpha = 0,05$) ; des différences hautement significatives quand $p \leq \alpha = 0,01$ et des différences très hautement significatives quand $p \leq \alpha = 0,001$ (Dagnelie, 2009).

4.3. Test de TUCKEY

Le test de TUKEY (Dagnelie, 2009) a permis de déterminer les groupes de sites homogènes par caractéristique physicochimique (MinitabInc, 2014).

5. Etude de la microflore microbienne totale des eaux superficielles agricoles

5.1 Dénombrement de la microflore microbienne

5.1.1. Isolement, purification et conservation des souches

L'analyse de la microflore a été conduite selon la technique des suspensions – dilutions telle qu'elle est décrite par (Rapilly, 1968) sur différents milieux de culture selon la méthode suivante(Figure : 05).

Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Pour permettre le développement des microorganismes, le milieu doit contenir tous les aliments nécessaires en quantité suffisante et en proportion relativement convenable.

Les milieux de culture choisie pour l'isolement sont purement synthétiques et favorables au développement des microorganismes. C'est un choix déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore Il s'agit des milieux PDA (milieu à base de Pomme de terre, Dextrose et Agar), MEA (milieu à base d'extrait de Malt et d'Agar, Czapeck (milieu à base d'élément minéraux et Agar), Sabouraud (a base de glucose et Agar) et milieu de Galzy et Slonimski (a base des sels minéraux et vitamines) . La composition chimique et le pH des milieux sont présentés dans l'annexe n°2.

10 ml de la solution mère de chaque prélèvement sont mélangés et agitées pendant quelques minutes dans un tampon phosphate PBS (Phosphate - Buffered Saline) Plusieurs dilutions au dixième sont préparées à partir du tube contenant la suspension mère.

Il est possible de dénombrer globalement les populations microbiennes d'une eau en comptant les colonies qui se développent sur milieu gélosé ensemencé par une dilution de l'échantillon (1 microorganisme =1 colonie).

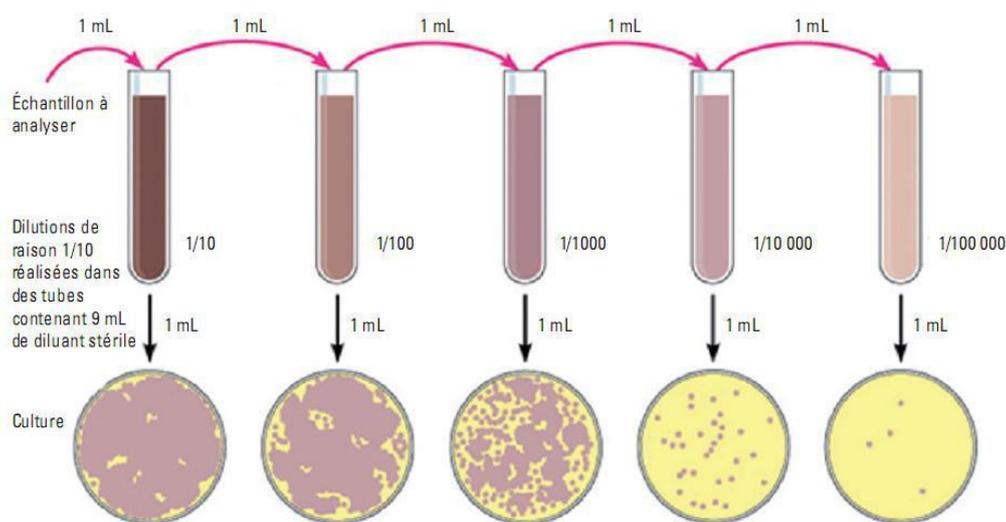


Figure 05. Méthode d'isolement de la microflore totale microbienne.

Après agitation, les différentes dilutions préparées sont utilisées pour réaliser des étalements sur différents milieux de culture. Un ml de chaque suspension-dilution est déposé dans une boîte des boîtes de pétri contenant le milieu de culture stérile, trois répétitions sont réalisées pour chaque dilution. Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours.

Les microorganismes isolés sont d'abord purifiés par plusieurs repiquages successifs monospore ou mono-colonie sur des milieux de culture spécifiques. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code. La conservation des microorganismes ainsi désignés se fait soit à une température de 4°C soit au congélateur à une température de -18°C. Dans les deux cas, aussi bien pour les bactéries que pour les champignons, des disques de gélose

prélevés sur le pourtour de la culture purifiée, sont transférés dans des tubes d'Eppendorf stériles de 1,5 ml, contenant du glycérol à 50% (Kebe *et al.*, 2009).

5.1.2. Comptage et expression des résultats

La détermination de la charge microbienne est faite par comptage des colonies et les résultats sont exprimés en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies) / ml d'eau selon la formule mathématique ci-dessous. Seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement (Dutruc-Rosset, 2003).

$$N = \sum \text{colonies} / V_{\text{ml}} \times (n_1 \times 0,1n_2) \times d_1$$

Où : N: Nombre d'UFC par volume d'eau; \sum colonies: somme des colonies des boîtes interprétables; V: Volume de solution déposée (1ml); n_1 : Nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue; n_2 : Nombre de boîtes considéré à la seconde dilution retenue; d_1 :Facteur de la première dilution retenue.

5.2. Identification de la microflore fongique isolée des eaux agricoles superficielles

après une série de repiquages successifs jusqu'à purification du champignon, La caractérisation et l'identification des espèces fongiques est basée sur l'observation macrosopiques et microscopiques des caractères morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

5.2.1. Identification macroscopique

L'identification morphologique repose sur des caractères macroscopiques sur les différents milieux de culture (dimension, couleur, texture, pigmentation du milieu, et croissance, aspect des colonies, de leur revers).

5.2.2. Identification microscopique

Les caractères microscopiques tels que l'aspect du mycélium, des spores, conidies, des phialides, des conidiophores, structures de résistances et éventuellement la forme sexuée ou asexuée constituent les bases de critères principaux de l'identification des champignons (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

À partir des caractéristiques macroscopiques et microscopiques, l'identification est effectuée en se référant à différentes clés de détermination : (Barnett, 1960 ; Ellis, 1971 ; Ellis, 1976 ; Domsch et *al.*, 1980 ; Wang et Zabel, 1992).

5.3. Identification de la microflore bactérienne

5.3.1. Identification macroscopique

Pour chaque colonie isolée et purifiée, les caractéristiques macroscopiques de la colonie sont vérifiées en se basant sur :

- la taille ou le diamètre de la colonie : Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies.
- la forme : l'allure des contours lisses, dentelés, déchiquetés, réguliers, irréguliers.
- relief : surface bombée, demi-bombée, plate centre parfois surélevé, parfois ombiliqué (en creux).
- L'aspect de la surface, Il peut être lisse ou rugueux.
- L'opacité : colonies opaques, translucides, transparentes.
- La consistance : au moment du prélèvement, il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).
- La couleur (pigmentation) : Les colonies habituelles sont crèmes. Une couleur différente est due à des pigments : jaune, rouge, orange, violette ...

5.3.2. Détermination des principaux types de bactéries

En rassemblant les critères précédemment décrits, trois sortes de colonies peuvent être distinguées :

- colonies S ou Smooth : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes.
- colonies R ou Rugueuses : colonies à surface rugueuse et bords dentelés, plates, de consistances sèches et donnant des suspensions hétérogènes.
- colonies M ou muqueuse : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, filantes sous l'anse, et donnant des suspensions hétérogènes.

5.3.3. Observation microscopique

L'observation microscopique permet de faire les observations suivantes :

- **la forme des cellules** : Ce caractère est très important en bactériologie, il peut à lui seul conduire à la détermination de genre mais on doit l'utiliser avec une extrême prudence. C'est ainsi qu'on différencie des germes ayant :
 - une forme sphérique : les cocci (ordres de Micrococcales)
 - une forme allongée en bâtonnet : les bacilles (ordre des Bacterales)
 - une forme intermédiaire : les cocobacilles
 - une forme incurvée en virgule (vibrio) ou en ondulation (ordre des Spirillales)
 - une forme spiralée (ordre des Spirochaetales)
 - une forme ramifiée (ordre des Actinobactériales).
- **Mode de groupements** : dans les cultures, les modes de regroupement sont liés au mode de division des germes et viennent compléter les données morphologiques et fournir de précieuses informations pour l'identification . Ainsi par exemple, dans l'ordre des Micrococcales, les différents groupements observés sont caractéristiques d'un genre donné:
 - groupement par deux en diplocoques : genre *Pneumococcus* pour les cocci Gram +genre *Neisseria* pour les cocci Gram-
 - groupement en chainettes : genres *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*
 - groupement en tétrades : genre *Gaffkya*
 - groupement en amas plans (grappe de raisin): genre *Staphylococcus*
 - groupement en amas non plans : amas cubiques : genre *Sarcina*, amas irréguliers : genre *Micrococcus*
 - groupements en palissades ou genres *Corynebacterium* et *Cellulomonas*
- **Mobilité** : la mobilité est le caractère le plus important mis en évidence à l'état frais. On doit observer :

La présence ou l'absence de mobilité,- les caractères de cette mobilité : frétillement des bactéries à ciliature polaire ou tournoiement des bactéries péritriches.

Remarque: Une bactérie mobile doit se déplacer dans le champ microscopique avec un mouvement qui lui est propre, les autres bactéries restant immobiles ou se déplaçant dans d'autres directions. Attention cette mobilité ne doit pas être confondue avec les mouvements browniens qui sont des mouvements désordonnés de particules (sans déplacement véritable) dus à l'agitation thermique des molécules de liquide ni avec les

mouvements transmis par les courants (toutes les bactéries sont entraînées dans la même sens).

- **Éléments particuliers de la bactérie :** la présence d'une capsule est révélée à l'état frais de la souche cultivée sur milieu enrichi, par la coloration négative à l'encre de Chine. Sa mise en évidence est un indice important.

Ex : des diplocoques Gram+ entourés d'une capsule importante évoquent *Streptococcus pneumoniae*.

- **Les spores,** Leur présence permet à elle seule de ranger les bactéries aérobies dans la famille des Bacillaceae. De plus la spore et sa position permettent la classification des bactéries en groupes à l'intérieur d'une famille.

5.3.4. La coloration de Gram

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux àensemencer etc. La coloration de Gram est une coloration qui teste l'alcool - résistance d'une souche bactérienne. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi.

Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine que celles à Gram positives. De plus, cette paroi est très riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans laquelle l'éthanol est fortement soluble.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet (rem : certaines bactéries telles que les *Bacillus*, apparaissent parfois roses et violettes sur le même frottis, on les dit « Gram labiles » et les différences de coloration sont dues à des différences d'âge des bactéries).

5.3.5. Test oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries. Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène -diamine- oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène -diamine.

Il s'agit d'écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie du germe à étudier sur le disque de papier pré-imprégné par le réactif. Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le

germe possède une oxydase : le test est positif, si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

5.3.6. Test catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction : $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (Marchal et *al.*, 1991).

5.3.7. Caractérisation à l'aide de galeries API 20E

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif (dont les Vibrionaceae), comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, et permet aussi la réalisation de tests en anaérobiose (ajout de paraffine). La suspension bactérienne, inoculée dans 5 ml d'eau physiologique stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, est préparée à partir d'une colonie isolée suite à plusieurs repiquages successifs. L'ajout de réactifs s'avère nécessaire pour certains tests. L'incubation se fait à 36°C ± 2°C pendant 18 à 24 heures.

Le 21^{ème} test (oxydase) est réalisé en parallèle grâce à un disque oxydase, sur lequel quelques gouttes de suspension bactérienne sont versées.

Puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

La lecture des réactions se fait d'après le tableau de lecture fournit dans le kit et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (base de données Api Web), après y avoir inscrit le profil numérique à 7 chiffres.

Tableau 7. Tableau de lecture des tests du système API 20 E

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitropheline-BD-Galactopyranoside	0.223	B-galactosidase (Ortho Nitro Phenyl-BD Galastopyranosidase)	Incolore	Jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	OrnithineDèCarboxylase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>CIT</u>	Trisodimuncitrane	0.756	Utilisation du CITrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert /bleu (3)
<u>H2S</u>	Sodiome thiosulfate	0.075	Production d'H2S	Incolore / grisatre	Dèpot noir/fin liserè
<u>URE</u>	Uree	0.76	UREase	Jaune	<u>Rouge / orange (2)</u>
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DèsAminase	Jaune rougeatre	<u>TDA / immèdiat</u> morron-
IND	L-tryptophane	0.19	Production d'INDole	incolore vert pale /jaune	<u>JAMES / immèdiat</u> rose
<u>VP</u>	Sodium pyruvate	1.9	Production d'acètoine (VogesProskauer)	Incolore/rose pale	<u>VP 1 + VP 2 / 10 mln</u> rose /rouge(5)
<u>GEL</u>	Gelatine (origine bovine)	0.6	Gèlatinasa (GELatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1.9	Fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	1.9	Fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbiyol	1.9	Fermentation / oxydation (SORbito) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	Fermentation / oxydation (RHAMnose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	1.9	Fermentation / oxydation (SACcharose)(4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	1.9	Fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	0.57	Fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	1.9	Fermentation / oxydation (ARAbiose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		Cytochrome-Oxydase	(voir notice du test oxydase)	

3.8. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 NE

C'est une série de test qui permet d'identifier les non- Enterobacteriaceae et/ou bacilles à Gram négatif oxydase positif. La galerie API 20 NE comporte 20 microcupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se développent

seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification par un logiciel d'identification.

5.3.8.1. Test NO₃

La révélation des deux tests NO₃ et TRP est faite en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air. Une goutte de chaque réactif (NIT 1 et NIT 2) est ajoutée dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche des résultats. Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles). Pour cela, 2-3 mg de réactif de Zn sont ajoutés dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.

5.3.8.2. Test TRP

Une goutte de réactif JAMES est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

5.3.8.3. Test d'assimilation

La pousse bactérienne est observée, une cupule trouble indique une réaction positive.

5.3.8.4. Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Tableau 08. Tableau de lecture des tests du système API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO3	potassium nitrate	0.136	Reduction des Nitrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
			Reduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
				<u>Zn / 5 min</u>	
				rose	incolore
TRP	l-tryptophane	0.2	Formation d'indole (tryptophane)	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incolore	
				vert pâle/jaune	rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1.92	Fermentation (GLUcose)	Bleu à vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1.92	Arginine DHydrolase	jaune	orange/rose/rouge
<u>URE</u>	Urée	0.76	UREase	jaune	orange/rose/rouge
ESC	Esculine	0.56	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris/marron/noir
	citrate de fer	0.072	(ESCuline)		
GEL	gélatine (origine bovine)	0.6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion de pigment	diffusion de pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
<u>GLU</u>	D-glucose	1.56	Assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
<u>ARA</u>	L-arabinose	1.4	Assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
<u>MNE</u>	O-mannose	1.4	Assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1.36	Assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl-glucosamine	1.28	Assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1.4	Assimilation (MALtose)	transparence	trouble
<u>GNT</u>	potassium gluconate	1.84	Assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
<u>CAP</u>	acide caprique	0.78	Assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1.12	Assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1.12	Assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
<u>MLT</u>	acide malique	1.56	Assimilation (trisodiumCITrate)	transparence	trouble
<u>CIT</u>	trisodium citrate	2.28	Assimilation (PhénylACétique)	transparence	trouble
<u>PAC</u>	acide phénylacétique	0.8		transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

6. Etude de la biodégradation de deux pesticides (mancozèbe et méthomyl) par les souches microbiennes isolées

- **Objectif de l'étude:** il s'agit de déterminer les capacités cataboliques et de rechercher parmi les souches microbiennes isolées acclimatées et non acclimatées à la pollution par les pesticides, des souches capables de dégrader efficacement les substances actives du mancozèbe et du méthomyl. Afin de déterminer les capacités métaboliques des souches sélectionnées, deux objectifs ont été formulés.

1. Vérifier la tolérance des souches microbiennes à travers leur croissance en mode batch (culture discontinu)
2. Déterminer ensuite les taux de biodégradation des deux pesticides après 5 jours à partir des cultures batch.

6.1. Les souches microbiennes

Dix souches bactériennes et dix souches fongiques ont été testées séparément. Un consortium d'une population mixte constituée par l'ensemble des souches bactériennes et un consortium d'une population composée de l'ensemble des souches fongiques ont été également étudiés.

6.2. Les milieux de culture

Les milieux nutritifs utilisés pour la culture des souches fongiques sélectionnées pour le processus métaboliques : tolérance et biodégradation sont : MEA, PDA, CZAPEK, Milieu liquide de GALZY et Slonimski. La composition des milieux de cultures est présentée dans l'annexe n°2.

6.3. Les produits chimiques ou pesticides

Les pesticides utilisés, nous ont été fournis par Bayer. Ce sont des composés utilisés à grande échelle pour les cultures maraîchère et céréalières au niveau des régions du Nord-est algérien. Il s'agit d'un fongicide et d'un insecticide commercialisés en Algérie respectivement sous les noms de mancozèbe et méthomyl.

6.3.1. Le mancozèbe

Le mancozèbe est un est un fongicide particulièrement approprié pour lutter contre les champignons de moisissure, etc. Appartenant à la famille des carbamates et, plus précisément, un dithiocarbamate, non inhibiteur des cholinestérases².

Il s'agit de la combinaison de 2 autres dithiocarbamates : l'éthylène-bis-dithiocarbamate de manganèse et de zinc ou manèbe et l'éthylène-bis-dithiocarbamate de zinc ou zinèbe³.

Le mancozèbe est un fongicide de contact à action préventive, dont le mode d'action multisite correspond au groupe de gestion de la résistance. Il est utilisé pour lutter contre un large éventail de maladies des plantes sur une grande variété de cultures. Le mancozèbe appartient au groupe des fongicides communément appelés les éthylènebis(dithiocarbamates) (EBDC), au même titre que les matières actives manèbe, métirame et nabame.

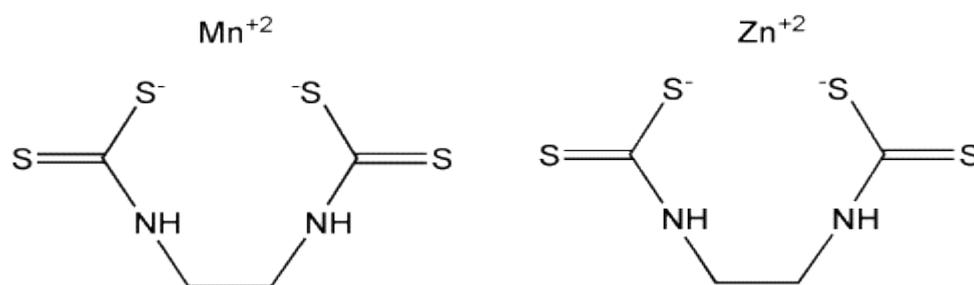


Figure 6. Structure chimique du mancozèbe

Formule brute : $(C_4 H_6 Mn N_2 S_4)_x (Zn)_y$

IUPAC: manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt

CA: [1,2-ethanediybis[carbamo(dithio)ato](2-)]manganese mixture with [1,2-ethanediybis[carbamo(dithio)ato] (2-)]zinc 9Cl) [ethylenebis(dithiocarbamato)]manganese mixture with [ethylenebis(dithiocarbamato)]zinc (8Cl).

6.3.2. Le méthomyl

Le méthomyl est un insecticide systémique à action rapide faisant parti du groupe des carbamate. La matière active méthomyl agit par contact et ingestion et inhibe la formation de cholinérase. Il est soluble dans l'eau, solide cristallin, qui dégage une odeur de soufre-like. Il est très toxique, il est classé comme un insecticide carbamate qui est désigné comme une utilisation limitée de pesticides par l'Agence américaine de protection de l'environnement. Depuis la fin des années 1960, la substance est utilisée comme pesticide dans les fruits et légumes commerciale ainsi que des produits stockés. L'utilisation comme insecticide est très efficace contre une large gamme de parasites, en particulier ceux qui sont résistants aux organophosphorés.

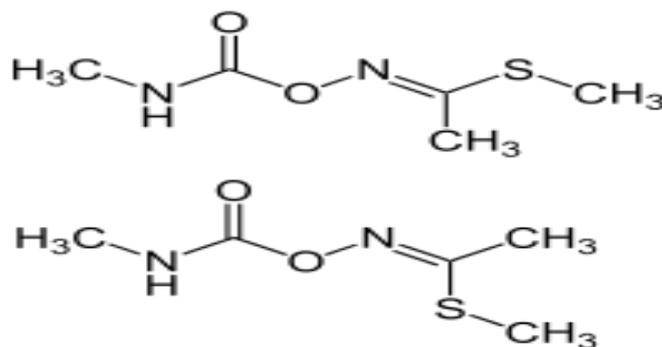


Figure 7. Structure chimique du méthomyl

Formule brute : C₅ H₁₀ N₂ O₂ S

IUPAC : N-[(methylcarbamoyl)oxy]ethanethioimidate de S-méthyle

CA : methyl N-[[[(methylamino)carbonyl]oxy]ethanimidothioate.

Les principales caractéristiques physico-chimiques sont données dans les tableaux.

6.4. Les précultures et les cultures

Les précultures et cultures sont conduites en mode batch sur milieu synthétique Galzy et Solninski (GS), additionné de glucose (5g/l) à pH 4,5, le milieu est réparti dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml par fiole, l'ensemble est alors stérilisé sous pression vapeur saturante (20 mn à 120°C). L'inoculum (mycélium plus spores ou colonies de bactéries ou de champignons) est prélevé des boîtes de Pétri et introduit de manière aseptique dans les fioles. Chaque essai est réalisé en triplicata (trois répétitions pour chaque souche et trois répétitions pour le consortium bactérien constitué par la population mixte). L'incubation se fait à une température 27°C sous éclairage de 1200Lux (12H/24H) et en condition agitée (sur plaque orbitale à une vitesse de rotation de 180 tr/mn) pendant deux jours.

Les molécules de fongicide et d'insecticide sont préparées dans un mélange DMSO/éthanol (50/50, V/V) et stérilisées par filtration à travers une membrane de 0,22 µm Millipore (Bedford, MA), puis ajoutées dans les cultures d'une façon aseptique à la concentration finale de 100 mg/l.

Des témoins de dégradation abiotique (milieu + pesticide sans inoculum) sont inclus dans les essais.

Les différentes phases de la méthodologie utilisée sont schématisées dans la figure suivante :

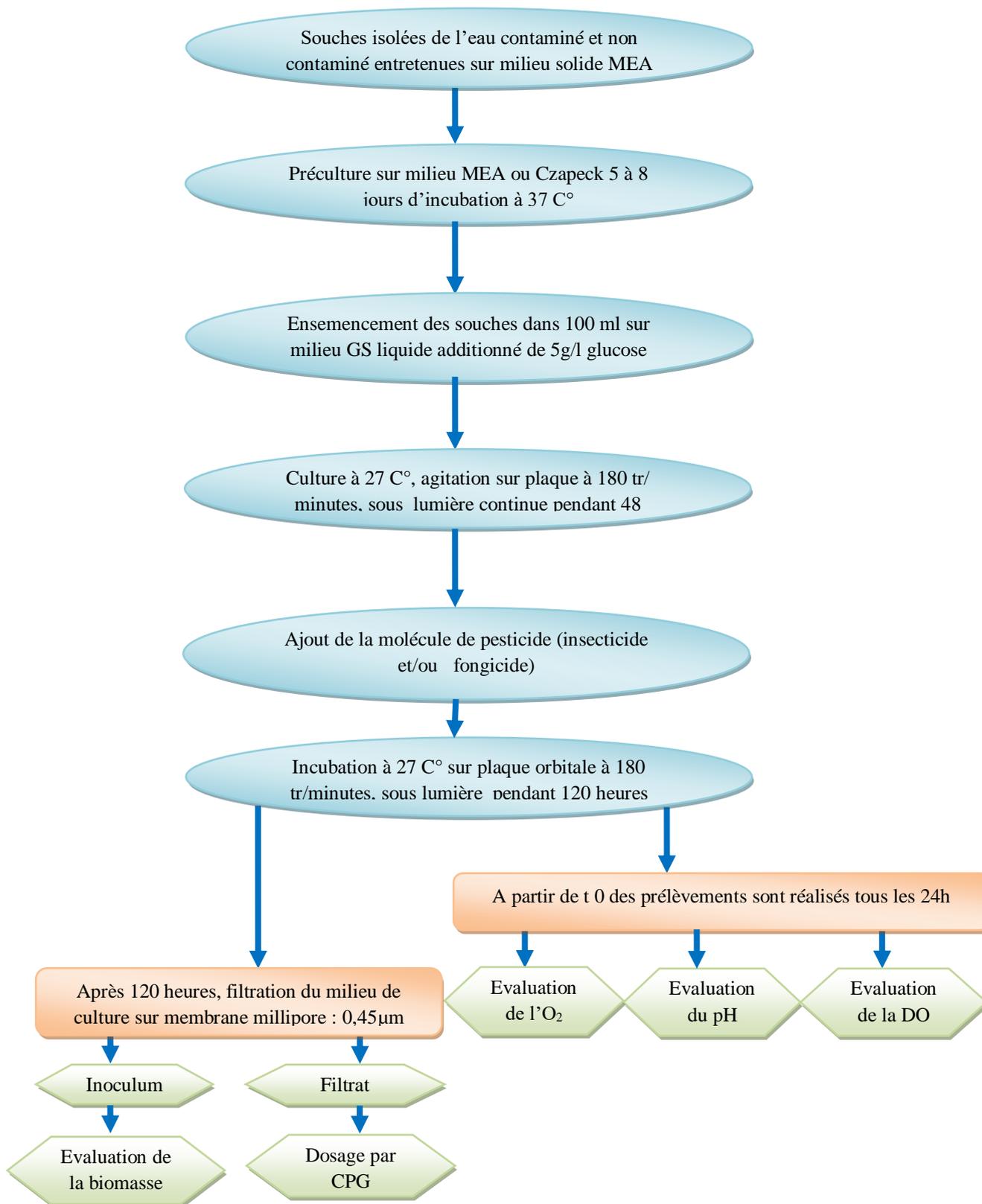


Figure 8. Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradabilité des molécules de pesticides

6.5. Détermination de la tolérance des souches microbiennes vis-à-vis du pesticide à travers leur croissance en mode batch (culture discontinu)

Les paramètres étudiés sont le pH, la Densité optique ou turbidité, le taux d'oxygène (DCO) et le poids sec de l'inoculum. Les mesures sont prises à partir des prélèvements sur milieu à partir du temps t_0 puis à tous les 24 heures. Les valeurs calculées ont permis ensuite de tracer les cinétiques de croissance.

6.5.1. Mesure du pH

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Et par voie de conséquence, il peut affecter le processus de biodégradation. Pour maintenir la survie de la bactérie dans le milieu, il est nécessaire que le pH soit proche de la neutralité ou légèrement basique, ceci favorise évidemment la rupture des liaisons ester par hydrolyse. Le pH est déterminé à l'aide d'un pH mètre de type Wagtech 525043.

6.5.2. Détermination de la densité optique

La turbidimétrie est utilisée pour déterminer la croissance bactérienne en présence de pesticides utilisé comme source de carbone à température ambiante pendant 5 jours. La densité optique est déterminée pendant la période d'incubation à des intervalles de temps de 24 h. Elle est mesurée à une longueur d'onde de 660 nm pour les bactéries et 630nm pour les champignons sur un spectrophotomètre (Jenway-6300). La courbe d'étalonnage réalisée séparément permet de relier la densité optique obtenue au nombre réel de bactéries ou de champignons.

6.5.3. Détermination du taux d'oxygène nécessaire à la dégradation des composés organiques du milieu (DCO)

Ce test est particulièrement utile pour la caractérisation d'un milieu traité par voie biologique ou physico-chimique. Il détermine la quantité de l'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique (biodégradable ou non) du milieu à l'aide d'un oxydant puissant.

L'oxydabilité est utilisée dans le cas de faible concentration en matières organiques (<40 mg/l). La technique utilisée est celle de Rodier (2005) qui utilise à froid le permanganate de potassium comme oxydant. Elle consiste à introduire dans un erlenmeyer 50 ml d'échantillon, 5 ml de solution d'acide sulfurique ($\frac{1}{2}$), et 50 ml de solution de permanganate de potassium (N / 80). Ce mélange est laissé pendant quatre heures à la température ambiante du laboratoire. Puis décoloré par 10 ml de solution de sulfate de fer et

d'ammonium. L'excès de sulfate de fer est titré par la solution de permanganate (N / 80) jusqu'à apparition de la coloration rose. L'oxydabilité est déterminée par mesure de l'oxygène nécessaire à l'oxydation du carbone organique en molécule de CO₂ dans l'échantillon). Cette mesure a l'avantage de fournir rapidement un résultat, et d'être facilement reproductible, mais ne renseigne pas directement sur la nature ou la quantité des composés du milieu.

6.5.4. Calcul du poids sec de l'inoculum

Après 120 heures, le contenu des fioles erlen-Meyer est récupéré, filtré à travers une membrane de 0,45 µm Millipore. Le filtrat est récupéré dans un tube en vue des dosages chromatographiques pour la détermination du pourcentage de biodégradation du pesticide. Le contenu de la membrane est mis à sécher à une température de 105 °C pendant 24 heures puis pesé afin de déterminer son poids en mg/ml.

Le poids sec est calculé selon l'équation suivante :

$$Ps = (M - M0)$$

M : poids de la membrane après séchage

M0 : poids de la membrane vide

7. Evaluation des taux de biodégradation des deux pesticides après 5 jours à partir des cultures batch en mode discontinu.

L'évaluation de la disparition du produit (pesticide) se fait par dosage en chromatographie en phase gazeuse (CPG) de sa quantité résiduelle, quantité qui, par la suite, permet de déterminer le pourcentage de disparition. Des prélèvements (1ml) sont effectués à un temps (t₀), c.à.d. au moment de l'ajout du pesticide, et après 120h. Les fractions prélevées sont filtrées sur membrane millipore (0,45µm), extraites à l'hexane puis injectées. Trois injections sont réalisées pour chaque échantillon.

7.1. Conditions chromatographiques

Colonne OV-1701, L = 30 m, D = 0,32 mm, Ep = 0,25 µm, N₂ = 2 ml/min- Détecteur Abs à 300 °C, débit N₂, 30 ml/min – Injecteur SPI 50°C (30 sec) à 300°C, volume Injectable 1µl – Four 50°C à 280°C, avec un pas de température de 10°C/min.

7.2. Le dosage

Pour déterminer les concentrations résiduelles des différentes molécules testées, nous utilisons pour chaque produit, un échantillon étalon de concentration connue dans le méthanol correspondant à une concentration finale de 100 mg/l dans le milieu de culture. Le programme de l'intégrateur, sur la base du temps de rétention, de la surface du pic donnée par l'étalon et de la surface du pic donnée par l'échantillon, calcule la concentration restante du substrat étudiée pour chaque échantillon.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyses physicochimiques des eaux superficielles agricoles

La température de l'eau est mesurée in situ et elle est comprise entre 23,71°C et 26,9°C. Les échantillons témoins présentent une moyenne plus élevée avec 26,9°C. Les valeurs enregistrées sont dans les normes et aucune de ces valeurs ne dépassent les normes.

La température de l'eau est un élément essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes, elle dépend de l'ensoleillement et des échanges avec l'atmosphère. Les variations de la température ont des effets importants car elle influence le développement des colonies de micro-organismes (Liss et al., 1992).

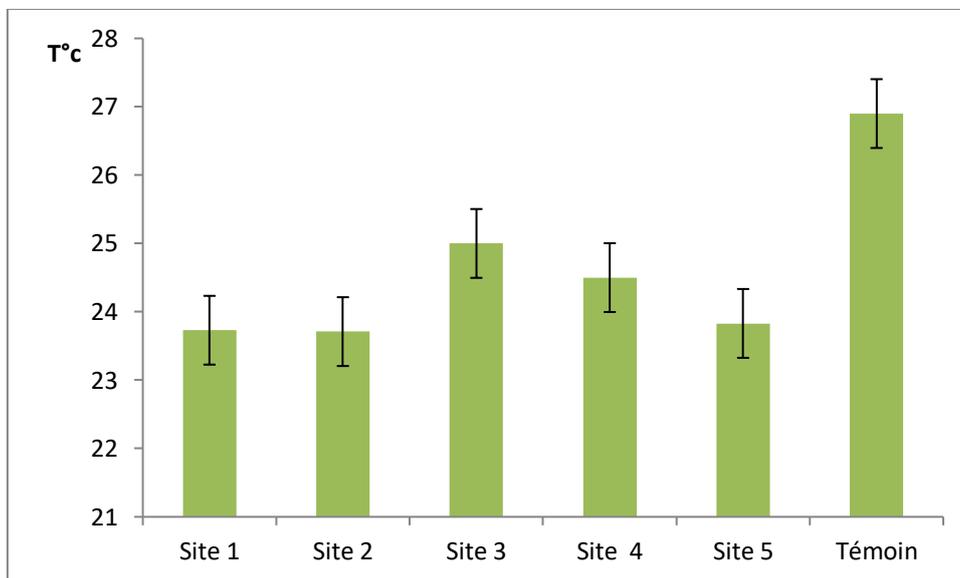


Figure 9. La température des eaux superficielles agricoles

Le pH de l'eau mesure la concentration des protons H^+ contenus dans l'eau. Il résume la stabilité de l'équilibre établi entre les différentes formes de l'acide carbonique et il est lié au système tampon développé par les carbonates et les bicarbonate (El Blidi et al., 2003). La Figure 10 montre que le pH est compris entre un minimum de 6,80 au niveau du site 1 et un maximum de 7,6 au niveau du site Témoin, voisin de la neutralité.

Toutefois, il est à signaler que des valeurs de pH inférieures à 5 ou supérieures à 8,5 affectent la croissance et la survie des microorganismes (Mara, 1980). La diminution du pH résulte de l'activité bactérienne de décomposition de la matière organique (AnsaAnare et al., 1999).

Le pH dépend de l'origine des eaux, de la nature géologique du substrat et du bassin versant traversé (Dussart, 1966; Bermond et Vuichard, 1973). Ce paramètre conditionne un grand nombre d'équilibres physico-chimiques entre l'eau, le gaz carbonique dissous, les carbonates et les bicarbonates qui constituent des solutions tamponnées conférant à la vie aquatique un développement favorable. Dans la plupart des eaux naturelles, le pH est compris habituellement entre 6 et 8,5 (Hceflcd, 2007).

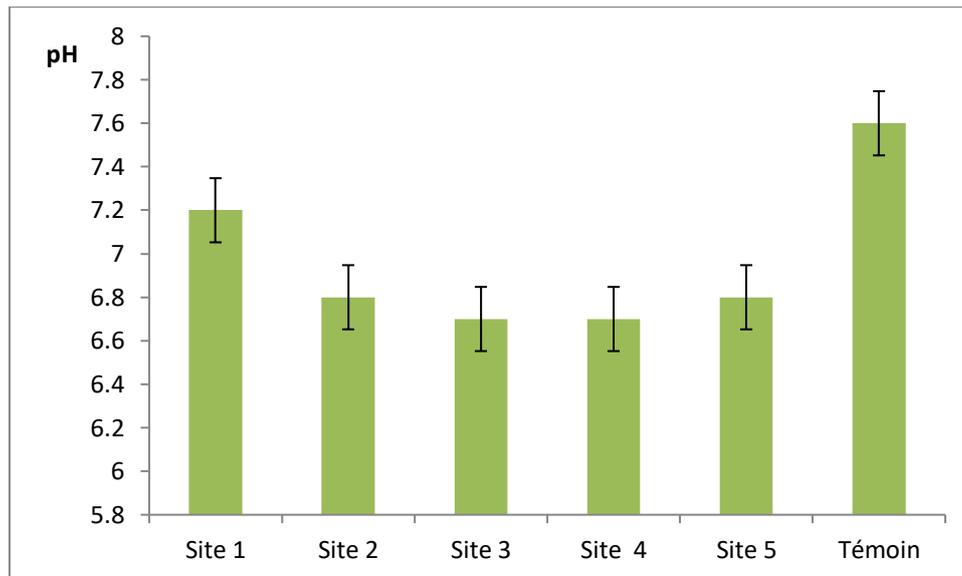


Figure10. pH des eaux superficielles agricoles.

La conductivité donne une idée de la minéralisation d'une eau et à ce titre un bon marqueur de l'origine d'une eau (Hceflcd, 2006). Elle est proportionnelle à la minéralisation de l'eau, ainsi plus l'eau est riche en sels minéraux ionisés, plus la conductivité est élevée (Derwich et *al.*, 2010).

La conductivité électrique désigne la capacité de l'eau à conduire un courant électrique et elle est déterminée par la teneur en substances dissoutes, la charge ionique, la capacité d'ionisation, la mobilité et la température de l'eau. Par conséquent, elle renseigne sur le degré de minéralisation d'une eau. Les valeurs de la conductivité électrique des eaux étudiées sont très élevées supérieures à 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et dépassent la norme de l'OMS (dans l'annexe n°3) donc ces eaux sont de minéralisation élevée avec une valeur maximale de 5.7 mS/cm au niveau du site témoin et une valeur minimale de 0.9 mS/cm au niveau du site 4 (Figure 11).

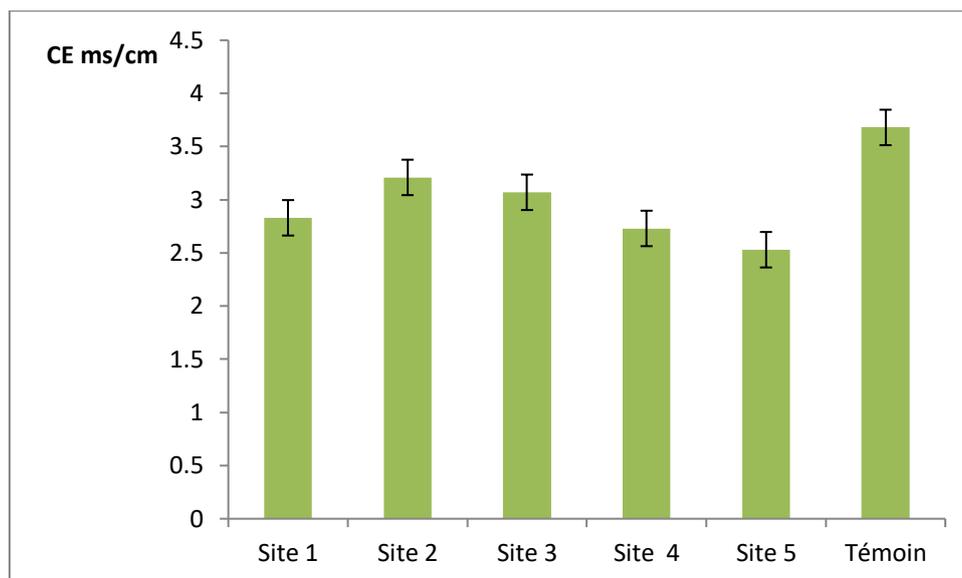


Figure 11. Conductivité électrique des eaux superficielles agricoles.

La figure 12 montre des teneurs en oxygène dissous irrégulières et faibles. Elles se situent entre 2.53 (site 5) et 3.16 mg/l (site témoin). Les valeurs enregistrées sont basses et sont différentes des normes admissibles. Dans tous les cas, les teneurs en oxygène obtenues peuvent encore diminuer dès que la dégradation des matières organiques et la multiplication des micro-organismes aérobies s'amorcent (Meinck et *al.*, 1977).

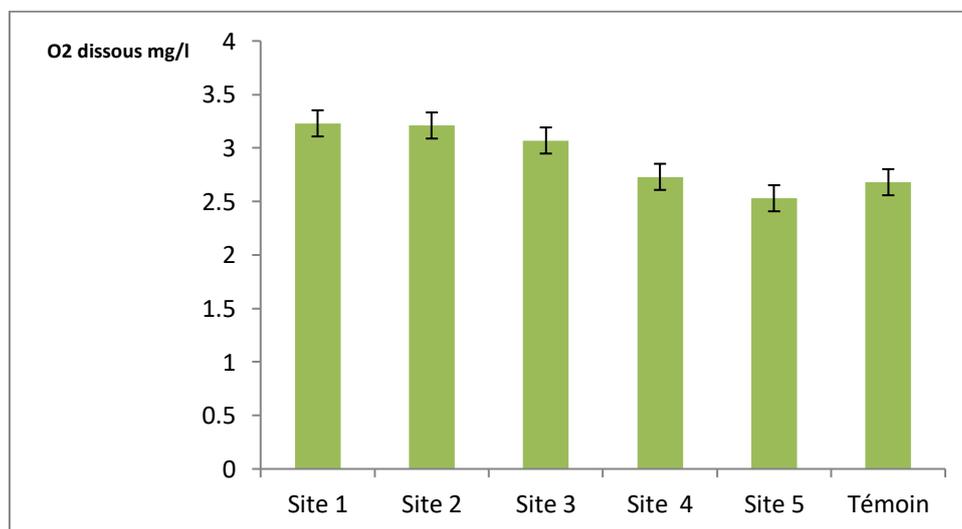


Figure 12. Taux d'oxygène dissous des eaux superficielle agricole.

La DBO5 traduit la quantité d'oxygène moléculaire utilisée par les micro-organismes pendant une période d'incubation de 5 jours à 20 °C pour décomposer la matière organique, dissoute ou en suspension, contenue dans un litre d'eau. D'après Chapman et *al.*, 1996, la DBO5 des eaux naturelles est inférieure à 2 mg/l.

La Figure 13 montre que les valeurs de la DBO5 enregistrées sont comprises entre 2,00 mg/l au niveau de site1 et 5.20mg/l au niveau de site3. Il est clair que les concentrations de la DBO5 sont largement inférieures à la norme (30 mg/l dans l'annexe n°3). Ce qui montre l'existence de microorganismes capables de bioépuration dans les échantillons d'eaux prélevées.

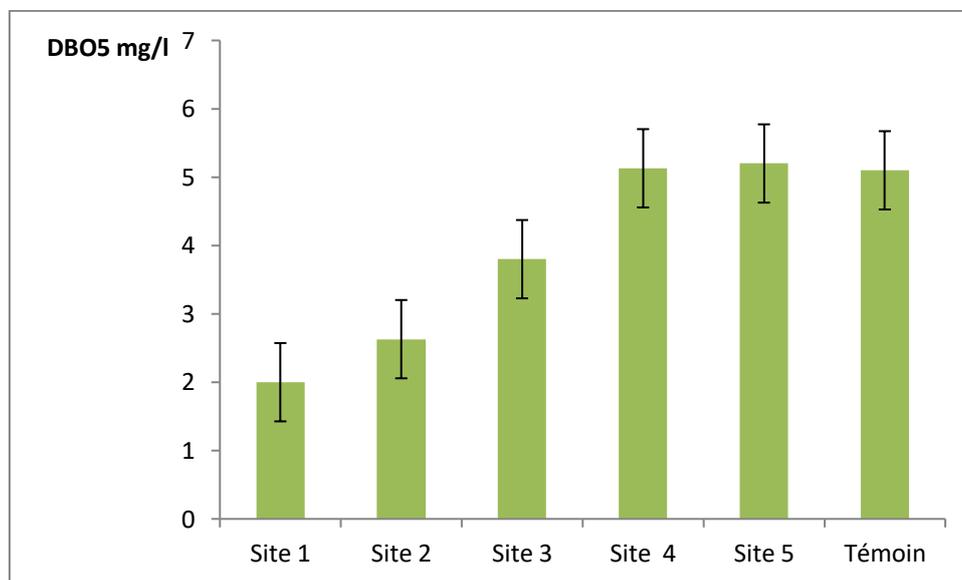


Figure 13. Teneurs de la DBO5 des eaux superficielles agricoles.

Concernant la demande chimique en oxygène DCO et d'après la Figure 14, les résultats font apparaître clairement que le site 1 présente la valeur minimale (15mg/l) et le site témoin la valeur la plus importante (38.33mg/l), inférieure à la norme qui est fixée à 40 mg /l selon les normes (annexe n°3).

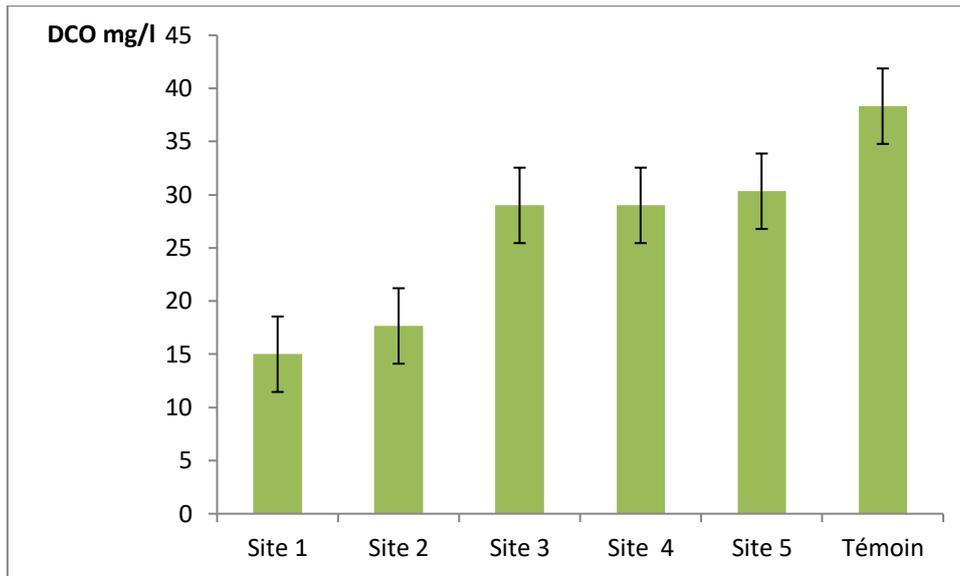


Figure 14. Teneurs de la DCO des eaux superficielles agricoles.

Le rapport DCO/DBO5 indique une biodégradabilité difficile des matières organiques et inorganiques présentes puisque toutes les valeurs DCO/DBO5 sont $>$ à 3. En effet le rapport DCO/DBO5 donne une première estimation de la biodégradabilité d'un échantillon donné. D'après la Figure 15, la valeur maximale est enregistrée au niveau du site 1 (7.63), est la valeur minimale est enregistrée au niveau du site 4 (5.65). Les valeurs sont supérieures ou inférieures à la norme (annexe n°3).

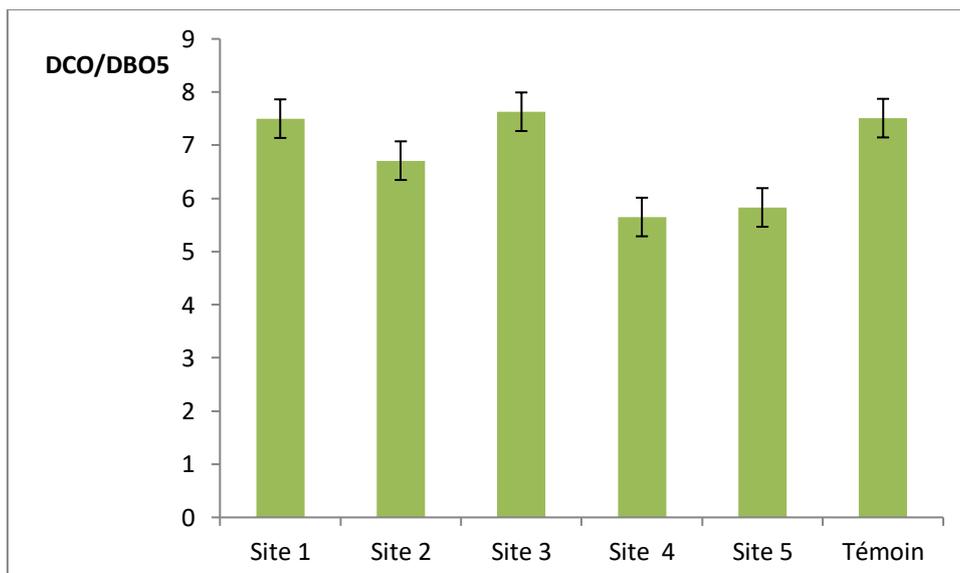


Figure 15. Rapport DCO/DBO5 des eaux superficielles agricoles.

L'ammoniac provient principalement de la dégradation des matières organiques azotées, il peut s'infiltrer avec l'eau dans les sols vers les nappes (Boulanouar, 1986 ; Chapman et *al.*, 1996 ; Al qawati et *al.*, 2015). La présence d'ammonium dans les eaux souterraines provient d'une contamination de surface à partir d'effluents ou d'un phénomène de réduction des nitrates fréquent dans les nappes captives et nous donne un indice sur la pollution organique. Elle peut également donner un indice sur une éventuelle pollution microbologique (Baran et *al.*, 2004), la figure 16 montre que les teneurs d'ammonium des eaux analysent s'échelonnent entre 0,45 mg/l au niveau du site 4 est 0,09 mg/l au niveau du site 5.

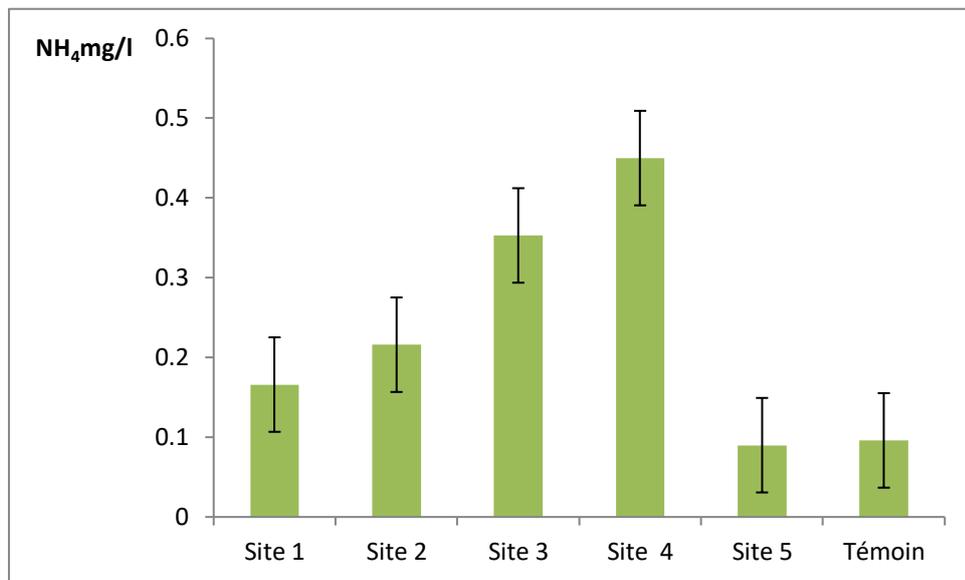


Figure 16. Teneurs de NH₄ des eaux superficielles agricoles.

La présence de chlorures dans les eaux est due le plus souvent à la nature des terrains traversés. On les retrouve dans presque toutes les eaux naturelles (Degbey, 2011). Ainsi, les eaux courantes exemptes de pollution ont une teneur généralement inférieure à 25mg/L.

Les valeurs de chlorure des eaux variant d'un maximum de 1606.66 mg /l jusqu'à un minimum de 61.66 mg /l (Figure 17).

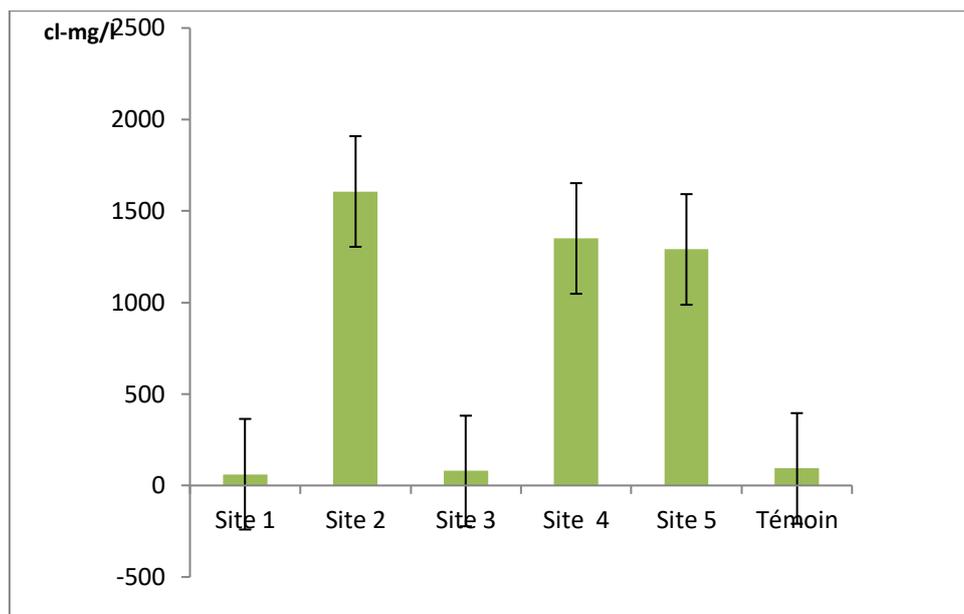


Figure 17. Teneurs des chlorures (Cl) des eaux superficielles agricoles.

Dans les cours d'eau les phosphates proviennent soit de la décomposition de la matière organique soit du lessivage des terres agricoles (Khalaf et *al.*, 2007).

Les différentes concentrations enregistrées en ortho phosphates au niveau des sites étudiés sont comprises entre 1,02 mg/l au niveau de site témoin et 3,83mg/l au niveau de site 2 (Figure 18) inférieurs à la norme.

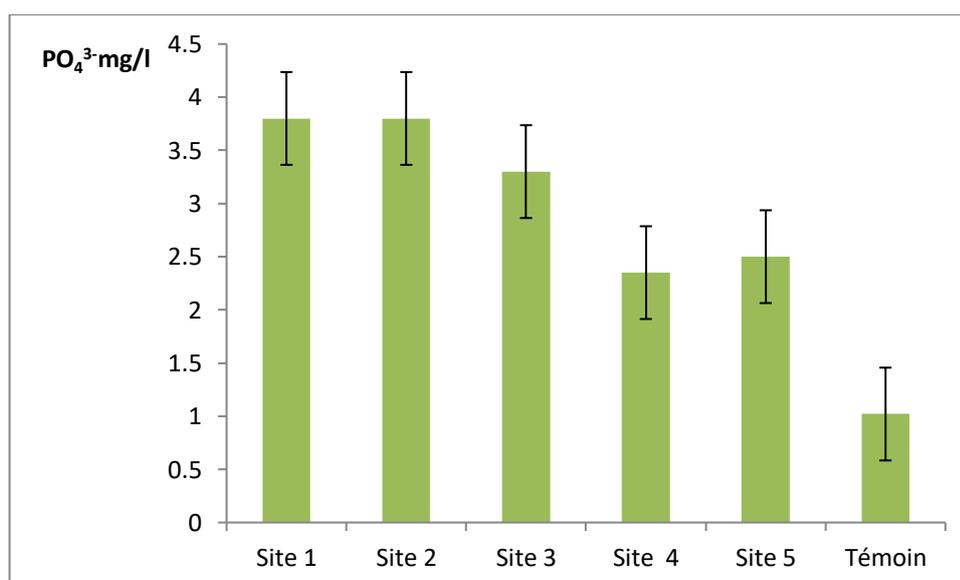


Figure18. Teneurs de la PO_4^{3-} des eaux superficielles agricoles.

Les teneurs des phénols mesurés durant la période d'étude varient entre 0,08 mg/l au niveau du site témoin et 3,76 mg/l au niveau du site 4 et sont inférieures à la norme fixée à 350 mg/l. Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques.

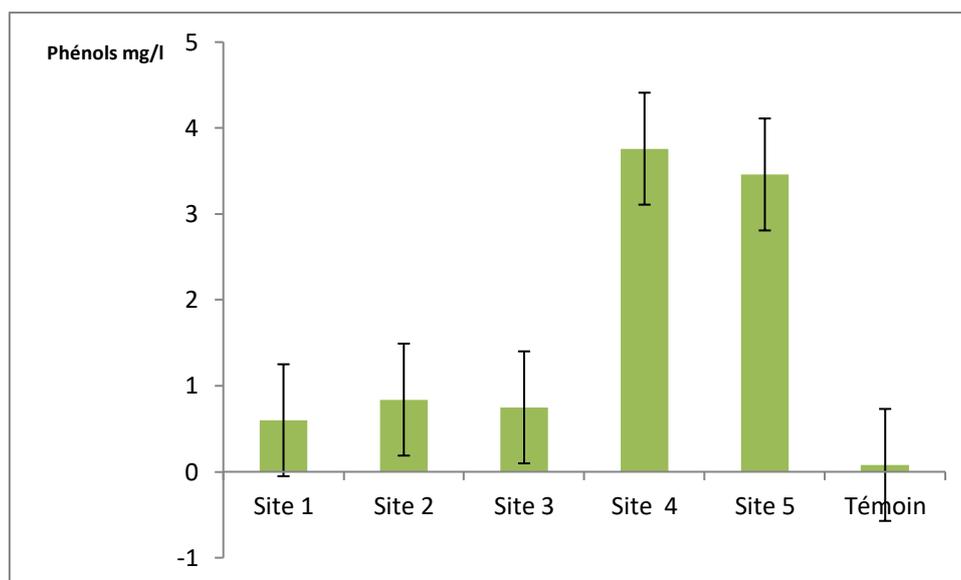


Figure 19. Teneurs des phénols des eaux superficielles agricoles.

La présence de nitrates peut résulter de l'épandage excessif d'engrais ou de la lixiviation des eaux usées ou d'autres déchets organiques vers les eaux de surface et les eaux souterraines (OMS, 2004).

Les valeurs de nitrates des eaux varient d'un maximum de 54,39mg/l au niveau du site 2 mg /l jusqu'à un minimum de 19,89 mg /l au niveau du témoin (Figure 21). Alors que pour les nitrites la valeur maximale est enregistrée au niveau du site2 (7,99mg/l) qui dépasse les normes (annexe n°3).

Les ions nitrates (NO_3^-) représentent la forme la plus soluble de l'azote, sa présence dans les eaux de surface est liée à l'utilisation intensive des produits fertilisants (Chapman et *al.*,1996).

Les Nitrates sont présents dans l'eau par lessivage des produits azotés dans le sol, par décomposition des matières organiques ou des engrais de synthèse ou naturels (Samak, 2002).

Comme les nitrates, les nitrites sont très répandus dans l'environnement, les uns et les autres se retrouvent dans la plupart des produits alimentaires, dans l'atmosphère et dans une grande

partie des eaux. Les fortes teneurs correspondent à la réduction des nitrates en nitrites par les anaérobies sulfito-réducteurs. Elles peuvent également être liées à l'oxydation bactérienne de l'ammoniac (Bengoumi *et al.*, 2004).

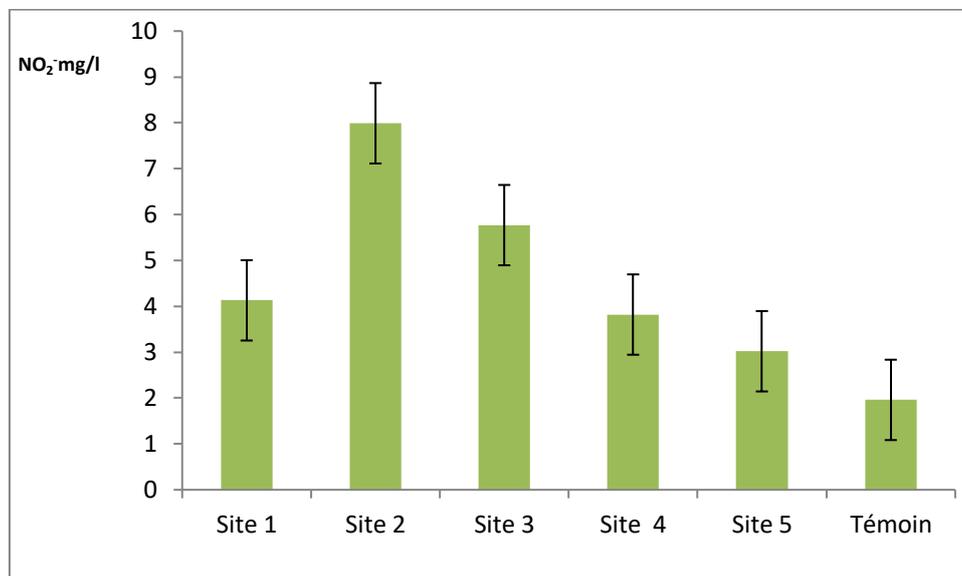


Figure 20. Teneurs NO₂⁻ des eaux superficielles agricoles.

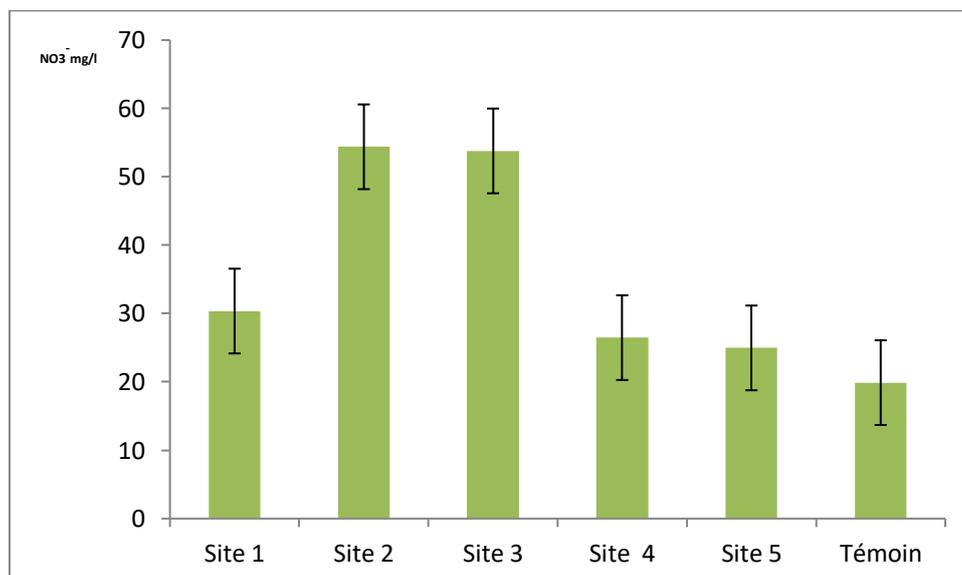


Figure 21. Teneurs NO₃⁻ des eaux superficielles agricoles.

2-Analyses physico-chimiques des molécules de pesticides étudiées

Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives (mancozèbe, méthomyl) étudiées reflètent leur faible mobilité et leur absence de dissociation ainsi que leur faible stabilité dans l'eau. Ces deux substances s'avèrent assez persistantes au niveau des différentes

composantes de l'environnement. Ce type de comportement est dû à leur pouvoir élevé de toxicité.

Tableau 9. Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées.

Paramètres physico-chimiques	Mancozèbe	Methomyl
Pression de vapeur	13.3 μ Pa	<ul style="list-style-type: none"> • 6.73 mPa à 25 °C • 21.54 mPa à 40 °C • 0.72 mPa à 25 °C
Constante de Henry	<0.00059 Pa*m ³ /mole	<ul style="list-style-type: none"> • 2.1 e-9 Pa*m³/mole
Solubilité dans l'eau	2 - 20 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> • 58 g/L à 25 °C
Coefficient de partage n-octanol / eau (K _{ow} =(log Pow))	1,34 entre 22°C et 25°C au pH 7	0.09 à 20°C et au pH de 7
Coefficients K _{oc} et K _d	K _{oc} non mesurable car instable dans l'eau	K _{oc} min: 38 K _{oc} Max: 238
Dissociation dans l'eau	absence de dissociation	pK _a : 9.3 à 20 °C
Stabilité dans l'eau (DT ₅₀)	1 jour(s) à 22 °C et au pH de 4 2.2 jour(s) à 22 °C et au pH de 9	144 jour(s) à 25 °C et au pH de 5 0.02 jour(s) à 25 °C et au pH de 9
Mobilité	Peu mobile	Peu mobile
Dégradation dans le système eau – sédiment	/	DT 50: 5j DT 90: 13-15j

Les eaux superficielles agricoles analysées semblent contaminées par des polluants d'origines organiques et inorganiques. L'analyse statistique montre l'existence de différences très hautement significatives entre les 6 sites pour chacune des variables suivantes, T°, p H , DBO5, DCO, NH₄, orthophosphates, chlore, phénols ; des différences hautement significatives entre les 6 sites pour le teneur moyennes d'O₂ et l'inexistence de différences significatives entre les 6 sites pour la conductivité électrique.

L'estimation du degré de pollution d'un milieu par les facteurs physiques et chimiques est difficile et manque souvent de précision compte tenu, de l'hétérogénéité et l'insuffisance des données disponibles concernant les normes. En outre, les multiples interactions entre la nature des composés polluants, l'eau et les facteurs climatiques de l'environnement rendent l'évaluation de la qualité et le degré de pollution des milieux aquatiques plus difficile.

3. Evaluation de la microflore totale des eaux superficielles agricoles

La distribution de la microflore est irrégulière dans les différents prélèvements des eaux analysés. La figure 22 montre que le pourcentage total des différents sites étudiés des champignons et des bactéries. La microflore dénombrée est constituée de 54% de champignons et 46% de bactéries.

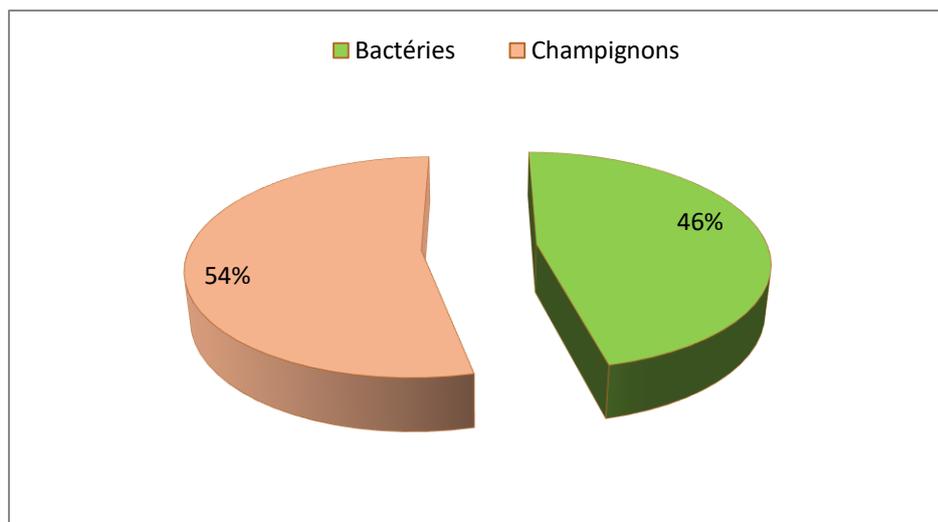


Figure 22. Pourcentage de la microflore microbienne totale des sites étudiés.

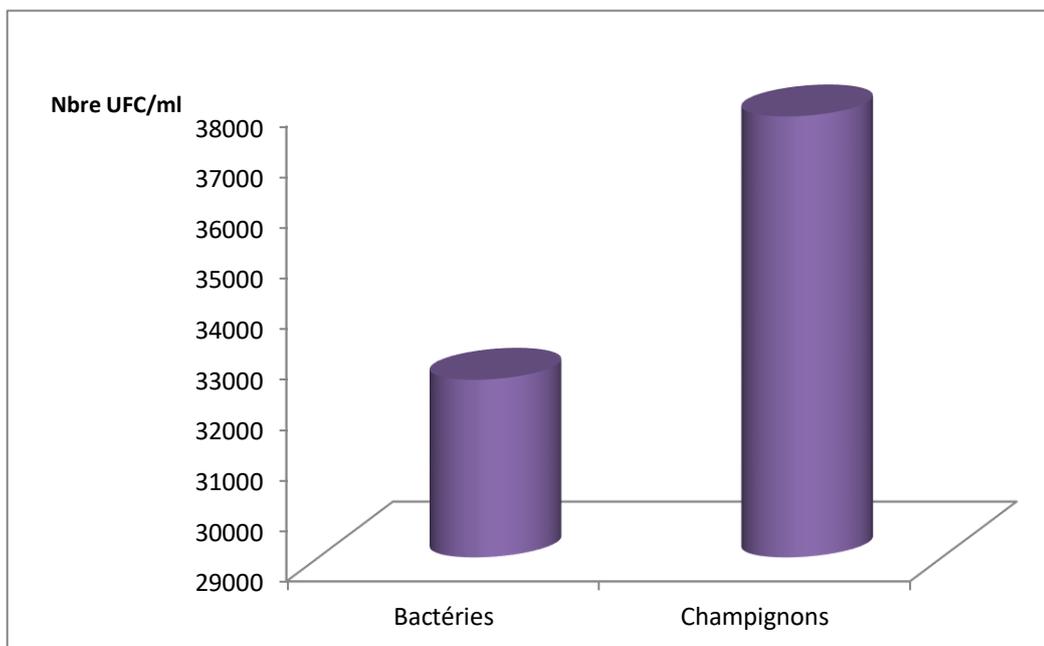


Figure 23. Microflore microbienne totale dénombrée au niveau des sites étudiés.

3.1. Les bactéries

Les eaux renferment une microflore microbienne riche avec 32521 isolats bactériens dont 1558 au niveau du site 1, 8307 au niveau du site2, 4473 au niveau du site 3, 6902 au niveau du site 4, 1698 isolats dénombrés à partir des échantillons du site 5 et 9583 isolats détectés des eaux du site témoin (figure 24).

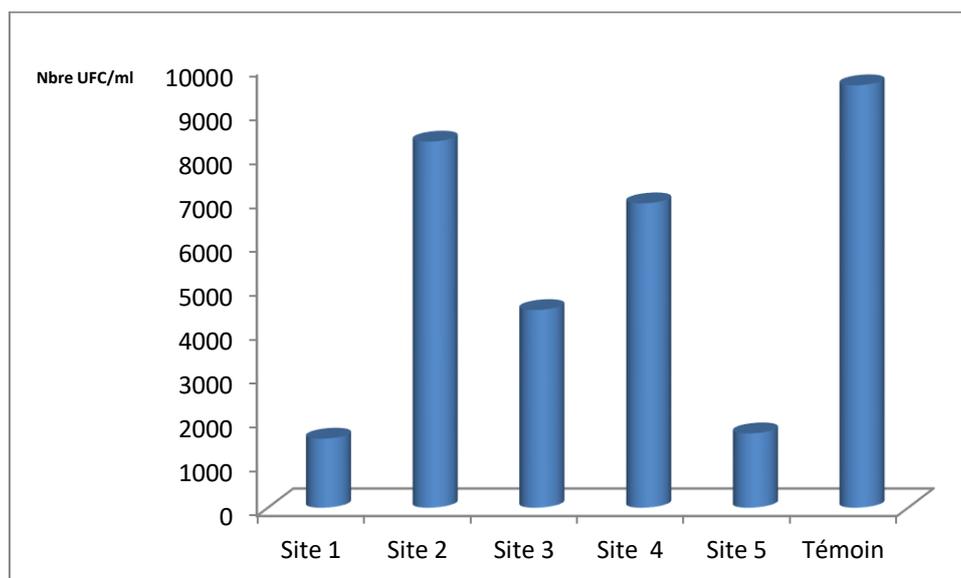


Figure 24. La microflore bactérienne totale des sites étudiés.

La figure 25 montre que le pourcentage d'isolats bactériens fluctue entre 5% et 29% avec un taux maximal enregistré au niveau de témoin et un taux minimal au niveau du site 1 et 5. Le site témoin est plus riche en charge bactérienne.

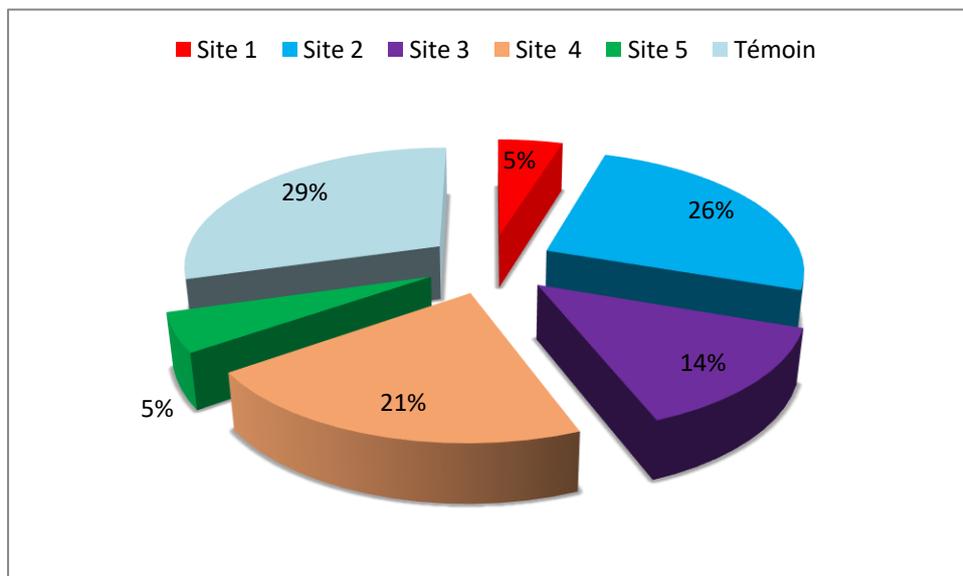


Figure 25. Pourcentage d'isolats bactériens des eaux superficielles agricoles.

Dix espèces bactériennes ont été identifiées dans les eaux analysées qui sont réparties d'une manière à peu près équitable sur l'ensemble des sites. La moitié des espèces identifiées sont absentes au niveau du site témoin (tableau n°10).

Tableau10. La liste des espèces bactérienne identifiées

*	Site1	Site2	Site3	Site4	Site5	Témoin
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	+		+	
<i>Aeromonas salmonicida</i>			+	+	+	
<i>Chryseomonas luteola</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		+			+	+
<i>Pasteurella Pneumotropica</i>	+		+		+	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+		+		+
<i>Sténotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+	
<i>Moellerella wisconsensis</i>			+	+	+	
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+			+	+

Tableau 11. Taxonomie des espèces bactérienne isolées

Règne	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Bacteria	Protéobactérie	Gamma Protéobactérie	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophima</i>
					<i>Aeromonas</i>	<i>salmonicida</i>
			Pseudomonales	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonace</i>	<i>aeruginosa</i>
					<i>Chryseomonas</i>	<i>Luteola</i>
			Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Sténotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
			Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Pasteurella</i>	<i>pneumotropica</i>
		Enterobactériaes	Enterobactériaceae	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	
		Beta Prooteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
		Vlavobacteria	Vlavobactériaes	Vlavobactériaceae	<i>Chryseobacterium</i>	<i>meningosepticum</i>
			Enterobactériaes	Enterobactériaceae	<i>Moellerella</i>	<i>wisconsensis</i>

3.2. Les champignons

La figure 26 montre la densité fongique totale des sites échantillonnés, 37724 isolats fongiques dont 1784 sont détectés à partir des échantillons du site 1, 13235 du site 2, 9060 du site 3, 12050 du site 4 et 1307 du site 5, 1296 du site 6.

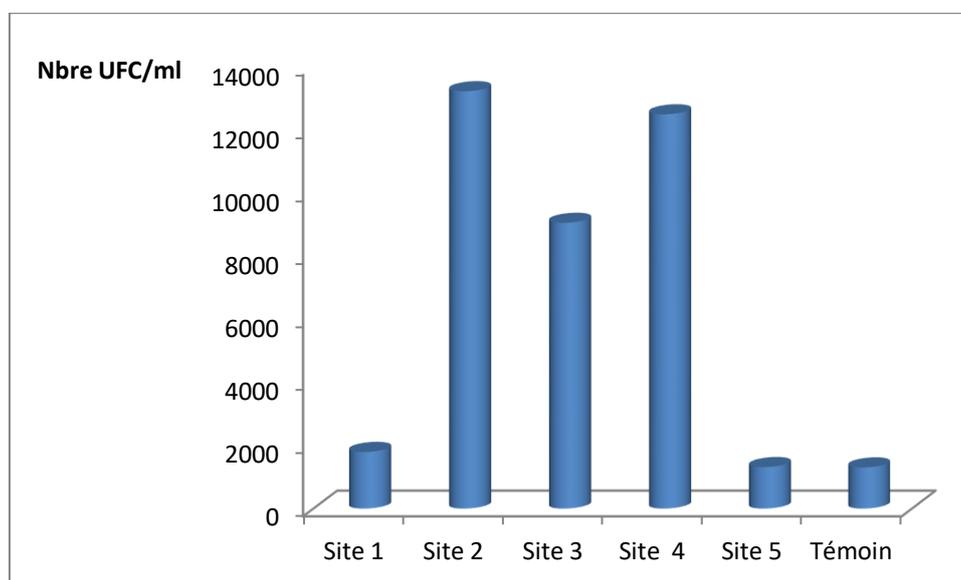


Figure 26. La microflore fongique totale des sites étudiés.

Le nombre total d'isolats fongiques des eaux superficielles agricoles est exprimé par la figure (27), il indique que le site témoin est le plus pauvre en souches fongiques pendant que la première position est occupée par le site 2.

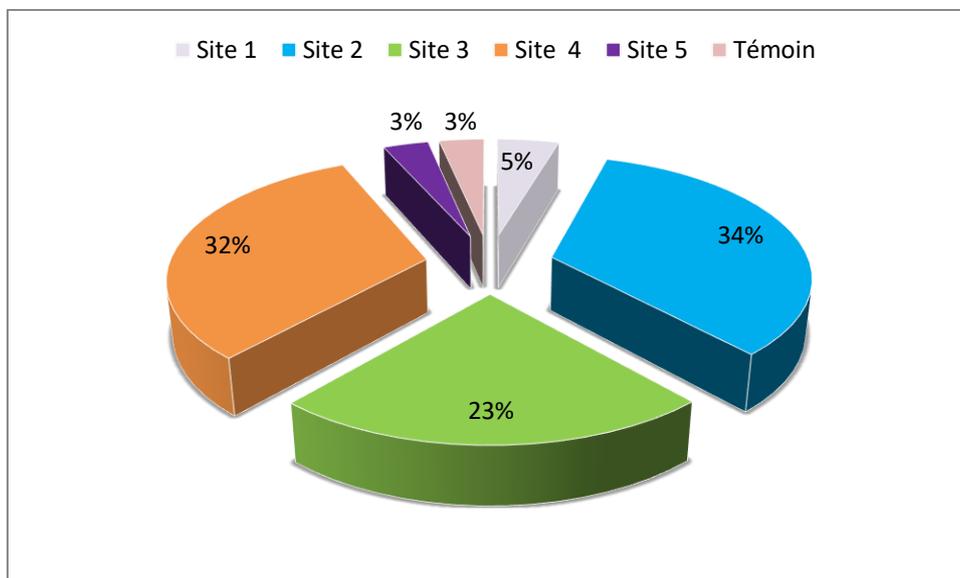


Figure 27. Pourcentage d'isolats fongiques des eaux superficielles agricoles.

Dix espèces fongiques ont été identifiées dans les eaux analysées qui sont réparties d'une manière à peu près équitable sur l'ensemble des sites. La moitié des espèces identifiées sont absentes au niveau du site témoin (tableau n°12).

Tableau 12. La liste des espèces fongiques identifiées dans chaque site

Souches	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site5	Témoin
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+		+		+
<i>Aspergillus fumigatus</i>			+	+	+	
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	+	+	+			+
<i>Aspergillus terreus</i>		+		+	+	+
<i>Penicillium notatum</i>	+		+	+	+	
<i>Penicillium citreonigrum</i>	+	+	+		+	+
<i>penicillium chrysogenum</i>		+	+	+		
<i>Trichoderma viride</i>		+		+		+
<i>Rhizopus sp</i>	+		+	+	+	

Tableau13. Liste et taxonomie des espèces bactérienne identifiées au niveau des eaux

Réne	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Fungi	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
					<i>Aspergillus flavus</i>
					<i>Aspergillus fumigatus</i>
					<i>Aspergillus terreus</i>
					<i>Aspergillus versicolor</i>
				<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citreonigrum</i>
	<i>Penicillium chrysogenum</i>				
	<i>Penicillium notatum</i>				
	Sordariomycetes	Hypocreales	Trichodermaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoder maviride</i>

L'importance des champignons microscopiques contribuent à la décontamination de l'environnement pollué par les pesticides. Cependant, rares sont les études qui se sont intéressées à l'inventaire de la mycoflore et en particulier celles des eaux superficielles agricoles. Pour cela, notre travail constitue l'un des premiers travaux pionniers dans ce domaine.

Dans ce cadre, il a été question de quantifier, puis de répertorier la microflore totale bactérienne et fongique présentes dans les eaux agricoles superficielles polluées par les pesticides avant leur utilisation dans les essais de biodégradation. Dans les milieux pollués, la diversité microbienne diminue et seule des souches capables d'utiliser les pesticides arrivent à survivre (Huang et *al.*, 2010). Cette hypothèse avancée par de nombreux auteurs explique la fréquence de notre inventaire où prédominent les genres *Aspergillus* et *Penicillium* pour les champignons et *Chryseomonas* et *Aeromonas* pour les bactéries sur le reste des populations, mais sans pour autant négliger l'importance de chaque membre de la communauté microbienne des sites étudiés.

L'évaluation quantitative de la microflore fongique isolée, indique une variabilité importante de champignons filamenteux au niveau des sites contaminés par les pesticides. Cette variabilité a été également enregistrée au niveau du site témoin avec une population non négligeable.

La plupart des espèces de champignons inventoriées appartiennent notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Rhizopus*. Ces espèces sont probablement parmi celles tolérantes à la présence de pesticides et celles qui ont des potentialités d'adaptation aux conditions difficiles du biotope à partir duquel elles ont été isolées. Les genres précités de cet inventaire appartiennent tous à la catégorie des agents efficaces, réputés dans le domaine de la biodégradation. Les études sur l'isolement des champignons filamenteux dans des environnements contenant les pesticides présentent une diversité de genres très similaire à celle trouvée dans notre étude. Il s'agit des études sur des sols contaminés par des pesticides (Bhalerao et *al.* 2007, Shivaramaiah et *al.*, 2006, Tigini et *al.*, 2009, Lee et *al.*, 2003, Teresa et *al.*, 2012, Rani et *al.*, 2014). Aussi, d'autres études ont été menées sur les eaux et il s'agit de El Fels, 2014 ; BhupalRedd et *al.*, 2012 ; Hai et *al.*, 2012 ; Biswas et *al.*, 2015.

Parmi tous les champignons inventoriés, il semble qu'*Aspergillus niger* est l'espèce la moins affectée par la présence des pesticides dans les eaux agricoles. Sa capacité de résistance lui a

permis de surmonter les conditions difficiles. Elle a été détectée avec une fréquence élevée dans tous les échantillons d'eaux agricoles analysées. Cette prépondérance a été signalée également dans des travaux antérieurs (Bordjiba et *al.* 2003, Bordjiba et *al.*, 2001; Ramadevi et *al.*, 2012). Elle a été également signalée dans divers substrat de sols, eaux, sédiments, (Mouchacca, 1982 ; Dunn et Baker, 1983 ; Guiraud et *al.*, 1995 ; Chafai, 1996; Steiman et *al.*, 1997 Mukhtar et *al.*, 2015 ; Jain et *al.*, 2015 ; Geetha et *al.*, 2016 ; Thirugnanam et *al.*, 2016). C'est un champignon très tolérant aux différents types de polluants (pesticides, hydrocarbures, métaux lourds) et supportent aussi les concentrations élevées de ces contaminants. Elle a été isolée dans des milieux fortement contaminés par des doses élevées de divers pesticides et notamment par les herbicides ((Domsch et *al.*, 1980 ; Pitt, 1979).

Cependant, le genre *Penicillium* est représenté uniquement par trois souches à une fréquence faible, avec des taux relativement faibles par rapport à ceux d'*Aspergillus niger*. Bien qu'il soit très réputé par sa présence au niveau des sols et des eaux voire même dans tous les écosystèmes et tous les types de biotopes et considéré comme étant un genre fongique très résistant et très réputé dans l'utilisation des polluants organiques en tant que source de carbone et d'énergie dans la croissance et développement au niveau des substrats. Ce genre ubiquiste a été en outre signalé comme l'une des espèces de microorganismes du sol qui possède des capacités de tolérance de certains polluants organiques les triazines. Cette rareté des *Penilliums* dans nos sites pollués de la région de l'est algérien a été également rapportée par Belaze(2015) et Hassaine (2016) dans les zones polluées respectivement par les pesticides et les hydrocarbures. Les *Penicilliums* sont des champignons polyphages, ubiquistes qui sont résistants à la plupart des substances toxiques et en particulier aux produits phytosanitaires.

Les populations de *Trichoderma* et de *Rhizopus*, sont également moins importantes que celles des *Aspergillus*. Ces résultats ne concordent pas avec les études réalisées sur la microflore fongique des sols, des eaux et des sédiments. Ils ont été isolés à partir de sol organique et minéral par Balasooriya et Parkinson (1967), dans les régions du nord par Nespiak (1970) et dans les régions du sud ou tropicales par Kobayasi et *al.*, (1977).

La biomasse bactérienne totale inventoriée est importante et notamment du point de vue quantitatif. Les eaux superficielles provenant des sols agricoles contaminés constituent un biotope très favorable où l'activité biologique est intense entraînant la croissance de ces communautés microbiennes. Toutefois, l'emploi de pesticides a permis la sélection des souches microbiennes résistantes capables de se maintenir pendant plusieurs années à cette

situation défavorable. Parallèlement, les souches sensibles sont affectées, elles sont inhibées voire même détruites.

Nous avons inventorié 70245 isolats parmi lesquels un nombre de 32521 espèces bactériennes dont les plus importantes sont celles affiliées aux genres : *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Chryseobacterium*, *Moellerella*, *Sténotrophomonas*, *Chryseomonas*, appartenant aux principales familles : Aeromonadaceae, Pseudomonaceae, Burkholderiaceae. La fréquence des espèces répertoriées est variable selon la nature et le lieu de prélèvement.

Les espèces les plus abondantes sont *Chryseomonas luteola*, *Sténotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*. La première place est occupée par l'espèce *Chryseomonas luteola* et la dernière position est représentée par *Moellerella*. Toutes ces souches ont été adaptées à un environnement complexe, et pourraient être d'une grande utilité en bioremédiation dans les zones contaminées par les pesticides (Soulas, 1993 ; Buitrónetal. 1996 ; Kargi et al., 2004 ; Ortiz-Hernandez et al., 2010 ; Karishma Baishya et al., 2015).

Il y a des espèces recensées dans les eaux témoins mais qui n'ont pas été détectées au niveau des sites contaminés. Il s'agit là des bactéries sensibles qui n'arrivent à s'adapter au milieu pollué par les pesticides et sont ainsi tuées suite à l'effet bactéricide des pesticides. Parallèlement, d'autres espèces bactériennes nouvelles apparaissent au niveau des eaux polluées.

Chryseomonas est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde, et différentes espèces ont été isolées de niches écologiques diverses. Il est très souvent dominant dans les sites contaminés par les pesticides (Matsumura, 1988). Il semble être impliqué dans les premières phases des procédés de bioremédiation lorsque les polluants sont disponibles (Kaplan et Kitt, 2004).

Par ailleurs, la plupart des souches bactériennes, caractérisées au cours de ce travail, avaient déjà été identifiées : c'est le cas du genre *Pseudomonas* qui est largement représenté dans l'étude de la biodégradation des pesticides. Ainsi, on retrouve dans les travaux de Tatianeetal., 2007 ; Anthony et al., 2008 ; Boricha et al., 2009 ; Sarkar et al., 2009 ; Amritha et al., 2014 ; Kulkarni et al., 2015. , les travaux de Saadatullah et al., 2009 ; Yi-Cheng et al., 2000 ; Laura et al., 2010 ; Agarry et al., 2013 ; Karabi et al., 2015 ont isolés et identifiés les genres *Serratia* ; *Stenotrophomonas* ; *Aeromonas* ; *Burkholderia* du sol contaminé par les pesticides.

Parmi les espèces rares de cette microflore bactérienne, nous avons constaté, une exhibition modeste des espèces de *Moellerella wisconsensis* dans les eaux superficielles agricoles des sites contaminés. Les communautés de ces mêmes espèces au niveau du site témoin sont plus abondantes. Ceci fait apparaître également que certaines espèces bactériennes comme les espèces fongiques sensibles sont influencées par l'effet toxique de ces molécules de pesticides. Cette sensibilité accrue pourrait être expliquée par un manque d'adaptation et une faible induction des systèmes enzymatiques de détoxification.

Les communautés de champignons et de bactéries ont des fonctions vitales dans l'environnement, car elles ensemble dégrader et minéraliser les composés organiques (Frey-Klett et *al.*, 2011); La répartition de la microflore totale aussi bien microbienne que fongique est généralement influencée par les caractéristiques du biotope qui se retrouvent souvent dans les caractères physiologiques des souches isolées. Ces caractères sont variables selon les espèces et influencés par les paramètres physiques et chimiques de ce biotope. Les caractéristiques physico-chimiques influent énormément aussi bien quantitativement que qualitativement, sur la répartition de la biomasse microbienne, mais deux sont prépondérants, il s'agit de la teneur en matière organique qui est un des paramètres nécessaires à la vie des microorganismes du sol, et en particulier les micromycètes. Il semble que l'abondance de certaines espèces est liée à des taux élevés de matières organiques et notamment pendant les premières étapes de décomposition (Belaze, 2015). Le pH est aussi l'un des facteurs à prendre en compte parmi ceux qui engendrent une bonne activité biologique des microorganismes du sol et de l'eau. La grande majorité se développe dans une zone de pH de 4,5 – 8,0 et les optima se situent entre 5,5 et 7,5 (Botton et *al.*, 1990).

La croissance des communautés microbiennes est liée à des restrictions très sévères (en particulier la pauvreté en aliments). Les eaux agricoles sont en effet un biotope hétérogène, tant du point de vue physique et chimique, que du point de vue biologique et, selon Skinner (1968), il constituerait non pas un milieu permettant le développement des microorganismes mais uniquement un environnement protecteur autorisant la survie de populations variées (Arpin et *al.*, 1986).

Les champignons et les bactéries isolés à partir des milieux pollués sont des microorganismes acclimatés à la présence du produit phytosanitaire toxique ayant acquis des performances considérables de détoxification et par voie de conséquence, ils deviennent capables de réduire, séquestrer, ou de dégrader ces produits nocifs.

De nombreuses études ont montré les capacités de survie des souches fongiques et bactériennes dans des milieux contaminés par les pesticides (Tixier et *al.*, 2000 ; Mukherjee, 2009 ; Adhikari, 2010 ; Harms et *al.*, 2011 ; Singh et *al.*, 2012). Certains chercheurs ont constaté par ailleurs que le sol contaminé par des pesticides est éventuellement décontaminé par inoculation avec des micro-organismes spécifiquement adaptés (Kamal et *al.*, 2008).

4. Evaluation de la croissance des souches microbiennes sous l'effet des pesticides (Tolérance de la souche vis-à-vis du pesticide)

4.1. Densité optique

En général, une grande fluctuation des valeurs de la Do démontrant ainsi une augmentation de la concentration bactérienne au 5^{ème} jour par rapport au 1^{er} jour.

Aussi bien pour le mancozèbe que pour le méthomyl la densité optique la plus élevée est enregistrée avec *Chryseomonas luteola*; cette élévation de la D.O témoigne d'une bonne croissance sous les différentes conditions testées. *Chryseomonas luteola* arrive également à croître normalement dans le milieu ; une variation régulière dans le temps avec des densités optiques croissantes. La croissance arrive à son maximum au bout de 120 h. La cinétique de la courbe de croissance de la population mixte traduit également une bonne croissance avec des densités optiques se rapprochant de celles de *Chryseomonas luteola*. Les autres souches bactériennes affichent des courbes de croissance à allures très similaires avec des densités optiques moins importantes.

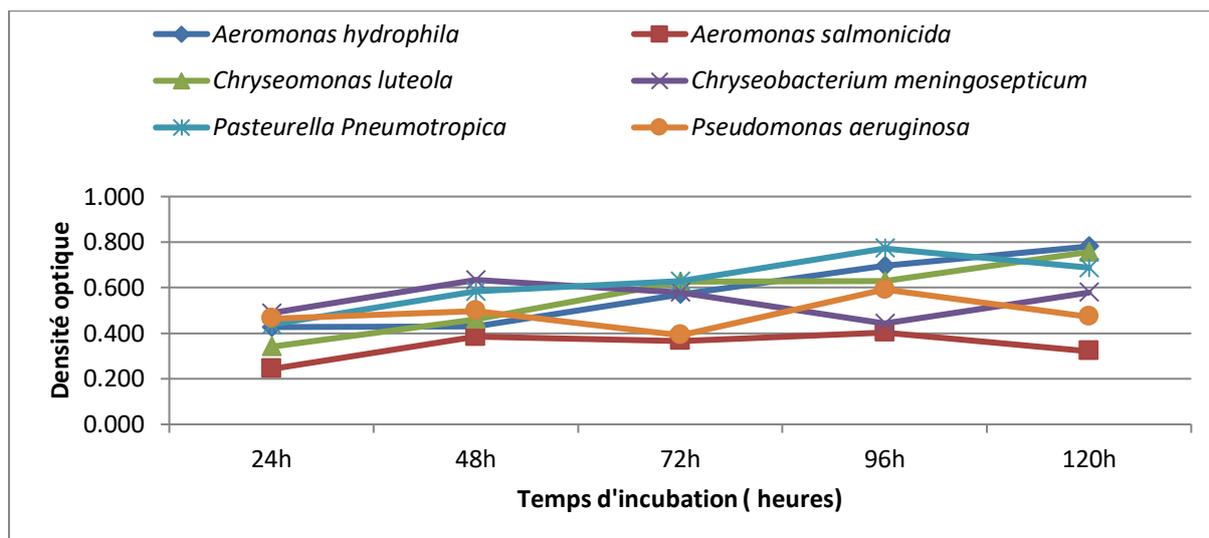


Figure 28. Densité optique des souches bactériennes en absence du pesticide

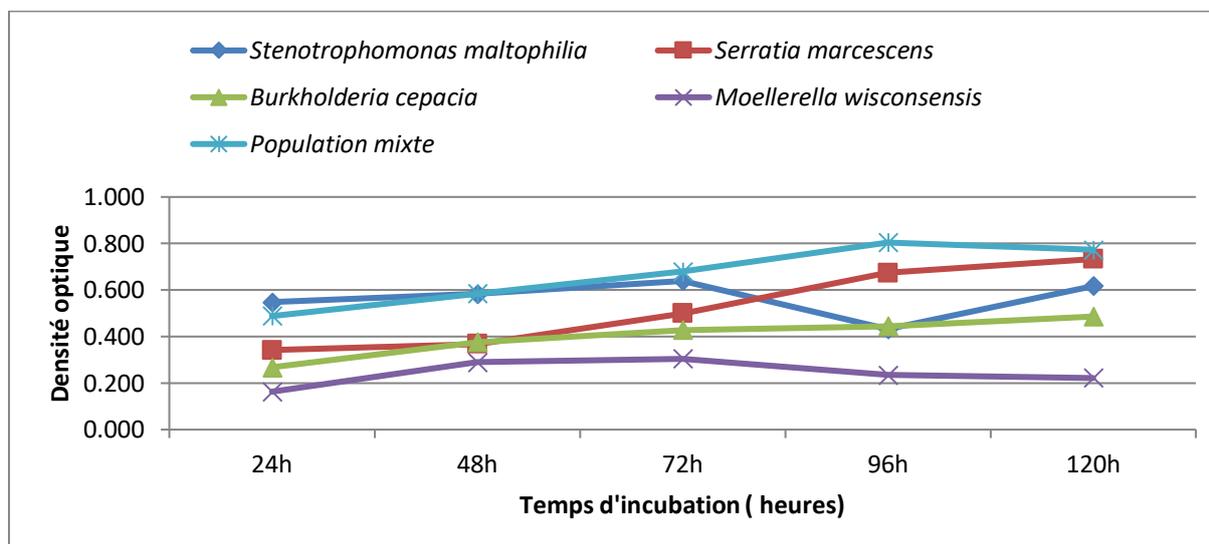


Figure 29. Densité optique des souches bactériennes en absence du pesticide

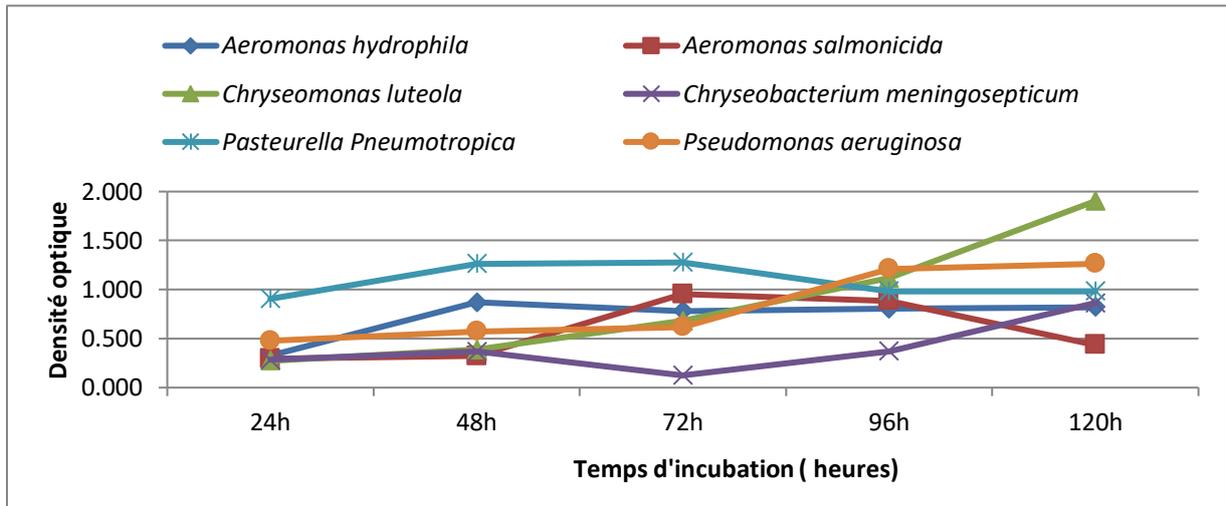


Figure 30. Densité optique des souches bactériennes en présence de mancozèbe

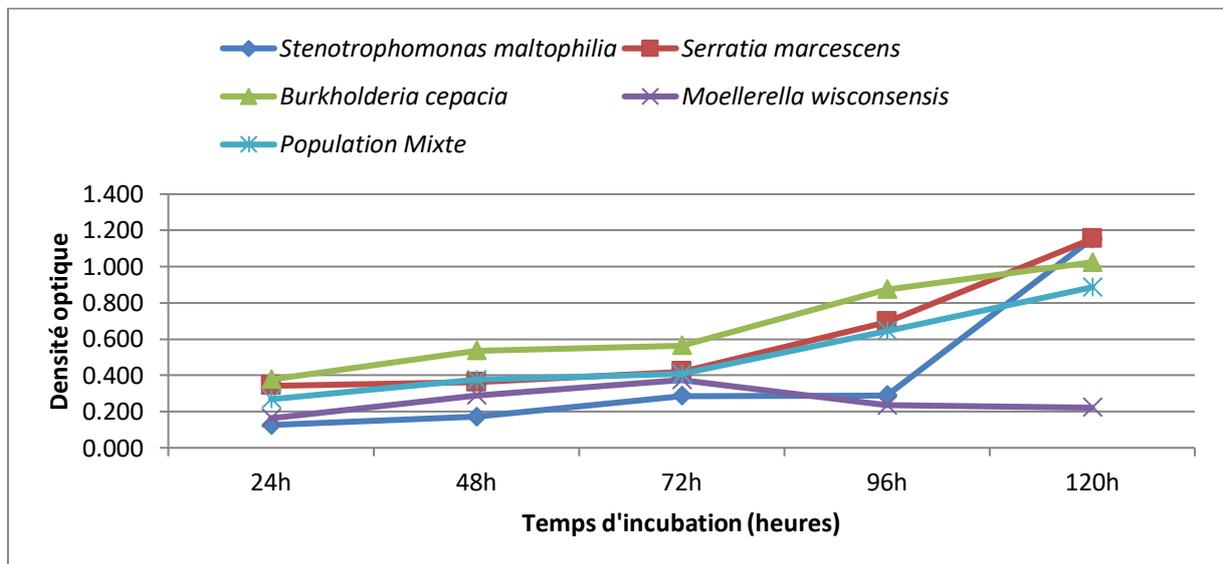


Figure 31. Densité optique des souches bactériennes en présence de mancozèbe

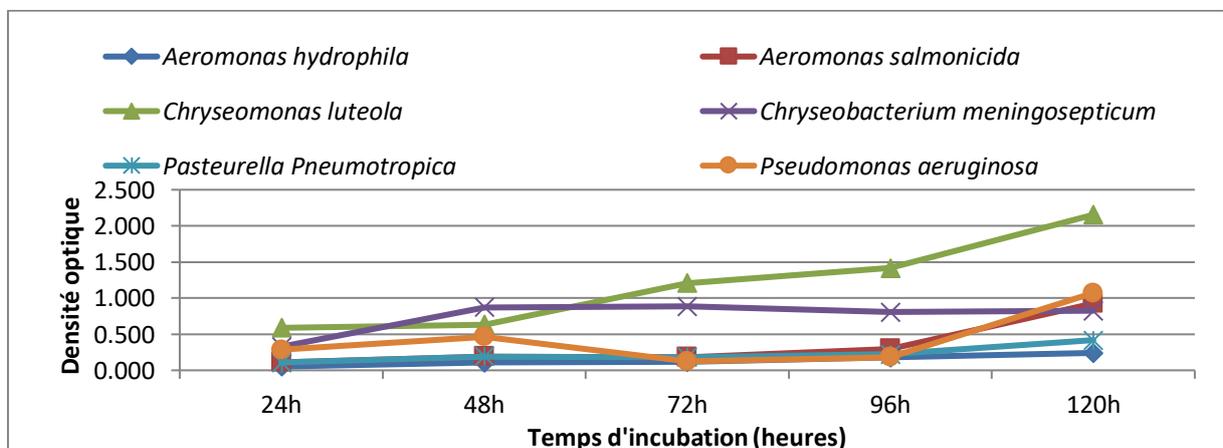


Figure 32. Densité optique des souches bactériennes en présence de méthomyl

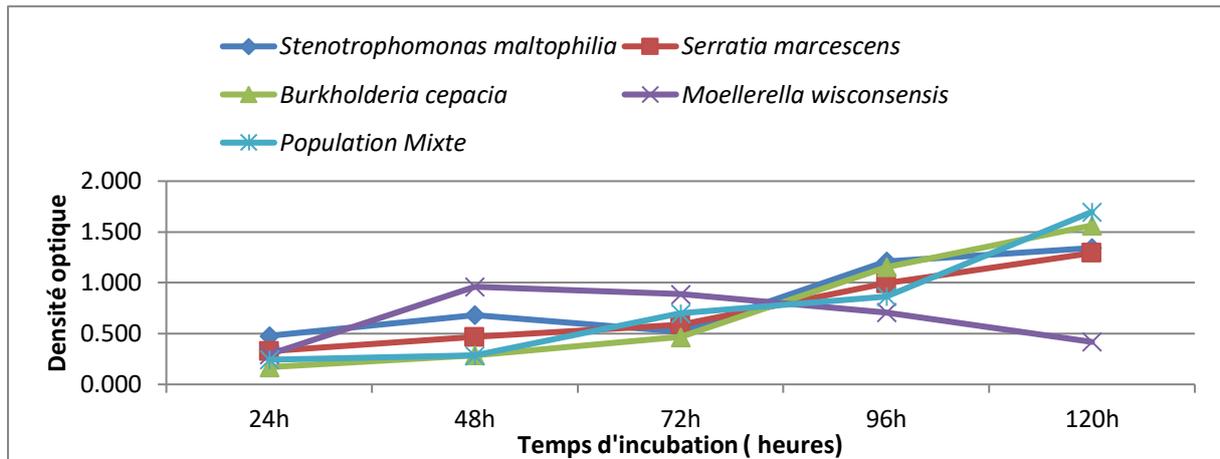


Figure 33. Densité optique des souches bactériennes en présence de méthomyl

4.2. p H

Les résultats présentés dans les figures (33, 34, 35, 36) montrent que l'ensemble des souches bactériennes entraînent une acidification du milieu et ce, pour les deux molécules de pesticides. Les valeurs indiquent une baisse de pH pour tous les échantillons. En présence de mancozebe la valeur la plus faible du p H est enregistré chez *Chryseomonas luteola* 3,06. Un pH de 3,7 est obtenu au niveau du milieu inoculé avec *Aeromonas hydrophila* contenant le méthomyl.

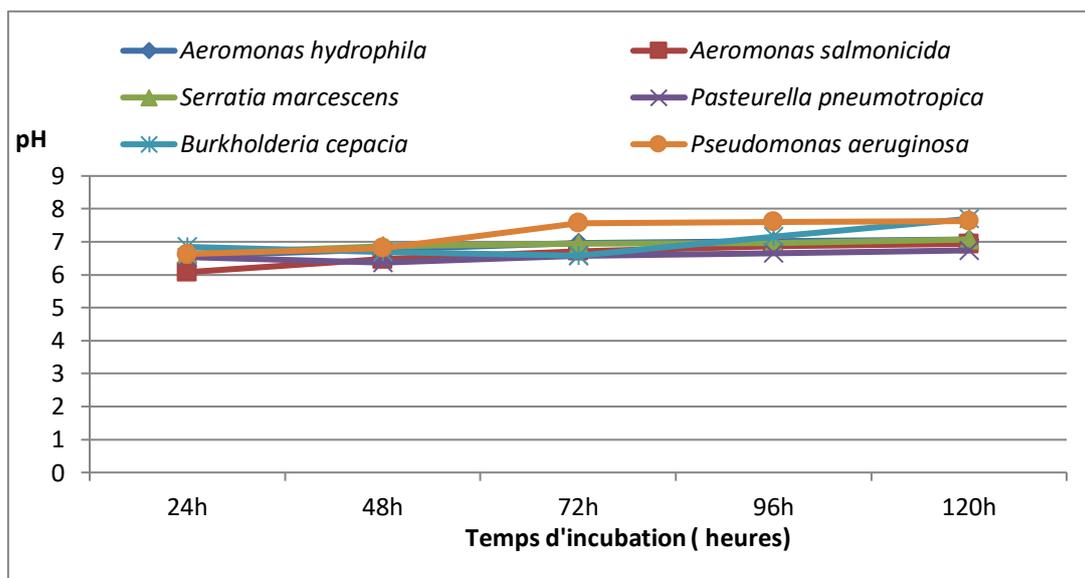


Figure 34. pH des cultures en présence des souches bactériennes et en absence du pesticide

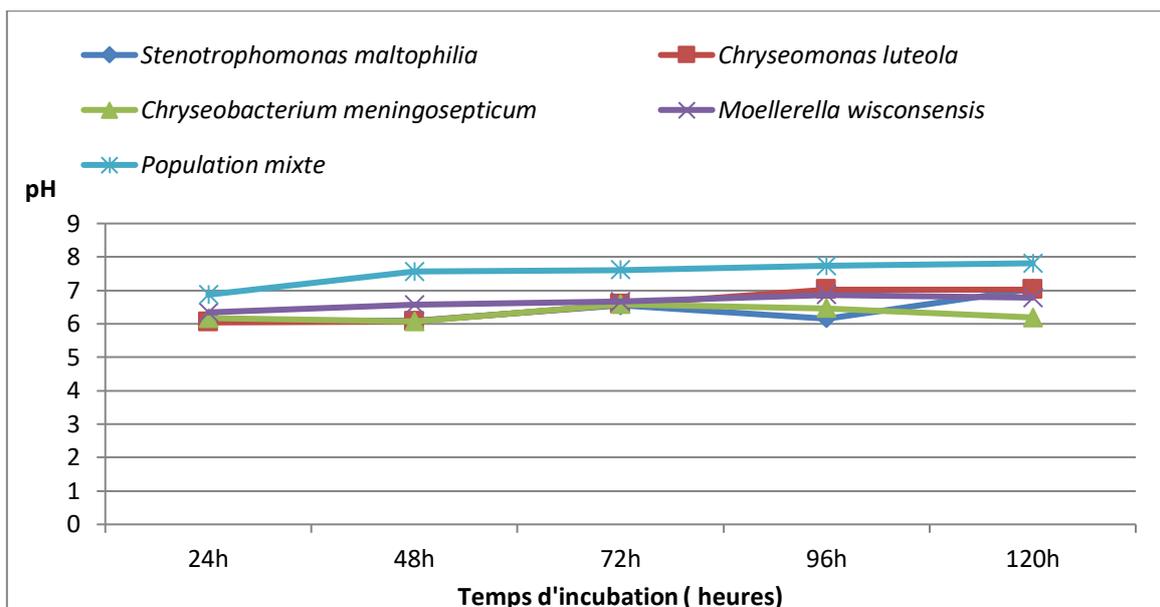


Figure 35. pH des cultures en présence des souches bactériennes et en absence du pesticide

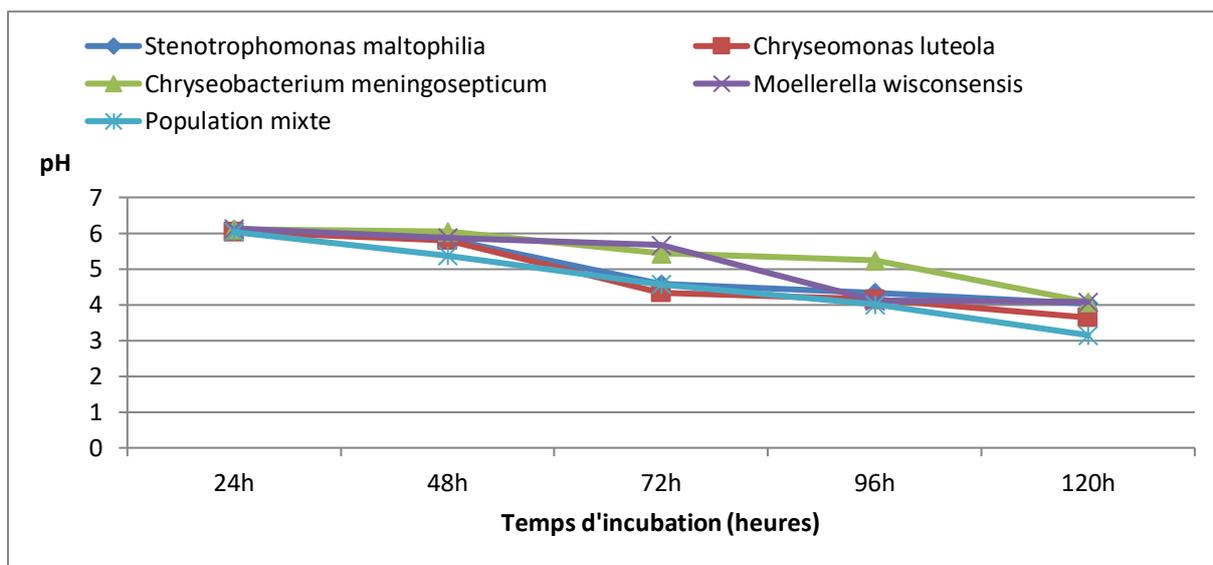


Figure 36. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du mancozèbe

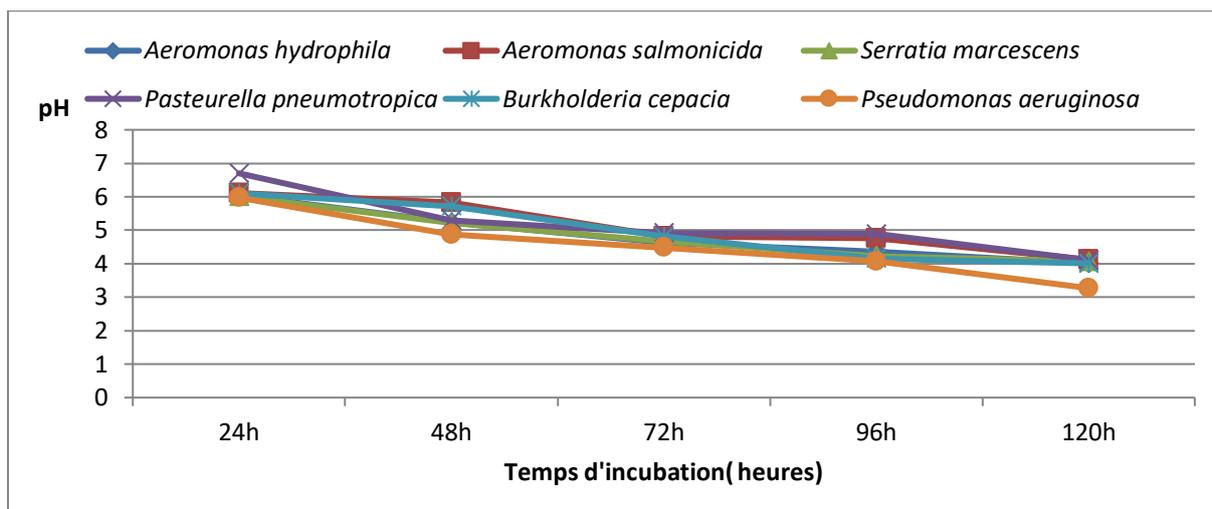


Figure 37. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du mancozèbe

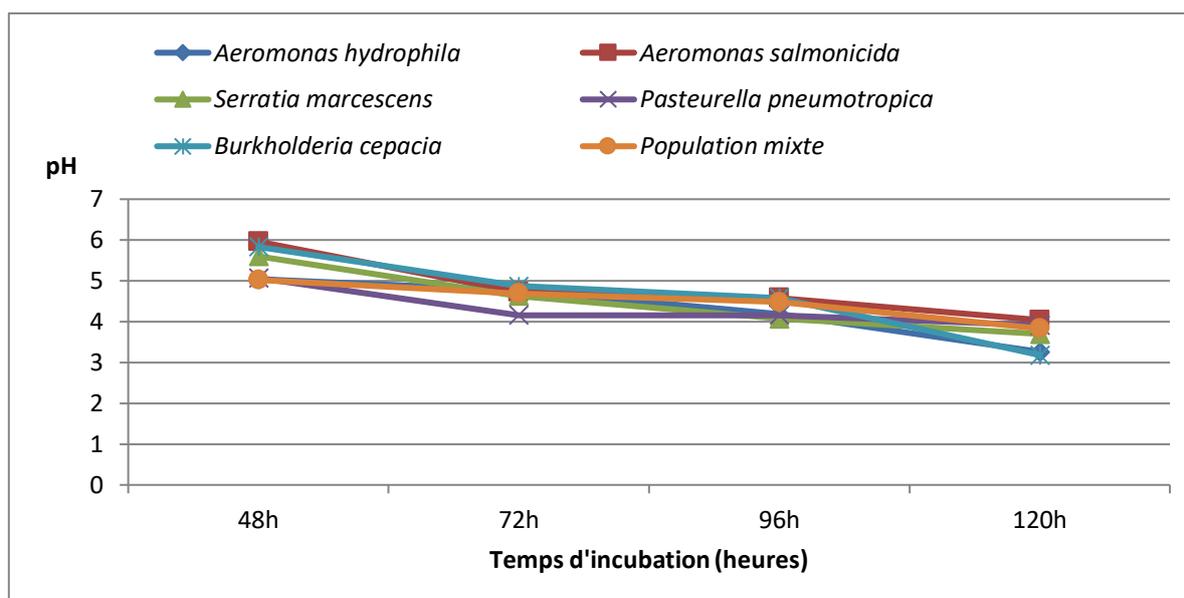


Figure 38. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du méthomyl

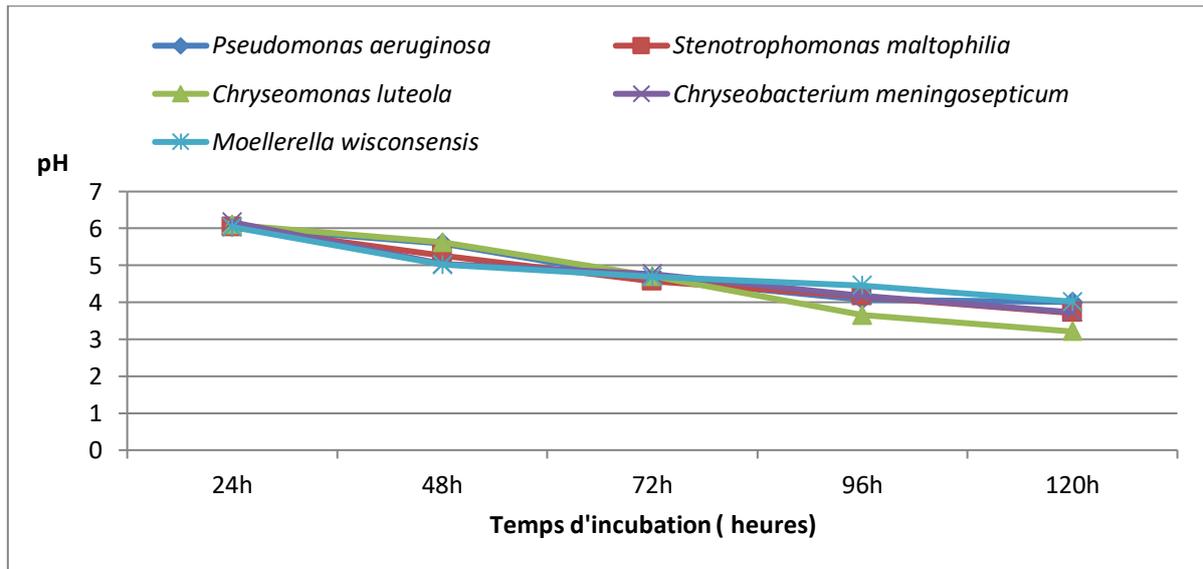


Figure 39. pH des cultures en présence des souches bactériennes et du méthomyl

4.3. Taux d'oxygène

La teneur en oxygène (DCO) calculée correspond à l'oxygène nécessaire pour oxyder les composés organiques restants dans le milieu. Plus la valeur est basse plus la quantité restante de ces composés n'ayant pas subi de dégradation est élevée. Après 5 jours d'incubation, on note une oxydation non négligeable des matières organiques présentes. La teneur en oxygène détectées dans les milieux de culture supplémentés de mancozèbe ou de méthomyl et inoculés avec la souche *Chryseomonas luteola* inférieure à celle des autres souches. Une diminution progressive des concentrations en fonction du temps dont le taux le plus bas est atteinte à 120 h. Les concentrations d'oxygène détecté après 120 h converties en pourcentage nous indiquent plus clairement les taux de pesticides dégradés et les pourcentages des résidus restant dans le milieu. Des valeurs plus élevées ont été décelées en présence des autres souches et de la population mixte.

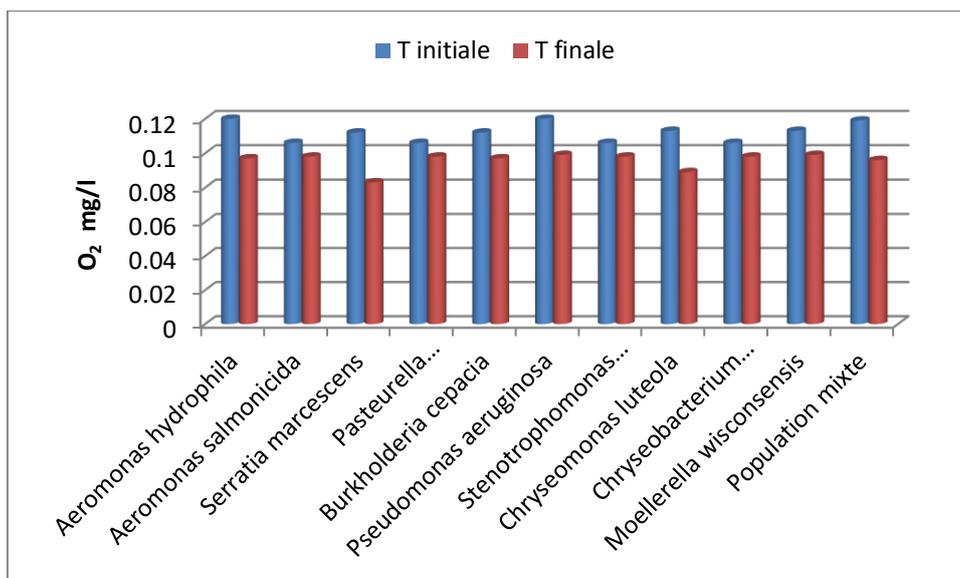


Figure 40. Taux d'oxygène du milieu en présence des souches bactériennes en absence du pesticide.

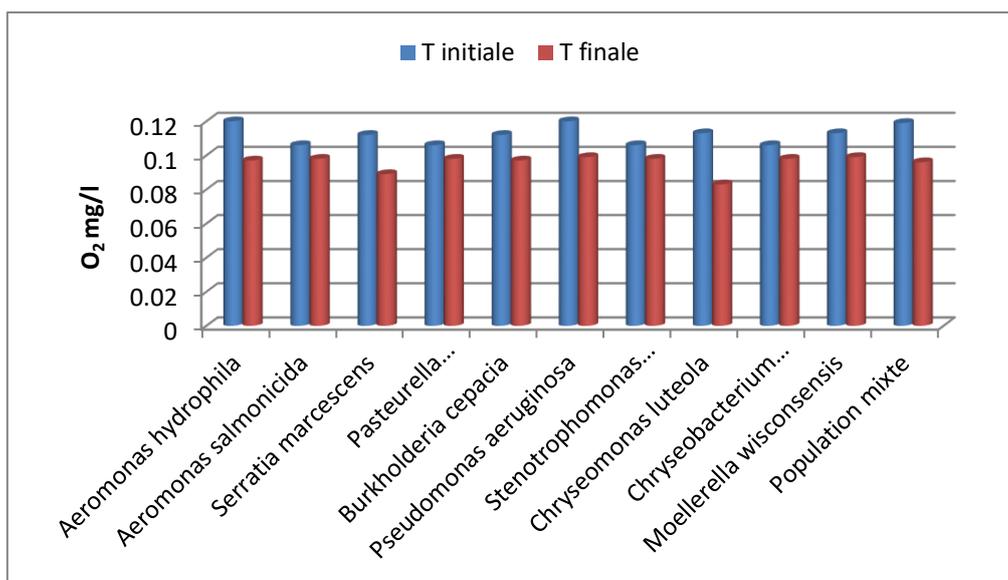


Figure 41. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches bactériennes en présence du mancozèbe

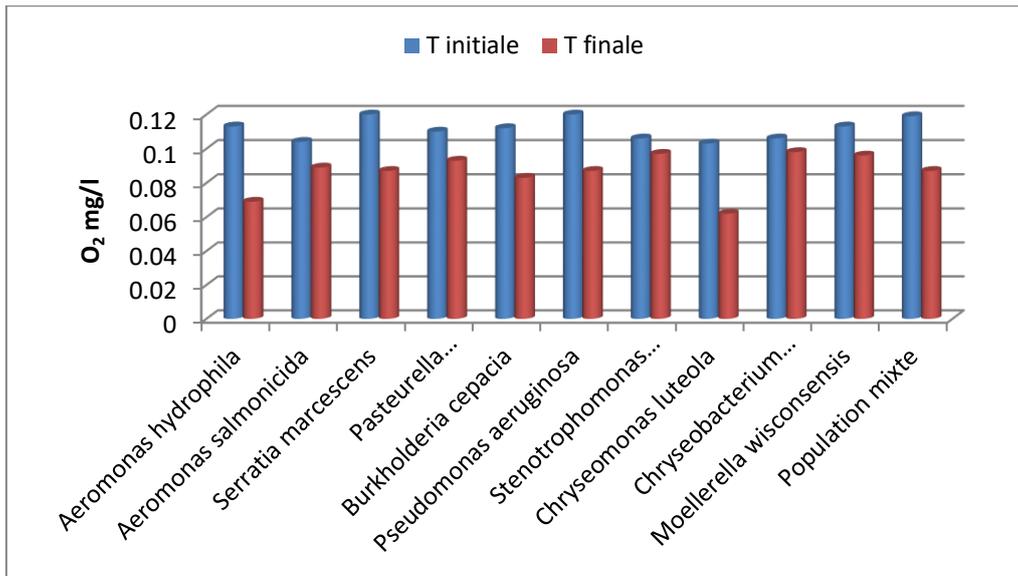


Figure 42. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches bactériennes en présence du méthomyl

4.4. Poids sec de l'inoculum

Les figures (43, 44) révèlent qu'après 120 h d'incubation en présence de chacune des deux molécules de pesticide. Dans tous les cas, le poids sec de l'inoculum bactérien obtenu à partir des cultures contenant le pesticide est nettement supérieur par rapport à celui enregistré à partir des cultures sans pesticides. Les souches testées s'avèrent tolérantes à la présence de pesticide et montrent une affinité vis-à-vis de ces deux composés. Ces derniers constituent une source de carbone assurant un bon développement pour l'ensemble des souches bactériennes. Avec le mancozèbe La biomasse bactérienne la plus élevée (331 mg) est celle de *Chryseomonas luteola* suivis par *Aeromonas hydrophila* (302 mg). Quant au poids de l'inoculum le plus faible (131 mg) est celui de *Moellerella wisconsensis* (168 mg). Alors qu'avec le méthomyl, la biomasse bactérienne la plus élevée (379 mg) est celle de *Chryseomonas luteola*, suivi par la population mixte (364), tandis que le plus faible (187 mg) est celui de *Moellerella wisconsensis*.

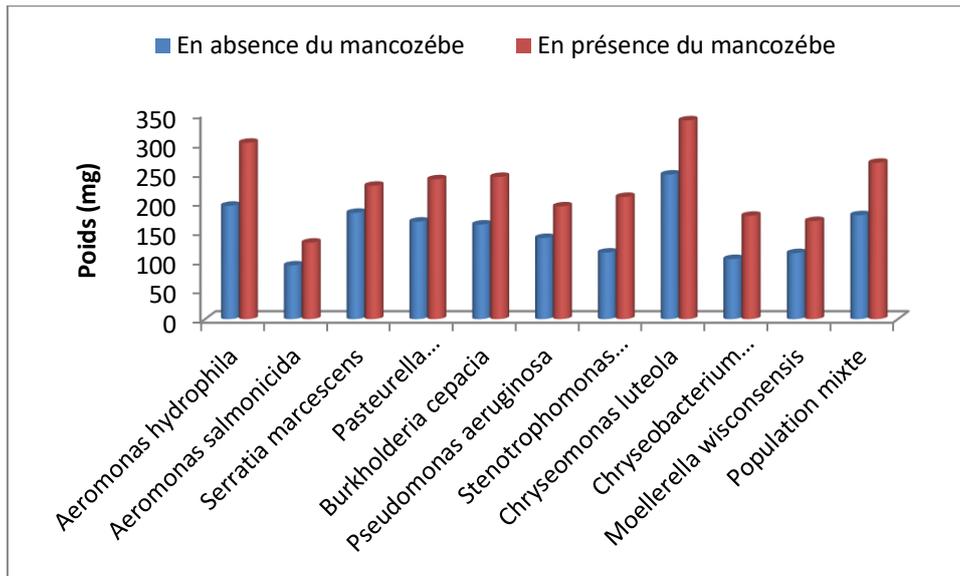


Figure 43. Poids sec de l'inoculum bactérien en absence et en présence du mancozèbe

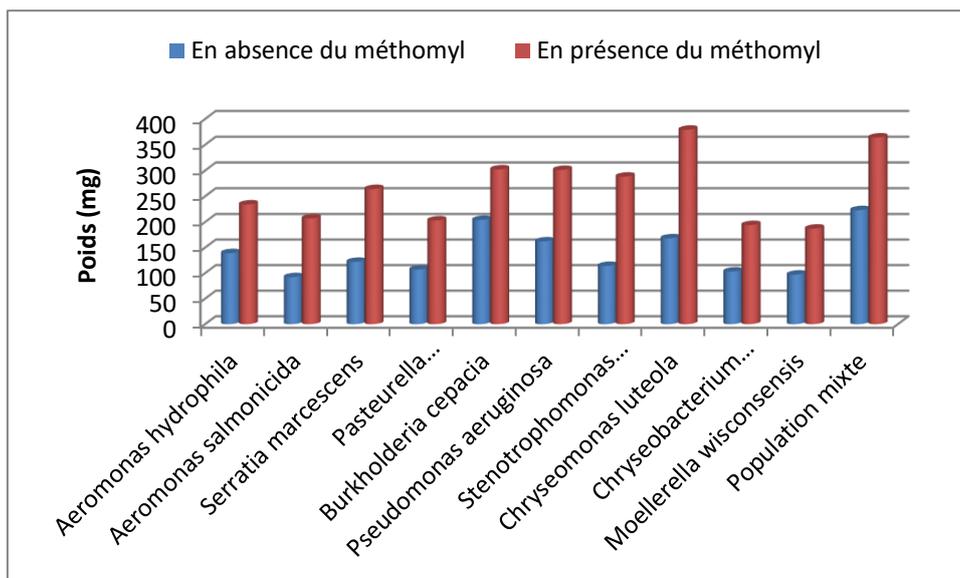


Figure 44. Poids sec de l'inoculum bactérien en absence et en présence du méthomyl

Les courbes de croissance des souches fongiques figures (47, 48, 49, 50), obtenues en présence du pesticides ont une allure proche de celles des courbe de croissance en absence de pesticides figures (45, 46); ce qui indique une bonne tolérance de toutes les souches pour la molécule testée.

Les densités optiques calculés à partir des milieux contenant les champignons sont hétérogènes. Elles sont situées dans un intervalle de 0,28 - 2,29 pour les souches individuelles incubées, et 0,61 - 0,35

pour le consortium en présence du mancozèbe. Les chiffres sont compris entre 0,09 et 1,80 pour les souches testées séparément et situées dans un intervalle de 0,57 -0,97 en présence du méthomyl. La L'espèce *Aspergillus niger* semble meilleur avec un développement important pour le méthomyl tandis que pour le mancozèbe, c'est l'espèce *Penicillium citreonigrum* qui semble l'emporter.

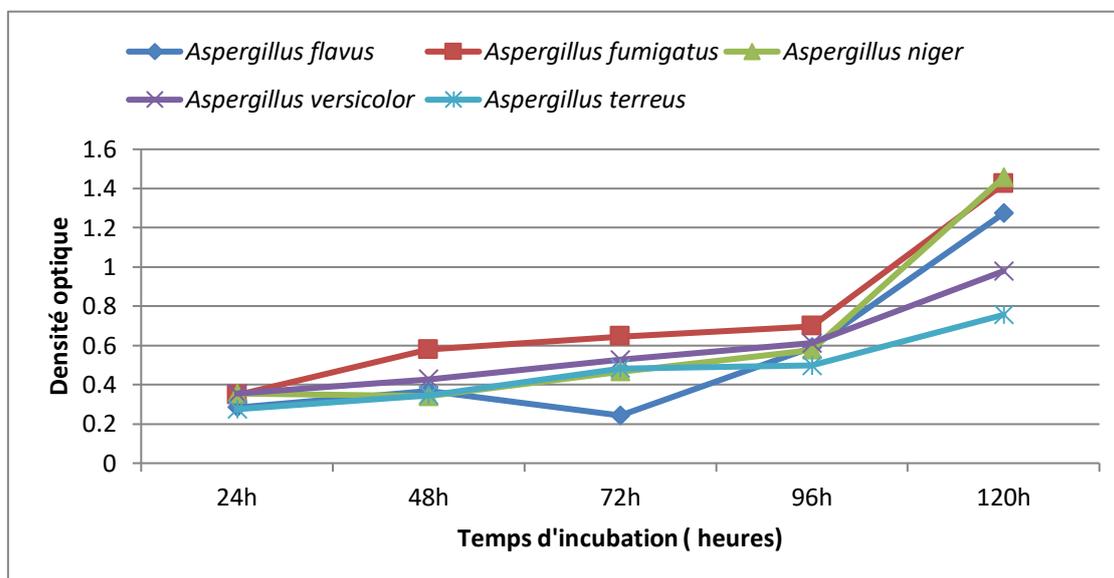


Figure45. Densité optique des souches fongiques en absence du pesticide

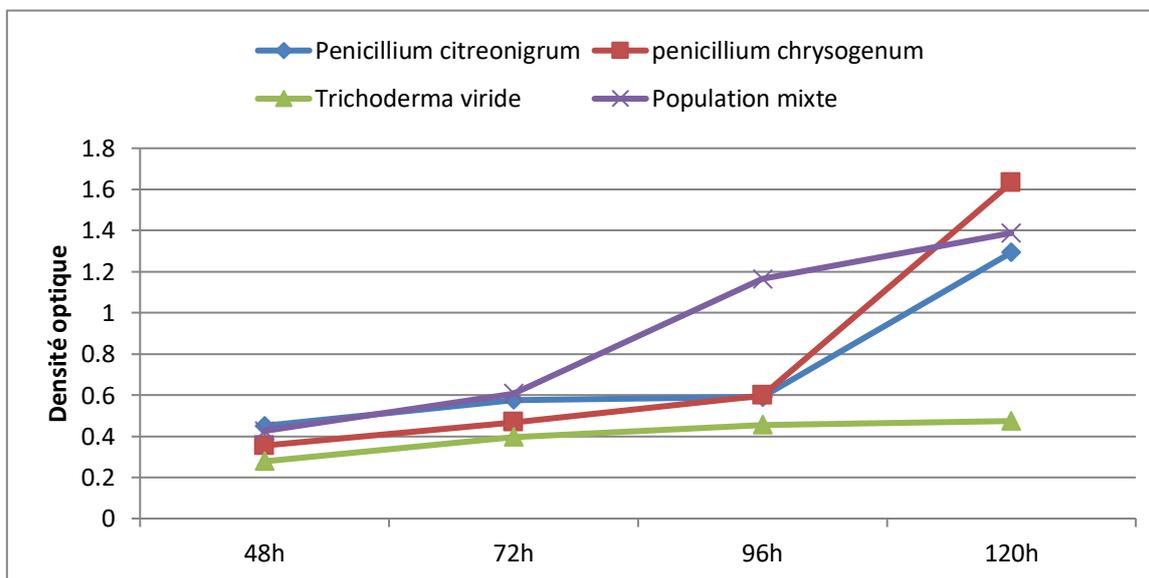


Figure46. Densité optique des souches fongiques en absence du pesticide

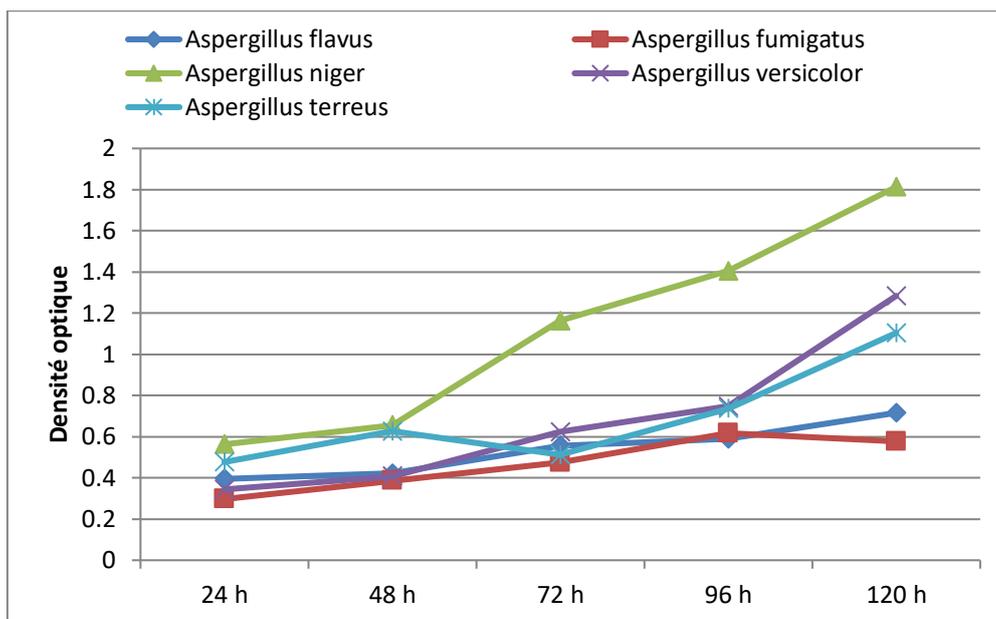


Figure 47. Densité optique des souches fongiques en présence de mancozèbe

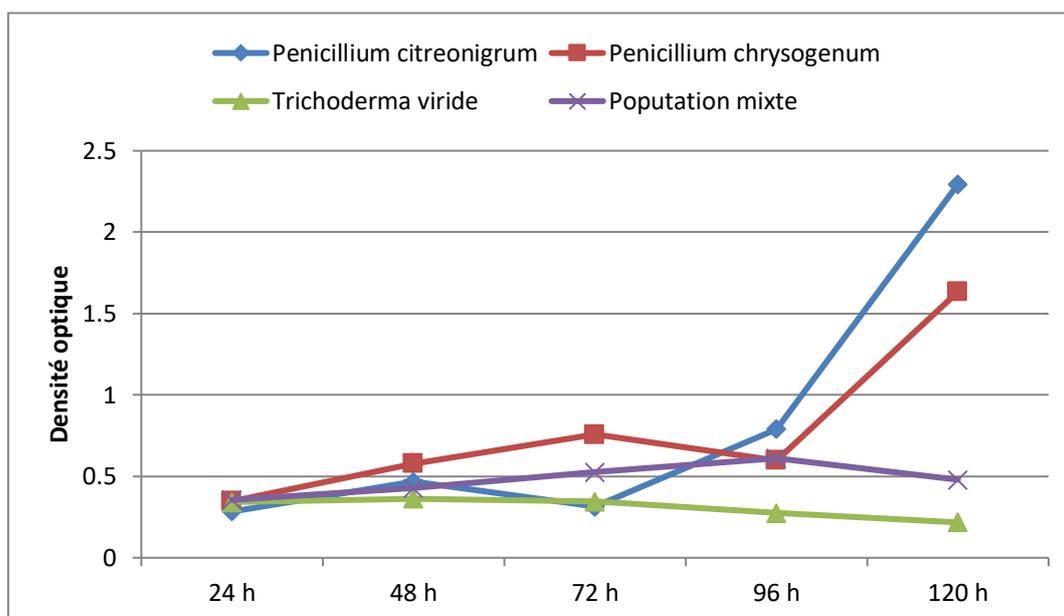


Figure 48. Densité optique des souches fongiques en présence de mancozèbe

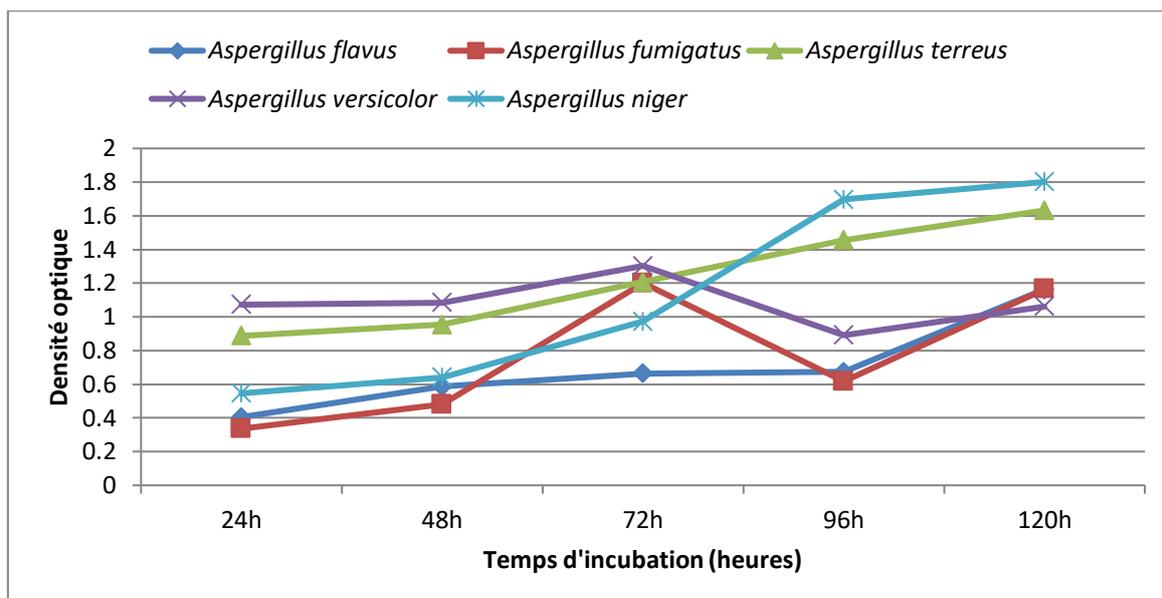


Figure 49. Densité optique des souches fongiques en présence du méthomyl

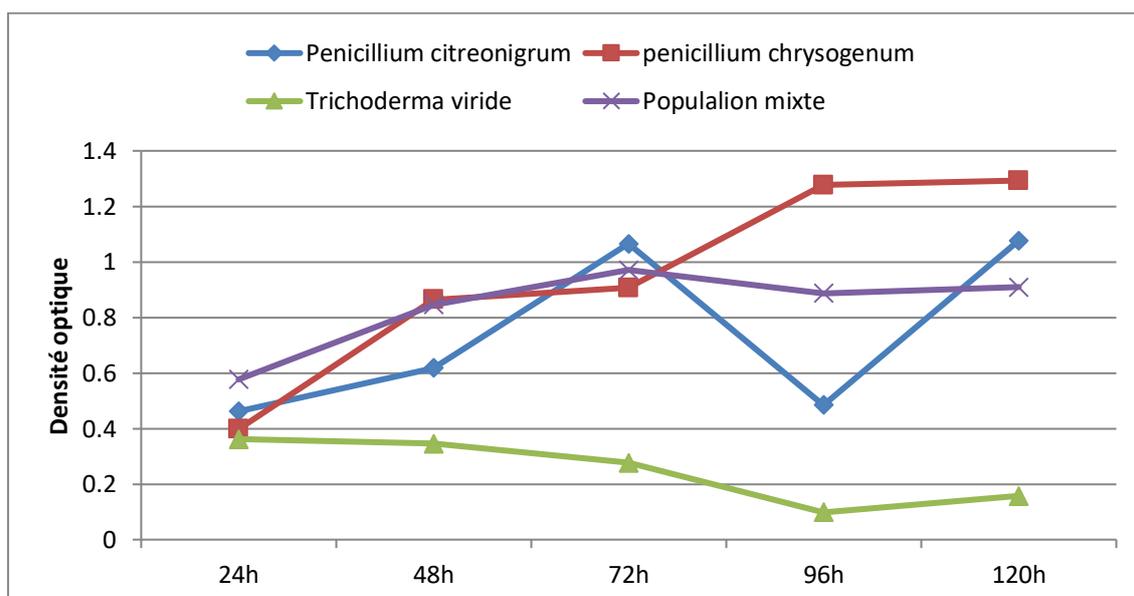


Figure 50. Densité optique des souches fongiques en présence du méthomyl

Dans le milieu de culture, le pesticide est la seule source de carbone et d'énergie. Une bonne croissance a été observée, accompagnée d'une acidification du milieu ; traduisant ainsi une activité fongique par utilisation du mancozèbe et du méthomyl. Les valeurs des pH des milieux de culture des différents champignons additionnés de mancozèbe ont une tendance très acide. Ils oscillent tous entre 4,07 et 1,09 pour les souches individuelles et

3,71 et 2,01 pour la population mixte. Pour ceux additionnés de méthomyl, les valeurs oscillent entre 3,97 et 1,21 pour les souches individuelles et entre 3,67 à 1,23 pour le consortium. L'augmentation de la biomasse qui est accompagnée par une diminution de pH est conforme à la présence d'une activité microbienne.

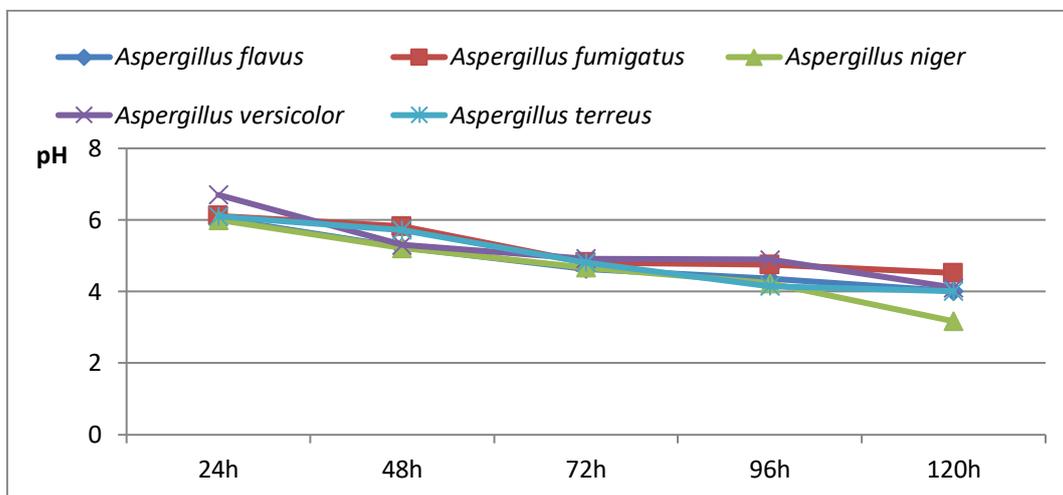


Figure 51. Evaluation du pH des souches fongiques en absence du pesticide

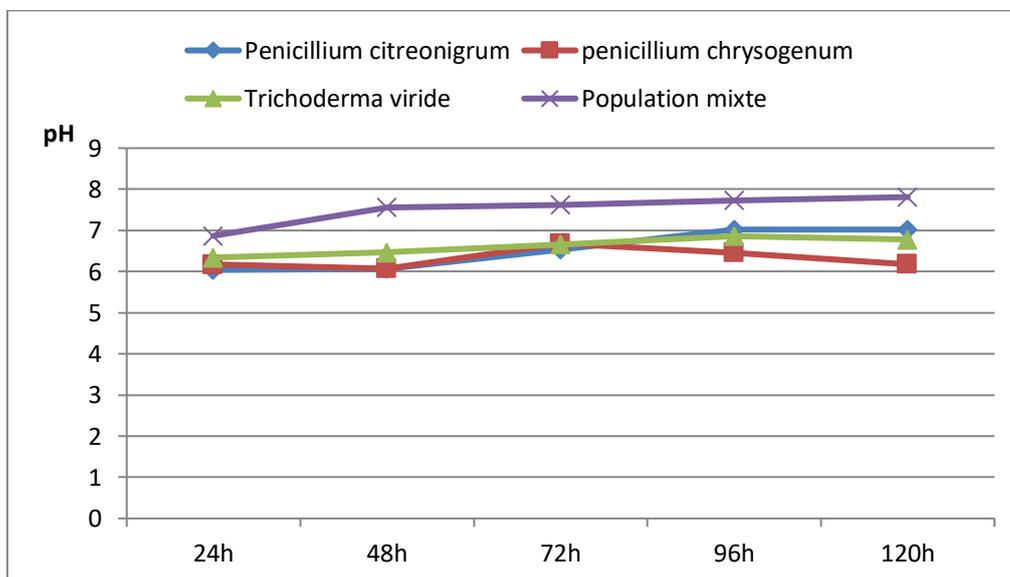


Figure 52. Evaluation du pH des souches fongiques en absence du pesticide

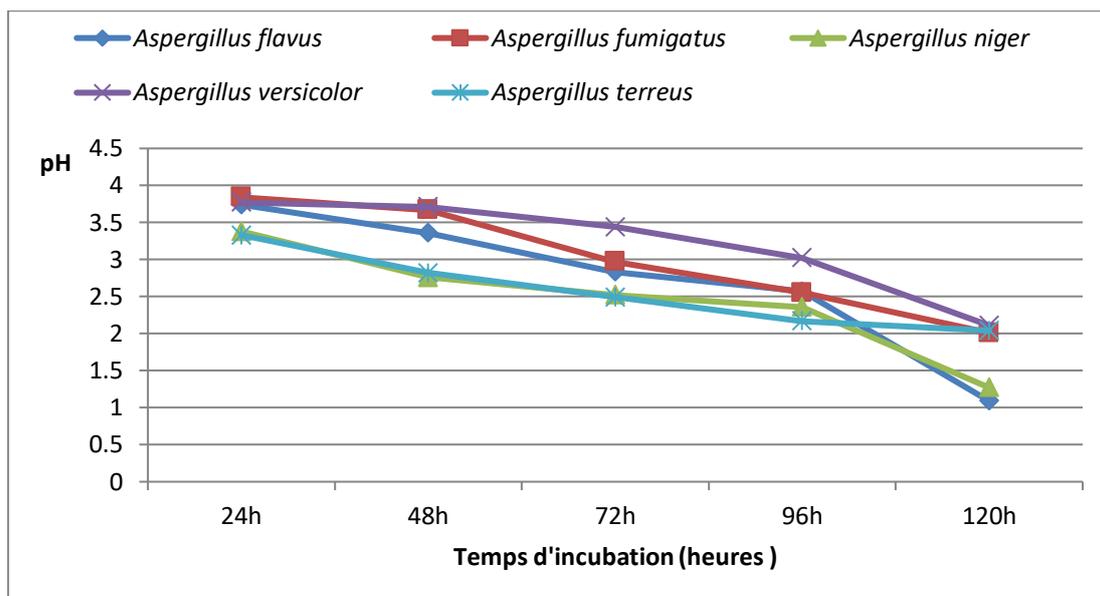


Figure53. Evaluation du pH des souches fongiques en présence du mancozèbe

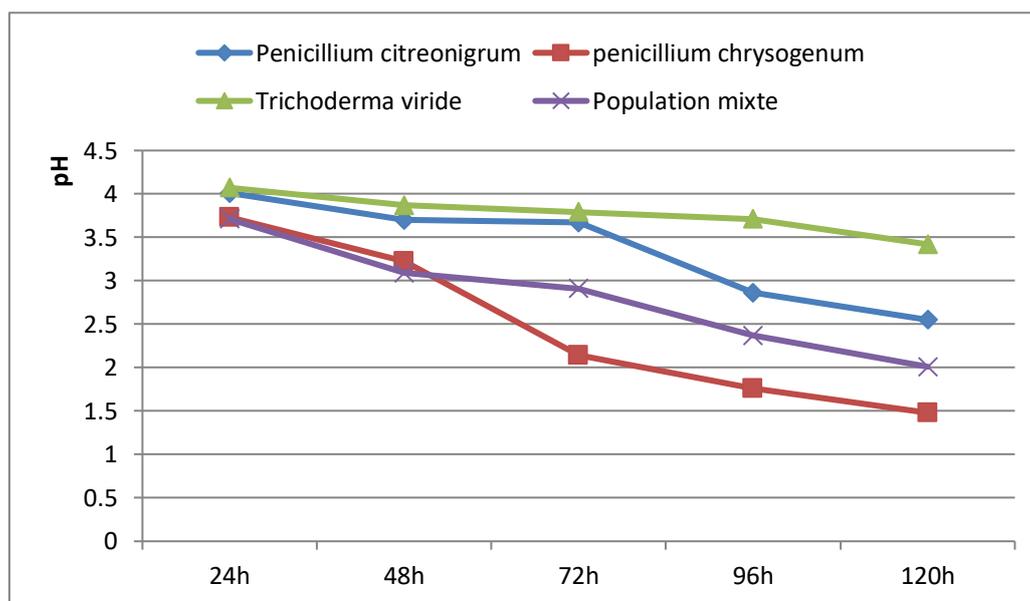


Figure54. Evaluation du pH des souches fongiques en présence du mancozèbe

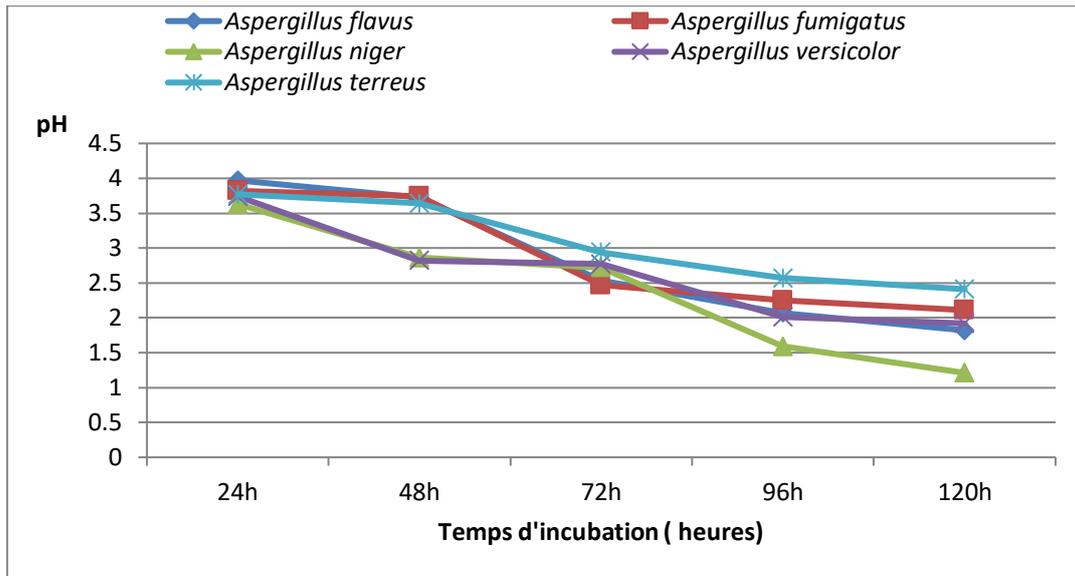


Figure 55. Evaluation de p H des souches fongiques en présence du méthomyl

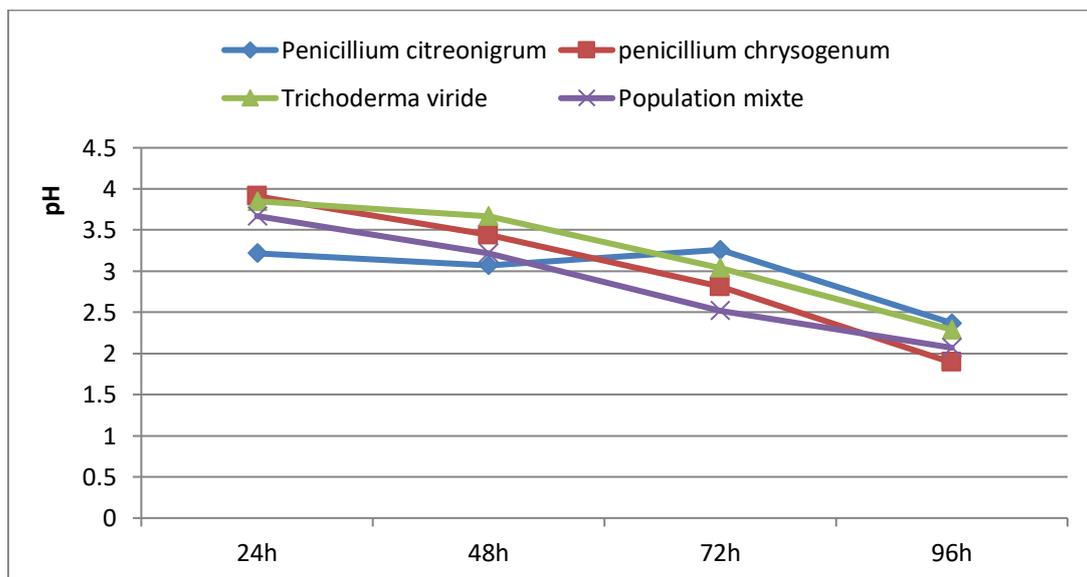


Figure 56. Evaluation de p H des souches fongiques en présence du méthomyl

Après 5 jours d'incubation, on note une oxydation importante des matières organiques présente figures (57, 58, 59). Pour ce qui est des souches pures individuelles, les teneurs enregistrées dans les milieux de culture contenant le mancozèbe et inoculés avec la souche *Aspergillus niger* est inférieure à celle des autres souches. Les taux d'oxygène affichent une diminution progressive des concentrations en fonction du temps dont le taux le plus bas est atteint à 120 h. Les résultats obtenus indiquent que les molécules ont été oxydées et transformées après un temps d'incubation de 120 heures. Des valeurs plus élevées ont été décelées en présence des autres souches et de la population mixte.

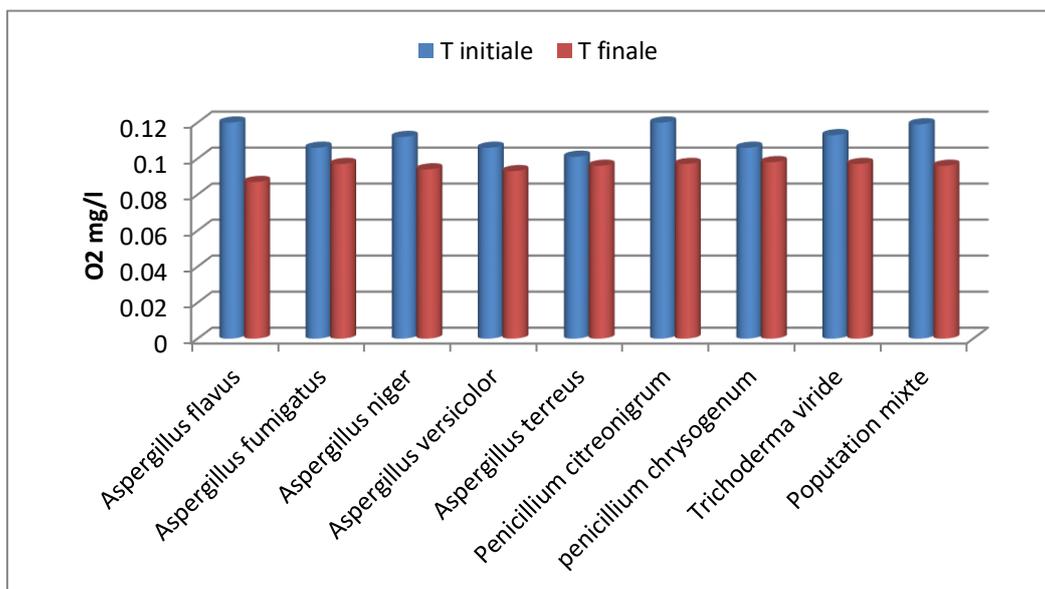


Figure 57. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches fongiques en absence du pesticide

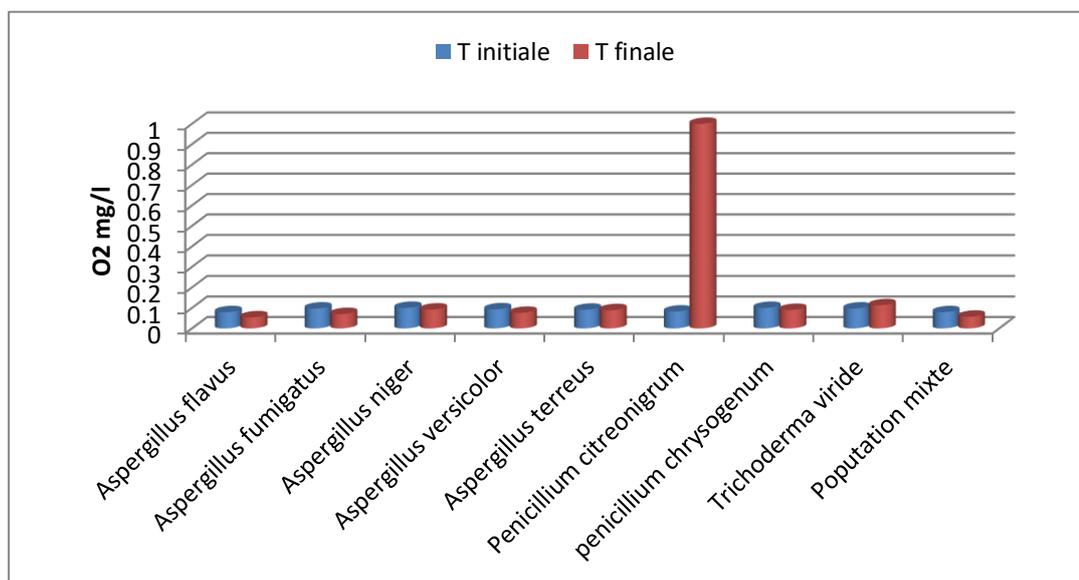


Figure 58. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches fongiques en présence du mancozèbe

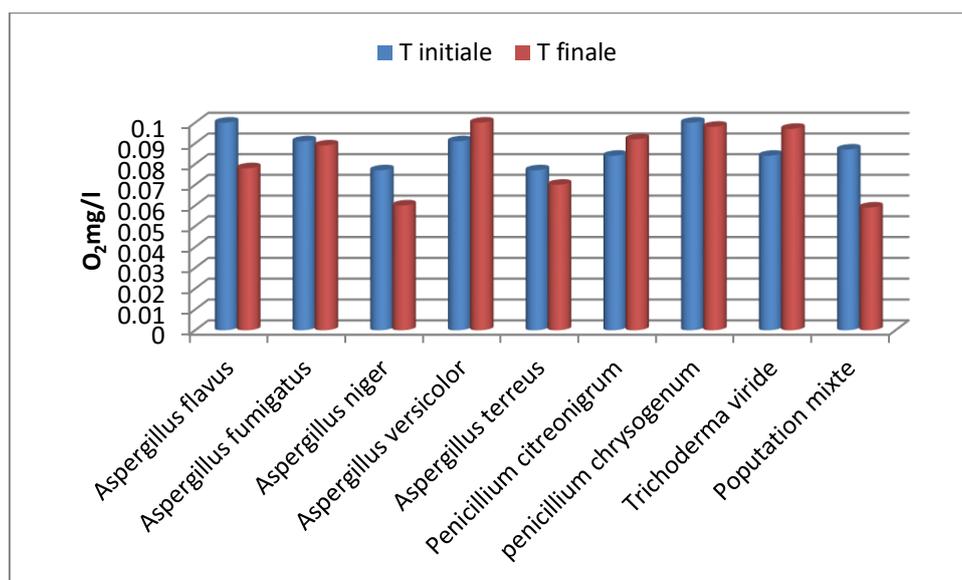


Figure 59. Taux d'oxygène du milieu contenant les souches fongiques en présence du méthomyl

Les résultats présentés dans les figures (60, 61) montrent que le poids sec de l'ensemble des souches fongiques est à son tour plus important en présence de pesticides qu'en son absence. La biomasse fongique semble tolérer la présence des deux molécules utilisées et le maximum de poids est enregistré par la population fongique (478 mg) en présence du mancozèbe. Pour le methomyl *Aspergillus niger* marqué 477 mg.

Le poids de l'inoculum le plus faible (199 mg) pour le mancozebe est celui *Penicillium citreonigrum* et pour le methometyl est celui *Trichoderma viride*(202mg).

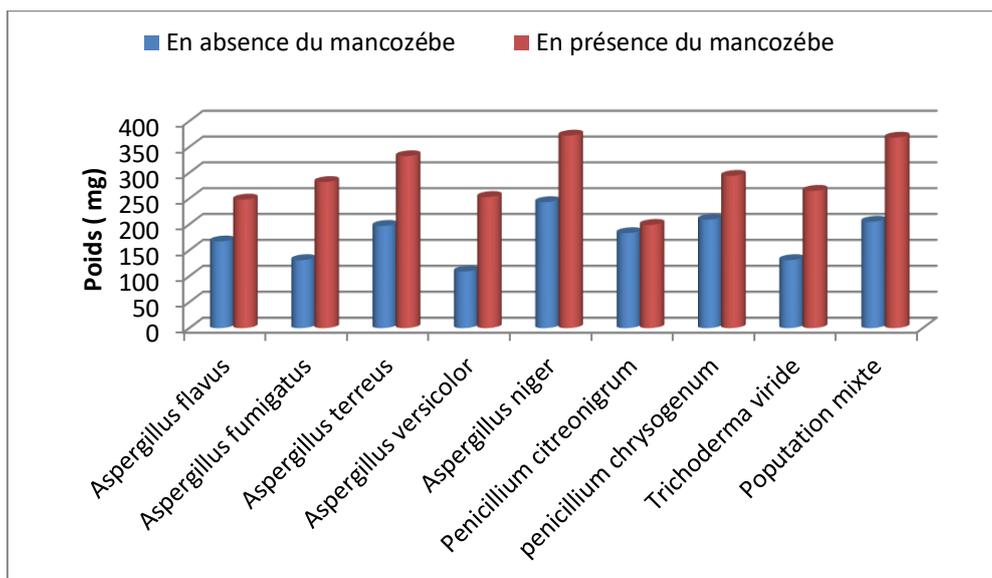


Figure 60. Poids sec de l'inoculum fongique en absence et en présence du mancozèbe

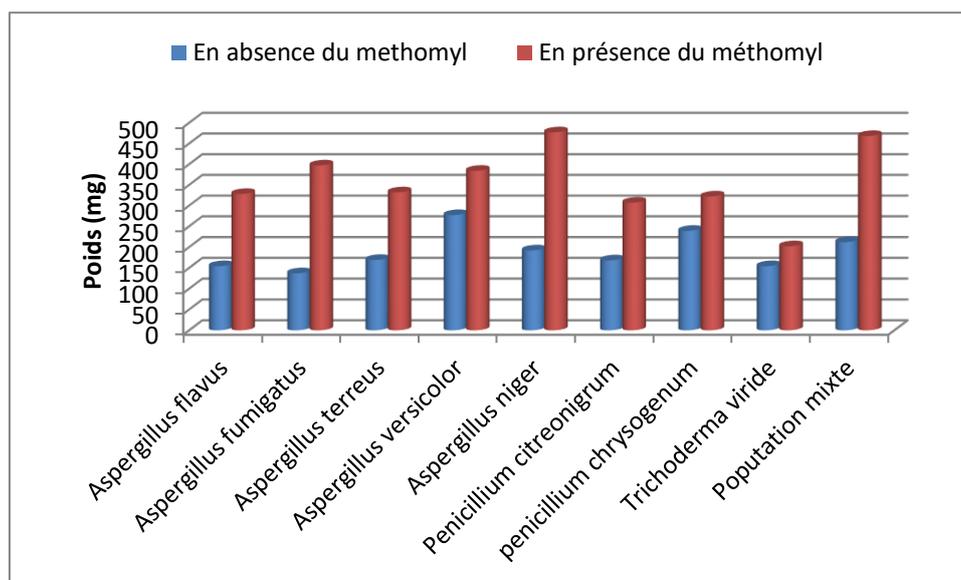


Figure 61. Poids sec de l'inoculum fongique en absence et en présence du méthomyl

Employés à doses modérées, les pesticides n'affectent pas trop la croissance de la microflore. Cependant, lorsqu'ils sont utilisés à de doses dépassant les normes admissibles, ils peuvent inhiber la croissance de la plupart des microorganismes, car ils s'accumulent dans les cellules et affectent leur membrane cellulaire (Inoue et Horikoshi, 1989; Sikkema *et al.*, 1995).

Les paramètres de croissance calculés en mode batch discontinue (pH, densité optique, taux d'oxygène du milieu, poids de l'inoculum) montrent qu'il y a un bon développement de la

plupart des souches bactériennes et fongiques avec une biomasse microbienne qui augmente en fonction du temps et ce, en présence du fongicide mancozèbe ajouté au milieu de culture lors de la phase exponentielle. Cette augmentation est plus accentuée pour *Chryseomonas luteola* et *Aspergillus niger*. Cette augmentation du poids de l'inoculum peut s'expliquer par le fait que les espèces en question possèdent une bonne tolérance vis-à-vis du pesticide étudié et peuvent s'adapter aux conditions difficiles des milieux inoculés.

Des pH bas sont relevés après 120 H d'incubation à partir des milieux contaminés par le pesticide etensemencés par les bactéries. Cette baisse de pH est enregistrée notamment avec *Chryseomonas luteola* et *Aspergillus flavus* et la population mixte. L'acidification du milieu peut être engendrée par le processus de la biodégradation, suite aux différentes réactions de biodégradation. Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus par Gillian et al., 2001, Kétif, 2008 qui signalent des modifications de pH du milieu durant le processus de biodégradation des herbicides, fongicides et insecticides par *Aspergillus niger* et *Aspergillus clavatus*.

Si l'on se réfère au poids sec de l'inoculum après 120 heures, on note qu'il existe une parfaite corrélation entre l'augmentation du poids sec et la baisse du pH. Les milieux acides à neutres favorisent la croissance des nombreux microorganismes. Le pH reste un paramètre important pour le développement et le maintien de la biomasse microbienne du milieu.

Il est à noter aussi que les taux d'oxygène calculés sont relativement bas après cinq jours par rapport au taux calculés au début de l'expérimentation (temps:T0). Ceci indique que les souches microbiennes testées sont tolérantes à la présence de pesticide et sont capables de l'oxyder et de le biotransformer. Ceci est vrai notamment pour les souches *Aeromonas hydrophila*, *Chryseomonas luteola* et *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* en présence du méthomyl et pour les souches *Chryseomonas luteola*, *Serratia marcescens* et *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* pour le mancozèbe. En revanche, Les valeurs d'O₂ déterminées à partir des milieuxensemencés par les souches *Stenotrophomonas maltophilia* et *Aspergillus versicolor* en présence de méthomyl ; *Moellerella wisconsensis* et *Penicillium citreonigrum* en présence du mancozèbe et du méthomyl sont plus importantes. Ces chiffres révèlent la présence de quantités importantes de matières organiques non dégradées dans le milieu après les 120 h d'incubation. Ceci est dû au fait que le consortium bactérien ne soit pas tout à fait capable de biodégrader ou de minéraliser complètement le pesticide du milieu, malgré son développement au cours des premières phases de croissance.

Les potentialités métaboliques des consortiums microbiens ne sont pas meilleures que celles des souches pures. Dans notre cas, la population mixte s'est révélée peu efficace à l'égard des deux molécules. Nos résultats confirment ceux obtenus par Belaze (2015) mesosulfuron-méthyl, l'iodosulfuron-méthyl, propinèbe et cymoxanil et Hassaine (2016) qui montrent la déficience des consortiums microbiens pour les hydrocarbures (kérosène et le pétrole brut). Nos résultats ne concordent cependant pas avec les travaux de Melgarejo et Martínez 1992 ; Gillian et *al.*, 2001 qui affirment que certaines molécules toxiques sont mieux oxydées et parfois minéralisées complètement lorsqu'elles sont mises en contact avec un consortium de souches. Selon ces auteurs, les populations mixtes sont très efficaces et possèdent de hautes potentialités ; elles agissent alors en synergie, détoxifient le produit et le convertissent en composé plus simple et moins toxique que le produit initial. Cette hétérogénéité dans le comportement du consortium des populations microbiennes mixte serait due probablement au temps d'incubation. Au cours de notre expérimentation, les microorganismes sont mises en culture pendant 120 heures uniquement, alors que les taux de biodégradation les plus importants ont été enregistrés à partir des cultures incubées pendant 15 à 30 jours. (Das et *al.*, 1995 ; Melgarejo et Martínez 1992).

Ce type de comportement de la part de ces souches individuelles ou les populations mixtes, pourrait s'expliquer par l'hypothèse du co-métabolisme avancée par (Soula, 1985) qui démontre que certains microorganismes, dégradent un pesticide donné avec accumulation concomitante d'un métabolite. De tels microorganismes ne peuvent donc continuer à se développer que dans la mesure où ils trouvent dans le milieu un autre substrat plus facilement accessible que le pesticide et servant de source de carbone. La deuxième hypothèse est celle avancée par Kilbane et *al.*, 1982 ; Chatterjee et *al.*, 1982 in Belaze (2015) qui précisent que ces microorganismes sont pourvus d'équipements enzymatiques incomplets et par conséquent, ne peuvent pas mener à terme le processus de biodégradation.

5. Evaluation des taux de biodégradation du mancozèbe par CPG

Les pourcentages de la biodégradation du mancozèbe par les souches bactériennes et fongiques sont indiqués par les figures (62, 63). Le taux de biodégradation varie entre 16% et 56,36% pour les bactéries et 10% ; et 54,03% Pour les champignons.

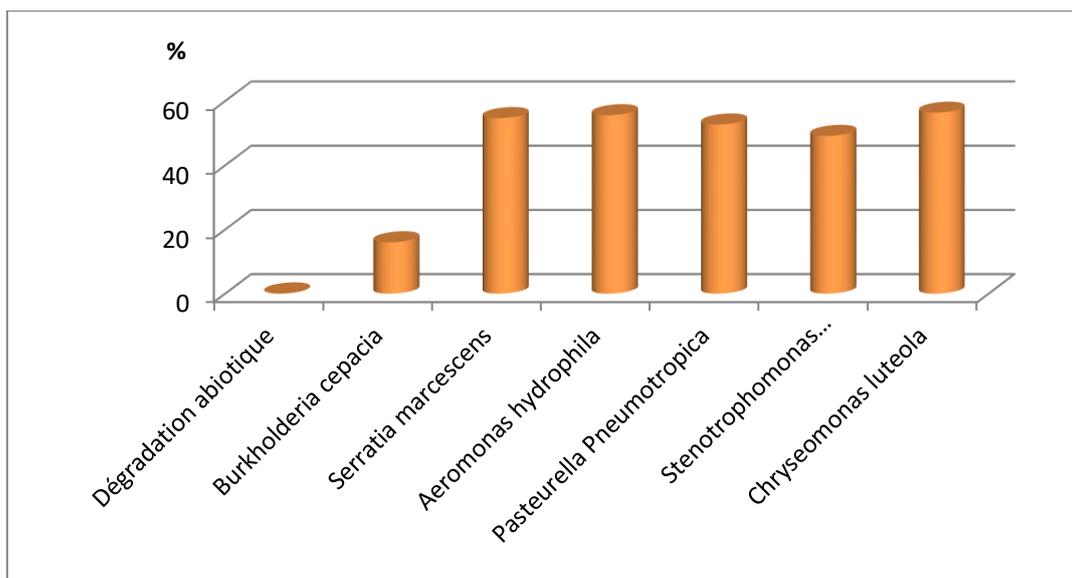


Figure 62. Pourcentage de biodégradation du mancozèbe par les souches bactériennes

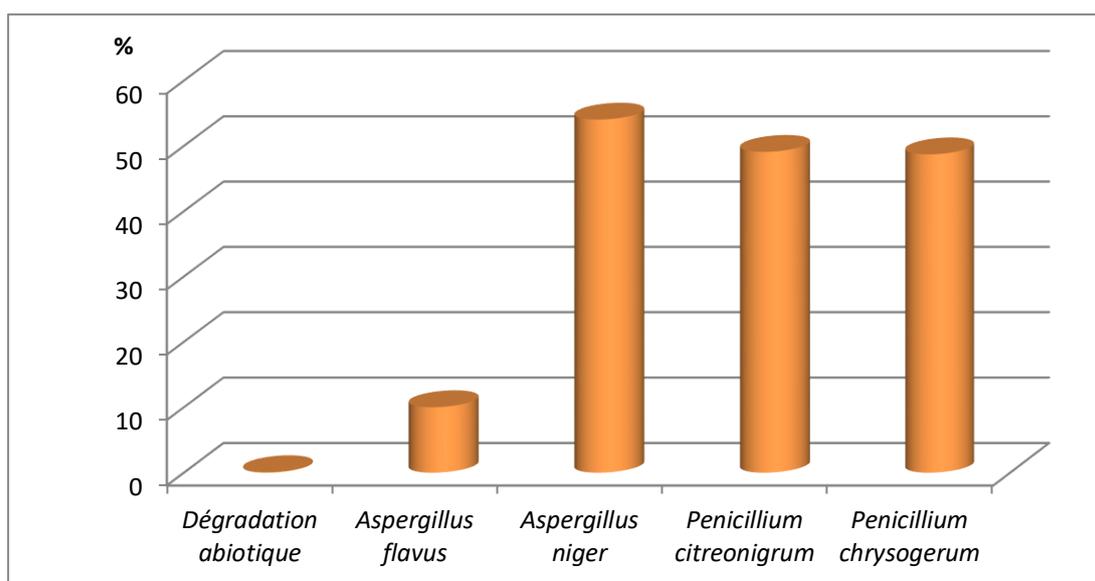


Figure 63. Pourcentage de biodégradation du mancozèbe par les souches fongiques

Les profils des chromatogrammes de la biodégradation du fongicide, le mancozèbe par les bactéries (64, 65, 66, 67, 68, 69) font apparaitre des pics majeurs (pics1, 2, 4, 5) et mineur (pic3) constituant des métabolites secondaires issus de la biodégradation. Les mêmes métabolites secondaires issus de la biodégradation du mancozèbe avec les mêmes temps de rétention de 10min5sec, 10min 9sec, 14min5sec, 14min8sec, 14min2sec pour les souches *chryseomonas*, *Pasteurella pneumotropicae*, *Aeromonas hydrophila*. Aussi, les mêmes métabolites secondaires représentés par des pics mineurs avec les mêmes temps de rétention

(10min7sec, 10min9sec, 14min1sec, 14min6sec, 15min) sont issus de la biodégradation du mancozèbe par *Serratia marcescens* et *Burkholdeia cepacia*.

Pour ce qui est de la biodégradation des champignons, les résultats sont présentés dans les figure 67 à 70, l'espèce *Aspergillus niger* semble la meilleure avec un taux de biodégradation important (54,03%), 4pics majeurs (pic 1, pic2, pic4, pic5) représentant les mêmes métabolites secondaires formés après la transformation du mancozèbe avec des temps de rétention successifs de 10min7sec, 10min9sec, 4min7sec, 15min1sec et 1 pic mineur avec un temps de rétention de 14min1sec. Les deux espèces de *Penicillium* (*Penicillium citreonigrum* et *Penicillium chrysogenu* mont montré un pouvoir de biodégradation médiocre avec apparition de pics mineurs uniquement. L'espèce *Aspergillus flavus* semble la moins efficiente car son pouvoir de biodégradation est très faible (10%).

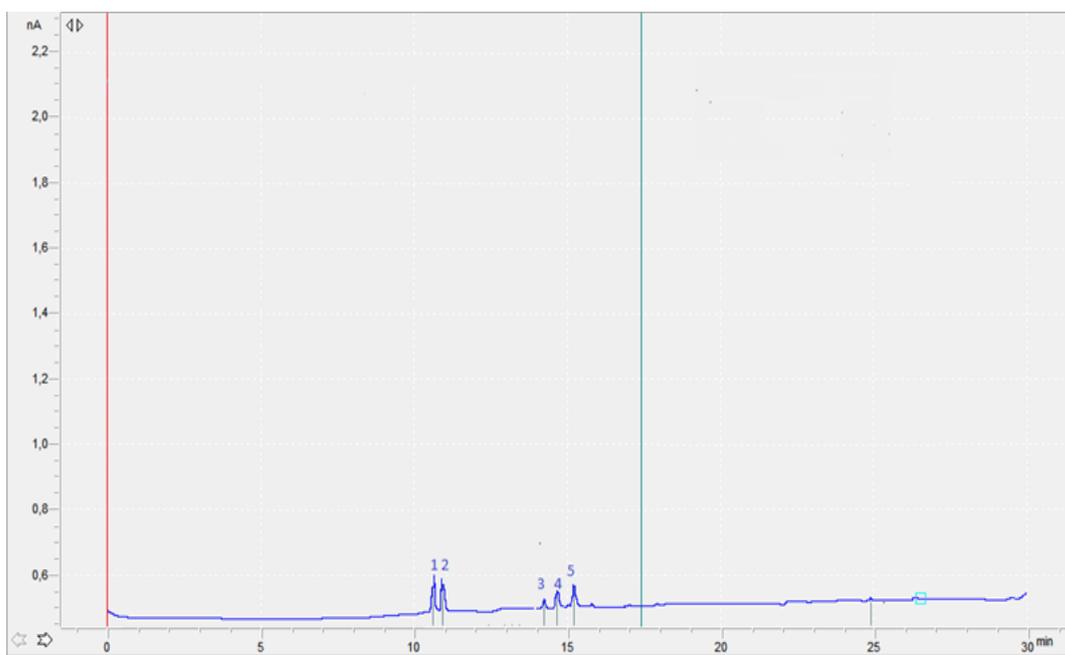


Figure 64. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par

Stenotrophomonas maltophilia

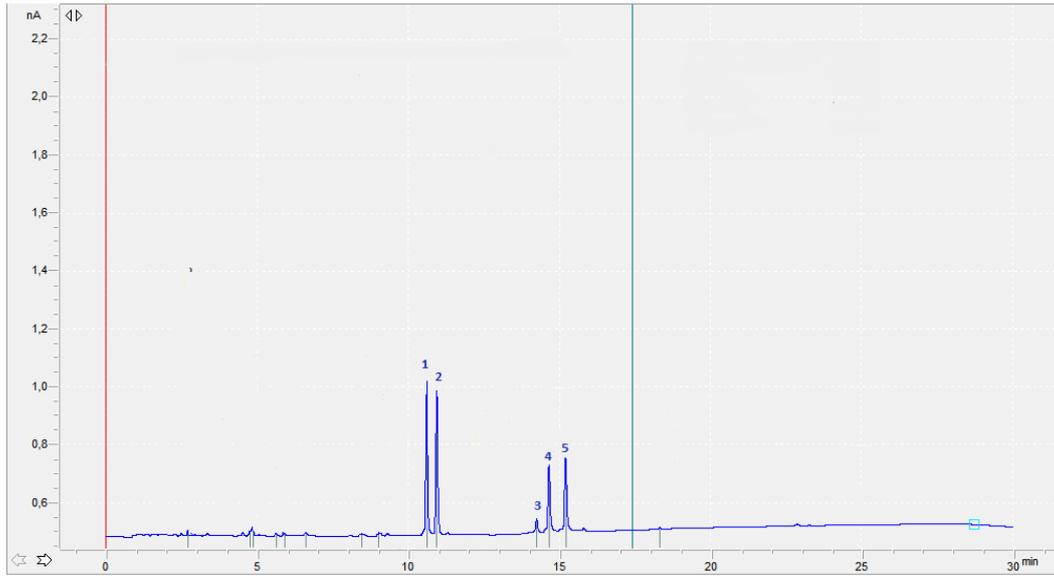


Figure 65. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Pasteurella pneumotropica*

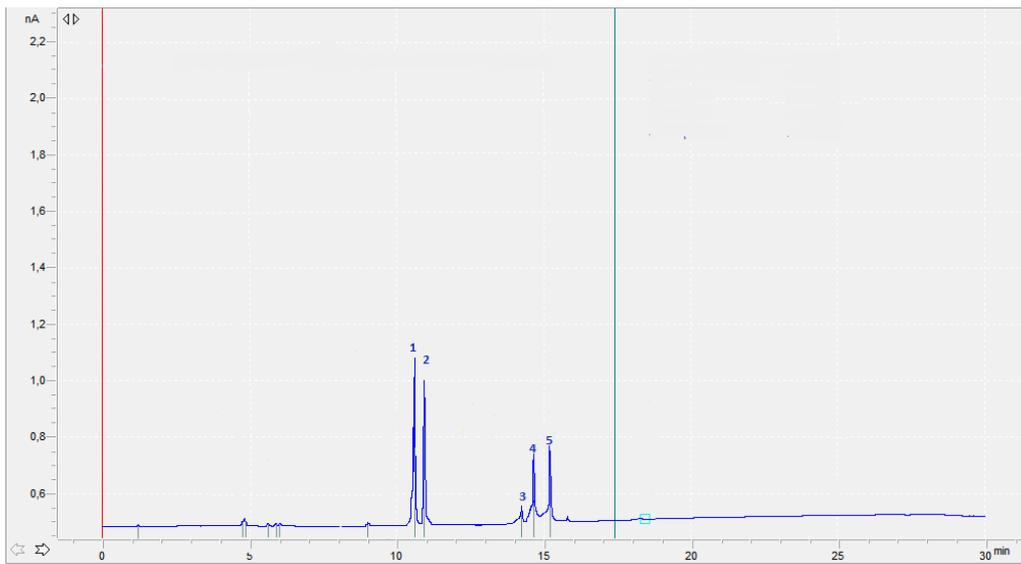


Figure 66. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Aeromonas hydrophila*

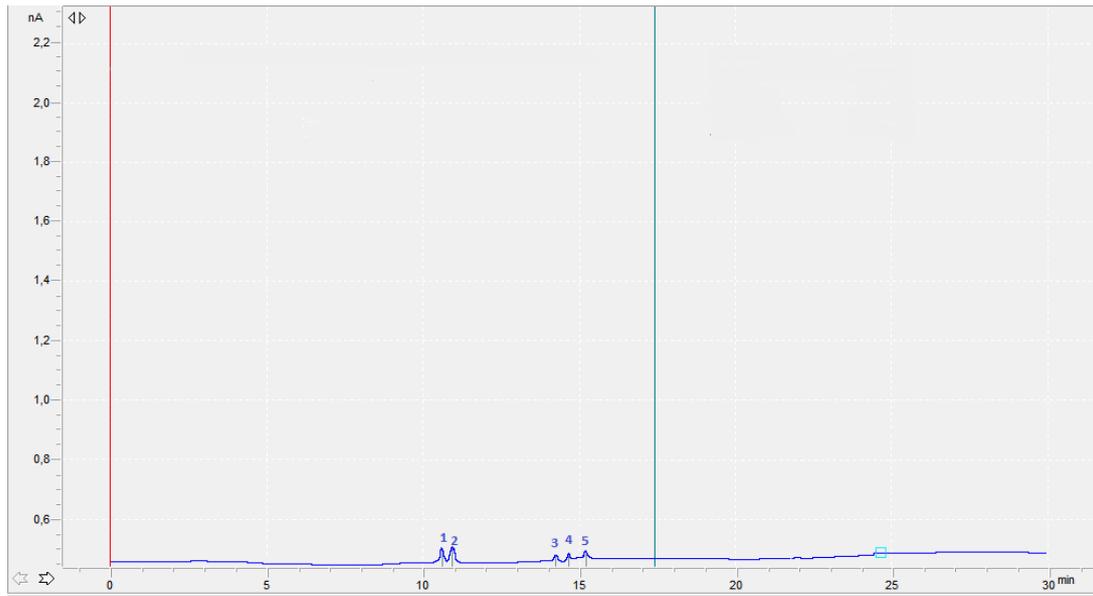


Figure 67. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Serratia marcescens*

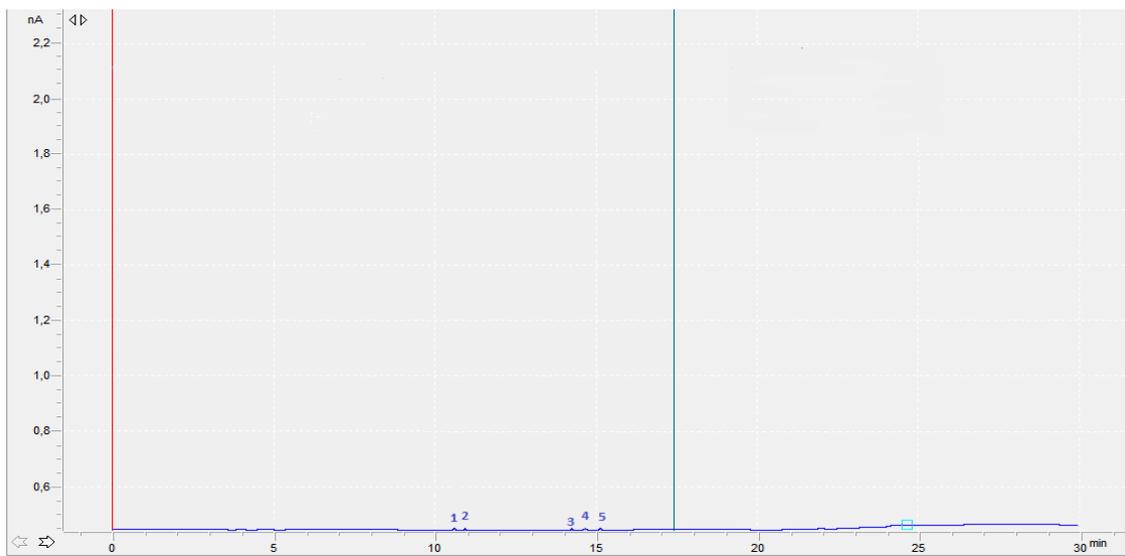


Figure 68. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Burkholderia cepacia*

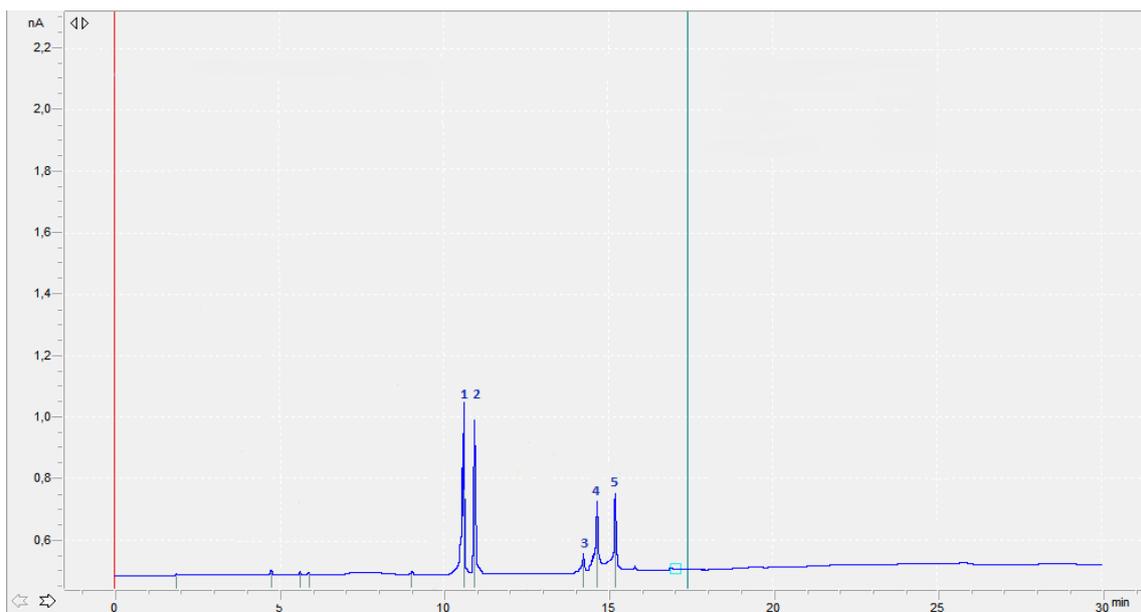


Figure 69. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Chryseomonas luteola*

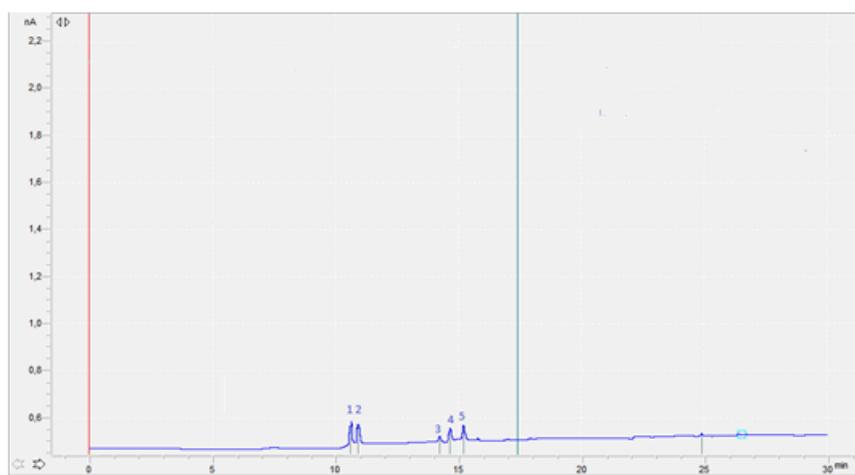


Figure 70. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Aspergillus flavus*

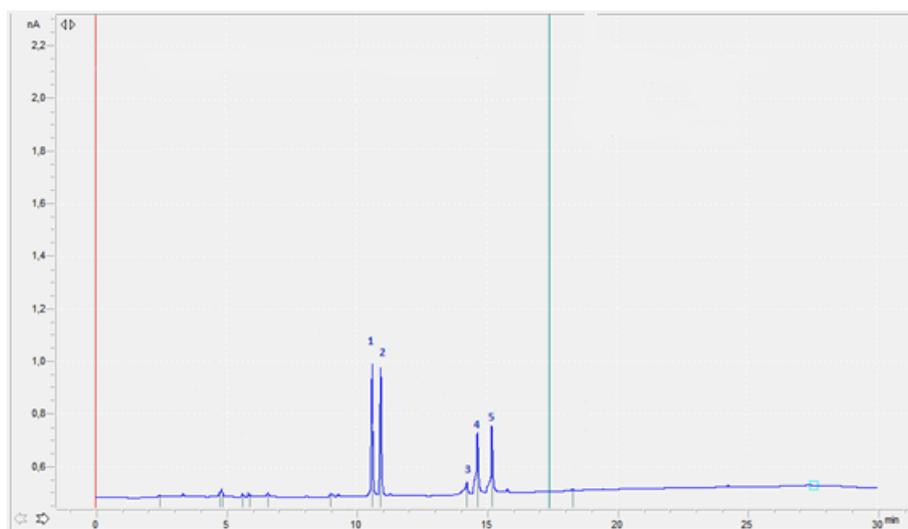


Figure 71. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Aspergillus niger*

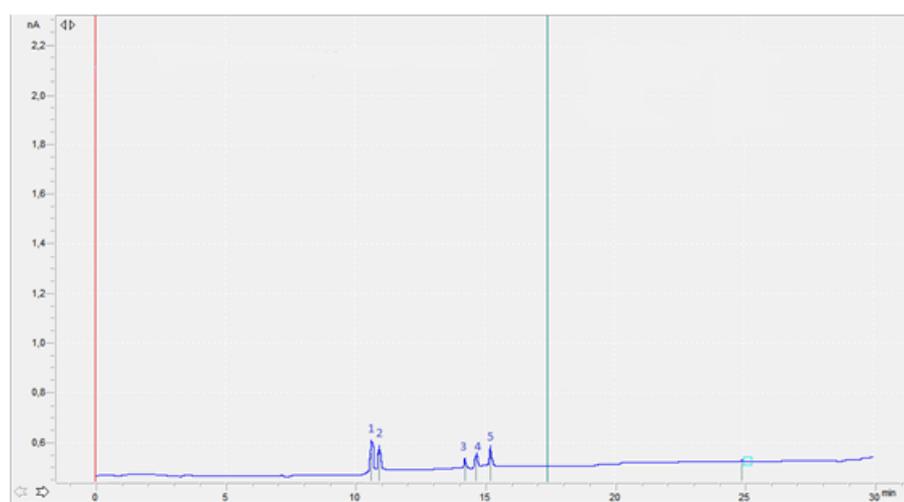


Figure 72. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Penicillium citreonigrum*



Figure 73. Chromatogramme des taux de biodégradation du mancozèbe par *Penicillium chrysogenum*

Dans ce présent travail, les profils de la CPG ont révélé la présence de métabolites dans les extraits de milieu de culture à partir de toutes les souches fongiques étudiées. Les résultats sont illustrés par les figures (68, 69, 70, 71). Ceci indique que la disparition du mancozèbe est au moins due à sa biotransformation. *Aspergillus niger* l'a presque complètement transformé (54,03 %) suivi de *Penicillium citreonigrum* (49,09 %), et *Penicillium chrysogenum* (48,71%). Cinq pics apparaissent ayant des temps de rétention respectifs de 11 min, 12 min, 13 sec, 14, min et 15 min. Ces pics Le pic 1 et le pic 4 représentent des métabolites secondaires issus de la biodégradation du mancozèbe par les différentes souches fongiques.

Le mancozèbe ajouté en mode batch discontinu ne semble pas trop toxiques pour les souches testées et pourrait être assimilé en tant que source de carbone et d'énergie. Les espèces bactériennes et fongiques ensemencées dans le milieu liquide contenant le mancozèbe servant comme source de carbone, sont susceptibles de provoquer la modification de sa concentration initiale. Le mancozèbe est un carbamate dérivé de l'acide dithiocarbamique; c'est un fongicide systémique qui agit en inhibant la germination des spores. Il a donc comme organismes cibles principaux les champignons, les protozoaires et les végétaux. Il est utilisé pour lutter contre un large éventail de maladies des plantes sur une grande variété de cultures. Il appartient au groupe des fongicides communément appelés les éthylènes bis (dithiocarbamates) (EBDC), au même titre que les matières actives manèbe, métirame et nabame qui ne sont pas persistants au niveau des sols mais qui ne devraient pas atteindre les eaux souterraines et les nappes

phréatiques. Les dithiocarbamates et dérivés se dégradent rapidement dans le sol par l'action microbienne, mais leur taux de dégradation est fonction du taux d'humidité du sol, ce qui en fait une substance légèrement à modérément persistante dans ce milieu. En règle générale, l'ETU ne se lie pas fortement aux sols, où sa mobilité est élevée à très élevée; il peut donc atteindre les eaux de surface et les eaux souterraines. (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire . ARLA, 2013).

La majorité des profils des différents chromatogrammes de la CPG ont révélé l'apparition de nouveaux pics pendant la disparition de ces composés, indiquant leur biotransformation par les bactéries et les champignons. Cependant, à partir de nos résultats, il n'est pas exclu qu'un autre processus comme celui de la bioaccumulation soit impliqué dans les processus de disparition des composés. Des métabolites secondaires majeurs et mineurs sont également révélés par les différents chromatogrammes qui prouvent que la biodégradation de mancozèbe n'est que partielle. Ces métabolites sont représentés par les pics majeurs et mineurs apparus par les différents chromatogrammes (figure 61-70) lors de la biodégradation ayant pour temps de rétention : 11 min, 12 min, 13 min, 14 min, 15 min.

Le fongicide mancozèbe est biodégradé par les espèces bactériennes et fongiques avec des pourcentages non négligeables. Toutefois le pouvoir de catabolisation des souches testées est assez médiocre puisqu'il ne dépasse pas les 57% aussi bien pour les souches bactériennes que les souches fongiques. Les meilleurs pouvoirs dégradants sont ceux de *Chryseomonas luteola* avec 56,36 % et du *Aspergillus niger* avec 54,03%. Ces deux espèces microbiennes sont réputées pour leurs hautes potentialités cataboliques vis-à-vis de divers polluants de l'environnement les plus récalcitrants, tels que les organophosphorés, les organochlorés, les pyréthrénoïdes ou encore les dithiocarbamates comme le mancozèbe. Ces souches se sont révélées dans notre cas, moins efficaces avec une métabolisation partielle avec des taux de biodégradation dépassant à peine les 50%. (Dileep, 2008). Ces résultats font allusion à un pouvoir de dégradation difficile dû à la persistance et la récalcitrance de la molécule de mancozèbe testée.

Nos résultats sont également divergents avec ceux obtenus à partir des travaux de Lyman et Lacoste (1975) où le mancozèbe semble rapidement décomposé, par hydrolyse, en complexe polymérique formé de chaînes polymères variables et de faible masse moléculaire (fragments de polymères), d'espèces monomères et intermédiaires, de produits de transformation, et

d'autres matières non identifiées. En milieu liquide, il est légèrement persistant dans des conditions aérobies. En milieu liquide anaérobie, la transformation semble être ralentie. Il est modérément persistant à persistant dans des conditions anaérobies. Les demi-vies pour mancozèbe dans L'eau à pH 5-9 a été signalée comme moins d'un jour. La minéralisation est respectivement de 50 et 90 jours pour 20 et 10 ppm.

Contrairement à nos investigations, de nombreuses autres études ont rapporté également que de nombreuse espèces fongiques sont d'excellents biodégradeurs du mancozèbe (Donecheetal., 1983 ; Cernohlávkov et *al.*, 2009 ; Ahlawat et al.2010 ; Fawole et *al.*, 2010 ; Abhishek et *al.*, 2014).

En revanche, nos résultats obtenus à partir des cultures batch sont en parfaite concordance avec les informations signalées par L'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, 2014) indiquant une biodégradabilité difficile du mancozèbe au niveau des différents composantes de l'environnement.

Cette biodégradabilité moyenne obtenue dans notre présente étude pourrait s'expliquer par les conditions d'incubation auxquelles sont soumises les cultures. Dans nos essais, les souches ont été soumises à une température de 27°C pendant que les taux de biodégradation les plus importants, ont été enregistrés à partir des expériences conduites à une température de 37°C (température optimale de développement de la plupart des microorganismes) bien que cette température ne reflètent pas les conditions réelles des écosystèmes naturels. Les mêmes constatations ont été également mentionnées par Mougin et *al.*, (1994) concernant *Phanerochaete chrysosporium*. Ce microorganisme pourtant réputé pour ses hautes potentialités cataboliques vis-à-vis de divers polluants de l'environnement et même les plus récalcitrants s'est révélé peu efficient, et a montré des capacités médiocres en réduisant seulement 21% de la concentration initiale des substrats testés.

Par ailleurs, on pourrait évoquer la nature et le nombre des substituant de la substance chimique pour expliquer la biodégradabilité des molécules. Le mancozèbe est formé de la combinaison de 2 autres dithiocarbamtes: l'éthyhlène-bis- dithiocarbamate de manganèse et de zinc ou manèbe et l'éthylène-bis-dithiocarbamate de zinc ou zinèbe. Cette substance active constituée de groupements N-H et des doubles liaisons qui pourraient avoir une grande influence sur la transformation et augmenter la résistance de la décomposition de la substance active de la part des bactéries et des champignons. La nature chimique du mancozèbe semble jouer un rôle important dans sa biodégradation.

Les potentialités métaboliques des consortiums microbiens ne sont pas meilleures que celles des souches pures. Dans notre cas, la population mixte s'est révélée peu efficace à l'égard des deux molécules. Nos résultats confirment ceux obtenus par Belaze (2015) mesosulfuron-méthyl, l'iodosulfuron-méthyl, propinèbe et cymoxanil; et Hassaine (2016) qui montrent la déficience des consortium microbiens pour les hydrocarbures (kérosène et le pétrole brut). Nos résultats ne concordent cependant pas avec les travaux de Melgarejo et Martínez 1992 ; Gillian et *al.*, 2001 qui affirment que certaines molécules toxiques sont mieux oxydées et parfois minéralisées complètement lorsqu'elles sont mises en contact avec un consortium de souches. Selon ces auteurs, les populations mixtes sont très efficaces et possèdent de hautes potentialités ; elles agissent alors en synergie, détoxifient le produit et le convertissent en composé plus simple et moins toxique que le produit initial. Cette hétérogénéité dans le comportement du consortium des populations microbiennes mixte serait due probablement au temps d'incubation. Au cours de notre expérimentation, les microorganismes sont mises en culture pendant 120 heures uniquement, alors que les taux de biodégradation les plus importants ont été enregistrés à partir des cultures incubées pendant 15 à 30 jours. (Das et *al.*, 1995 ; Melgarejo et Martínez 1992).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre travail visait à étudier les potentialités cataboliques de la microflore autochtone des eaux superficielles agricoles vis à vis de deux pesticides: un fongicides, le mancozèbe et un insecticide, le méthomyl.

En Algérie, très peu de travaux ont été réalisés sur ces deux produits agropharmaceutiques et leur bioremédiation in vitro par la microflore fongique et bactérienne.

Avant d'entamer l'isolement et l'identification de la microflore totale des eaux superficielles étudiées, nous avons jugé nécessaire d'apprécier leur degré de pollution en déterminant les caractéristiques physico-chimiques des paramètres hydriques principaux. Les analyses montrent que la qualité des eaux contaminées est quelque peu affectée. Les valeurs du rapport de biodégradabilité DCO/DBO5 sont supérieures aux normes internationales au niveau de tous les sites étudiés. Par ailleurs, les teneurs en nitrites, en ions ammonium et en chlorures dépassent les chiffres limites; ce dépassement découle de l'évidente présence des pesticides dans les eaux des parcelles étudiées. Toutefois nous devons signaler que l'évaluation de la contamination des eaux soumises à l'effet des divers polluants reste souvent difficile à apprécier compte tenu de l'interaction entre les paramètres des eaux, des pesticides, et également les facteurs climatiques du milieu environnant.

En se référant aux résultats physico-chimiques des échantillons d'eau analysés, on relève un retentissement important sur la composition de la microflore aussi bien quantitativement que qualitativement. Les populations microbiennes isolées sont très diversifiées avec une biomasse importante au niveau de tous les sites contaminés. La microflore fongique est particulièrement marquée par une abondance d'*Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus*) peu de *Penicillium* (*Penicillium notatum*, *Penicillium citreonigrum*, *Penicillium chrysogenum*). La flore bactérienne isolée appartient à plusieurs familles dont les principales espèces sont: *Chryseomonas luteola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Sténotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*. Toutefois, on dénote une meilleure performance des familles des *Pseudomonaceae*, des *Aeromonadaceae* et une présence faible de la famille des *Enterobacteriaceae*.

La flore microbienne des échantillons d'eau témoin est également assez importante et hétérogène avec une baisse relative par rapport à celles du site témoin. Toutefois, les espèces

inventoriées présentent des dissimilarités avec leurs homologues des sites contaminés du point de vue fréquence.

La plupart des espèces identifiées sont des espèces ubiquistes retrouvées dans de nombreux milieux tels que les sols, les effluents, les eaux usées, etc. Ce sont des espèces tolérantes aux divers polluants de l'environnement (pesticides, hydrocarbures, métaux lourds) et qui possèdent par ailleurs des capacités de croissance même dans les milieux les plus pauvres en nutriments. Ces espèces inventoriées constituent une liste de microorganismes résistants susceptibles de survivre dans les conditions particulières de substrats fortement contaminés par la présence de plusieurs herbicides, fongicides et insecticides. Nous tenons à signaler ici, que les techniques d'isolement ne permettent pas à chaque fois d'obtenir toutes les espèces vivantes dans un milieu, où il est difficile de satisfaire les exigences physiologiques de toutes les espèces fongiques et bactériennes présentes dans un échantillon donné. Le nombre et la nature des espèces microbiennes sont influencés par des facteurs tels que la durée de la période d'incubation, la concentration partielle en oxygène, le pH du milieu, la présence de matières nutritives spécifiques dans le milieu de culture, la compétition entre les bactéries et les champignons pour les nutriments, etc.

Pour ce qui est des capacités de croissance des souches soumises à l'effet des deux pesticides, il semble d'une manière évidente que les souches testées sont en mesure de croître dans les conditions difficiles des milieux liquides pollués. En effet, dans les conditions de nos expérimentations, la présence des deux substances actives (Méthomyl et Mancozèbe) ajoutées lors de la phase exponentielle du développement n'affecte pas les cinétiques de croissance de nos souches. Les potentialités de croissance microbiennes évaluées à partir des différents paramètres physiques et chimiques (densité optique, pH, taux d'oxygène, poids de l'inoculum) mettent en évidence la tolérance de la plupart des souches testées. Si l'on compare maintenant les potentialités de développement et de croissance des souches pures individuellement avec celles du consortium ou population mixte, on relève une adaptation légèrement meilleure des souches de *Chryseomonas luteola* et d'*Aspergillus niger* utilisées individuellement. Les conditions de nos expériences n'ont pas permis aux espèces bactériennes et fongiques formant le consortium d'agir en synergie pour pouvoir survivre aux conditions difficiles, et d'accéder facilement au pesticide afin de l'utiliser comme une source de carbone et d'énergie pour une éventuelle oxydation. Cette déficience du mélange des souches en consortium microbien semble probablement liée à un équipement enzymatique non hautement actif de son génome.

Par ailleurs, l'évaluation de la biodégradation et des potentialités cataboliques des souches testées par la chromatographie en phase gazeuse fait ressortir une différence de comportement entre les souches. Ceci illustre que la présence de pesticides favorise chez les bactéries et les champignons la sélection des systèmes enzymatiques efficaces et leur stimulation dans les réactions de biodégradation. Il paraît que les espèces *Aspergillus flavus* et *Burkholderia cepacia* sont celles qui sont sensibles, ne possédant pas de systèmes enzymatiques efficaces; leur pouvoir de biodégradation est par conséquent faible pour le mancozèbe et le méthomyl. En face, nous retrouvons les espèces résistantes telles que: *Chryseomonas luteola* et *Aspergillus niger*; ces dernières semblent beaucoup plus intéressantes face aux deux pesticides. Ceci pourrait s'expliquer par leur possession d'un patrimoine génétique pourvu d'un équipement enzymatique actif vis - à-vis des ces deux substances chimiques. Cette dynamique de leurs complexes enzymatiques se traduit par la catalyse de différentes réactions de biodégradation et de bioconversion d'un grand nombre de substances pesticides chimiquement différentes.

Les profils des chromatogrammes ont révélé la présence de métabolites dans les extraits des milieux de culture étudiés. Les principaux pics mineurs et majeurs des chromatogrammes des meilleures souches bactériennes et fongiques représentent probablement les mêmes métabolites issus de la biodégradation de la molécule initiale. D'ores et déjà, nous pensons que *Chryseomonas luteola* et *Aspergillus niger* sont des microorganismes possédant les caractéristiques demandées d'agents biologiques de dépollution. Néanmoins, pour envisager leur utilisation dans la bioremédiation des sites contaminés, il faut d'abord approfondir les recherches sur les réactions de métabolisation et de biodégradation.

Mais avant d'envisager l'application sur terrain de ces processus biologiques de bioremédiation, il faudrait tout d'abord limiter les risques de pollution par une politique de protection de l'environnement notamment par:

- la mise en place d'un système d'évaluation des risques liés à l'utilisation sans aucun contrôle de ces produits biocides.
- la mise en place d'un organisme responsable des analyses systématiques régulières des résidus de pesticides dans les différentes composantes de l'environnement (sol, eau, plantes denrées alimentaires, etc.)
- l'identification de la nature des résidus
- l'établissement des normes nationales et locales des doses de pesticides admissibles au niveau des différentes matrices environnementales.

Enfin pour pouvoir envisager la bioremédiation par les bactéries ou les champignons des eaux contaminés, il serait pertinent :

- d'améliorer les méthodes et les conditions de réalisation des cultures batch en optimisant les conditions d'incubation.
- d'étudier la diversité génétique par l'identification moléculaire des souches autochtones ayant un fort pouvoir de biodégradation
- d'identifier les enzymes impliquées et déterminer les gènes responsables de la dégradation

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Abhauer, J. 1991.** Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment, in Pesticide chemistry, VCH, New York, 361-372.
2. **Aboukacem, A., Chahlaoui, A., Soulaymani, A., Rhazi-filali,F.et Benali,D. 2007.** Etude comparative de la qualité bactériologique des eaux des oueds Boufekrane et Ouislane à la traversée de la ville de Meknès (Maroc). Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.N°1, p : 10-22.
3. **Adeyeye, A. and Osibanjo, O. 1999.** Residues of organochlorine pesticides in fruits, vegetables and tubers from Nigerian markets. The science of the total environment 231: 227- 233.
4. **Adhikari. S. 2010.** Bioremediation of Malathion from Environment for Pollution Control. Research Journal of Environmental toxicology 4(3) 147-150.
5. **Agarry, S. E., Olu-Arotiowa,O. A., AremuM. O. and Jimoda,L. A. 2013.** Biodegradation of Dichlorovos (Organophosphate Pesticide) in Soil by Bacterial Isolates. Journal of Natural Sciences Research. ISSN 2224-3186. Vol.3, No.8.
6. **Agarwal, M., Koelling, K.W. and Chalmers,J.J.1998.** Characterization of the degradation of polylactic acid polymer in a solid substrate.environment. Biotechnology Progress, 14(3): p. 517-526.
7. **Aissaoui, A. 2013.** Evaluation du niveau de contamination des eaux du barrage hammam Grouz de la région de Oued Athmania (Wilaya de Mila) par les activités agricoles.Univ. Mouloud Mammeri de TiziOuzou. Mémoire de magister.133p.
8. **Aït boughrous, A. 2007.** Biodiversité, écologie et qualité des eaux souterraines de deux régions arides du Maroc : le Tafilalet et la région de Marrakech thèse de doctorat université Cadi Ayyad Marrakech 236p.
9. **Ala-AI, A., Vasu, O. A., and Huang,J. 1991.** Exocellular and intracellular accumulation of lead in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 is mediated by the phosphate content of the growth medium. FEMS Microbiol. Lett. 83:.283-29.
10. **Alexander, M. 1994.** Biodegradation and bioremediation. Academic Press, A division of Harcourt Brace & Company. New York.

11. **Al Housari, F., Höhener, P., Chiron, S. 2011.** Factors responsible for rapid dissipation of acidic herbicides in the coastal lagoons of the Camargue (Rhône River Delta, France). *Science of the Total Environment* 409:582-587.
12. **AL-Qawati, M. , Azami Idrissi, Y., Alemad,A., Belhaili, I., Marc, I., Baichouti, F., EL Kharrim, K. et Belghyti, D. 2015.**Analyse et Contrôle de la qualité physico-chimique des eaux souterraines de la région SIDI ALLAL TAZI-Gharb-MAROC *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 Vol. 13 No, pp. 420-429.
13. **Aminot, A., et Kérouel, R. 2004.** Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses. Edition :Ifremer, France, 336 P.
14. **Amritha,G. Kulkarni, and Kaliwal,B. B. 2014.** Bioremediation of Methomyl by Soil Isolate – *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. ISSN: 2319-2399.Volume 8, Issue 12.
15. **Anderson, K. L., Wheeler, K. A., Robinson, J. B., Tuovinen, O. H. 2002.**Atrazine Atrazine mineralization potential in two wetlands. *Water Res*; 36(19):4785-94.
16. **Andral, B., 1996.** Données sur le comportement et les effets des produits phytosanitaires dans l’environnement. Rapport interne Ifremer.
17. **Anne-Antonella Serra 2015.** Réponses écophysiologiques et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité : implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées. Thèse de doctorat en Biologie. L’université de Rennes 1. pp. 305.
18. **Anthony, R., Smith, W., Carol, A.B. 2008.** Induction of enzymes of 2, 4 dichlorophenoxyacetatedegradation in *Burkholderia cepacia* 2and toxicity of metabolic intermediates. *Biodegradation*.,19, 669–681.
19. **Arias-Estevez, M., Lopez-Periago, E., MartinezCarballo, E., Simal-Gandara, J., Mejuto, J.-C., et García-Río, L. 2008.** The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(4), 247–260.
20. **Arpin P., David J.F., Guittonneau G.G., Kilbertus G., Ponge J.F. & Vannier G., 1986.** Influence du peuplement forestier sur la faune et la microflore du sol et des humus. I. Description des stations et étude de la faune du sol. *Rev. Écol. Biol. Sol*, 23: 89–118.
21. **Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M. 2005.** Pesticides, agriculture et environnement.

Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France).

B

22. **Bach, M., Letzel, M., Kaul, U., Forstner, S., Metzner, G., Klasmeier, J., Reichenberger, S. et Frede, H. G. 2010.** Measurement and modeling of bentazone in the river main (germany) originating from point and non-point sources. *Water Research*, 44(12), 3725–3733.
23. **Badillet G., de Briève C., Guého E., 1987.** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.
24. **Bahrouni, H. 2010.** Caractérisation de l'efficacité technique des systèmes de pulvérisation et des pertes de pesticides appliqués aux cultures basses dans les régions méditerranéennes : cas de la Tunisie. PhD thesis, Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques/Montpellier SupAgro/INAT-Tunisie.
25. **Bai, Y., Zhou, L., Li, J., 2006.** Organochlorine pesticide (HCH and DDT) residues in dietary products from Shaanxi Province, People's Republic of China. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 76: 422-4280
26. **Bailey, G. W. et White, J. L. 1964.** Soil-pesticide relationships, adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids, with implications concerning pesticide bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(4), 324–332.
27. **Bailey, R.E., 2001.** Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere*, 43: 167-1820.
28. **Baker, M.D. et Mayfeld, C.L. 1980.** Microbial and non-biological decomposition of chlorophenols and phenol in soil. *Water Air Soil Pol/ut.*, 13, 411-424.
29. **Baker, P. B. et Woods, D. R. 1977.** Co-metabolism of the Ixodicide Amitraz. *Journal of Applied Microbiology*, 42, 187-196.
30. **Ballerini, D., Gatellier, C., Vogel, T. 1998.** Techniques de traitement par voie biologique. Ademe Editions. Angers. 247p.
31. **Baran, N., Negrel, Ph., Malcuit, E., Vittecoq, B. 2006.** Suivi de la qualité des eaux souterraines de Martinique, campagne de saison des pluies 2005 : résultats et comparaison avec la 1ère campagne de basses eaux (2004) et 1ère campagne de saison des pluies (2004). BRGM/RP-54717-FR , pp. 101.
32. **Barber, J.L. 2005.** Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes: a review. *Science of the total environment*, 349: 1-44.

33. **Bardgett, R.D. 2005.** The biology of soil: a community and ecosystem approach. New York: Oxford University Press Inc.
34. **Baril A., Whiteside M., Boutin C. 2005.** Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry*, 24, 2, 360-371.
35. **Barraclough, D., Kearney, T., and Croxford, A. 2005.** Bound residues: environmental solution or future problem? *Environ Pollut.* 133(1); 85-90.
36. **Barriada-Pereira, M., Gonzalez-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Polze-Mahia, P., Prada-Rodriguez, D., Fernandez-Fernandez, E. 2005.** Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 58: 1571-1578.
37. **Barriuso, E. et Houot, S. 1996.** Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology & Biochemistry*, 28(10-11), 1341–1348.
38. **Barriuso, E., Soulas, G., et Schiavon, M. 2000.** Rétention et dégradation des pesticides dans le sol. *Hydrogéologie*, 1(1), 49–56.
39. **Barriuso, J., Solano, B.R., Lucas, J.A., Lobo, A.P., Villaraco, A.G., Mañero, F.J.G. 2008.** Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad I., Pichtel J., Hayat S. (eds): WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1–17.
40. **Battu, R.S., Singh, B., Kang, B.K., Joia, B.S. 2005.** Risk assessment through dietary intake of total diet contaminated with pesticide residues in Punjab, India, 1999-2002. *Ecotoxicology and environmental safety* 62(1): 132-139.
41. **Bechard, G. J., Bisailon, G. and Beaudet. R. 1990.** Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions. *Cano J. Microbiol.* 36:573-578.
42. **Bedos, C., Flura, D., Rousseau, M.F., Masson, S., Cellier, P., Barriuso, E., 2001.** Pesticide volatilization flux: a semi-field system. The eight Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Denmark.
43. **Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., and Gabrielle, B. 2002.** Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants : overview. *Agronomie*, 22(1), 21–33.
44. **Beigel, C. and Di Pietro, L. 1999,** Transport of triticonazole in homogeneous soil columns: Influence of nonequilibrium sorption, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1077–1086.

45. **Bélamie, R., Calvet, R. et Chassin, P. 1997.** Les transferts sol- eaux, des produits phytosanitaires, l'eau dans l'espace rural, production végétal et qualité de l'eau. INRA Edition, 231- 248.
46. **Belaze Abdelhakim. 2015.** Effet des pesticides sur les deux composantes de l'environnement (sol, eau) responsables de leur transfert le long de la chaîne alimentaire. Biodégradation d'un fongicide et d'un herbicide par la flore microbienne isolée. Thèse de doctorat en toxicologie. université Badji Mokhtar-Annaba. pp. 181
47. **Belyea, L.R., and Lancaster, J. 1999.** Assembly rules within a contingent ecology. *Oikos* 86:402-416.
48. **Bending, G.D., Friloux, M., Walker, A. 2002.** Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 212(1):59-63.
49. **Bending, G.D., Lincoln, S.D., Edmondson, R.N. 2006.** Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* 139:279-287.
50. **Bengoumi, M., traoure, A., Bouchriti, N., Bengoumi, D. et El Haraik, A. 2004.** Qualité de l'eau en aviculture .Revue trimestrielle d'information scientifique et technique – Volume 3 – N°1, Maroc, 5-25pp.
51. **Benoit, P., Barriuso, E., Bergheaud, V., and Etiévant, V. 2000.** Binding capacities of different soil size fractions in the formation of herbicide-bound residues. *Agronomie*, 20(5), 505–512.
52. **Benslama, O. 2014.** Isolement et caractérisation des bactéries capables de dégrader l'herbicide Glyphosate et optimisation des conditions de culture pour une dégradation plus efficace. Thèse de doctorat univ constantine 175p.
53. **Bermond, R., Vuichard, R. 1973.** Les paramètres de la qualité des eaux. Documentation Française, Paris, 179p.
54. **Berry, D. F., Francis, A. J. and Bollag, J. M. 1987.** Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51 :43-59.
55. **Bhalerao, T.S. and Puranik, P.R. 2007.** Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulphan by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International biodegradation & biodegradation*, 59: 315-321.

56. **Bhat, T. K., Singh, B., Sharma, O. P. 1998.** Microbial degradation of tannins: a current perspective. *Biodegradation* 9: 343–357.
57. **Bhupal Reddy, T., Venkata Ramana Reddy, A. and Rami Reddy, Y. V. 2012.** Biodegradation of organochlorine pesticides endosulfan in soil and water environments. *Scholars Research Library Der Pharma Chemica*, 2012, 4 (3): 1016-1018.
58. **Biogenie INC. 1994.** Profil d'entreprise. Ste-Foy, QC, 1.
59. **Blackwell, M. 2011.** The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 millions species?. *American Journal of Botany*. Vol (98) : 426-438.
60. **Blanchoud, H., Garban, B., Ollivon, D., and Chevreuil, M. 2002.** Herbicides and nitrogen in precipitation: progression from west to east and contribution to the Marne river (France). *Chemosphere*. 47(9); 1025-1031.
61. **Blanco, M., Zamora, D., Planells, J., & Mulero, R. 2009.** Analytical control of adjuvants in herbicide formulations by NIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(3), 839–844.
62. **Blasco, C., Fernandez, M., Pico, Y., Font, G., Manes, J. 2002.** Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anl. Chim. Acta*, 461, 1, 109-116.
63. **Blasco, C., Font, G., Manes, J., Pico, Y., 2005.** Screening and evaluation of fruit samples for four pesticide residues. *Journal of AOAC international*, 88, 3, 847-853.
64. **Bliefert, C. et Perraud, R. 2001.** "Chimie de l'environnement: Air, Eau, Sols, Déchets". Paris, Deboeck Université. 477.
65. **Boivin, A. 2003.** Disponibilité Spatio-temporelle et Transfert des pesticides dans les Sols. PhDthesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
66. **Boopathy, R. 2000.** Bioremediation of explosives contaminated soils. *Int Biodeter Biodeg*. 46 : 29-36.
67. **Bordjiba, O. 2003.** Effet des pesticides sur la microflore fongique du sol. Biodégradation des herbicides par les souches isolées. Thèse de doctorat d'états. Université Joseph Fourier Grenoble I.
68. **Bordjiba, O., Steiman, R., Kadri, M., Semadi, A et Guiraud, P. 2001.** Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 30(2): 418-426.
69. **Boricha H., Fulekar, 1.M.H. 2009.** *Pseudomonas plecoglossicida* as a novel organism for the bioremediation of cypermethrin. *Biology and Medicine*, 1 (4): 1-10.

70. **Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuril, M. and Blanchoud, H. 2009.** Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surfacewaters through urban sewerage systems. *Chemosphere* In Press, Corrected Proof.
71. **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.
72. **Boulanouar M., 1986.** Études écologiques comparées de quelques puits de la région de Marrakech. Impact des pollutions sur la zoocénose des puits. Thèse de 3ème cycle, Université Cadi Ayyad, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, 207p.
73. **Boul, H.L. 1994.** DDT residues in the environment –a review with a New Zealand perspective. *New Zealand Journal of agricultural research*, 38: 257-277.
74. **Bouziyani, M. 2007.** Le guide de la médecine et de la santé en Algérie. L'usage immodéré des pesticides : De graves conséquences sanitaires. Faculté De Médecine d'Oran.
75. **Bremond, R. et Vuichard, R. 1973.** Paramètres de la qualité des eaux. Ministère de la protection de la nature et de l'environnement. SPEPE, Paris. 179 p.
76. **Briand, O., Bertrand, F., Seux, R., Millet, M. 2002.** Comparison of different sampling techniques for the evaluation of pesticide spray drift in apple orchards. *Sci. Total Environ.*, 288, 199-213.
77. **Briand, O., Millet, M., Bertrand, F., Cellier, P., Bedos, C., Seux, R., 2003.** Atmospheric concentrations and volatilisation fluxes of two herbicides applied on maize. *Fresenius Environmental Bulletin* 12, 675-679.
78. **Buitrón, G., Gonzalez, A. 1996.** Characterization of the microorganisms from an acclimated activated sludge degrading phenolic compounds, *Water Sci. Technol.*, 34, 289-94.
79. **Burkhard, N., Guth, J.A., 1981.** Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system. *Pesticide science* 12, 37-44.
80. **Burns, K.A., and Villeneuve, J.P. 1982.** Dissolved and particulate hydrocarbons in water from spring sampling of the Var river estuary (S. France). *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol.5, pp.195-203.

C

81. **Cahagnier, B., Richard-Molard, D. 1998.** Analyse mycologique In Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158.
82. **Calvet, R. 1989.** Adsorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*, 83, 145–177.
83. **Calvet, R. 2003.** Le sol : propriétés et fonctions. France Agricole Editions.
84. **Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.P., Coquet, Y. 2005.** Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. ISBN 2-8557-119-7 Editions France Agricol.
85. **Campbell, C.K., Johnson, E.M., Philpot, C.M., Warnock, D.W. 1996.** Identification of pathogenic fungi, Public Health Laboratory Service (298pp), London, United Kingdom.
86. **Cao, J., Diao, X.-p., and HU, J.Y. 2013.** Hydrolysis and photolysis of herbicide clomazone in aqueous solutions and natural water under abiotic conditions. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(11), 2074–2082.
87. **Capkin, E., Altinok, I., Karahan, S. 2006.** Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere* 64, 1793–1800.
88. **Carluer, N., Gouy, V., Gril, J.-J. 2007.** Le transfert diffus des pesticides vers les milieux aquatiques et les moyens de le limiter. *Sinfotech - Les fiches Savoir-faire*, 4 p.
89. **Carson, L. 1962.** *Silent spring*. Riverside Press, Cambridge, MA, USA.
90. **Castillo, M. del, P. et Torstensson, L. 2007.** Effect of Biobed Composition, Moisture, and Temperature on the Degradation of Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5725-5733.
91. **C.E.C. 2002.** Making the environment Healthier for Our Kids-An overview of environmental challenges to the health of North America's children.
92. **Chabasse, D., Bouchara, J.P., De Gentile, L., Brun, S., Cimen, B., Penn, P. 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale*. Edition Bioforma. Paris. P. 11, 53, 55, 57, 59, 81, 85, 93, 102, 103, 109.
93. **Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., and Hinsinger, P. 2003.** Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ Pollut.* 123(2); 229-238.
94. **Chandra, R. and Rustgi, R. 1998.** Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 23(7): p. 1273-1335.

95. **Chang, T.C., Chang, H.C., Yu, F.W., Lenie, D., Mario, V and Chung, T.T. 2005.** Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus* *Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J. Clinical Microbiol.*43(4): 1632-1639.
96. **Chapman, D., Kimstach, V. 1996.** Selection of water quality variables. Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environment monitoring, Chapman edition, 2nd ed. E & FN Spon, London.
97. **Charnay, M.-P. 2001.** “Respiromètre clos”: Etudes de la biodégradation des pesticides, Rapport de l’INRA : dispositifs pour l’étude du comportement des pesticides dans l’environnement Montpellier, pp : 93-98.
98. **Chatterjee, D.K., Kilbane, J.J. et Chakrabarty, A.M. 1982.** Biodegradation of 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid in soil by pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* (44), 514-516.
99. **Chen, P-L., Wu, C-J., Tsai, P-J., Tang, H-J., Chuang, Y-C., Lee, N-Y. 2014.** Virulence diversity among bacteremic *Aeromonas* isolates: Ex Vivo, animal, and clinical evidences. *Plos One*, 9 (11).
100. **Cherif, S. 1997.** "Etude en laboratoire des cinétiques de volatilisation des pesticides épandus sur un sol et application à un modèle théorique." Thèse de l’Université Louis Pasteur Strasbourg, 192 pages.
101. **Cherif, S., Wortham, H., 1997.** A new laboratory protocol to monitor the volatilization of pesticides from soils. *International journal of environmental analytical chemistry* 68, 199-212.
102. **Chevillard, A., Angellier-Coussy, H., Guillard, V., Gontard, N., & Gastaldi, E. 2012.** Controlling pesticide release via structuring agropolymer and nanoclays based materials. *Journal of Hazardous Materials*, 205–206, 32–39.
103. **Chevreuil, M., Garmouma, M., Teil, M.J., Chesterikoff, A., 1996.** Occurrence of organochlorine (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from the urban and rural stations of the Paris area. *Science of total environment* 182: 25-37.
104. **Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A. and Arshad, M. 2013** “Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil,” *Journal of Environmental Management*, vol.114, pp.372–380.
105. **Cluzeau, S., Patunelle, M. C., Lhoutellier, C. 2000.** Index phytosanitaire, Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris, 644 p.

106. **Colin, F. 2000.** Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). Unité mixte Cemagref-ENGREF "Structure des systèmes spatiaux". 233.
107. **Colleu, S., et Mignard, E. 2000.** La lutte contre la pollution des sols par les pesticides: limiter les apports, réduire les fuites. INRA, 5p.
108. **Collotta, M., Bertazzi, P.A., and Bollati, V. 2013.** Epigenetics and pesticides. *Toxicology*. 307, 35–41.
109. **Columa, 1977.** Les herbicides et le sol. *ACTA*, 143 p.
110. **Copin, A., Bertrand, C., Govindin, S., Come, V. & Couturier, Y. 2004.** Effects of ultraviolet light (315nm), temperature and relative humidity on degradation of polylactic acid plastic films. *Chemosphere*, Vol. 55, p. 763-773.
111. **Corwin, D. L., Loague, K., and Ellsworth, T. R. 1999.** Introduction assessing nonpoint source pollution in the vadose zone with advanced information technologies. In L. Corwin, K. Loague, & R. Ellsworth (Eds.), *Geophysical Monograph Series*, volume 108 (pp. 1–20). Washington, D. C. : American Geophysical Union.
112. **Coulibaly, k. 2005.** Etude de la qualite physico-chimique et bacteriologique de l'eau des puits de certains quartiers du district de these de doctorat université de Bamako. 67p.
113. **Coulibaly, L., Gourène, G., et Spiros N. Agathos. 2008.** Sélection d'un champignon filamentueux pour l'épuration des eaux usées: le phénol comme inhibiteur modèle de discrimination entre *Aspergillus niger* et *A. oryzae*. *Sciences & Nature* Vol. 5 N°2 : 111 – 119.
114. **Cousins, I.T., Bondi, G., Jones, K.C. 1999.** Measuring and modeling the vertical distribution of semivolatile organic compounds in soils. I: PCB and PAH soil core data. *Chemosphere* 39: 2507-2518.
115. **Cunin, R. 1993.** Introduction à la génétique bactérienne, ed. Vigot. Paris.
116. **Cuppen, J.G.M., Van denBrink, P.J., Camps, E., Uil, K.F., Brock, T.C.M. 2000.** Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquat. Toxicol.* 48, 233–250.

D

117. **Dagnélie, P. 1970.** Théorie et méthodes statistiques : applications agronomiques (vol.2). Gembloux, presses agronomiques, 451p.

- 118. Dagnélie, P. 2006.** Statistique théorique et appliquée. Inférences à une et à deux dimensions. Bruxelles université DE BOECK et LARCIER : 659p.
- 119. Dalton, H., Stirling, D. I., et Quayle, J. R. 1982.** Co-Metabolism [and Discussion].PhilosophicalTransactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 297(1088), 481-496.
- 120. Darnerud, P.O., Atuma, S., Aune, M., Bjerselius, R., Glynn, A., Peterson Grawé, K., Becker, W. 2006.** Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market data. Food and chemical toxicology 44: 1597-1606.
- 121. Das AC, Chakravarty A, Sukul P, Mukherjee D 1995.** Insecticides: their effect on microorganisms and persistence in rice soil. Microbiol Res 150:187–194
- 122. Dileep, K. 2008.** Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. Indian J. Microbiol. 48:35–40
- 123. De Snoo, G.R. 1999.** Unsprayed field margins: effects on environment, biodiversity and agricultural practice, Landscape and Urban Planning 46(1-3): 151-160.
- 124. Debenest, T. 2007.** Caractérisation de l’impact des pollutions agricoles sur les diatomées benthiques. Thèse de doctorat, Univ. Bordeaux 1, 251p.
- 125. Degbey, C. 2011.** Facteurs associés à la problématique de la qualité de l’eau de boisson et la santé des populations dans la commune d’Abomey-calavi au Bénin. Thèse de doctorat en Sciences de la santé publique. Ecole de santé publique. UniversitéLibre de Bruxelles (ULB).
- 126. Derache, R. 1986.** Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation – Lavoisier, Aparia, Paris, 299-321. 594 p.
- 127. Derwich, E., Benaabidate, L., Zian, A., Sadki, O., Belghity, D. 2010.** Larhyss Journal, 08,101-112. pp.
- 128. Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la répression des fraudes (D.G.C.C.R.F). 2006.** Plan de surveillance des fruits et légumes. Direction générale de l'alimentation.
- 129. Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., and Pace, N.R. 1998.** Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Applied And Environmental Microbiology 64: 3869-3877.

- 130. Doubi, M., Dermaj, A., Ait hadou, B., chebabe, D.,Erramli, H.,Hajjaji, N., Srhiri , A. 2013.** Contribution à l'étude physico-chimique de l'oued Moulouya et un affluent au niveau de la région d'Outat el Haj. Larhyss Journal, n°16, pp. 91-104.
- 131. Duggan, R.E., Barry, H.C., Johnson,L., Y., 1966.**Pesticides residues in total diet samples. Science, 157, 1006.
- 132. Dur, J.-C., Gouy, V., Calvet, R., Belamie, R., and Chaplain, V. 1998.**Influence of adsorption-desorption phenomena on pesticide runoff measured under controlled conditions. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science, 327(6), 405–411.
- 133. Dussart, B. 1966.** Limnologie : Etude des eaux continentales. Gauthier- Villars, Ed., Paris.

E

- 134. EL Blidi, S., Fekhaoui, M. 2003.** Hydrologie et dynamique marégraphique de l'estuaire du Sebou (Gharb, Maroc). Bull. Inst. Sci., 25 : 57–65.
- 135. El-Dib,M.A., Aly, O.A. 1976.** Persistence of some phenylamide pesticides in the aquatic environment—I. Hydrolysis. Water Research 10:1047-1050.
- 136. Eldsater, C.,Erlandsson, B., Rendstad, R.,Albertsson,A.C.and Karlsson, S.2000.** The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly (epsilon-caprolactone).Polymer, 41(4): p. 1297-1304.
- 137. El Fels, L. 2014** Suivi physico-chimique, microbiologique et ecotoxicologique du compostage de boues de step melangees a des dechets de palmier: validation de nouveaux indices de maturite. These univ. doctorat de l'université de toulouse. 295p.
- 138. Elmholt, S., Frisvad, J.C., Thrane, U. 1991.** The influence of fungicides on soil mycoflora with special attention to tests of fungicide effects on soilborne pathogens. In Altman J.: Pesticideinteractions in crop production: beneficial and deleterious effects. CRC Press, Boca Raton,Florida, USA, 227-243.
- 139. El Rashidi, M. 2012.** Etude cinétique et mécanistique des réactions hétérogènes du folpet et dimethomorphe avec l'ozone et les radicaux OH. photooxydation homogène des composes morpholiniques avec les radicaux OH » Université de Reims.
- 140. Entry, J. A. et Emmingham, W. H.1995.** The Influence of dairy manure on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in pasture soils. Canadian Journal of SoilScience, 75, 379-383.

141. **Evans, R.O., Skaggs, R.W., Gilliam, J.W. 1995.** Controlled versus conventional drainage effects on water quality. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering* 121, 271-276.

F

142. **Falco, G., Bocio, A., Llobet, J.M., Domingo, J.L., Casas, C., Teixido, A. 2004.** Dietary intake of hexachlorobenzene in Catalonia, Spain. *The science of the total environment* 322: 63-70.
143. **FAO/OMS Commission du Codex Alimentarius, 1994.** Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires, 2, FAO/OMS, Rome 477p.
144. **Fawcette, R.S. 1994.** The impact of conservation tillage on pesticide runoff into surface water. *J. Soil Water.* 49 p:126-135.
145. **Firbank, L.G. 2005.** Benefits of organic farming to biodiversity vary among taxa. *Biology Letters* 1:431-434.
146. **Fletcher, J. S., Pfeleger, T. G., and Ratsch, H. C. 1993.** "Potential environmental risks associated with the new sulfonylurea herbicides." *Environ. Sci. Technol.* 27:2250-2252.
147. **Forgacz C. 2011.** Elaboration de matériaux poreux à partir de sous-produits de la biomasse par polymérisation d'émulsions concentrées. Thèse de doctorat en chimie organique. L'université de Bordeaux 1. pp. 144.
148. **Forman, S., Novak, J., Tykva, R., Kas, J., Wimmer, Z., Ruml, T. 2002.** "Evaluation of toxicity of pesticides and their biodegradation products using human cells", *Chemosphere*, 46, p: 209-217.
149. **Fournier, E. et Bondereff, J. 1983.** Les produits antiparasitaires à usage agricole. Conditions d'utilisation et toxicologie. Tec. Et doc. Lavoisier, Paris, 334 pp.
150. **Fournier, J. 1988.** Chimie des pesticides. Cultures et Techniques, Agence de Coopération Culturelle et Technique.
151. **Frazar, C. 2000** The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites. National Network of Environmental Studies (NNEMS) Fellow. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office Washington, DC.
152. **Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. 2011.** Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 583-609.

153. **Führ, F., Burauel, P., Dust, M., Mittelstaedt, W., Pütz, T., Reinken, G. and Stork, A. 1998.** Comprehensive tracer studies on environmental behavior of pesticides: The lysimeter concept. In: 'The Lysimeter Concept'. (Ed.: Führ, F., Hance, R.J., Plimmer, J.R., Nelson, J.O.), ACS Symposium Series 699, 1-20.
154. **Fuller, R.J., Norton, L.R., Feber, R.E., Johnson, P.J., Chamberlain, D.E., Joys, A.C., Mathews, F., Stuart, R.C., Townsend. M.C., Manley, W.J., Wolfe, M.S., Macdonald, D.W., Firbank, R.G. 2005.** Benefits of organic farming to biodiversity vary among taxa. *Biol Lett*, 22;1(4):431-4.

G

155. **Gamouh, A., Bensalah, M., Abaadi, N., Zyad, A., Coste, C.M. et Fournier, J.C. 2004.** Effets comparés et interactifs des pesticides et facteurs physiques sur la minéralisation de substrats carbonés dans le sol. *Bulletin de l'institut scientifique, section science de la vie*, 2004-2005, N° : 26-27, 35-38.
156. **Gao, J., Liu, L., Liu, X., Lu, J., Zhou, H., Huang, S., Wang, Z., Spear, P.A. 2008.** Occurrence and distribution of organochlorine pesticides – lindane, p,p' -DDT, and heptachlor epoxide – in surface water of China. *Environment International* 8, 1097-1103.
157. **Garaba, V., Plesca, V., Isac, I. 2005.** Les POP, l'environnement et la santé. *L'environnement* 1 (18): 38-41.
158. **Gavrilescu, M. 2005.** Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.* 5(6): 497-526.
159. **Geetha, S., Nalini, M. and Jyothi, K. 2016.** Effect of pesticides on *Aspergillus niger* from agricultural soil. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Volume 5, Issue 5, 731-739.
160. **Gerber, H.R., Anderson, J.P.E., Bügel-mogensen, B., Castle D., Domsch, K.H., Malkomes, H.-P., Arnold, D.J., Van de werf, H., Verbeken, R., Vonk, J.W. 1989.** Revision of recommended laboratory tests for assessing side-effects of pesticides on soil microflora. 4th Int. Workshop, Basle, Bundesforschungsanstalt, Braunschweig.
161. **Gerecke, A. C., Scharer, M., Singer, H. P., Muller, S. R., chwarzenbach, R. P., Sagesser, M., Ochsenbein, U., and Popow, G. 2002.** Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants--current situation and reduction potential. *Chemosphere*. 48(3); 307-315.

162. **Gevao, B., Semple, K. T., & Jones, K. C. 2000.** Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, 108(1), 3–14.
163. **Gil, Y. and Sinfort, C. 2005.** Emission of pesticides to the air during sprayer application : A bibliographic review. *Atmospheric Environment*, 39(28), 5183–5193.
164. **Giroux, I. 2003.** Contamination de l'eau souterraine par les pesticides et les nitrates dans les régions en culture de pomme de terre. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Ministère de l'environnement gouvernement du Québec.
165. **Gourdon, R. 2002.** Aide à la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables Association RECORD, n°00-0118/1A, 151 p.
166. **Gouy, V. et Gril, J. 2003.** Diagnostic de la pollution diffuse par les produits phytosanitaires et solution correctives. Communication-Groupe Français des pesticides (GFP) : transfert des produits phytosanitaires, diagnostic de pollution et solution correctives. Lyon, France 15-17 mai 2001. Cemagref Edition, BP22-92162. Antonym Cedex, France.
167. **Gouy V., Boivin, A., Gril, J.J., Carluer, N. 2007.** Quantification et maîtrise des flux de pesticides de la parcelle au bassin versant : intérêt et limites des zones tampons enherbées et boisées. Dans : Azote, Phosphore et Pesticides. Les nouvelles stratégies de réduction des flux en amont. Communication lors de la Journée Scientifique et Technique ENGEES-ULP-LIFE-ASTEE 08 février 2007.
168. **Grébil, G., Novak, S., Perrin-Ganier, C., Schiavon, M. 2001.** La dissipation des produits phytosanitaires appliqués au sol. Ingénierie EAT.
169. **Gril, J. J., Gouy, V. et Carluer, N. 1999.** Processus de transfert superficiel des produits phytosanitaires, de la parcelle au bassin versant. *La Houille Blanche*, (5), 76–80.
170. **Guermouche Mrassi, A. 2014.** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse de doctorat Univ. Oran 166p.
171. **Guerrero, R., et Berlanga, M. 2006.** Life's unity and flexibility: the ecological link. *Int Microbiol* 9:225-235.
172. **Guigon-Moreau, E. 2006.** Transferts des pesticides vers les eaux superficielles et l'atmosphère : Caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle –Thèse : Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 251 p.
173. **Guillard, C., Fischer, M., Herrmann, J.M., Agüera, A., Tejedor, A., Piedra, L., Fernandez-Alba, A. 2001.** "Analyse des métabolites de dégradation photo catalytique

de divers pesticides dans les eaux de la région d'Almeria (Espagne) ", Actes du 30^{ème} congrès du groupe français des pesticides, pp : 29-37.

H

174. **Hai, F. I., Modin, O. Yamamoto, K.Fukushi, K.Nakajima, F. andNghiem, L. D. 2012.**Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, vol.43, no.3, pp.459–462.
175. **Hakkarainen, M. 2001.**Aliphatic polyesters: Abiotic and biotic degradation anddegradation product. In: Albertsson AC (ed) Degradable aliphatic polyesters. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 113–138.
176. **Haladik, M.L., Hsiao, J.J., Robert, A.L. 2005.** Are neutral chloroacetamide herbicide degradates of potential environmental concern? Analysis and occurrence in the Upper Chesapeake bay. Environmental Science and Technology 39:6561-6574.
177. **Hall, R.J. 1987.** Impact of pesticides on bird populations. In G.J. Marco *et al.*: Silent spring revisited. Am. Chem. Soc., Washington, DC, USA, 85-111.
178. **Hanson, M.L., Sibley, P.K.,Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G. 2002.** Trichloroacetic acid (TCA) and trifluoroacetic acid (TFA) mixture toxicity to the macrophytes *Myriophyllumspicatum* and *Myriophyllumsibiricum* in aquatic microcosms. Science of Total Environment. 285, 247–259.
179. **Hanumantharaju, T.H., Awasthi, M.D. 2004.** Persistence and Degradation of Metalaxyl, Mancozeb fungicides and its Metabolite Ethylenethiourea in soils. Ind. J Environ. Health. 46: 312–231.
180. **Harms, H., Schlosser, D., Wick, L.Y. 2011.** Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nat. Rev. Microbiol. 9, 177-192.
181. **Hassaine, A. 2016.**Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda. Thèse de Doctorat en Sciences en Biologie Végétale. Univ Annaba.
182. **Hceflcd, 2006.** Etude sur la pisciculture au barrage Almassira, CR dar CHAFAAI, Cercle d'ELBROUGE, Province de Settat, 201p.
183. **Heider, J., and Fucks, G. 1997.** Anaerobic metabolism of aromatic compound. Eur. J. Biochem. 243:677-696.

- 184. Heimbach, F. 1997.** Field tests on the side effects of pesticides on earthworms: Influence of plot size and cultivation practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, pp: 671-676.
- 185. Hesketh, N., Jonesa, M.N., Tipping, E. 1996.** The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 327, pp: 191-201.
- 186. Hesterberg, D. 1998.** Biogeochemical cycles and processes leading to changes in mobility of chemicals in soils. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **67**, 121-133.
- 187. Himmi, N., Fekhaoui, M., Foutlane, A., Bourchic, H., El Maroufy, M., Benazzout, T., & Hasnaoui, M. 2003.** Relazione plankton-parametri fisici chimici in un bacino dimaturazione (laguna mista beni slimane – Morocco. *Rivista di idrobiologia*. Universitadegli studi di Perugia, dipartimento di biologia animale ed ecologia laboratoire di idrobiologia “G.B. Grassi”, 110–111p
- 188. Höfte, M., et Altier, N. 2010.** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* 161: 464-471.
- 189. Holland, J.M., Frampton, G.K., Çilgy, T., Wratten, S.D. 1994.** Arable acronyms analysed - a review of integrated arable farming systems research in Western Europe. *Ann. appl. Biol.*, 125, 399-438.
- 190. Holman, I.P., Dubus, I.G., Hollis, J.M., Brown, C.D. 2004.** Using a linked soil model emulator and unsaturated zone leaching model to account for preferential flow when assessing the spatially distributed risk of pesticide leaching to groundwater in England and Wales. *The Science of the Total Environment* 318, 73-88.
- 191. Horvath, R. S. 1972.** Cometabolism of the herbicide, 2,3,6-trichlorobenzoate by natural microbial populations. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 7, 273-276.
- 192. Hughes Martiny, J.B., Bohannon, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L. 2006.** Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Micro* 4: 102.
- 193. Huynt, T. H. 1990.** Effet des pesticides sur les zoocoenoses de gastéropodes

I

- 194. IBGE. 2005.** Qualité physico- chimique et chimique des eaux de surface: cadre général. Les données de l'IBGE : "L'eau à Bruxelles" Novembre 2005.

- 195. Ifen.2007.** Institut français de l'alimentation. Les pesticides dans les eaux, données 2005, numéro D9. 43 p.
- 196. INERIS. 2005.** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Institut national de l'environnement industriel et des risques.
- 197. INERIS 2014.** Valeur guide Environnementale mancozebe– n° CAS : 8018-01-7
- 198. Inoue, A., and K. Horikoshi. 1989.** A *Pseudomonas* thrives in high concentration of toluene. *Nature (London)* 338:264–265.
- 199. INRA-Cemagref. 2005.** pesticides, agricultures, environnement, Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. INRA-Cemagref.

J

- 200. Jablonowski, N. D., Linden, A., Köppchen, S., Thiele, B., Hofmann, D., & Burauel, P. 2012.** Dry–wet cycles increase pesticide residue release from soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), 1941–1947.
- 201. Jacobsen, C. S. 1997.** Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil* 189:139-144.
- 202. Jain, R., Garg, V. 2015.** Degradation of Monocrotophos in Sandy Loam Soil by *Aspergillus sp.* *Iranica Journal of Energy and Environment*, 6 (1): 56-62.
- 203. Jarvis, N. J. 2007.** A review of non-equilibrium water flow and solute transport in soil macropores: principles, controlling factors and consequences for water quality. *European Journal of Soil Science*, 58(3), 523–546.
- 204. Jensen, A.A. 1983.** Chemical contaminants in human milk. *Res.Rev.*, 89, 1-128.
- 205. Jim, C. S. and Van Veld, P. A. 1983.** Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure, time, inoculum, and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:428-435.
- 206. John, P.J., Bakore, N., Bhatnagar, P. 2001.** Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. *Environmental International* 26: 231-236.
- 207. Johnson, A.C., Haria, A. H., Bhardwaj, C.L., Williams, R.J., Walker A. 1996.** Preferential flow pathways and their capacity to transport isoproturon in a structured clay soil. *Pesticide science*, 48 : 225-237.

- 208. Jose, F. 1999.** Essai de biodegradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3ème édition. Dunad. Paris. P.102-116.
- 209. Joshi, S.C., Mathur, R., Gajraj, A., Sharma, T. 2003.**Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. Environmental Toxicology and Pharmacology, 14, pp: 91-98.
- 210. JouSims, G. K., Sommers, L. E., et Konopka, A. 1986.** Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil. Applied Environmental Microbiology, 51, 963-968. Journal of Soil Science, 83, 303-309.
- 211. Juhasz, A. L., et Naidu, R. 2001.** Extraction and recovery of organochlorine pesticides from fungal mycelia. Journal of microbiology methods, 39, 149-158.
- 212. Jurado-Exposito, M., Walker, A. 1998.** Degradation of isoproturon, propylsamide and alachlor in soil constant and variable incubation condition, Soil Sciences, 5, p 339-348.

K

- 213. Kalita, P.K., Algoazany, A.S., Mitchell, J.K., Cooke, R.A.C., Hirschi, M.C. 2006.** Subsurface water quality from a flat tile-drained watershed in Illinois, USA. Agriculture, Ecosystems and Environment 115, 183-193.
- 214. Kamal, M.Z., Nashwa, A.H., Fetyan, A., Ibrahim, A.M. and El-Nagdy, S. 2008.** Biodegradation and Detoxification of Malathion by *Bacillus thuringiensis* MOS-5. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2(3) 724-732.
- 215. Kan, C.A., Meijer, G.A.L. 2007.** The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. Animal feed science and technology 133:84-108.
- 216. Karabi Biswas, Dipak Paul, Sankar Narayan Sinha. 2015.** Biological Agents of Bioremediation: A Concise Review. Frontiers in Environmental Microbiology; 1(3): 39-43.
- 217. Kargi, F., Eker, S. 2004.** Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture, Enz. Microbiol. Technol., 2004, 35, 424-428.
- 218. Karishma, B., Prasad, S.H. 2015.** Isolation, Characterization and Growth Studies of Malathion Insecticide Degrading Bacteria. International Journal OF Environmental Sciences Volume 6, No 5.
- 219. Katagi, T. 2008.** Surfactant effects on environmental behavior of pesticides. In D. M. Whitacre (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, number 194

- in Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (pp. 71–177). Springer New York.
- 220. Kaufmann, k. 2004.** Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).
- 221. Kelley, J.R., Duggan, J.M. 2003.** Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Clinical Epidemiology*, 56, pp: 1-9.
- 222. Kessraoui, A. 2008.** Dégradation des pesticides chlortoluron, carbofurane et bentazone en milieux aqueux par les procédés d'oxydation avancée. Thèse de doctorat. Univ.Paris Est. 151p.
- 223. Khalaf, G., Slim, K., Saad, Z. et Nakhlé, K.2007.** Evaluation de la qualité biologique des eaux du Nahr el Jaouz (Liban) : application des méthodes indicielles. *Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon.*, 76 (9–10) : 255- 268.
- 224. Kilbane, J.J., Chatterjee, D.K., Karns, J.S., Kellog, S.T. et Chakrabarty, A.M. 1982.** Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* (44), 72-78.
- 225. Kilbane, J. J., Chatterjee, D. K.etChakrabarty, A. M. 1983.** Detoxification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. *AppliedEnvironmental Microbiology*, 45, 1697-1700.
- 226. Köhler, H.R., and Triebkorn, R.2013.** Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond. *Science*. 341, 759–765.
- 227. Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Lee, E. A., Meyer, M. T., Furlong, E. T. and Glassmeyer, S. T. 2006.**Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment* 354(2-3): 191-197.
- 228. Kreiter, S., Esmenjaud, D., Martinez, M., Sforza, R., Thiéry, D., Van Helden, M., Yvon, M. 2008.**Ravageurs de la vigne, 2ème édition, 424 p.
- 229. Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V. 2003.** Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere*, 50, 871–901.
- 230. Kulkarni, A.G., Kaliwal, B.B. 2015.** Bioremediation of Methomyl by Soil Isolate - *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bioremed Biodeg* 6: 281.doi:10.4172/2155-6199.1000281
- 231. Kumar, U., and Agarwal,H.C. 1992.** Fate of [14C]mancozeb in egg plants (*Solanummelongena L.*) during summer under sub-tropical conditions”, *Pestic. Sci.*, 36, 121- 125.

L

- 232. Larsbo, M., Löfstrand, E., de Veer, D. v. A. and Ulén, B. 2013.** Pesticide leaching from two Swedish topsoils of contrasting texture amended with biochar. *Journal of Contaminant Hydrology*, 147, 73–81.
- 233. Laura Ortiz-Hernández Ma. and Enrique Sánchez-Salinas. 2010.** Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26 (1) 27-38.
- 234. Laurent, E. 2008.** Matériaux mésomorphes à empreinte moléculaire pour le développement d'un capteur de pesticide. Thèse de doctorat. Univ. Paris Est. 151p.
- 235. Lavorel, S., and Garnier, E. 2002.** Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* 16: 545-556.
- 236. Lazaro, R., Herrera, A., Bayarri, S., Conchello, P., Arino, A. 1997.** Intake of DDT residues from selected meals of the Aragonese (NE Spain) Diet. *Pesticide Science* 50: 145-147.
- 237. Leblanc, G.A. 1995.** Are environmental sentinels signalling ? *Environmental Health Perspectives*, 103, 888- 890.
- 238. Lecomte, P. 1995.** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Édition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.
- 239. Lecomte, V., Barriuso, E., Bresson, L.M., Koch, C., Le Bissonnais, Y. 2001.** Mobilisation des pesticides par le ruissellement érosif : influence de l'état structural de surface du sol. Actes du 30 congrès du GFP, pp: 69-77.
- 240. Lee, S.E., Kim, J.S., Kennedy, I.R., Park, J.W., Kwon, G.S., Koh, S.C. and Kim, J.E. 2003.** Biotransformation of an Organochlorine Insecticide, Endosulfan, by *Anabaena* Species. *J. Agri. Food and Chem.*, 51: 1336-1340.
- 241. Lennartz, B., Kamra, S., and Meyer-Windel, S. 1997.** Field scale variability of solute transport parameters and related soils properties. *Hydrology and earth system Sciences*.4: 801-811.
- 242. Lerch, T., Dignac, M.F., Nunan, N., Barriuso, E., & Mariotti, A. 2009.** Ageing processes and soil microbial community effects on the biodegradation of soil 13c-2,4-d nonextractable residues. *Environmental Pollution*, 157(11), 2985–2993.
- 243. Lesaffre, B., et Arlot, M.P. 1991.** Maîtrise de l'excès d'eau dans les sols et effets sur l'environnement : impacts du drainage sur le milieu. Salon H2O Grenoble, 28 mars

- 244. Levanon, D. 1993.** Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25:1097- 1105.
- 245. Levario-Carillo, M., Amato, D., Ostrosky-Wefman, P., Gonzales-Horta, C., Corona, Y., Sanin, L.H. 2004.** Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere*, 55: 1421-1427
- 246. Li, S. and McCarthy, S. 1999.** Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials*, 20(1): p. 35-44.
- 247. Lie, E., Bernhoft, A., Riget, F., Belikov, S.E., Boltunov, A.N., Derocher, A.E., Garner, G.W., Wiig Skaare, J.U., 2003.** Geographical distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in polar bears (*Ursus maritimus*) in the Norwegian and Russian Arctic. *The Science of The Total Environment*, 306, pp: 159-170 and intrauterine growth retardation” *Chemosphere*, 55, pp: 1421-1427.
- 248. Linders, J.B.H.J., Jansma, J.W., Mensink, B.J.W.G., Otermann, K. 1994.** Pesticides: benefaction or Pandora's box? A synopsis of the environmental aspects of 243 pesticides. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), report n° 679101014, Bilthoven, Pays-Bas.
- 249. Liss, N., Allen, D.G. 1992.** Microbiological Study of Bleached Kraft Pulp Mill Aerated Lagoon. *JOURNAL OF PULP AND PAPER SCIENCE: VOL. 18 NO.*
- 250. Lissalde, S. 2010.** Application et validation des échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'échantillonnage passif des pesticides dans les eaux du bassin versant charentais. In : thèse de doctorat Univ de Poitiers.
- 251. Liu, L., Li, S., Garreau, H., Vert, M. 2000.** Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) blend films. *Biomacromolecules*, 1(3): p. 350-359.
- 252. Loiseau, L. and Barriuso, E. 2002.** Characterization of the atrazine's bound (nonextractable) residues using fractionation techniques for soil organic matter. *Environmental Science & Technology*, 36(4), 683-689.
- 253. Losada, A., Fernandez, N., Diez, M.J., Teran, M.T., Garcia, J.J., Sierra, M. 1996.** Organochlorine pesticide residues in bovine milk from Leon (Spain). *The science of the total environment* 181: 133-135.
- 254. Lotto, N.T., Cail, M.R., Guedes, C.G.F. and Rosa, D.S. 2004.** The effect of temperature on biodegradation test. *Mater. Sci. Eng. C*, 24: 659-662.

- 255. Louchart, X. 1999.** Transfert de pesticides dans les eaux de surface aux échelles de la parcelle et d'un bassin versant viticole. Étude expérimentale et éléments de modélisation. Thèse de doctorat. École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 263 p.
- 256. Louchart, X., Voltz, M., Andrieux, V., Moussa, R. 2001.** Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. *J. Environ. Qual.*, 30-982-991.
- 257. Louchart, X. and Voltz, M. 2006.** Aging effects on the availability of herbicides to runoff transfer. *Environmental Science & Technology*, 41(4), 1137–1144.
- 258. Lyman, W. R. and Lacoste, R. J. 1975.** New developments in the chemistry and fate of ethylenebis (dithiocarbamate) fungicides. *Environ. Qual. Saf.*, suppl 3, 67-74.

M

- 259. MacGehan, M.B., et Lewis., D.R. 2002.** Transport of particulate ou colloid-sorbed contaminants through soil. Part 1: General principles. *Biosyst. Eng.*, **83**, 255-273.
- 260. Mackay, D., Fraser, A. 2000.** Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental pollution* 110: 375-391.
- 261. Madrigal Monarre, I. 2004.** Rétention de pesticides dans les sols des dispositifs tampon, enherbés et boisés : rôle des matières organiques. PhDthesis, Paris, Institut national agronomique Paris-Grignon.
- 262. Madrigal, M.I. 2004.** Rétention des pesticides dans les sols des dispositions tampon, enherbés et boisés-rôle des matières organiques. Thèse de doctorat. Univ. Toulouse. 264p.
- 263. Mahaut, T., Deleu, R., Rasquin, B., Schiffers, B. 2001.** Comparaison de la toxicité directe et des effets sublétaux de 4 pesticides à l'égard de différents stades de développement d'*Adaliabipunctata* (Coleoptera, coccinellidae). Actes du 30^{ème} congrès du groupe français des pesticides, pp : 183-189.
- 264. Maiga Fatoumata Sokona. 2002.** Manuel du cours d'hygiène du milieu, F.M.P.O.S
- 265. Majewski, M.S., Capel, P.D. 1995.** Pesticides in the atmosphere, distribution, trends and governing factors. Chelsea, Michigan, Ann Arbor Press.
- 266. Makhoukh, M., Sbaa, M. Berrahou, A., VAN.Clooster, M. 2011.** Contribution à l'étude physico-chimique des eaux superficielles de l'oued Moulouya (Maroc oriental) *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n° 09, Décembre 2011, pp. 149-16.

- 267. Malghani, S., Chatterjee, N., Yu, H., Zejiao, L. 2009.** Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 1517-8382.
- 268. Mamy, L. and Barriuso, E. 2007.** Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *European Journal of Soil Science*, 58(1), 174–187.
- 269. Mancozèbe/ décision de réévaluation. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire** Le 30 juillet 2013 (ISSN : 1925-0983)
- 270. Mangels, G. 1991.** Behavior of the imidazolinone herbicides in the aquatic environment. *The Imidazolinone Herbicides*. CRC, Boca Raton, FL, USA, 183-190.
- 271. Mara D, 1980.** Sewage treatment in hot climates. Ed. John Wiley & sons. 168 pp.
- 272. Marcheterre, L., Choudhry, G., and Webster, G. 1988.** Environmental Photochemistry of Herbicides. *Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology*. 103(61-126).
- 273. Marín-Benito, J. M., Brown, C. D., HerreroHernández, E., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M. J., and Rodríguez-Cruz, M. S. 2013.** Use of raw or incubated organic wastes as amendments in reducing pesticide leaching through soil columns. *Science of The Total Environment*, 463–464, 589–599.
- 274. Marliere, F. 2000.** Mesure des pesticides dans l’atmosphère. INERIS (Institut National de l’Environnement Industriel Et Des Risques). Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l’Air.
- 275. Marten, E., Muller, R.J. and Deckwer, W.D. 2003.** Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3): p. 485-501.
- 276. Martinez, M.P., Angulo, R., Pozo, R., Jodral, M. 1997.** Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. *Food and chemical toxicology* 35: 621-624.
- 277. Matsumura, F. 1988.** Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In Matsumura, F and Krishna Murti CR, (eds), *Biodegradation of pesticides*, New York, Academic Press, 3: 67-87.
- 278. Mayer, J.M., Allen, A.L. Dell, P.A., McCassie, J.E., Shupe, A.E., Stenhouse, P.J. Stenhouse, Welch, E.A., Kaplan, D.L. 1993.** Development of Biodegradable Materials ; Balancing degradability and performance. Conference: 205. American Chemical Society national meeting, Denver, CO (United States).

- 279. Meinck, F Stooff, H., Kohlschütter, H. 1977.** Les eaux résiduaires industrielles, 2ème Ed. Masson, paris, 863p.
- 280. Meister, R.T. 1992.** Farm Chemicals Handbook '92. Meister Publishing Company, Willoughby, OH.
- 281. Melgarejo, M. P. et Martínez, V. R. 1992.** El Granado. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- 282. Mercier, P. 1998.** Contribution méthodologique à l'étude des matières en suspension: Application au transfert particulaire en sol drainé. Thèse de l'ENGREF, 198 p.
- 283. Meyer, A., Chrisman, J., Moreira, J.C., Koifman, S. 2003.** Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. Environmental Research, 93, p: 264-271.
- 284. Miglioranza, K.S.B., Aizpun de Moreno, J.E., Osterrieth, M.L., Escalante, A.H. 1999.** Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of « Los Padres » pond watershed, Argentina. Environmental pollution, 105: 91-99.
- 285. Migrain, I., Green, G. A. & Monteil, H. 1993.** Degradation of atrazine in laboratory microcosms: isolation and identification of the biodegrading bacteria. Environmental Toxicological and Chemistry, 12: 1627-1637.
- 286. Millán, S., Sampedro, M. C., Unceta, N., Goicolea, M. A., Rodriguez, E., Barrio, R. J. 2003.** Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. Journal of chromatography A, 995, 135-142.
- 287. Miller, P.C.H., Butler-Ellis, M.C. 2000.** Effects of formulation on spray nozzle performance for applications from ground-based boom sprayers. Crop Protection, 19, 609-615.
- 288. Monard, C. 2008.** Biodégradation des herbicides en sols tempérés – Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol thèse Univ. DE RENNES 1. 251p.
- 289. Mougin, C., Laugero, C., Asther, M., Dubroca, J., Frasse, P., Asther, M. 1994.** Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 705–708.
- 290. Moussaoui, K.M., Boussahe, R., Tchoulak, Y., Haouchine, O., Benmami, M., Dalachia, N. 2001.** Utilisation, évaluation et impacts des pesticides en Algérie. Ecole Nationale Polytechnique. 78 :105-118.

- 291. Mukherjee, I. 2009.** Determination of Pesticide Residues in Honey Samples. Bulletin of environmental contamination and toxicology 83(6) 818–821.
- 292. Mukhtar, H., iqrahizer alinawaz, asad-ur-rehman and ikram-ul-haq. 2015.** biodegradation of endosulfan by *Aspergillusniger* isolated from cotton fields of punjab, Pakistan. Pak. J. Bot., 47(SI): 333-336.
- 293. Mun, R.P., Young, B.W., Boger, D.V. 1999.** Atomisation of dilute polymer solutions in agricultural spray nozzles. J. Non-Newtonian Fluid Mech., 83,163-178.
- 294. Musy, A. 2005.** Cours d'hydrologie générale - l'évaporation et l'interception. <http://echo.epfl.ch/e-drologie/>. [En ligne ; accès le 23-08-08].

N

- 295. Nebie, R.C., Yameogo, T.R. et Sie, S.F. 2002.** Résidus de pesticides dans quelques produits alimentaires de grande consommation au Burkina Faso. Bulletin d'information de la SOACHIM N°4pp 68-78.
- 296. Nedelec, Y. 2005.** Interactions en crues entre drainage souterrain et assainissement agricole. Thèse de l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Paris, 213p.
- 297. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. 1983.** *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. editor
- 298. Neumann, M., Schrluz, R., Schafer Muler, W., Mannheller, W., Liess, M. 2002.** The signification of entry router as point and non point sources of pesticides in small streams. Water Rev., 36, 835-842.
- 299. Neumann, M., Liess, M., and Schulz, R. 2003.** A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. Chemosphere. 51(6); 509-513.
- 300. Newsome, W. H. 1979.** Residues of mancozeb, 2-Imidazoline, and ethyleneurea in tomato and potato crops after field treatment with mancozeb. J. Agric. Food Chem., 27(6), 1188-1190.
- 301. Nopper-Jaunky, A. 2000.** Etude de la volatilisation des pesticides incorporés dans un sol agricole : études expérimentales et modélisation. Thèse soutenue à l'Université Louis Pasteur Strasbourg, 269 pages.

- 302. Nouayti, N., Khattach, D., Hilali, M. 2015.** Evaluation de la qualité physico-chimique des eaux souterraines des nappes du Jurassique du haut bassin de Ziz (Haut Atlas central, Maroc). *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (4): 1068-1081.
- 303. Nowak, K. M., Girardi, C., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer, A. & Kästner, M. 2013.** Contribution of microorganisms to non-extractable residue formation during biodegradation of ibuprofen in soil. *Science of The Total Environment*, 445–446, 377–384.
- 304. Nowak, K. M., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer, A., & Kästner, M. 2011.** Formation and fate of bound residues from microbial biomass during 2,4-d degradation in soil. *Environmental Science & Technology*, 45(3), 999–1006.
- 305. Nystrom, B., Bjornsater, B., Blanck, H. 1999.** Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms – Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. *Aquat Toxicol* 47(1):9–22.

O

- 306. Organisation mondiale de la santé (OMS). 1991.** L'Utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique. Genève.
- 307. Organisation mondiale de la santé (OMS). 2004.** Liens entre l'eau, l'assainissement, l'hygiène et la santé : faits et chiffres - mise à jour de novembre 2004. Genève.
- 308. Ortiz-Hernandez, M.L. and Sanchez-Salinas, E. 2010.** Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agriculture soils in Mexico. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(1): 27-38.

P

- 309. Pan, H. J., et Ho, W. H. 2004.** Determination of fungicides in water using liquid phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Analytica chimica Acta*, 527, 61-67.
- 310. Park, J.S., Wade, T.L. Sweet, S. 2001.** Atmospheric deposition of organochlorine contaminants to Galveston Bay, Texas. *Atmospheric Environment*, 35, pp: 3315-3324.
- 311. Pelizzetti, E., Maurino, V., Minero, C., Carlin, V., Pramauro, E., Zerbinati, O. and Tosato, M.L. 1990.** Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides. *Environ. Sci. Technol.*, 24, p1559-1565.

- 312. Penuela, G.A., Barcelo, D. 2000.** Comparative Photodegradation Study of Atrazine and Desethylatrazine in Water Samples Containing Titanium Dioxide/Hydrogen Peroxide and Ferric Chloride/Hydrogen Peroxide. *Journal of AOAC International* 83:53-60.
- 313. Pfleeger, T., Olszyk, D., Plocher, M., Yilma, S. 2008.** Effects of low concentrations of herbicides on full-season, field-grown potatoes, *Journal of Environmental Quality* 37: 2070-2082.
- 314. Piart, J. 1978.** Etude expérimentale des phénomènes de dégradation de certains insecticides organiques de synthèse. ORSTOM Cahiers ORSTOM, volume 13, N°1, sériebiologie, 1978.
- 315. Picó, Y., Font, G., Mañes, J. 2004.** In *Handbook of food analysis*, 2nd Ed., L. M. L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker, New York, NY, 1072 p.
- 316. Pignatello, J. J. 1999.** The measurement and interpretation of sorption and desorption rates for organic compounds in soil media. *Advances in agronomy*, VOL 69, 69, 1–73.
- 317. Pimentel, D., Levitan, L. 1986.** Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience*, 36, 86-91.
- 318. Pimentel, D. 1995.** Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 8(17-29).
- 319. Postle, J.K., Rheineck, B.D., Allen, P.E., Baldock, J.O., Cook, C.J., Zogbaum, R., Vandebrook, J.P. 2004.** Chloroacetanilide herbicide metabolites in Wisconsin groundwater: 2101 Survey results. *Environmental Science and Technology* 38:5339-5343.
- 320. Pot V., Simunek J., Benoit P., Coquet Y., YRA A., Martinez-Condron M.J. (2005).** “Impact of rainfall intensity on the transport of two herbicides in undisturbed grassed filter strip soil cores : evaluation of equilibrium and non equilibrium transport models”, *J. of Contaminant Hydrology*, 81, 63-68.
- 321. Prescott, M., Harley, P., Klein, A. 2003.** *Microbiologie* 2^{ème} édition. ISBN 1137p

R

- 322. R&H Company. 1987b.** The hydrolytic decomposition of Dithane M-45 at room temperature. DPR Vol. 176-040, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.
- 323. Racke, K. D. & Lichtenstein, E. P. 1985.** Effects of agricultural practices on the binding and fate of 14c-parathion in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 22(1), 1–14.

- 324. Rainey, P.B., Brockhurst, M., Buckling, A., Hodgson, D.J. and Kassen, R. 2005.** The use of *Pseudomonas fluorescens* population to study the causes and consequences of microbial diversity. In Biological diversity and function in soils. Bardgett, R.D.a.U., Michael B. and Hopkins, David W. (ed). Cambridge: Cambridge University Press, pp. 83-99.
- 325. Ramade, F. 1992.** Précis d'écotoxicologie. Ed. Masson 300pp.
- 326. Ramade, F. 2000.** Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Edition: Edi science International, France, 690 p.p428.
- 327. Ramadevi, C., Mitta Mahendra Nath and Muppala GuruPrasad. 2012.**myco degradation of malathion by a soil fungal isolate, *Aspergillus niger*. International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences, Vol. 2 (1), pp.108-115.
- 328. Rani, K., Dhanial, G. 2014.** Bioremediation and Biodegradation of Pesticide from Contaminated Soil and Water - ANoval Approach. *International journal of current Microbiology and Applied Science*; 3(10):23-33.
- 329. Rasmussen, B. F. 1996.** Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. The Science of The Total Environment, 188, pp: S45-S60.
- 330. Regitano, J. B., Koskinen, W. C., andSadowsky, M. J.2006.** Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(4), 1373–1379.
- 331. Renaud, F.G. et Brown, C.D. 2008.** Simulating pesticides in ditches to assess ecological risk (SPIDER): II. Benchmarking for the drainage model. Sci Total Environ. 394(1):124-33.
- 332. Renner, G. and Hopfer,C. 1987.** Subacute toxicity studies on pentachlorophenol (PCP) and the isomeric (TCH, TeC, TCR). Toxicol. Environ. Chem., 14:301-312.
- 333. Revitt, D.,Ellis, J. and Llewellyn, N. 2002.** Seasonal removal of herbicides in urban runoff. Urban Water. 4 13-19.
- 334. Reyes-Perez, E. 2009.** chimie multiphasique des pesticides dans l'air : Distribution et photoreactivité : thèse de doctorat Univ de Strasbourg. 123p.
- 335. Rifai, M. A. 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*. Mycologia.Papers. 116: 1-56.
- 336. Roche, H., Buet, A., Jonot, A., Ramade, F. 2000.** Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crusian carp (*Carassiuscarssius*), and catfish (*Ictalurusnebolosus*) from Vaccares lagoon (Frensh National Reserve of Camargue)- Effects on some physiological parameters. Aquatic Toxicology, 48, pp: 443-449.

- 337. Roda, C. 2012.** Exposition domestique à des polluants chimiques de l'air intérieur : modélisation et évaluation de l'impact sur la santé respiratoire chez le jeune enfant. Thèse de Doctorat de l'Université Paris Descartes, 344p.
- 338. Rodier, J. (1978).** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer, 6ème édition.
- 339. Rodier, J. 2005.** Analyse de l'Eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 8ème édition. Dunod. Paris, 1384p.
- 340. Rodier, J., Bazin, C., Broutin, J.P., Chambon, P., Champsaur, H., Rodi, L. 1996.** L'analyse de l'eau, 8ème édition. DUNOD (Editeur), Paris, France.
- 341. Roger, P., Jacq, V. 2000.** Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Université de Provence Aix-Marseille 1. 99p.
- 342. Roling, W. F. M. and van Verseveld, H. W. 2002.** Natural attenuation: What does the subsurface have in store? *Biodegradation*. **13**: 53–64.
- 343. Rouse, J.D., Sabatini, D.A., Suflita, J. M. and Harwell. J.H. 1994.** Influence of Surfactants on Microbial Degradation of Organic Compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **24**, 325-370.
- 344. Rousseau, S., Hartmann, A., Soulas, G. 2001.** Etudes de souches isolées dégradant l'atrazine. Actes du 30ème congrès du groupe français des pesticides, pp : 78-85.
- 345. Russell, E.W. 1973.** Soil conditions and plant growth. Longman, London.

S

- 346. Sabater, C., Cuesta, A. and Carrasco, R. 2002.** Effects of bensulfuron-methyl and cinosulfuron on growth of four freshwater species of phytoplankton. *Chemosphere*. **46**: 953–960.
- 347. Saha, S.K. and Tsuji, H. 2006.** Effects of molecular weight and small amounts of D-lactide units on hydrolytic degradation of poly(L-lactic acid)s. *Polymer Degradation and Stability*, **91**(8): p. 1665-1673.
- 348. Sakaliene, O., Papiernik, S. K., Koskinen, W. C., & Spokas, K. A. 2007.** Sorption and predicted mobility of herbicides in baltic soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **42**(6), 641–647.
- 349. Saliot, A., Bouloubassi, I., Lipiatou, E. 1992.** Stratégies d'échantillonnage et d'analyse appliquées à l'étude des polluants organiques dans les eaux côtières. *HydroecolAppl*, **4** : 9-12.
- 350. Samake, H. 2002.** Analyse physico-chimique et bactériologique au L.N.S des eaux de consommation de la ville de Bamako durant la période 2000 et 2001. Thèse de Doctorat

- en Pharmacie, 77p.Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto – Stomatologie, Bamako.
- 351. Sánchez-Camazano, M., Ariezo, M., Sánchez-Martin, M. J., Crisanto, T. 1995.**Effect of different surfactants on the mobility of selected non-ionic pesticides in soil. *Chemosphere* 31, 3793-3801.
- 352. Sanchez-Pena, L.C., Reyes, B.E., Lopez-Carrillo, L., Recio, R., Moran-Martinez, J., Cebrian, M.E., Quintanilla-Vega, B. 2004.**Organophosphorus pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agriculture workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, pp: 108-113.
- 353. Sarkar, S., Sreenivasan, S., Premkumar, R. 2009.**Biodegradation of propiconazole by *Pseudomonas putida* isolated from tea rhizosphere. *Plant Soil Environ* 55: 196-201.
- 354. Sauret, N. 2002.** Etude de la distribution des produits de protection des plantes entre les trois phases atmosphériques : Incidences sur la contamination des écosystèmes. Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- 355. Sawadogo, P.W., Traore, O., Topan, M., Tapsoba, K.H., Sedogo, P.M. et Bonzi-Coulibaly, L.Y. 2006.** Variation de la teneur en résidus de pesticides dans les sols de la zone cotonnière du BurkinaFaso. *Journal africain des Sciences de l'environnement* Numéro 1, 29-39.
- 356. Scheunert, I., Mansour, M., Dörfler, U. Schroll, R. 1993.** Fate of pendimethalin, carbofuran and diazinon under abiotic and biotic conditions. *The Science of The Total Environment*, 132, Issues 2-3, pp: 361-369.
- 357. Schiavon, M., Dousset, S., Portal, J.M., Guimont, H.P.H. 1996.** Etude du transfert par les eaux de drainage de divers produits phytosanitaires dans trois sols de Lorraine. Campagne 1994-1995. Rapport d'étude de l'agence de l'eau Rhin-Meuse, CNRS, Institut Polytechnique de Lorraine, ENSAIA Nancy, 13p.
- 358. Schoen, R., Gaudet, J. P., and Elrick, D. E. 1999.** Modelling of solute transport in a large undisturbed lysimeter, during steady-state water flux. *Journal of Hydrology*, 215(1), 82–93.
- 359. Schomburg, C. J., Glotfelty, D. E. and Seiber, J. N. 1991,** Pesticide occurrence and distribution in fog collected near Monterey California, *Environ. Sci. Technol.*, 25, 1, 155-160.
- 360. Scheyer, A. 2004.** Développement d'une méthode d'analyse par CPG/MS/MS de 27 pesticides identifiés dans les phases gazeuse, particulaire et liquide de l'atmosphère.

- Application à l'étude des variations spatio-temporelles des concentrations dans l'air et dans les eaux de pluie. These de Doctorat 208p.
- 361. Schulz, R., 2001.** Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa: importance of a single event. *Water Res.* 35(8); 1869-1876.
- 362. Schulz, R., 2004.** Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpointsource insecticide pollution: a review. *J Environ Qual.* 33(2); 419-448.
- 363. Schwartz, J., Morris, R. 1995.** Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am J Epidemiol*;142: 23-35.
- 364. Senesi, N. 1992.** Binding mechanisms of pesticides to soil humicsubstances. *Science of the total Environment*, 123, 63–76.
- 365. Shivaramaiah, H.M. and Kennedy. I.R. 2006.** Biodegradation of endosulfan by a soil bacterium. *J. Environ. Sci. Health B.*, 41: 895-905.
- 366. Sikkema, J., J. A. M. Bont and B. Poolman.1995.** Mechanisms of membranes toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59: 201-222.
- 367. Silvy, C. 1995.** Quantifications le phytosanitaire II. *Courrier de la cellule environnement de l'INRA*, n° 25.
- 368. Slimes, K., Rämö, S. Welling, L., Nikunen, U. 2006.** Comparison of the behavior of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions. *Agricultural Water Management* Volume 84, Issues 1–2, Pages 53-64.
- 369. Sims, R.C. 1986.** Loading rates and frequencies for land treatment systems. (In R.C. Loehr & J.F. Malina, Jr. (Eds.), *Land Treatment: A Hazardous Waste Management Alternative*. Water Resources Symposium No. 13, Center for Research in Water Resources, the University of Texas at Austin, (pp. 151-170). Austin, TX).
- 370. Singh, B., Kaur, J. and Singh, K. 2012.** Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28(3) 1133-1141.
- 371. Slim, K., Saad, Z., El-Samad, O., Kazpard, V. 2005.** Caractérisation chimique et algologique des eaux superficielles de la rivière Oronte (Liban) dans un climat semi-aride. *Revue Sécheresse*, 16: 31-35.
- 372. Soulas, G. 1985.** La dégradation des pesticides dans le sol. Aspect microbiens et cinétiques. *Science de sol* 1985/2 – pp. 43 - Plaisir-France.

- 373. Soulas, G. 1993.** Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 443-449.
- 374. Spark, K.M., Swift, R.S. 2002.** Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of the Total Environment*, 298, pp: 147-161.
- 375. Spea, R. 1991.** Recognised and possible exposure to pesticides. In W.J. Hayes & E.R. Laws, E.R. : *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 245-274.
- 376. Spencer, W.F. 1970.** Distribution of Pesticides between Soil, Water and Air. *Pesticides in the soil: Ecology, Degradation, and Movement*. Michigan State Univ., East Lansing, pp: 120-128.
- 377. Stamper, D. M., Tuovinen, O. H. 1998.** Biodegradation of the acetanilide herbicide alachlor, metolachlor and propachlor. *Crit. Rev. Microbiol* 24:1-22.
- 378. Stork, A., Witte, R., Führ, F. 1994.** A wind tunnel for measuring the gaseous losses of environmental chemicals from the soil/plant system under field-like conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 1, 234-245.

T

- 379. Tabuc, C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. thèse de doctorat. École nationale vétérinaire de Toulouse. 190p.
- 380. Tatiane, M.Silva, Maria, I., Stets, André M. Mazzetto, Fabiana D. Andrade, Sônia A. V. Pileggi, Paulo R. Fávero, Marcelo D. Cantú, Emanuel Carrilho, Paulo I.B. Carneiro, Marcos Pileggi. 2007.** Degradation of 2,4-d herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:522-525 ISSN 1517-8382.
- 381. Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S. 1993.** Engineering principles and management issues: Integrated solid waste management, London: McGraw-Hill, 978 p.
- 382. Thirugnanam. J. and Senthilkumar, R. 2016.** Degradation of Pesticide by Using Geofungi from Thanjavur District. *Thirugnanam. J et al. Ijsrm.Human*; Vol. 4 (3): 225-230.
- 383. Thomson, W. T. 1994.** *Agricultural Chemicéils*, Book 1, Insecticides. Publications, Fresno, California, 218 pages.

384. **Tigini, V., Prigione, V., Di Toro, S., Fava, F., Varese, G.C. 2009.** Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. *Microb Cell Fact* 8:5.
385. **Tixier, C., Bogaerts, P., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Twagilimana, L., Cuer, A., Bohatier, J., Veschambre, H. 2000.** Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron : structure and toxicity of metabolites. *Pest Manag. Sci.* 56, 455-462.
386. **Toe, A.M., Domo, Y., Hema, S.A.O. et Guissou, I.P., 2000.** Epidémiologie des intoxications aux pesticides et activité Cholinestérasique chez les producteurs de coton de la zone cotonnière de la boucle du Mouhoun , *Etude et Recherches* n°4-5, les pesticides au sahel : utilisation, impact et alternatives pp 39-48.
387. **Tomlin, C. 1994.** *The Pesticides Manual*. 10th Ed, British Crop Protection Council 15p.
388. **Topp, E. 2003.** Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. *Canadian Journal of Soil Science* 83: 303-309.
389. **Torsvik, V. and Ovreas, L. 2002.** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion In Microbiology* 5: 240-245.

U

390. **Ul-haq, I., Roheena, A., Ashraf, H. and Shah A .H . 2002.** Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase. *Biotechnology.* 1 (2-4), p: 61-66.

V

391. **Valenzuela, A. I., Pico, Y., Font, G. 2001.** Determination of five pesticide residues in oranges by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography to estimate daily intake of consumers. *J. AOAC int.*, 84, 901-909.
392. **VanBeinum, W., Beulke, S., Fryer, C., & Brown, C. 2006.** Lysimeter experiment to investigate the potential influence of diffusionlimited sorption on pesticide availability for leaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9152–9159.
393. **Van Den Berg, F., Kubiak, R., Benjey, W.G., Majewski, M.S., Yates, S.R., Reeves, G.L., Smelt, J.H., Van der Linden, A.M.A. 1999.** Emission of the pesticides into the air. *Water Air Soil Pollut.*, 115, 195-218.
394. **Van der Meer, J. R., de Vos, W. M., Harayama, S., et Zehnder, A. J. 1992.** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56, 677-694.

- 395. Van der Werf, H. 1996.** Assessing the impact on the environment. Agriculture, Ecosystems and Environment. 60(81-96).
- 396. Van der Zee, M. 1997.** Structure-Biodegradabilityrelationships of polymeric materials. Thèse à l'université de Twente. Pays-Bas,.
- 397. Viel, J.F., Challier, B., Pitard, A., Pobel, D. 1998.** Brain Cancer Mortality among French Farmers: The Vineyard Pesticide Hypothesis. Archives of environmental Health, 53, pp: 65-70.
- 398. Vogel, T., Ballerini, D. 2001.** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. Bul. Soc. Fr. Microbiol., 16(3) : 204-209.
- 399. Volhardt, K.P. et Schore, N.E. 1995.** Traité de chimie organique. De, Boeck Université, (W.H.Freeman 2 èmeEds.) ,1156p.
- 400. Von Oepen, B., Kördel, W., & Klein, W. 1991.** Sorptionof nonpolar and polar compounds to soils : processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD-guideline 106. Chemosphere,22(3), 285–304.
- 401. Voos, G. et Groffman, P. M.1997.** Relationships between microbial biomass and dissipation of 2,4-D and dicamba in soil. Biology and Fertility of Soils, 24, 106-110

W

- 402. Walker, A., Rodriguez-Cruz, M., and Mitchell, M. 2005.** Influence of ageing of residues on the availability of herbicides for leaching. Environmental Pollution, 133(1), 43–51.
- 403. Ware, G. W. 1994.** The Pesticide Book, 4th Ed. Thomson Publications, Fresno, California. 386 page.
- 404. Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M., BURT, J. P. 1992.** SCS/ ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 123: 1–157.
- 405. Waymann, B. and Rüdel, H. 1995.** Influence of air velocity, application dose, and test area size on the volatilization of lindane. Int. J. Environ. Anal. Chem., 58, 371-378.
- 406. Weber, J. B. 1991.** Fate and behavior of herbicides in soils. Plant sci., 5, 2-3.
- 407. Whelan, M.J., Davenport, E.J., Smith, B.G. 2007.** A globally applicable location-specific screening model for assessing the relative risk of pesticide leaching. Science of The Total Environment 377, 192-206.

- 408. Wolters, A., Linnemann, V., Herbst, M., Klein, M., Schaffer, A. and Vereecken, H. 2003.** Pesticide volatilization from soil: Lysimeter measurements versus predictions of European registration models. *Journal of Environmental Quality*, 32(4), 1183–1193.

X

- 409. X., 2003** Minitab software statistique, version 14.1 pour windows.
- 410. Xing, B., Pignatello, J. J., and Gigliotti, B. 1996.** Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environmental science & technology*, 30(8), 2432–2440.

Y

- 411. Yamaguchi, N., Gazzard, D., Scholey, G., Macdonald, D.W. 2003.** Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predator. *Chemosphere* 50, 265-273.
- 412. Yaron, B. 1989.** General principles of pesticide movement to groundwater. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 26(3–4), 275–297.
- 413. Yates, S. R. 2009.** Analytical solution describing pesticide volatilization from soil affected by a change in surface condition. *Journal of environmental quality*, 38(1), 259–267.
- 414. Ye, F., Xie, Z., Wu, X., Lin, X. 2006.** Determination of pyrethroid pesticide residues in vegetables by pressurized capillary electrochromatography. *Talanta*, 69, 97-102.
- 415. Yi-Cheng, S., Yan-Cheng, C., Zhe-Xian, T., Feng, M.L., Xin-Yue, W., Jing Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T.K., Shibuya, Y., Kamagata, T., Kanagawa & Kurane, R. 2000.** *Burkholderia kururiensis* sp. nov. a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 743-749.
- 416. Young, M. S., Early, M. F., Mallet, C. R., Krol, J. 2001.** Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazim in apple juice. *Journal of AOAC international*, 84, 5, 1608-1613.

- 417. Yunlong, Y., Fengming, S., Zhong, Z. 1997.** Isolation and identification of a broad-spectrum bacterial strain (*Alcaligenessp*) degrading pesticides. Journal of Zhejiang Agricultural University (China). 23: 111-11

Z

- 418. Zambonin, C. G., Cilenti, A., Palmisano, F. 2002.** Solid phase microextraction and gaz chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. Journal of chromatography A, 967, 255-260.
- 419. Zapata, A., Oller, I., Bizani, E., Sánchez-Pérez, J., Maldonado, M., and Malato, S. 2009.** Evaluation of operational parameters involved in solar photo-fenton degradation of a commercial pesticide mixture. Catalysis Today, 144(1-2), 94–99.
- 420. Zgheib, S. 2009.** Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l'usage du territoire. thèse de doctorat Paris 349p.
- 421. Zhang, J., Lan, W., Qiao, C., Jiang, H., Mulchandani, A. et Chen, W. 2004.** Bioremediation of organophosphorus pesticides by surface-expressed arboxylesterase from mosquito on Escherichia Cloi. Biotechnol. Prog. 20: 1567-1571.
- 422. Zhongli, C., Shunpeng, L and Guoping, F. 2001.** Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4922-4925.
- 423. Zimmer, D. 1995.** Drainage, assainissement agricole et crues : un débat qui reste d'actualité géomètre, 7, 36-39.
- 424. Zohair, A., Salim, A.B., Soyibo, A.A., Beck, A.J. 2006.** Residues of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in organically-farmed vegetables. Chemosphere 63 (4): 541-553.