



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTEDES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: TOXICOLOGIE

Intitulé

**Effet des pesticides sur les deux composantes de l'environnement (sol, eau) responsables de leur transfert le long de la chaine alimentaire. Biodégradation d'un fongicide et d'un herbicide par la flore microbienne isolée.**

Presentée par: Mr.BELAZE Abdelhakim

**Membre de Jury:**

|                          |       |                    |                       |
|--------------------------|-------|--------------------|-----------------------|
| Dr. DJEBAR Mohammed-Réda | (Pr)  | Président          | Université de Annaba  |
| Dr. BORDJIBA Ouahiba     | (Pr)  | Directeur de thèse | Université de Annaba  |
| Dr. SERIDI Ratiba        | (Pr)  | Examineur          | Université de Annaba  |
| Dr. TADJINE Aicha        | (Pr)  | Examineur          | Université d'El Taref |
| Dr. GRARA Nadjoud        | (MCA) | Examineur          | Université de Guelma  |

Année universitaire: 2014 /2015

## TABLE DES MATIÈRES

RESUME FRANCAIS

RESUME ANGLAIS

RESUME ARABE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

|  |    |
|--|----|
| 1. Quelques définitions.....   | 04 |
| 2. Classification des pesticides.....  | 05 |
| 3. La consommation des pesticides dans le monde.....   | 09 |
| 3.1. Des stocks de pesticides inutilisés dans le monde.....                                      | 09 |
| 4. Utilisation des pesticides en Algérie.....  | 11 |
| 5. Les propriétés physico-chimiques des pesticides.....  | 11 |
| 5.1. Pression de vapeur ou tension de vapeur.....  | 11 |
| 5.2. Constante de Henry.....   | 11 |
| 5.3. Solubilité dans l'eau ou dans les solvants organiques.....                                  | 11 |
| 5.4. Coefficient de partage octanol/eau.....   | 12 |
| 5.5. Vitesse d'hydrolyse.....  | 12 |
| 5.6. Vitesse de photolyse.....   | 12 |
| 5.7. Dissociation dans l'eau.....  | 12 |
| 5.8. Dose létale 50 (DT50).....  | 12 |
| 5.9. Koc et Kd.....  | 13 |
| 5.10. D'autres paramètres à prendre en compte.....   | 13 |
| 6. Mode d'action.....  | 14 |
| 7. Rétention des pesticides dans le sol.....   | 14 |
| 7.1. Phénomènes d'adsorption-désorption.....   | 16 |
| 8. Réglementation en vigueur pour l'utilisation des produits phytosanitaires : homologation..... | 17 |
| 8.1. Les tests de toxicité.....  | 18 |
| 8.1.1. Les tests de toxicité aiguë (DL50 orale, DL50 cutanée et CL50).....                       | 18 |
| 8.1.2. Les tests de mutagénèse et de génotoxicité.....   | 18 |
| 8.1.3. Les tests de cancérogénèse.....   | 18 |
| 8.1.4. Les tests de toxicité pour la reproduction.....   | 18 |

|  |    |
|--|----|
| 8.1.5 Tests permettant de définir les seuils toxicologiques de référence dans le but d'assurer la sécurité de l'opérateur et du consommateur ..... | 19 |
| 8.1.5.1 AOEL (Admissible Operator Effect Level) .....  | 19 |
| 8.1.5.2 DJA (Dose Journalière Admissible).....   | 19 |
| 8.1.5.3 ARfD (Acute Reference Dose ou dose de référence aiguë) .....   | 20 |
| 8.1.5.4. LMR (Limite maximale de résidus) .....  | 20 |
| 9. Devenir des pesticides dans l'environnement .....   | 20 |
| 9.1. La dispersion .....   | 21 |
| 9.1.1. Le transfert des pesticides vers les eaux souterraines .....  | 21 |
| 9.1.2. Facteurs influençant le transfert des pesticides vers les eaux souterraines .....   | 22 |
| 9.1.2.1. Propriétés des sols .....   | 22 |
| 9.1.2.2. Propriétés des pesticides.....  | 24 |
| 9.1.2.3. Pratiques culturales .....  | 25 |
| 9.1.2.4. Temps de contact sol-pesticide .....  | 25 |
| 9.1.2.5. Facteurs climatiques .....  | 26 |
| 9.2. La volatilisation.....  | 26 |
| 9.3. Ruissellement et lixiviation.....   | 26 |
| 9.4. La bioaccumulation .....  | 27 |
| 9.5. La dégradation.....   | 28 |
| 9.5.1. La dégradation chimique .....   | 28 |
| 9.5.2. La dégradation physique .....   | 29 |
| 9.5.3. La dégradation biotique ou biodégradation.....  | 29 |
| 9.6. La persistance .....  | 29 |
| 10. Toxicité et écotoxicité des pesticides .....   | 30 |
| 10.1. Toxicité sur l'homme .....   | 30 |
| 10.2. Contamination des sols.....  | 31 |
| 10.3. Contamination des eaux superficielles et souterraines.....   | 32 |
| 10.4. Contamination de l'air .....   | 33 |
| 10.5. Effets sur la flore .....  | 35 |
| 10.5.1. Action sur la photosynthèse .....  | 35 |
| 10.5.2. Action sur les membranes cellulaires.....  | 35 |
| 10.5.3. Action sur la division cellulaire .....  | 36 |
| 10.5.4. Action sur l'auxine .....  | 36 |
| 10.6. Effets sur la faune.....   | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 10.7. Effets sur la microflore microbienne des sols et des eaux .....      | 37 |
| <b>CHAPITRE II : ANALYSE DES PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES</b>               |    |
| 1. Introduction .....  | 39 |
| 2. Matériel et méthodes .....  | 41 |
| 2.1. Présentation et localisation de la zone et des stations d'étude ..... | 41 |
| 2.2. Présentation du matériel d'étude utilisé .....                        | 49 |
| 2.2.1. Prélèvements des échantillons de sol .....                          | 49 |
| 2.2.2. Prélèvement des échantillons d'eau de ruissellement .....           | 50 |
| 2.2.3. Méthodes d'analyse des paramètres physico-chimiques du Sol .....    | 50 |
| 2.2.3.1. Les matières organiques .....                                     | 50 |
| 2.2.3.2. Le calcaire total .....   | 51 |
| 2.2.3.3. Le pH eau .....   | 51 |
| 2.2.3.4. Le pH kcl .....   | 52 |
| 2.2.3.5. La conductivité électrique .....                                  | 52 |
| 2.2.3.6. L'humidité .....  | 52 |
| 2.2.4. Analyses des paramètres physico-chimiques de l'eau .....            | 52 |
| 2.2.4.1. Le Ph .....   | 53 |
| 2.2.4.2. La conductivité électrique .....                                  | 53 |
| 2.2.4.3. La demande biologique en oxygène (DBO5) .....                     | 53 |
| 2.2.4.4. La demande chimique en oxygène (DCO) .....                        | 54 |
| 2.2.4.5. Rapport DCO / DBO5 .....  | 54 |
| 2.2.4.6. L'oxygène dissous .....   | 54 |
| 2.2.4.7. Les nitrates et nitrites .....                                    | 54 |
| 2.2.5. Analyses des paramètres physico-chimiques des pesticides .....      | 56 |
| 2.2.5.1. La solubilité (S) .....   | 56 |
| 2.2.5.2. La pression de vapeur (P) .....                                   | 56 |
| 2.2.5.3. La constante de Henry (H) .....                                   | 56 |
| 2.2.5.4. Koc et Kd .....   | 56 |
| 2.2.5.5. Mobilité .....  | 57 |
| 2.2.5.6. Persistance en plein champ .....                                  | 57 |
| 2.2.5.7. Kow .....   | 57 |
| 2.2.5.8. Stabilité dans l'eau .....  | 57 |
| 3. Résultats et discussion .....   | 58 |
| 3.1. Analyses physico-chimique du sol .....                                | 58 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2. Analyses physico-chimique des eaux.....   | 63 |
| 4. Conclusion.....   | 71 |
| <b>CHAPITRE III : ETUDE DE LA MICROFLORE</b>   |    |
| 1. Introduction.....   | 72 |
| 2. Les champignons.....  | 73 |
| 2.1. Classification des moisissures.....   | 74 |
| 2.2. Identification.....   | 75 |
| 2.3. Modes de reproduction.....  | 75 |
| 3. Les bactéries.....  | 76 |
| 3.1. Approches traditionnelles d'identification.....   | 77 |
| 3.2. Identification bactérienne par analyse de l'ADN extrait de l'environnement<br>(approche métagénomique)..... | 78 |
| 3.2.1. Caractérisation des communautés bactériennes.....   | 78 |
| 3.2.2. Apport des nouvelles technologies à haut débit.....   | 80 |
| 3.3. Classification des bactéries.....   | 80 |
| 3.4. Reproduction des bactéries.....   | 82 |
| 4. Matériel et Méthodes.....   | 83 |
| 4.1. Dénombrement de la microflore des sols.....   | 83 |
| 4.1.1. Etalement et incubation.....  | 83 |
| 4.2. Dénombrement de la microflore des eaux de ruissellement.....  | 83 |
| 4.2.1. Etalement et incubation.....  | 83 |
| 4.3. Purification et conservation des isolats du sol et des eaux.....  | 84 |
| 4.4. Expression des résultats.....   | 84 |
| 4.5. Identification de la microflore fongique isolée des eaux et des sols.....                                   | 84 |
| 4.5.1. Identification macroscopique.....   | 85 |
| 4.5.2. Identification microscopique.....   | 85 |
| 4.6. Identification de la microflore bactérienne.....  | 85 |
| 4.6.1. Identification macroscopique.....   | 85 |
| 4.6.1.1. Détermination des principaux types de bactéries.....  | 86 |
| 4.6.2. Observation microscopique morphologique.....  | 86 |
| 4.6.2.1. Réalisation du frottis à l'état frais.....  | 86 |
| 4.6.2.2. Observation microscopique.....  | 86 |
| 4.6.3. La coloration de Gram.....  | 88 |
| 4.6.4. Test oxydase.....   | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.6.5. Test catalase .....  | 88  |
| 4.6.6. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 E.....   | 89  |
| 4.6.7. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 NE.....  | 91  |
| 4.6.7.1. Test NO <sub>3</sub> .....   | 91  |
| 4.6.7.2. Test TRP.....  | 91  |
| 4.6.7.3. Test assimilation.....   | 91  |
| 4.6.7.4. Interprétation .....   | 91  |
| 5. Résultats et discussion.....   | 93  |
| 6. Conclusion.....  | 105 |
| <b>CHAPITRE IV : BIODEGRADATION</b>   |     |
| 1. Introduction .....   | 107 |
| 2. Généralités sur la biodégradation .....  | 108 |
| 2.1. Définition .....   | 108 |
| 2.2. Les mécanismes de l'adaptation .....   | 109 |
| 2.3. Les principales catégories de microorganismes dégradants.....                                      | 110 |
| 2.3.1. Réactions d'hydrolyse .....  | 113 |
| 2.3.2. Réactions redox .....  | 113 |
| 2.4. Les caractéristiques de l'agent biologique (ou du microorganisme) de dégradation<br>efficace ..... | 114 |
| 2.5. Les facteurs influençant la biodégradation des pesticides .....                                    | 115 |
| 2.5.1. Propriétés physico-chimiques des pesticides .....  | 115 |
| 2.5.2. Structure du sol.....  | 115 |
| 2.5.3. Distribution spatiale des microorganismes .....  | 116 |
| 2.5.4. Facteurs environnementaux.....   | 116 |
| 3. Quelques données sur les familles Thiocarbamates, Sulfonylurées, Acétamides.....                     | 116 |
| 3.1. Thiocarbamates .....   | 116 |
| 3.1.1. Généralités.....   | 116 |
| 3.1.2. Nature chimique .....  | 117 |
| 3.1.3. Propriétés physiques et chimiques .....  | 117 |
| 3.1.4. Mode d'action des carbamates .....   | 117 |
| 3.1.5. Photodégradation.....  | 118 |
| 3.2. Les sulfonylurées.....   | 118 |
| 3.2.1. Activité herbicide .....   | 119 |
| 3.2.2. Mode d'action .....  | 120 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.2.3. Propriétés physico-chimiques des sulfonyles   | 120 |
| 3.2.4. Devenir des sulfonyles dans l'eau et dans le sol  | 121 |
| 3.2.4.1. Adsorption au sol   | 121 |
| 3.2.4.2. Mobilité dans le sol  | 122 |
| 3.2.4.3. Persistance et dégradation dans le sol  | 122 |
| 3.2.4.4. Dégradation dans les milieux aqueux   | 122 |
| 3.2.5. Photodégradation  | 123 |
| 3.2.6. Toxicité  | 123 |
| 3.3. Les Acétamides  | 124 |
| 3.3.1. Définition  | 124 |
| 3.3.2. Propriétés physiques et chimiques des acétamides  | 124 |
| 3.3.2.1. Propriétés physiques  | 124 |
| 3.3.2.2. Propriétés chimiques  | 125 |
| 3.3.3. Toxicité des amides   | 125 |
| 4. Matériel et méthodes  | 127 |
| 4.1. Matériel biologique   | 127 |
| 4.2. Les milieux de culture  | 127 |
| 4.3. Les produits chimiques ou pesticides  | 129 |
| 4.3.1. Milraz  | 129 |
| 4.3.2. Chevalier   | 131 |
| 4.4. Préparation des précultures   | 134 |
| 4.5. Etude des capacités cataboliques des espèces microbiennes isolées   | 135 |
| 4.5.1. Cultures  | 135 |
| 4.5.2. Evaluation de la croissance des souches bactériennes sous l'effet des pesticides<br>(Tolérance de la souche vis-à-vis du pesticide) | 137 |
| 4.5.2.1. Mesure du Ph  | 137 |
| 4.5.2.2. Détermination de la de croissance par Turbidimétrie   | 137 |
| 4.5.2.3. Détermination du taux oxygène nécessaire à la dégradation des composés<br>organiques du milieu (DCO)                              | 137 |
| 4.5.2.4. Calcul de la biomasse total (poids sec de l'inoculum)   | 138 |
| 4.6. Evaluation des taux de biodégradation des pesticides par chromatographie en phase<br>Gaseuse  | 138 |
| 4.6.1. Conditions chromatographiques   | 138 |
| 4.6.2. Dosage  | 139 |

|   |     |
|---|-----|
| 5. Résultats et discussion.....   | 139 |
| 5.1. Evaluation de la croissance des souches bactériennes sous l'effet des pesticides<br>(Tolérance de la souche vis-à-vis du pesticide)..... | 139 |
| 5.2. Evaluation des taux de biodégradation des pesticides par CPG.....  | 147 |
| 6. Conclusion.....  | 156 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....   | 158 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....   | 161 |

## Résumé

Les pesticides tuent chaque année 2000 personnes dans le tiers du monde tandis que 25 millions d'ouvriers agricoles sont gravement atteints car la concentration des pesticides est élevée dans l'organisme. Leur présence est observée au niveau de toutes les composantes de l'environnement et de tous les maillons de la chaîne alimentaire en concentrations variables dans le temps. Cette contamination est chronique et peut engendrer des effets carcinogènes, immunosuppresseurs, mutagènes, neurotoxiques et tératogènes.

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes proposés d'évaluer l'effet des deux pesticides (le fongicide milraz, l'herbicide chevalier) largement utilisés pour traiter les cultures céréalières et maraichères dans les régions du Nord-est algérien. Pour ce faire, l'estimation du degré de la pollution des sols et des eaux a été réalisée à partir de l'analyse des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques. L'identification de la microflore microbienne et les capacités métaboliques de dégradation des souches les plus représentatives ont été également déterminées.

Les résultats montrent qu'il existe une pollution des sols et des eaux. Les valeurs de certains paramètres sont différents des normes admissibles

L'étude de la flore microbienne des régions étudiées nous a permis d'obtenir une microflore totale égale à 79115 composée de 51407 espèces bactériennes appartenant à plusieurs familles Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae, pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae, Rhizodiaceae, Rhizopodaceae. Une part importante des espèces inventoriées constitue une liste de microorganismes susceptibles de survivre dans les conditions particulières de substrats fortement contaminés par la présence de plusieurs herbicides, fongicides et insecticides.

Les analyses des paramètres de tolérance font ressortir qu'il y a un bon développement de toutes les souches testées avec une biomasse qui augmente d'une manière assez importante et ce, en présence des deux molécules de pesticides étudiée. Des pH bas ont été relevés après 120 H d'incubation à partir des milieux contaminés par les pesticides et ensemencés par les bactéries. Il est à noter qu'il existe une parfaite corrélation entre l'augmentation du poids sec et la baisse du pH. Les résultats des taux d'oxygènes nécessaires à l'oxydation des molécules organiques (DCO) indiquent que les potentialités métaboliques de la population mixte ne sont pas meilleures que celles des souches pures contrairement à ce qui a été décelé à partir de l'analyse des autres paramètres, poids, pH et densité optique.

Les dosages par CPG montrent que les potentialités cataboliques des trois souches testées varient selon la nature du pesticide et la nature de la souche microbienne. Une meilleure tolérance et une grande affinité de *Burkholderia cepacia* pour les deux molécules ajoutées dans le milieu durant le début de la phase exponentielle de croissance. Les trois espèces bactériennes testées pourraient devenir potentiellement intéressantes quant à leur pouvoir de biodégradation et l'induction de leur système enzymatique de biotransformation, dans des conditions optimum favorables à leur croissance. D'ores et déjà, Il semble que ces souches possèdent un large spectre d'action avec un système enzymatique actif vis-à-vis de ces deux produits phytosanitaires récalcitrant qui sont classés parmi les produits de synthèse à biodégradabilité difficile.

La majorité des profils de la CPG ont révélé l'apparition de nouveau pics pendant la disparition de ces composés, indiquant leur biotransformation par les bactéries, 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.

**Mots clés :** pesticides, biodégradation, bactéries, sol, eau

## Abstract

Pesticides kill every year 2000 people in the third world while 25 million agricultural workers are seriously affected because the concentration of the pesticide is high in the body. Their presence is observed in all components of the environment and of all links of the food chain in varying concentrations in time. This contamination is chronic and can cause carcinogenic, immunosuppressive, mutagenic, neurotoxic and teratogenic.

For all these reasons, we proposed to evaluate the effect of two pesticides (the fungicide Milraz, the herbicide chevalier) widely used to treat cereal and vegetable crops in the regions of North-eastern Algeria. To do so, the estimate of the degree of pollution of soil and water was carried from the analysis of physical-chemical and microbiological characteristics. The identification of the microbial microflora and metabolic capacity degradation of the most representative strains were also determined.

The results show that there is a pollution of soil and water. The values of some parameters are different qualifying standards.

The study of the microbial flora of the regions studied allowed us to achieve a total microflora equal to 79115 composed of 51407 bacterial species belonging to several families Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae, pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae, Rhizodiaceae, Rhizopodaceae. An important part of species inventoried is a list of microorganisms capable of surviving in the particular conditions of heavily contaminated substrates by the presence of several herbicides, fungicides and insecticides.

Analyses of tolerance parameters bring out that there is a good development of all strains tested with a biomass that increases a fairly significant and that, in the presence of the two pesticide molecules studied. Low pH were identified after 120 H in incubation from contaminated environments by pesticides and seeded with bacteria. Note that there is a perfect correlation between the increase in dry weight and lower pH. The results of rate of oxygen necessary to the oxidation of organic molecules (COD) indicate that the metabolic potential of mixed population were not better than those of pure strains contrary to what was found from analysis other parameters, weight, pH and optical density.

GPC assays indicate that the catabolic potential of the three strains tested vary depending on the nature of the pesticide and the nature of the microbial strain. Better tolerability and a high affinity for the two molecules *Burkholderia cepacia* added to the medium during the start of the exponential growth phase. The three bacterial species tested could become potentially

interesting about their biodegradation power and induction of enzymatic biotransformation system, under favorable conditions for their optimum growth. Already, it seems that these strains have a broad spectrum of action with an active enzyme system towards these two recalcitrant pesticides which are classified as difficult biodegradability synthetic products.

Most profiles of the GPC revealed the appearance of new peaks during the disappearance of these compounds, indicating their biotransformation by bacteria, however, from our results it is not excluded that another process like this bioaccumulation is involved in the disappearance of compounds process.

**Keywords:** pesticide, biodegradation, bacteria, soil, water.

## ملخص

إن المبيدات تتسبب في وفاة ما لا يقل عن 2000 شخص سنويا في العالم الثالث، إضافة إلى إصابة حوالي 25 مليون عامل في الزراعة بأمراض خطيرة تعود أساسا إلى التركيز العالي لهذه المبيدات في الجسم، من خلال ملاحظتها على مستوى كل مكونات المحيط و كذا روابط السلسلة الغذائية بتركيز متغير عبر الزمن، هذا التلوث المزمن يولد أعراض سرطانية، إضطرابات في الإستجابة المناعية، طفرات، تسمم الأعصاب، خلق خلايا غير عادية.

لهذه الأسباب إقترحنا تقييم تأثير نوعين من المبيدات (مبيد فطريات *le milraz*، مبيد الأعشاب *le chevalier*) الأكثر إستعمالا لمعالجة محاصيل الحبوب و الخضر في مناطق شمال شرق الجزائر. قمنا بذلك من خلال تقدير درجة تلوث التربة إنطلاقا من تحليل الخصائص الفيزيوكيميائية و الميكروبيولوجية، تحديد السلالات الميكروبية و القدرة الأيضية على تحليل السلالات الأكثر تمثيلا.

أظهرت النتائج أن هناك تلوث في التربة و المياه، حيث أن قيم بعض المعلمات تختلف عن المعايير المقبولة. دراسة الميكروبات من المناطق المدروسة سمحت لنا بالحصول على مجموع بكتيريا كلية تساوي 79115 مكونة من 51407 أنواع بكتيرية تنتمي إلى عائلات عديدة، *Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae, pseudomonadaceae*، *Xanthomonadaceae, Rhizodiaceae, Rhizopodaceae* حصة معتبرة من هذه الأنواع المجردة تشكل قائمة من البكتيريا القادرة على العيش في ظروف خاصة وهي عرضة لتلوث شديد في ظل وجود العديد من مبيدات الأعشاب، مبيدات الفطريات، مبيدات الحشرات.

تحليل المعايير التسامح أظهر تطور جيد لجميع السلالات المختبرة بكتلة حيوية تزداد بشكل هام في وجود جزأين من المبيدات المدروسة. تسجيل حموضة درجة منخفضة بعد 120 ساعة من التحضين إنطلاقا من أوساط ملوثة نتيجة للمبيدات و البكتيريا المزروعة، تجدر الإشارة إلى وجود إرتباط جيد بين الزيادة في الوزن الصافي و إنخفاض درجة الحموضة.

نتائج نسب الأكسجين اللازمة لأكسدة الجزيئات العضوية (DCO) تشير إلى أن الإمكانيات الأيضية لتلك السلالات المختلطة ليست أفضل من تلك الخاصة بالسلالات النقية عكس ما تم الكشف عنه خلال تحليل المتغيرات الأخرى: الوزن، درجة الحموضة، الكثافة الضوئية.

التجريب عبر (CPG) يظهر أن إمكانيات السلالات التقويضية الثلاث المختبرة تتغير حسب طبيعة المبيد و طبيعة السلالة الميكروبية، التسامح جيدة و تجانس بين *Burkholderia cepacia* و الجزيئات المضافة في الوسط خلال بداية مرحلة مضاعفة النمو، إضافة إلى الإعتماد على الأنواع الثلاثة للبكتيريا المختبرة من حيث قدرتها على المساهمة في التحلل البيولوجي و تحريك جهازها الإنزيمي في التحويل البيولوجي و ذلك في شروط مثلى تساعد على النمو.

يظهر أن هذه السلالات تتمتع بجهاز إنزيمي نشط ضد هذين المنتجين المصنفين ضمن المنتجات ذات تركيبة صعبة التحلل البيولوجي.

لقد كشفت أغلب نتائج (CPG) ظهور قمم خلال إختفاء مركباته مشيرة إلى تحولهم بيولوجيا من طرف البكتيريا، و إنطلاقا من النتائج التي توصلنا إليها يمكن القول بأن وجود عملية مشابهة للتراكم البيولوجي أمر غير مستبعد، و أن هذه العملية قد ساهمت في إختفاء المركبات.

**الكلمات المفتاحية: المبيدات - التحلل البيولوجي - البكتيريا - التربة - الماء**



|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1-1.</b> Principaux marchés de pesticides dans le monde .....                         | 10 |
| <b>Figure 1-2.</b> Principaux processus de dissipation des herbicides dans l'environnement..... | 15 |
| <b>Figure 1-3.</b> Transfert des pesticides.....  | 21 |
| <b>Figure 1-4.</b> Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides .....        | 31 |
| <b>Figure 1-5.</b> Cycle de contamination atmosphérique par les pesticides .....                | 34 |
| <b>Figure 2-1.</b> Carte de localisation géographique du site1 contaminé El Karma.....          | 41 |
| <b>Figure 2-2.</b> Carte de localisation géographique du site2 contaminé Guelma.....            | 42 |
| <b>Figure 2-3.</b> Carte de localisation géographique du site témoin Aïn El Assel .....         | 43 |
| <b>Figure 2-4.</b> Diagramme climatique de la région d'El Karma.....                            | 44 |
| <b>Figure 2-5.</b> Courbe de température de la région d'El Karma.....                           | 44 |
| <b>Figure 2-6.</b> Diagramme climatique de la région de Guelma .....                            | 46 |
| <b>Figure 2-7.</b> Courbe de température de la région de Guelma .....                           | 47 |
| <b>Figure 2-8.</b> Diagramme climatique de la région d'Aïn El Assel.....                        | 48 |
| <b>Figure 2-9.</b> Courbe de température de la région d'Aïn El Assel.....                       | 49 |
| <b>Figure 2-10.</b> Taux de matière organique dans les sols traités et le sol témoin.....       | 58 |
| <b>Figure 2-11.</b> Taux de calcaire dans les sols traités et le sol témoin .....               | 59 |
| <b>Figure 2-12.</b> Taux d'humidité dans les sols traités et le sol témoin .....                | 60 |
| <b>Figure 2-13.</b> pH eau et pH kcl des sols traités et le sol témoin .....                    | 60 |
| <b>Figure 2-14.</b> Conductivité électrique des sols traités et le sol témoin.....              | 61 |
| <b>Figure 2-15.</b> Teneurs de la DBO5 des eaux de ruissellement .....                          | 63 |
| <b>Figure 2-16.</b> Teneurs de la DCO des eaux de ruissellement .....                           | 64 |
| <b>Figure 2-17.</b> Taux d'oxygène dissous des eaux de ruissellement .....                      | 65 |
| <b>Figure 2-18.</b> Teneurs en nitrates des eaux de ruissellement.....                          | 65 |
| <b>Figure 2-19.</b> Teneurs en nitrites des eaux de ruissellement.....                          | 66 |
| <b>Figure 2-20.</b> pH des eaux de ruissellement .....  | 66 |
| <b>Figure 2-21.</b> Conductivité électrique des eaux de ruissellement.....                      | 67 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 2-22.</b> Rapport DCO/DBO5 des eaux de ruissellement .....   | 68  |
| <b>Figure 3-1.</b> Les grands groupes des eumycètes .....  | 75  |
| <b>Figure 3-2.</b> Cycle de vie des champignons.....   | 76  |
| <b>Figure 3-3.</b> Microflore totale des eaux de ruissellement .....   | 93  |
| <b>Figure 3-4.</b> Microflore totale des sols .....  | 94  |
| <b>Figure 3-5.</b> Nombre total d'isolats bactériens des eaux de ruissellement .....   | 94  |
| <b>Figure 3-6.</b> Nombre total d'isolats fongiques des eaux de ruissellement.....   | 95  |
| <b>Figure 3-7.</b> Nombre total d'isolats bactériens des sols.....   | 95  |
| <b>Figure 3-8.</b> Nombre total d'isolats fongiques des sols .....   |     |
| <b>Figure 3-9.</b> Les espèces bactériennes communes entre les sites contaminés des sols et des<br>eaux de ruissellement .....           | 96  |
| <b>Figure 3-10.</b> Les espèces fongiques communes entre les sites contaminés des sols et des eaux<br>de ruissellement.....              | 97  |
| <b>Figure 3-11.</b> Les espèces bactériennes communes entre les sites contaminés et témoin des<br>sols et des eaux de ruissellement..... | 98  |
| <b>Figure 3-12.</b> Les espèces fongiques communes entre les sites contaminés et témoin des sols<br>et des eaux de ruissellement .....   | 98  |
| <b>Figure 4-1.</b> Les deux voies de dégradation des pesticides.....   | 111 |
| <b>Figure 4-2.</b> La dégradation ultime .....   | 112 |
| <b>Figure 4-3.</b> Structure chimique générale des carbamates (1), des thiocarbamates (2) et des<br>dithiocarbamates (3).....            | 117 |
| <b>Figure 4-4.</b> Structure chimique générale des sulfonyleurée.....  | 119 |
| <b>Figure 4-5.</b> Structure chimique générale des acétamides .....  | 124 |
| <b>Figure 4-6.</b> Structure chimique de cymoxanil .....   | 130 |
| <b>Figure 4-7.</b> Structure chimique du propinèbe.....  | 131 |
| <b>Figure 4-8.</b> Structure chimique du Mesosulfuron-methyl .....   | 132 |
| <b>Figure 4-9.</b> Structure chimique du Mesosulfuron-methyl .....   | 133 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 4-10.</b> Structure chimique du Mefenpyr-diethyl .....  | 134 |
| <b>Figure 4-11.</b> Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradabilité des molécules de pesticides ..... | 136 |
| <b>Figure 4-12.</b> Turbidité (Do) des échantillons de culture en absence du pesticide.....                                       | 139 |
| <b>Figure 4-13.</b> Turbidité (Do) des échantillons de culture en présence du Milraz.....   | 140 |
| <b>Figure 4-14.</b> Turbidité (Do) des échantillons de culture en présence du chevalier.....                                      | 140 |
| <b>Figure 4-15.</b> pH des culture en présence des souches bactériennes et en absence du pesticide.....                           | 141 |
| <b>Figure 4-16.</b> pH des culture en présence des souches bactériennes et du Milraz.....   | 141 |
| <b>Figure 4-17.</b> pH des culture en présence des souches bactériennes et du Chevalier.....                                      | 142 |
| <b>Figure 4-18.</b> Poids sec de la biomasse total de l'inoculum .....  | 143 |
| <b>Figure 4-19.</b> Poids sec de la biomasse total de l'inoculum .....  | 143 |
| <b>Figure 4-20.</b> Pourcentage de la biodégradation du chevalier et milraz par <i>Aeromonas</i><br><i>Hydrophila</i> .....       | 147 |
| <b>Figure 4-21.</b> Pourcentage de la biodégradation du chevalier et milraz par <i>Pasteurella</i><br><i>pneumotropica</i> .....  | 148 |
| <b>Figure 4-22.</b> Pourcentage de la biodégradation du chevalier et du milraz par <i>Burkholderia</i><br><i>Cepacia</i> .....    | 148 |
| <b>Figure 4-23.</b> Chromatogramme des taux de biodégradation du chevalier par <i>Aeromonas</i><br><i>hydrophila</i> .....        | 149 |
| <b>Figure 4-24.</b> Chromatogramme des taux de biodégradation du chevalier par <i>Pasteurella</i><br><i>pneumotropica</i> .....   | 149 |
| <b>Figure 4-25.</b> Chromatogramme des taux de biodégradation du chevalier par <i>Burkholderia</i><br><i>cepacia</i> .....        | 150 |
| <b>Figure 4-26.</b> Chromatogramme des taux de biodégradation du milraz par <i>Aeromonas</i><br><i>Hydrophila</i> .....           | 150 |
| <b>Figure 4-27.</b> Chromatogramme des taux de biodégradation du milraz par <i>Pasteurella</i>                                    |     |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| <i>Pneumotropica</i> ..... | 151 |
|----------------------------|-----|

**Figure 4-28.** Chromatogramme des taux de biodégradation du milraz par *Burkholderia*

|                      |     |
|----------------------|-----|
| <i>cepacia</i> ..... | 151 |
|----------------------|-----|

### Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1-1.</b> Exemples de pesticides ..... | 07 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1-2.</b> Corrélation entre l'utilisation des pesticides et les rendements agricoles..... | 10 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1-3.</b> Commercialisation des pesticides en Algérie ..... | 11 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1-4.</b> Persistance de certains pesticides..... | 30 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 2-1.</b> Résultats des paramètres physico-chimiques du sol ..... | 58 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 2-2.</b> Classification des sols d'après leur teneur en matières organiques ..... | 59 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 2-3.</b> Gamme de pH des sols..... | 61 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 2-4.</b> Echelle de salinité du sol..... | 62 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 2-5.</b> Résultats des paramètres physico-chimiques des eaux ..... | 63 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 2-6.</b> Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées ..... | 69 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 2-7.</b> Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées ..... | 70 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 3-1.</b> Tableau de lecture du test du système API 20 E..... | 90 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 3-2.</b> Tableau de lecture du test du système API 20 E..... | 92 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 3-3.</b> Liste et taxonomie des espèces bactérienne identifiées au niveau des sols ..... | 99 |
|---|----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 3-4.</b> Liste et taxonomie des espèces bactérienne identifiées au niveau des eaux de ruissellement..... | 100 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 3-5.</b> Liste et taxonomie des espèces fongiques identifiées au niveau des sols..... | 101 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 3-6.</b> Liste et taxonomie des espèces fongiques identifiées au niveau des eaux de ruissellement..... | 101 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 4-1.</b> Evaluation de la DCO en absence du pesticide ..... | 144 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 4-2.</b> Evaluation de la DCO en présence du milraz ..... | 144 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 4-3.</b> Evaluation de la DCO en présence du chevalier..... | 144 |
|--|-----|

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Au siècle dernier, la population a été exposée à une augmentation de l'utilisation des produits agropharmaceutiques. Les progrès dans le développement de produits chimiques de synthèse

ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la production agricole. Faciles d'accès et d'emploi, relativement peu chers, les produits phytosanitaires de synthèse ou pesticides se sont révélés très efficaces dans un nombre important de cas.

Cependant, au cours de ces dernières années, l'intérêt de l'opinion publique mais aussi des chercheurs à l'égard de l'utilisation des pesticides et de ses conséquences sur l'environnement n'a cessé d'augmenter. L'utilisation systématique de ces produits est remise en question, avec la prise de conscience croissante des risques qu'ils peuvent générer pour l'environnement, voire pour la santé de l'homme. Les études les plus fréquentes concernent la présence de ces molécules dans le sol (Fenske et *al.*, 2002), la contamination des eaux et des fruits, (Veillerette, 2001) des légumes (Calvet, 2005), le développement de phénomènes de résistance chez les organismes et les dangers des pesticides au niveau de chaque maillon de la chaîne alimentaire. (Aubertot et *al.*, 2005),

La santé humaine est également en danger, En 2012, l'OMS estimait que les pesticides étaient à l'origine de nombreuses intoxications et de la mort de 220 000 personnes par jour dans le monde et environ 500 millions d'ouvrier agricoles sont gravement atteints. Les pays développés qui utilisent 80% des quantités de pesticide ne comptent que la moitié des cas d'intoxication. Les organes atteints sont principalement les muqueuses, la peau, le système digestif et le système respiratoire.

L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent des grandes quantités de pesticide. Ainsi environ 800 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs. Récemment dans notre pays, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est le milieu agricole d'abord qui utilise le plus de pesticides en termes de variétés et de doses. Cette utilisation à l'échelle nationale des produits phytosanitaires dans les cultures, fait craindre une pollution massive des sols, des eaux superficielles, des nappes souterraines et de toutes les composantes de l'environnement.

Les analyses des résidus de pesticides pour évaluer le degré de contamination des milieux naturels (les sols, les cultures, les eaux superficielles,) ne sont pas faites systématiquement. Des analyses effectuées sur des échantillons d'eau prélevés dans la région de Staouali (Alger) et de Annaba ont montré que dans plus de 30% des échantillons, la concentration de certaines molécules organochlorées et organophosphorées dépasse les valeurs préconisées par

l'O.M.S (Moussaoui *et al.*, 2001). Les pesticides sont dans nos assiettes ; les fruits, les légumes, les denrées alimentaires végétales et animales contiennent des résidus de pesticides ; tous les maillons de la chaîne alimentaire sont ainsi contaminés.

Cette situation est d'autant plus préoccupante que l'usage des pesticides doit être répété périodiquement. Cette répétition au long terme, entraîne nécessairement une accumulation en pesticides et de leurs résidus dans nos milieux naturels, mettant en danger toute la population par leur toxicité multiforme. Il paraît désormais indispensable de s'interroger sur les effets néfastes susceptibles d'être induits par une exposition aux pesticides.

A travers ce travail de recherche, nous nous sommes interrogés sur ces produits agro-pharmaceutiques ou pesticides et leurs effets.

- Quels sont les risques à long terme d'une exposition régulière à ces produits ?
- Qu'en est-il plus particulièrement des sols et des eaux ?
- Est-il possible d'évaluer le degré de pollution d'un site contaminé ?
- Peut-on évaluer l'étendue de la contamination par des méthodes fiables ?
- Les doses de pesticides accumulées à la suite des traitements répétés d'une manière aléatoire, pourraient-elles engendrer des conséquences négatives sur le développement et le maintien de la biomasse microbienne et affecter cette microflore sur le plan quantitatif et qualitatif ?
- Et enfin peut-on trouver parmi la microflore microbienne acclimatée à la présence de pesticides, des agents de biodégradation efficaces afin de les envisager dans les processus de bioremédiation ?

Pour pouvoir répondre à ces questions, nous avons réalisé ce travail qui consiste à évaluer dans une première étape, les effets de deux pesticides (un fongicide, le milraz, et un herbicide, le chevalier, utilisés massivement dans les régions du Nord-est algérien) sur la qualité des sols et des eaux. Le degré de pollution est estimé en tenant compte d'un certain nombre de paramètres physiques et chimiques et microbiologiques.

Dans une seconde étape, nous avons étudié le comportement de quelques microorganismes sélectionnées à partir de la microflore microbienne préalablement inventoriées face à ces produits chimiques. Cette deuxième partie de notre étude se concentre plus particulièrement sur l'interaction entre les molécules de pesticides et les microorganismes étudiés, elle consiste en d'autres termes à déterminer si les molécules de pesticides sont toxiques pour les souches microbiennes ou au contraire sont tolérées et éventuellement dégradables par les souches

étudiées. Cette partie est réalisée dans le but de sélectionner les souches les plus significatives et les plus performantes pour être utilisées dans les processus de biodégradation et de biorémédiation qui constitue le troisième volet de cette thèse. Dans ce volet, nous nous efforcerons de démontrer *in vitro*, les potentialités cataboliques des souches isolées de sols ou des eaux vis-à-vis du pesticide lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture comme étant l'unique source de carbone et d'énergie. Cette partie du travail vise à rechercher des souches sur-exprimant des systèmes enzymatiques efficaces (Kumar, 1999) en acquérant la faculté de s'adapter aux conditions écologiques difficiles de telle sorte qu'elles puissent être utilisées dans les processus de bioremédiation.

# **CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. Quelques définitions**

Le terme "pesticides" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux est dénommée substance active (anciennement dénommée matière active), à laquelle sont associés dans la préparation un certain nombre de «formulants» (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (ACTA, 2005).

Les pesticides à usage agricole peuvent être désignés de différentes façons : produits phytosanitaires pour les firmes qui les fabriquent et les vendent, produits phytopharmaceutiques pour la réglementation européenne et produits agropharmaceutiques pour les scientifiques agronomes.

Dans les textes relatifs à la réglementation européenne, on distingue : les produits phytopharmaceutiques (au sens de la Directive 91/414/CE du 15 Juillet 1991) : ils sont utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture contre les attaques de champignons parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore pour lutter contre les adventices ou "mauvaises herbes". Leurs utilisations peuvent s'élargir dans d'autres secteurs (sylviculture, aménagement des paysages et entretien des abords d'axes de transport, jardinage amateur). (Merhi, 2008).

Le décret n°94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques désigne par produits phytosanitaires « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et destinées à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action.
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance).
- assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que les substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs.

- détruire les végétaux indésirables, ou détruire des parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

Les biocides (au sens de la directive 98/8/CE) : les produits dénommés anciennement « pesticides à usage non agricole » sont maintenant appelés « produits biocides ». Ils concernent « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique». Les biocides sont destinés à des usages domestiques, par exemple dans des applications comme la protection du bois contre les champignons ou les termites, les insecticides ménagers, les produits antiparasitaires (anti-acariens, antipuces), etc. (Merhi, 2008).

## 2. Classification des pesticides

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées: les herbicides, les fongicides et les insecticides.

- **Les insecticides** : sont des produits capables de provoquer la mort des insectes, parmi les insecticides on peut citer : les carbamates, les pyréthroides, les organophosphorés, et les organochlorés.
- **Les herbicides** : ce sont des produits chimiques complexes destinés au contrôle des mauvaises herbes et de végétations ligneuses. Les herbicides agissent sur une cible biochimique d'action, parfois plusieurs, la conséquence est généralement le blocage d'une fonction, avec des répercussions dommageable pour la cellule végétale.
- **Les fongicides** : les fongicides sont des produits chimiques utilisés pour lutter contre les champignons et les moisissures. Ils sont le plus souvent de nature synthétique (Anonyme, 2005). Les fongicides ont plusieurs actions, une action biochimique, action sur les métabolites, et une action sur les liaisons vanderwals, hydrogènes, ioniques, covalentes (Devillers et *al.*, 2005).

Les pesticides peuvent être classés selon :

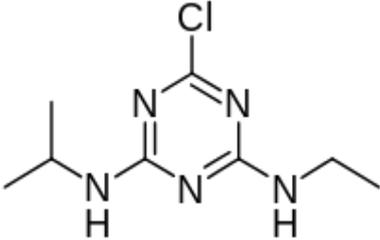
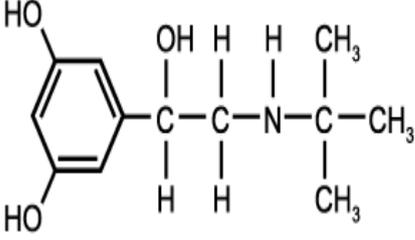
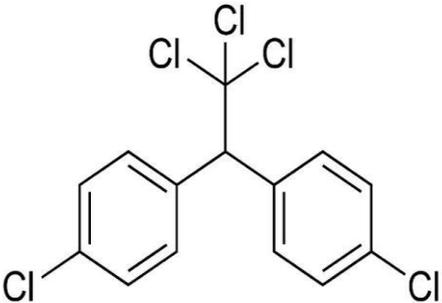
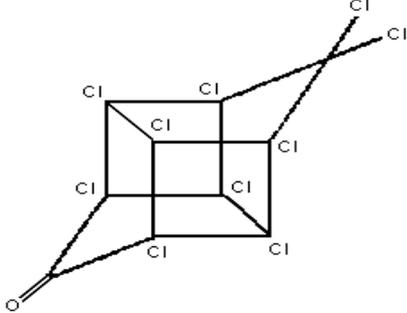
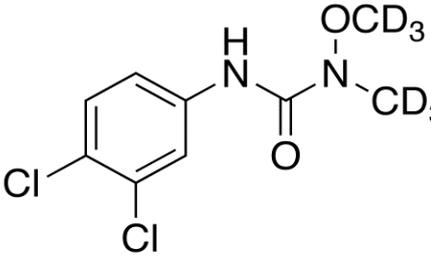
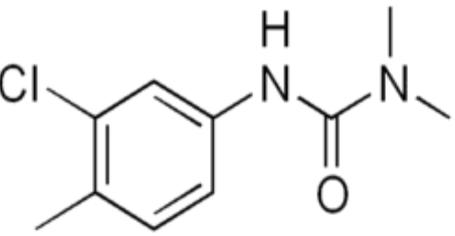
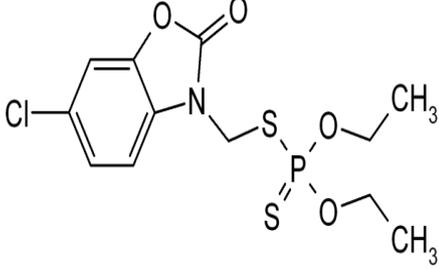
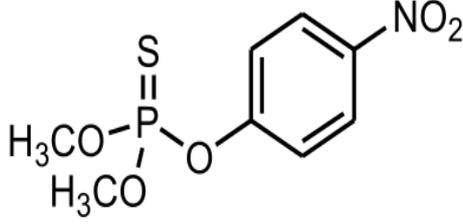
- **l'organisme visé** : Les produits phytosanitaires peuvent être classés en fonction des organismes-cibles qu'ils visent. On parle d'insecticides ou de fongicides polyvalents, herbicides totaux, produits sélectifs ou spécifiques. Selon les derniers chiffres donnés par

l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP, 2009), plus de 78 000 tonnes de substances actives ont été commercialisées en France en 2008. Les fongicides représentent 48% des tonnages de matières actives commercialisées en France, suivis par les herbicides avec 40% du volume total des ventes (UIPP, 2009).

- **La nature chimique :** Les pesticides peuvent être également classés en fonction de leur nature chimique en molécules inorganiques, organométalliques et organiques. Les pesticides organiques, de loin les plus nombreux, appartiennent à plus de 80 familles chimiques. Ces familles sont définies par un groupe d'atomes qui constituent une structure de base. La présence de certains groupements fonctionnels et/ou atomes confère aux pesticides certaines propriétés physico-chimiques (ionisabilité, hydrophobie, solubilité, persistance). Par exemple, un pesticide possédant un groupement donneur ou accepteur de proton est susceptible de s'ioniser. Un pesticide comprenant des atomes de chlore est généralement récalcitrant à la dégradation. Toutefois, il est important de souligner que la connaissance de la famille chimique à laquelle un pesticide appartient ne suffit pas à elle seule à la définition de ses propriétés ni à la prédiction de son comportement dans l'environnement.

Parmi les familles qui suscitent le plus d'intérêt dans le monde, citons les triazines (Cl/N), les organochlorés (Cl), organophosphorés (P), les carbamates (N) et les thiocarbamates (N/S). Ces familles sont regroupées dans le tableau suivant.

**Tableau 1-1.** Exemples de pesticides

| Famille chimique  | Exemples de pesticides   |
|-------------------|--|
| Triazines         | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Atrazine</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Terbutylazine</p> </div> </div>   |
| Organochlorés     | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>DDT</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Chlordécone</p> </div> </div>        |
| Urées substituées | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Linuron</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Chlorotoluron</p> </div> </div> |
| Organophosphorés  | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Phosalone</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Parathion</p> </div> </div>   |

Les triazines comptent parmi les plus anciens herbicides, les recherches sur ces composés ayant commencé dans les années 50. Dans cette classe, on trouve l'atrazine, l'un des herbicides les plus employés dans le monde. L'utilisation de l'atrazine est interdite en France depuis 2003 et dans l'Union Européenne depuis 2007 avec la décision 2004/141/CE à cause des risques écotoxicologiques et de pollution des eaux souterraines que présente cet herbicide. Selon une étude de l'Ifen (2007), l'atrazine et ses trois métabolites (l'atrazine déséthyl, l'atrazine déisopropyl et la 2-hydroxyatrazine) figurent parmi les substances les plus quantifiées en 2005 dans les eaux souterraines en France.

Les organochlorés sont représentés par un grand nombre de composés chimiques contenant plusieurs atomes de chlore. Deux insecticides connus de cette famille sont le dichlorodiphényltrichloroéthane, plus connu sous le nom de DDT, et le chlordécone présentant des effets néfastes pour la vie animale, l'usage du DDT en agriculture a été interdit dans la plupart des pays développés au cours des années 1970 et 1980 mais reste aujourd'hui encore toléré dans les pays tropicaux pour la lutte contre les épidémies telles que le paludisme et le typhus. Quant au chlordécone, ce composé pose actuellement le problème d'une contamination généralisée des écosystèmes antillais où il n'a été interdit qu'en 1993, alors qu'il est interdit en France métropolitaine depuis 1990 et aux Etats-Unis depuis 1976 (Bocquene et Franco, 2005 ; Coast et *al.*, 2006). Toxiques, bioaccumulés dans les tissus vivants et lentement dégradés dans les sols, ces deux composés organochlorés (DDT et chlordécone) réunissent les critères qui permettent de les considérer comme des polluants organiques persistants.

- **Les activités biologiques :** On parle des composés à action purement physique ou des produits à action physiologique ou biologique.
- **Le mode de pénétration :** On distingue les pesticides d'ingestion, les pesticides d'inhalation et les systémiques qui sont absorbés par les végétaux dont la sève devient toxique pour le prédateur. De la même façon on distingue les insecticides de contact et ceux de la translocation interne.
- **L'utilisation :** Les pesticides peuvent être utilisés soit en traitement préventif (prophylactiques) soit en traitement curatif (thérapeutique) dont l'effet peut être local (topique) ou général (systématique).
- **Epoque d'application :** Pesticides de post-semi ou de pré-semi, et de post ou prélevée.

### **3. La consommation des pesticides dans le monde**

Pas loin de 1000 euros de pesticides sont consommés chaque seconde dans le monde, soit un marché d'environ 30 milliards d'euros, à peu près stable depuis 2000.

Les Etats-Unis sont le premier consommateur mondiale de pesticides, suivent l'Inde, la France, 1er consommateur en Europe, puis l'Allemagne. Malgré les recommandations du Grenelle de l'environnement, la France est toujours championne de l'utilisation des produits phytosanitaires en Europe. Le Japon utilise 12 kg et est le 1er consommateur de pesticides à l'hectare, l'Europe, 3 kg, les Etats-Unis, 2,5 kg, l'Inde, gros producteur, 0,5 kg/ha.

En Europe et en Amérique du Nord, les herbicides représentent 70 à 80% des produits utilisés (notamment à cause de la forte augmentation des cultures de maïs) tandis que sous les tropiques, 50% des produits appliqués sont des insecticides. La diversification des cultures, avec l'amélioration du niveau de vie dans certains pays, modifie également cet équilibre, ainsi la Chine a converti l'équivalent de la surface de l'Angleterre de rizières en cultures maraîchères, entraînant une diversification des produits mis en œuvre.

La consommation mondiale de pesticide est en augmentation constante depuis les années 40, passant de 0,49 kg/ha en 1961 à 2 kg/ha en 2004. 20% de la surface totale des Etats-Unis, 35% de celle de la France, sont soumis à des traitements.

#### **3.1. Des stocks de pesticides inutilisés dans le monde**

Selon la FAO, d'importants stocks de pesticides inutilisés ou périmés menacent les populations. L'Ukraine détiendrait environ 19.500 tonnes de produits chimiques périmés, la Macédoine 10.000 tonnes, la Pologne 15.000 tonnes, la Moldavie 6.600 tonnes. En Asie, les stocks s'élèveraient à 6.000 tonnes, sans compter la Chine. Les pays du Moyen-Orient et de l'Amérique latine ont déclaré environ 10.000 tonnes (Dgccr ; Simagref, 2005 ; Ifen 2006).

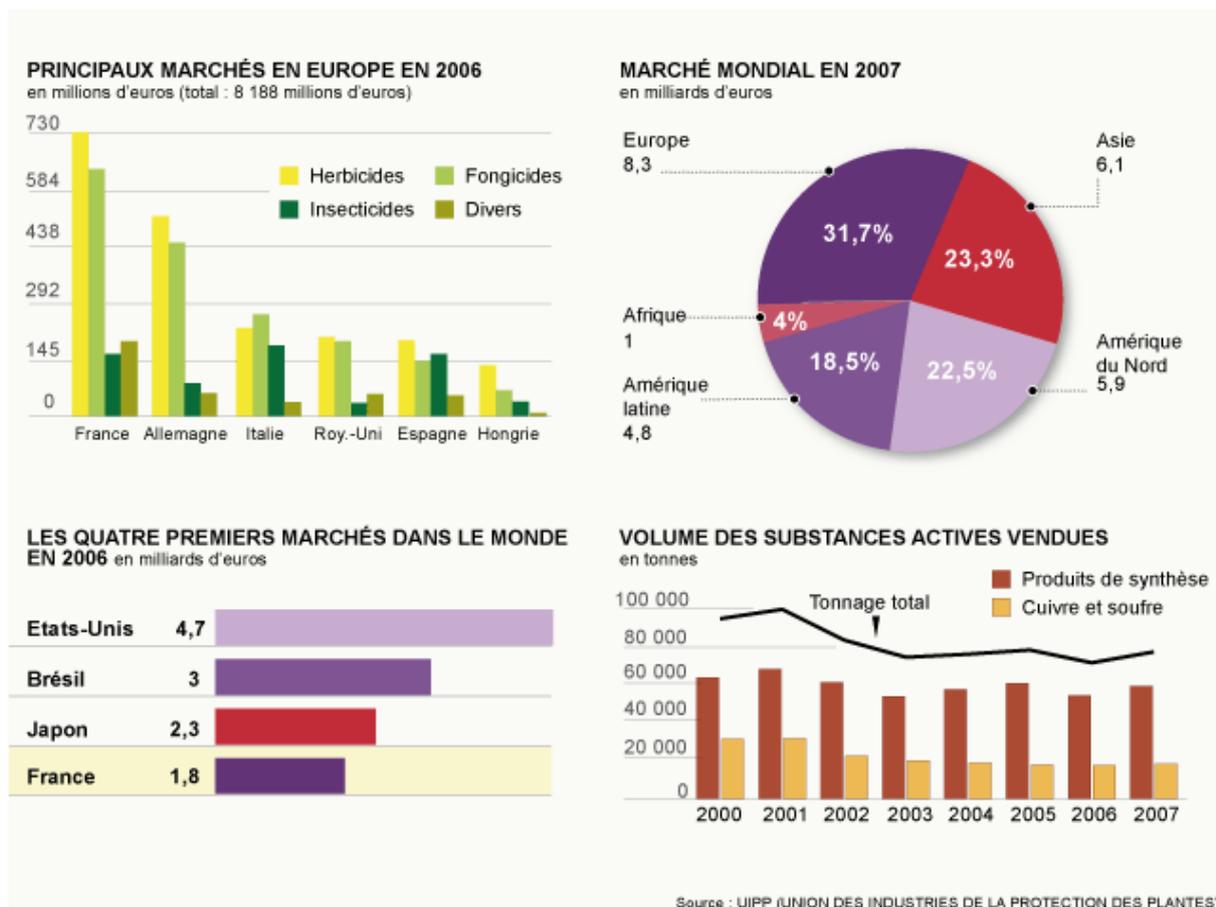


Figure 1-1. Principaux marchés de pesticides dans le monde

Tableau 1-2. Corrélation entre l'utilisation des pesticides et les rendements agricoles (Moussaoui, 2001)

| Pays ou Région  | Dose d'emploi<br>(kg/ ha) | Rang mondial<br><u>Utilisation</u> | Rendement<br>(T/ ha) | Rang mondial<br><u>Production</u> |
|-----------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Japon           | 10,8                      | 1                                  | 5,5                  | 1                                 |
| Europe          | 1,9                       | 2                                  | 3,4                  | 2                                 |
| U.S.A           | 1,5                       | 3                                  | 2,6                  | 3                                 |
| Amérique latine | 0,22                      | 4                                  | 2,0                  | 4                                 |
| Océanie         | 0,2                       | 5                                  | 1,6                  | 5                                 |
| Afrique         | 0,13                      | 6                                  | 1,2                  | 6                                 |

#### 4. Utilisation des pesticides en Algérie

Près de 6 000 à 10 000 T / an de pesticides, ce qui représente 10 à 20% des besoins normatifs.

**Tableau 1-3.** Commercialisation des pesticides en Algérie

| COMMERCIALISATION |         |         |         |        |         |
|-------------------|---------|---------|---------|--------|---------|
| Années            | 75-79   | 80-84   | 85-89   | 90-93  | 94-97   |
| Valeurs (T)       | 28270,2 | 22188,6 | 18064,6 | 8635,5 | 8328,48 |

Les stocks de pesticides périmés :

Selon l'INPV : - 1997 -----392 spécialités homologuées  
- 1998 -----432 spécialités homologuées

#### 5. Les propriétés physico-chimiques des pesticides

Les pesticides regroupent une grande diversité de structures chimiques et chaque molécule constitue une entité qui se caractérise par un ensemble de propriétés bien spécifiques.

##### 5.1. Pression de vapeur ou tension de vapeur

La pression de vapeur caractérise l'aptitude d'une substance active à se volatiliser. Elle est exprimée en Pascal (Pa), autrefois en millimètres de mercure ( $101325 \text{ Pa} = 1 \text{ atmosphère} = 760 \text{ mm Hg}$ ).

##### 5.2. Constante de Henry

La constante de Henry caractérise l'aptitude d'une substance active en solution à se volatiliser. Elle s'exprime en  $\text{Pascal} / \text{m}^3 / \text{mol}$ . La température accompagne cette donnée.

##### 5.3. Solubilité dans l'eau ou dans les solvants organiques

La solubilité est exprimée :

- par une va
- leur numérique (en g/L ou mg/L) dans l'unité la plus adéquate.
- par une appréciation qualitative choisie dans une gamme hiérarchisée (de insoluble à miscible).

#### **5.4. Coefficient de partage octanol/eau (P)**

**P** est le coefficient de partage octanol/eau. C'est une grandeur sans dimension, définie à une température et à un pH donnés. On peut aussi l'appeler  $K_{ow}$ . Il est souvent exprimé en logarithme décimal.

**Log P** est un indicateur de liposolubilité d'une substance. Si  $\log P \geq 3$ , la substance active est susceptible de bioaccumulation.

#### **5.5. Vitesse d'hydrolyse**

Elle est évaluée par le temps de dégradation de 50 % de la substance active (**DT50**) dans l'eau, exprimée en jours ou en heures à un pH donné et déterminée par un test de laboratoire.

#### **5.6. Vitesse de photolyse**

Elle est évaluée par le temps de dégradation de 50 % de la substance active (**DT50**) dans l'eau sous l'influence de la lumière, exprimée en jours ou en heures à un pH donné et déterminée par un test de laboratoire.

La nature de la source de lumière est précisée (naturelle ou lampe au xénon) ainsi que la durée et l'intensité de l'éclairage. S'il s'agit d'une lumière naturelle, le lieu et la saison sont mentionnés.

#### **5.7. Dissociation dans l'eau (pKa)**

Le **pKa** est la constante de dissociation, il définit la force d'un acide. Il précise à quel pH, il y a changement dans l'état d'ionisation de la molécule. C'est une grandeur sans unité, en général déterminée à 20° C sinon la température est précisée.

Le **pKb** est défini par la relation  $pK_a + pK_b = 14$ . Certaines molécules ne sont pas dissociées dans l'eau, il sera alors indiqué " absence de dissociation ".

#### **5.8. Dose létale 50 (DT50)**

C'est le paramètre de demi-vie, il est couramment employé pour représenter le temps nécessaire pour réduire de moitié une quantité initiale donnée de pesticide dans des conditions données (laboratoire, plein-champ). Ce paramètre caractérise donc la persistance du pesticide, facteur impliqué dans la détermination du caractère polluant potentiel d'un pesticide. En effet,

plus le pesticide est persistant dans les sols, plus il a de chances de subir des transferts vers les eaux souterraines ou superficielles.

### **5.9. Koc et Kd**

Le Koc permet d'évaluer la mobilité de la substance dans le sol et le risque de transfert de la substance active vers les eaux superficielles ; c'est le coefficient de partage carbone-eau. La rétention des pesticides par les sols peut être caractérisée également à l'aide du coefficient Kd ou coefficient 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.

Les paramètres DT50 et Koc sont souvent pris en compte pour estimer le risque de transfert des pesticides vers les eaux souterraines. Par exemple, l'indice de mobilité GUS (Groundwater Ubiquity Score) proposé par (Gustafson, 1989) se base sur ces deux paramètres pour classer les pesticides selon le risque de lixiviation qu'ils présentent.

Un autre exemple d'indice de mobilité utilisé est le Leaching Index (LEACH) utilisant en plus de ces paramètres la solubilité et la pression de vapeur des molécules (Chen et *al.*, 2002 ; Papa et *al.*, 2004).

### **5.10. D'autres paramètres à prendre en compte**

- En milieu acide, les bases faibles prédominent sous forme protonée, tandis que les acides faibles sont sous forme non dissociée (Calvet, 1989).
- Le caractère hydrophobe d'un pesticide augmente lorsque sa solubilité dans l'eau diminue, et il en résulte une rétention plus intense par la matière organique du sol (Baily et White, 1970 ; Calvet et *al.*, 2005).
- La force d'attraction entre la molécule adsorbée et une surface argileuse est directement proportionnelle à son pôle dipolaire et inversement proportionnelle à sa constante diélectrique.
- Plus un cation a un pouvoir de polarité élevé, plus l'adsorption sera importante (Baily et White, 1970).
- La taille de la molécule va avoir un effet sur l'adsorption par le volume et la surface qui lui sont associés. Le volume aura une influence en particulier sur la capacité des produits

organiques à être adsorbés sur les surfaces internes des minéraux. Lorsqu'on examine l'adsorption d'un composé, les caractéristiques de la molécule du pesticide ne doivent pas être considérées de manière individuelle, car elles interagissent simultanément.

## **6. Mode d'action**

L'action des pesticides sur les organismes vivants qu'ils visent se fait suivant différents modes.

Les herbicides peuvent agir sur les adventices se trouvant en concurrence avec une culture donnée en inhibant la photosynthèse ou les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse des lipides et des acides aminés chez les mauvaises herbes. D'autres herbicides agissent en perturbant la division cellulaire et la croissance des adventices. La notion de sélectivité est également importante : dans des conditions d'emploi bien définies, certains herbicides sont sélectifs et ne contrôlent que certaines plantes parmi celles qui sont traitées, d'autres sont non sélectifs (dits encore totaux ou à large spectre) et leur action touche toutes les espèces végétales traitées.

Concernant les insecticides, leurs effets toxiques s'exercent sur des fonctions vitales de l'insecte telles que la transmission de l'influx nerveux et la respiration. Les insecticides agissent par contact, ou par inhalation ou ingestion des molécules par l'insecte.

Les fongicides peuvent contrôler les champignons en affectant leur respiration ou leur division cellulaire ou en inhibant la biosynthèse des acides aminés et des stérols.

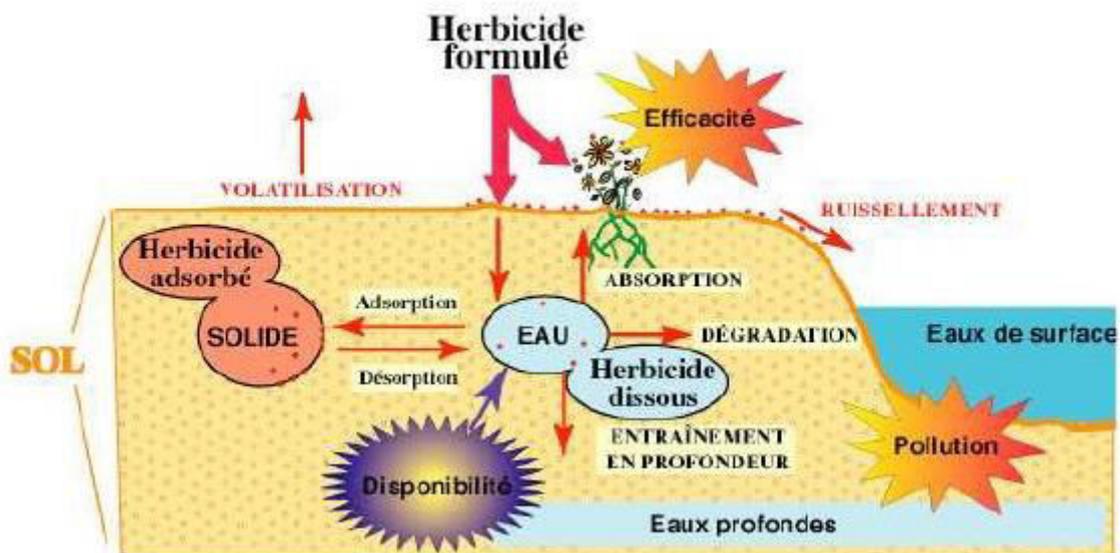
Une autre distinction est faite selon le mode d'action des produits phytosanitaires. Certains pesticides peuvent agir sur la partie de l'organisme vivant (plante, insecte ...) avec laquelle ils entrent en contact et sont alors dits « de contact » ou peuvent être absorbés par la plante et circuler dans les vaisseaux conducteurs avec la sève et sont qualifiés dans ce cas de « systémiques ».

## **7. Rétention des pesticides dans le sol**

La rétention est l'un des processus majeurs auxquels sont soumis les pesticides dans le sol. Le terme « rétention » englobe l'ensemble des phénomènes physico-chimiques et biologiques qui conduisent à une immobilisation plus ou moins longue des pesticides : absorption par les végétaux ou par la microflore du sol, précipitation, adsorption.

Dès leur application, les produits phytosanitaires se dissipent dans les différents compartiments du milieu naturel en suivant différentes voies : la volatilisation, l'entraînement vers les eaux de surface par ruissellement, le transfert vertical à travers les sols, la photolyse, l'absorption par les organismes vivants ...

Au niveau du sol, deux processus majeurs conditionnent le devenir des pesticides : la dégradation (biotique et abiotique) et la rétention par la matrice solide du sol (phénomènes d'adsorption-désorption). Une fraction du pesticide peut rester mobile dans la solution du sol et constitue la fraction dite disponible. En effet, le pesticide va être disponible pour les organismes vivants (plantes, microorganismes), on parle dans ce cas de biodisponibilité mais également pour l'entraînement en profondeur vers les eaux souterraines, engendrant ainsi leur contamination (Barriuso et *al.*, 1996).



**Figure 1-2.** Principaux processus de dissipation des herbicides dans l'environnement (Barriuso et *al.*, 1996)

La rétention des produits phytosanitaires dans les sols est un processus important car il régle la persistance des pesticides, leur biodisponibilité et leur transfert vers les eaux de surface et souterraines. D'une manière générale, la rétention des pesticides au niveau du sol limite leur dégradation et réduit leur transfert vers les nappes (Gajbhiye et Gupta, 2001 ; Koskinen et *al.*, 2002 ; Cooke et *al.*, 2004 ; Ariaz-Estevéz et *al.*, 2008).

## 7.1. Phénomènes d'adsorption-désorption

L'adsorption des pesticides par le sol est le processus de rétention le plus étudié et le mieux connu. L'adsorption *sensu stricto* est définie comme un phénomène interfacial qui correspond au transfert d'ions ou de molécules (les pesticides) depuis une phase fluide (la solution du sol) et à leur accumulation sur la phase solide du sol constituée par les minéraux et la matière organique (Sposito, 1989 ; Calvet et *al.*, 2005).

La littérature fait état de différents types d'interactions intervenant dans l'adsorption des pesticides dans les sols. Deux types d'adsorption sont distingués : l'adsorption physique et chimique (Bailey et White, 1964).

L'adsorption physique est due à des interactions électrostatiques de faible énergie régies par les forces de Van der Waals. Ces dernières sont impliquées dans la rétention d'un grand nombre de molécules organiques. L'adsorption physique est assurée par des interactions polaires et hydrophobes. Les interactions polaires mettent en jeu les régions polaires des surfaces minérales et organiques et les groupements fonctionnels polaires des pesticides. Les interactions hydrophobes, quant à elles, impliquent des interactions de type dipôle induit/dipôle induit. Ce type d'interaction est impliqué dans la rétention des pesticides peu ou pas polaires à caractère hydrophobe tels que les insecticides organochlorés. La liaison hydrogène est également une liaison de faible énergie. Elle joue un rôle important dans la rétention de nombreux pesticides polaires non ioniques comme les urées substituées et les phénylcarbamates (Gevao et *al.*, 2000 ; Lagaly, 2001 ; Calvet et *al.*, 2005).

Quand l'adsorption est due à la formation de liaisons chimiques entre un pesticide et les surfaces adsorbantes, on parle alors d'adsorption chimique. Cette dernière, contrairement à l'adsorption physique, met en jeu des énergies de liaison importantes. Parmi ces liaisons, citons la liaison ionique et la liaison de coordination. La liaison de coordination peut par exemple avoir lieu avec les argiles quand le cation compensateur à la surface des minéraux argileux est un cation métallique. Ce dernier peut interagir avec les pesticides pour former des complexes de surface. La liaison ionique concerne les pesticides chargés (cationiques et anioniques) qui s'adsorbent sur les surfaces du sol chargées négativement ou positivement (Lagaly, 2001 ; Calvet et *al.*, 2005). Ce type de liaison est majoritairement impliqué dans l'adsorption des triazines et des pesticides bipyridylum (tels que le paraquat et le diquat) sur les acides humiques. La liaison ionique est formée entre les groupes carboxyliques des

composés humiques et les atomes d'azote présents dans les amines des triazines ou les bipyridylium (Senesi et *al.*, 1995 ; Gevao et *al.*, 2000).

Ces différents mécanismes peuvent intervenir simultanément mais avec des importances relatives différentes selon l'état d'ionisation des molécules, leur polarité et la nature des surfaces adsorbantes (Koskinen et Harper, 1990 ; Senesi, 1992 ; Calvet et *al.*, 2005; Shirzadi et *al.*, 2008).

Le phénomène inverse de l'adsorption est appelé désorption. Il correspond à la libération dans la solution du sol de molécules préalablement adsorbées sur la phase solide.

L'étude de la désorption permet de renseigner sur la réversibilité de l'adsorption des pesticides et éventuellement de fournir des informations sur la nature des interactions sol pesticides mises en jeu. La désorption peut ne pas être complètement réversible, on est alors en présence d'un phénomène d'hystérésis. L'hystérésis peut avoir plusieurs explications dont la diffusion lente des molécules hors de la microporosité, la rétention irréversible des pesticides due à des interactions spécifiques avec les surfaces adsorbantes du sol, le piégeage physique des molécules dans les agrégats du sol ou dans la matière organique, les pertes de pesticide par dégradation et/ou volatilisation (Pignatello et Huang, 1991 ; Beulke et *al.*, 2004 ; Calvet et *al.*, 2005).

## **8. Réglementation en vigueur pour l'utilisation des produits phytosanitaires : homologation**

Pour être mis sur le marché, chaque produit phytosanitaire doit être homologué sur la base de l'analyse d'un dossier complet fourni par le demandeur et expertisé par les instances compétentes. L'homologation nationale a été harmonisée avec l'homologation internationale. Le texte d'homologation est complété par les directives des états (tel que la directive européenne 199/45/CE) spécifiant les lois et la régulation de la classification, de la formulation et de la dénomination des préparations chimiques dangereuse.

L'évaluation du risque d'un produit phytosanitaire pour l'homme est constituée d'une batterie de tests imposés par la directive 91/414/CE ; des tests de toxicité (aiguë, à court et à moyen terme), de mutagénèse, de cancérogénèse, et de tests de toxicité pour la reproduction.

## **8.1. Les tests de toxicité**

### **8.1.1. Les tests de toxicité aiguë (DL50 orale, DL50 cutanée et CL50)**

La voie d'absorption par inhalation (inhalatoire) chez le rat, irritation cutanée et oculaire chez le lapin et la sensibilisation cutanée chez le cobaye, permettent d'estimer la dose létale ainsi que les effets irritants ou sensibilisants d'un produit. Des tests de toxicité à court terme, comme des tests ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) (pendant en moyenne 28 jours d'exposition orale ou cutanée ou par inhalation chez le rat) ainsi que des tests à moyen terme (90 jours à 1 an, exposition orale chez le chien) sont également réalisés afin de déterminer des doses sans effets (NOEL= No-Observed Effect Level, NOAEL= No-Observed Adverse Effect Level ou Dose Sans Effet Nocif Observé (DSENO)) pour chaque espèce.

### **8.1.2. Les tests de mutagénèse et de génotoxicité**

Les tests de mutagénèse sont réalisés chez les procaryotes (Test d'Ames) et sur des cellules de mammifères. L'étude de génotoxicité se fait via la réalisation des tests d'aberrations chromosomiques tels que des tests de clastogénèse sur des cellules de mammifères in vitro. Ces tests sont ensuite complétés par d'autres études de mutagénèse réalisées avec des produits de dégradation de la molécule mère obtenus in vitro (fraction métabolique S9) ou in vivo (chez le rongeur). Dans le cas d'une réponse positive, des tests complémentaires tels que des tests in vivo sur des cellules germinales ou de micronoyaux sur moelle osseuse de rongeurs, sont utilisés pour renseigner sur la nature de l'effet (risque héréditaire, effet direct ou indirect sur l'ADN).

### **8.1.3. Les tests de cancérogénèse**

Les tests de cancérogénèse sont conduits sur deux espèces animales exposées par voie orale (2 ans chez le rat et 18 mois chez la souris).

### **8.1.4. Les tests de toxicité pour la reproduction**

Ces tests correspondent à des études réalisées sur plusieurs générations chez les rongeurs, et concernent les effets sur la fertilité et la gamétogénèse chez les parents ainsi que le développement pré/post-natal, la mortalité et la croissance des petits. De plus, les effets tératogènes ou les effets sur l'organogénèse suite à des expositions pendant des

périodes critiques du développement seront également examinés chez le rat, ou le lapin. Suite à ces études, les substances phytosanitaires seront classées selon leur caractère CMR (cancérogène, mutagène, reprotoxique) pour l'homme en 3 catégories :

- Catégorie 1: Substance connue cancérigène ou mutagène ou toxique pour la reproduction chez l'homme (preuves épidémiologiques)
- Catégorie 2: substance assimilée à un CMR, pouvant provoquer des effets CMR chez l'homme (forte présomption)
- Catégorie 3: Effets CMR possibles chez l'homme (substances préoccupantes, preuves insuffisantes pour catégorie 2)

### **8.1.5 Tests permettant de définir les seuils toxicologiques de référence dans le but d'assurer la sécurité de l'opérateur et du consommateur**

#### **8.1.5.1 AOEL (Admissible Operator Effect Level)**

L'AOEL fixe le niveau de danger acceptable pour l'opérateur (ou les professionnels). Cette dose (exprimée en mg substance/kg de poids corporel/j) est calculée à partir de la dose NOAEL obtenue chez l'animal le plus sensible (souvent rat) et selon le type d'exposition (NOAEL court terme pour les expositions saisonnières et NOAEL long terme pour une exposition > 3 mois / an). Pour calculer une AOEL dermique ou inhalatoire, la valeur de la NOAEL sélectionnée sera divisée par un facteur de 100 pour tenir compte de l'extrapolation inter- et intra- espèce et par un facteur de sécurité (2 à 5) qui prend en compte certains effets critiques (CMR). Pour l'AOEL systémique (orale) il faudra multiplier la NOAEL obtenue à court terme chez l'espèce la plus sensible par un facteur de correction « f » (%) lié à l'absorption orale.

#### **8.1.5.2 DJA (Dose Journalière Admissible)**

Elle est définie comme un seuil de sécurité sanitaire à long terme et représente la quantité de produit qui peut être ingérée par un individu quotidiennement et pendant toute une vie sans risque pour la santé. La DJA, exprimée en mg/kg de poids corporel/j, est fondée sur la valeur NOAEL obtenue après des tests à long terme chez l'espèce animale la plus sensible (rat ou souris) à laquelle on applique généralement des coefficients de variabilité inter- et intra-espèces (NOAEL/100) et un coefficient de sécurité supplémentaire (de 1 à 10) qui

prend en compte d'éventuels effets critiques (s'il n'y a pas d'effet critique la DJA sera égale à NOAEL/100).

#### **8.1.5.3 ARfD (Acute Reference Dose ou dose de référence aiguë)**

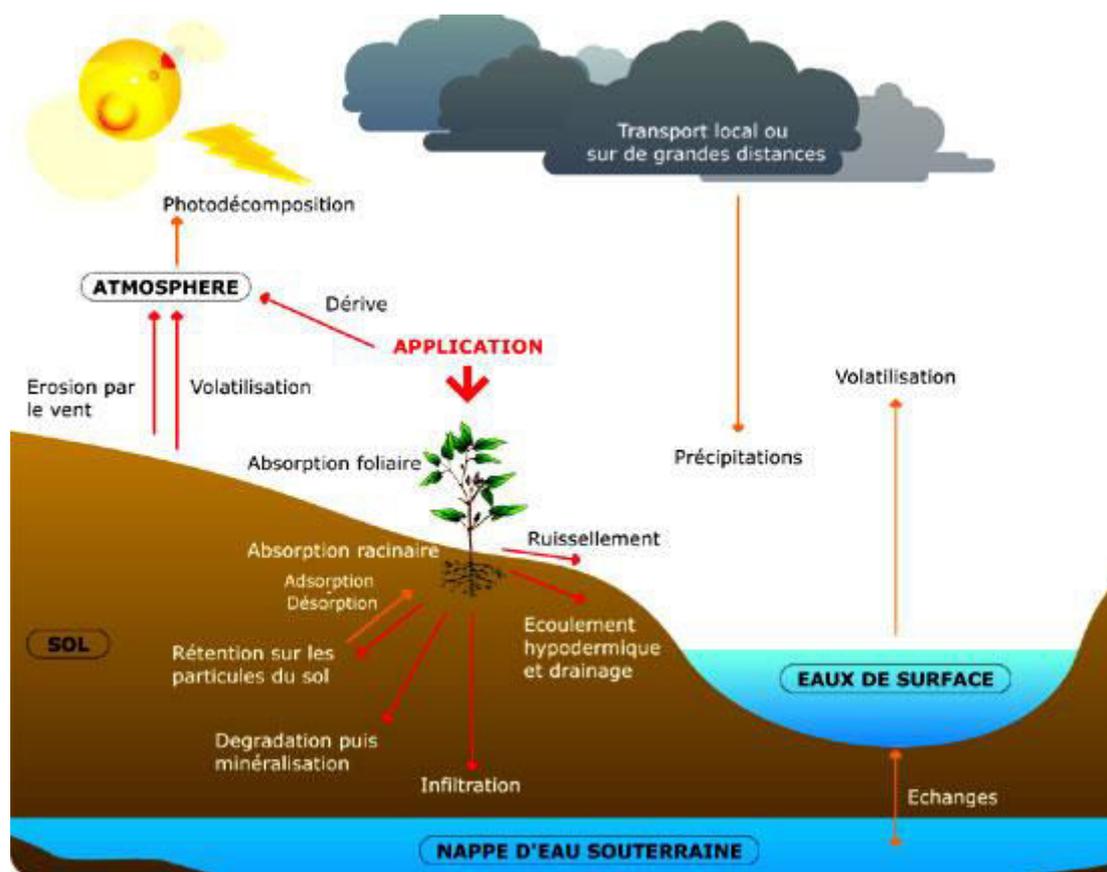
Elle est établie comme étant un seuil toxicologique de référence pour les expositions à court terme. La ARfD (exprimée en mg/kg de poids corporel/j) est définie comme la quantité la plus élevée de produit pouvant être ingérée sur une très courte durée (une journée ou un repas) sans risque aigu appréciable pour le consommateur. Ce concept remonte à l'année 1997. Cette valeur est en général supérieure à la DJA. Elle sera égale à la DJA uniquement si la valeur de NOAEL à court terme est égale à la valeur de la NOAEL à long terme.

#### **8.1.5.4. LMR (Limite maximale de résidus)**

Elle est définie pour les cultures autorisées au traitement. Les LMR (mg de substance/kg de produit agricole) sont établies par les autorités en fonction de l'évaluation des résidus trouvés au cours d'essais aux champs, basés sur les Bonnes Pratiques Agricoles (BPA). D'autre part, l'ensemble des LMR fixées pour les denrées végétales, les denrées animales et l'eau doit conduire au respect de la DJA et de l'ARfD de chaque substance évaluée afin d'éviter tout risque inacceptable de toxicité aiguë ou chronique. Contrairement aux aliments courants, les aliments infantiles sont soumis provisoirement à une LMR unique de 0,01 mg/kg dans le produit fini.

### **9. Devenir des pesticides dans l'environnement**

Les pesticides qui sont employés sont retrouvés à l'état de traces plus ou moins importantes dans quasiment tous les écosystèmes de notre planète. Ils prennent plusieurs chemins tels que la dispersion, la bioaccumulation et la dégradation (abiotique et biotique) et la persistance.



**Figure 1-3.** Transfert des pesticides (Projet ArtWet, 2010)

## 9.1. La dispersion

Les matières actives phytosanitaires sont appliquées le plus souvent sous forme de liquide pulvérisé sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas elles sont incorporées dans le sol, injectées ou déposées sous forme de granulés.

La moitié du produit peut être entraîné par le vent en dehors de la zone à traiter (Pimentel et Levitan, 1986). Ces pesticides peuvent influencer sur les effets environnementaux en modifiant le mode de dispersion du produit ou sa persistance (Levitan et *al.*, 1995). Les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines.

### 9.1.1. Le transfert des pesticides vers les eaux souterraines

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 du 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.

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  $\mu$  m 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).

### **9.1.2. 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).

#### **9.1.2.1. Propriétés des sols**

De façon générale, plus un pesticide est adsorbé au niveau du sol, moins son transport est important. Ainsi, la matière organique, principale phase adsorbante dans les sols est considérée comme l'un des facteurs-clefs influençant la mobilité des pesticides. En effet, de nombreux travaux ont montré que la matière organique réduit et retarde la migration des pesticides vers les eaux souterraines (Weber et *al.*, 2007 ; Ariaz-Estevez et *al.*, 2008). Des études sur l'atrazine ont montré que les quantités lessivées sont plus importantes dans les sols pauvres en matières organiques. Les auteurs ont attribué ces transferts à une plus grande conductivité hydraulique et une plus faible adsorption de l'atrazine au niveau de ces sols

(Wietersen et *al.*, 1993 ; Montoya et *al.*, 2006). Conrad et *al.*, (2006) ont signalé un comportement similaire pour le terbuméton, dont le lessivage est moindre dans le sol présentant le taux le plus élevé des matières organiques. Dans le même sens, (Fouqué-Brouard et Fournier, 1996) ont trouvé pour différentes phénylurées (dont l'isoproturon) que les sols les plus riches en matières organiques présentent les capacités de rétention les plus élevées et par conséquent les mobilités les plus réduites.

C'est ainsi que de nombreuses études ont montré que l'apport d'amendements organiques au sol augmente la rétention des produits phytosanitaires et réduit par conséquent le lessivage des pesticides. En effet, l'apport de margines d'olives ou de compost d'ordures ménagères dans le sol enrichit le sol en matières organiques, ce qui engendre une réduction de la porosité du sol et une augmentation de sa rétention d'eau, d'où une réduction du lessivage. De nombreux auteurs tels que Cox et *al.*, (1997) ; Cox et *al.*, (2001) ; Si et *al.*, (2006) ont fait une observation similaire dans le cas de l'étham et sulfuron-méthyl dont la capacité de rétention a été doublée et le lessivage en colonne réduit de 20 % suite à l'addition de tourbe au niveau du sol.

Par ailleurs, une multitude de travaux ont montré que l'addition de matière organique dissoute (MOD) ou son abondance naturelle dans le sol pourrait être à l'origine d'une augmentation des quantités transférées de produits phytosanitaires. Ceci a pu être observé pour de nombreux pesticides : le chlorpyrifos et le 2,4-D (Li et *al.*, 2005), le chlorotoluron (Song et *al.*, 2008), le MCPA (Haberhauer et *al.*, 2002), l'imidacloprid (Flores-Céspedes et *al.*, 2002). Différentes explications ont été avancées : l'augmentation de la solubilité des molécules en présence de la MOD (Chiou et *al.*, 1986 ; Thornton et *al.*, 2000 ; Li et *al.*, 2005), la compétition entre les pesticides et la MOD sur les sites d'adsorption, ce qui réduit la rétention et favorise le lessivage, la formation de complexe MOD-pesticide en solution puis co-transport du pesticide par la MOD (Haberhauer et *al.*, 2002 ; Muller et *al.*, 2007).

La texture des sols est également l'un des facteurs dont dépend le transport des pesticides dans le sol. Par exemple, (Mora et *al.*, 1997) ont trouvé que le terbacil est très mobile dans les sols à texture sableuse et modérément mobile dans les sols argileux. La mobilité de cet herbicide évolue inversement aux teneurs en argile dans les sols. Récemment, (Sakaliene et *al.*, 2007) ont constaté pour une large gamme d'herbicides et de sols que le lessivage se produit plus rapidement dans les sols présentant une texture grossière (sableuse). Ces

différences s'expliquent notamment par une taille des pores et une conductivité hydraulique plus importantes dans les sols sableux que dans les sols argileux (El arfaoui., 2010).

D'après (El arfaoui, 2010) Le transport des produits phytosanitaires dépend aussi de la structure du sol, en particulier de la présence de chemins préférentiels. En effet, les canaux créés au cours de la croissance racinaire, les trous résultant de l'activité des vers de terre, ainsi que les fentes de retrait dans les sols argileux desséchés peuvent aboutir au développement de macropores dans les sols. Dans les régions calcaires et crayeuses, la présence de fissures de type karstique favorise les transferts préférentiels d'eau et de polluants (Brouyère et *al.*, 2004 ; Roulier et *al.*, 2006). Cette macroporosité constitue des voies de circulation privilégiées pour l'eau et donc les pesticides. Ce type de transport convectif rapide représente un risque potentiel de contamination des nappes du fait que les produits phytosanitaires peuvent atteindre rapidement les eaux souterraines, limitant ainsi les processus de dégradation et/ou de rétention (Aderhold et Nordmeyer, 1995 ; Flury, 1996 ; Hesterberg, 1998 ; Pot et *al.*, 2005).

De multiples études ont souligné l'importance de la contribution des transferts préférentiels dans la lixiviation d'un grand nombre produits phytosanitaires (Brown et *al.*, 2000 ; De Jonge et *al.*, 2000 ; Malone et *al.*, 2004 ; Kjaer et *al.*, 2005 ; Siczec et *al.*, 2008).

#### **9.1.2.2. Propriétés des pesticides**

La prise en compte des caractéristiques des pesticides est nécessaire pour l'identification des molécules qui peuvent constituer un risque potentiel de contamination des ressources en eau. La plupart des approches d'estimation du risque de transfert des produits phytosanitaires vers les eaux souterraines utilisent des paramètres qui caractérisent les propriétés physico-chimiques des molécules, leur adsorption et leur persistance dans le sol (El arfaoui, 2010).

Par exemple, le paramètre de demi-vie  $DT_{50}$  est couramment employé pour représenter le temps nécessaire pour réduire de moitié une quantité initiale donnée de pesticide dans des conditions données (laboratoire, plein-champ). Ce paramètre caractérise donc la persistance du pesticide, facteur impliqué dans la détermination du caractère polluant potentiel d'un pesticide. En effet, plus le pesticide est persistant dans les sols, plus il a de chances de subir des transferts vers les eaux souterraines ou superficielles.

Les paramètres  $DT_{50}$  et  $K_{oc}$  sont souvent pris en compte pour estimer le risque de transfert des pesticides vers les eaux souterraines. Par exemple, l'indice de mobilité GUS

(Groundwater Ubiquity Score) proposé par (Gustafson, 1989) se base sur ces deux paramètres pour classer les pesticides selon le risque de lixiviation qu'ils présentent.

Un autre exemple d'indice de mobilité utilisé est le Leaching Index (LEACH) utilisant en plus de ces paramètres la solubilité et la pression de vapeur des molécules (Chen *et al.*, 2002 ; Papa *et al.*, 2004).

### **9.1.2.3. Pratiques culturales**

Les pratiques culturales sont susceptibles d'influencer les propriétés structurales du sol et par conséquent le transport des pesticides. Par exemple, selon (Elliott *et al.*, 2000) les techniques de labour conventionnelles réduisent la macroporosité et limitent donc le transport des produits phytosanitaires par flux préférentiel. (Isensee et Sadeghi, 1996) ont constaté en comparaison avec le labour conventionnel, une augmentation de la lixiviation de l'atrazine dans le système de non-labour. De nombreux travaux suggèrent en effet que le non-labour du sol favorise la formation de macropores *via* les racines des plantes, d'où le risque de transfert à travers ces chemins préférentiels (Isensee et Sadeghi, 1996 ; Cullum, 2009). Récemment, (Siczec *et al.*, 2008) ont démontré qu'au contraire, le non-labour est une technique bénéfique qui, en engendrant l'accumulation de matières organiques dans le sol, accroît la rétention des pesticides et limite par conséquent leur transfert vers la nappe. Au vu des précédents travaux, il est évident qu'aujourd'hui encore, l'impact des différentes techniques de travail du sol sur le transfert des pesticides n'est pas complètement clarifié.

### **9.1.2.4. Temps de contact sol-pesticide**

Le temps de résidence des produits phytosanitaires dans le sol influence leur rétention et est susceptible par conséquent d'affecter leur transfert vers les eaux souterraines. En effet, (Beck *et al.*, 1996) ont montré dans une étude que les concentrations d'atrazine et d'isoproturon dans les volumes percolés ont été réduites d'un facteur 30 après 21 mois de vieillissement. (Conrad *et al.*, 2006) ont constaté lors d'expériences d'élution sur des colonnes de sols reconstituées au laboratoire, que 76% de l'apport initial de terbuméton sont lixiviés quand l'élution commence 15 heures après l'application de cet herbicide, alors que cette proportion n'est que de 26% quand l'élution se fait six jours après l'application du terbuméton.

Ce comportement a été observé pour de nombreux pesticides dont les quantités lessivées ont été réduites en augmentant le temps séparant l'épandage du produit et l'irrigation. La

dégradation des pesticides au cours du vieillissement n'étant pas dans la plupart des cas suffisante pour expliquer la diminution des quantités transférées, il est possible que la diffusion à l'intérieur des agrégats du sol ait rendu les molécules moins disponibles au transfert (Beulke et *al.*, 2004 ; Renaud et *al.*, 2004 ; Walker et *al.*, 2005). Van Beinum et *al.*, (2006) adhèrent à cette hypothèse, en expliquant que la diffusion intra-agrégats augmente de façon significative au cours des premiers jours suivant l'application du pesticide.

#### **9.1.2.5. Facteurs climatiques**

Les caractéristiques climatiques telles que la température, l'intensité des précipitations et la saison où elles surviennent ainsi que le temps séparant les pluies et l'application du pesticide jouent un rôle important dans la détermination des transferts des produits phytosanitaires vers les eaux souterraines (Nolan et *al.*, 2008).

#### **9.2. La volatilisation**

C'est l'une des causes principales de fuites de pesticides hors de la zone cible, ces pertes dépassent souvent en importance celles dues à la dégradation chimique, ou au ruissellement et à la lixiviation (Taylor et Spencer, 1990), les molécules pesticides peuvent être véhiculées fort loin par les courants aériens et compensés par la dilution très rapide dans l'atmosphère.

La constante de Henry, rapport de la pression de vapeur à la solubilité dans l'eau, rend mieux compte du taux de volatilisation d'une substance que sa seule pression de vapeur (Jury, 1984 ; Spencer et Cliath, 1990 ; Dabéne et Marié, 1993).

On a, d'autre part, rapporté que les vapeurs pouvaient être concentrées dans les gouttelettes de brouillard puis redéposées sur les végétaux (Glotfelty et *al.*, 1987).

#### **9.3. Ruissellement et lixiviation**

L'eau peut entraîner la dispersion des pesticides dans le milieu par lavage des feuilles, ruissellement et lixiviation.

Le ruissellement contribue à la pollution des eaux de surface tandis que la lixiviation contribue surtout à celle des eaux profondes (Leonard, 1990). Le ruissellement peut être défini comme le mouvement à la surface du sol, de l'eau et des matières dissoutes et suspendues qu'elle contient éventuellement (Leonard, 1990). Cet écoulement peut entraîner des pesticides

dissous, en suspension ou adsorbés sur les sédiments. (Leonard, 1979), à partir des données de nombreux bassins versants, a trouvé que la concentration en pesticides dans les écoulements de surface était fortement corrélée aux concentrations mesurées dans les 10 mm supérieurs du sol. Leur incorporation réduira les risques de perte par ruissellement (Larson et *al.*, 1995).

Les matières actives solubles peuvent être entraînées dans le sol par lixiviation durant la pluie mais cependant, si le délai entre le traitement et la première pluie est bref, la concentration dans l'eau de ruissellement peut être plus forte pour les produits solubles. La mobilité des pesticides provoque le risque de pollution des eaux souterraines (Jury, 1987 ; Gustafson, 1989).

#### **9.4. La bioaccumulation**

Les organismes vivants ne parviennent pas à excréter certains composés (persistants) d'où leur accumulation dans les tissus. Le processus de propagation et d'augmentation de la nocivité d'un polluant au cours d'une chaîne alimentaire sont des phénomènes communs mais toujours impressionnants. "L'idée de chaînes" recouvre la notion de lieu naturel ou nécessaire entre les matériaux et les êtres vivants.

Toute substance qui contamine le milieu naturel peut être concentrée par les êtres vivants grâce aux échanges permanents avec le milieu extérieur et aux divers processus métaboliques. Cette concentration se fait selon un niveau variable suivant le maillon de la chaîne trophique considéré et qui subit les effets à long terme.

Les végétaux absorbent les pesticides par le système racinaire. Cette accumulation dans la biomasse des producteurs primaires à un taux bien supérieur à celui du sol, constitue le premier maillon de la concentration des chaînes trophiques alimentaires. Il y a également une concentration verticale des toxiques, le long des chaînes trophiques; et le plus haut coefficient de concentration se trouve au niveau du dernier maillon.

Ces concentrations en résidus totaux chez les prédateurs peuvent être suffisantes pour compromettre leur reproduction et même dans certains cas plus rares, faire périr les adultes. Une faible contamination initiale peut conduire à des cas de stérilité ou de mortalité en bout de chaîne (Di geronimo, 1987).

Une étude a montré que le DDT présent à un taux d'environ 0,000002 ppm dans l'eau, passe à 0,04 ppm dans le plancton, 1,5 ppm chez les poissons de taille moyenne et enfin à 20 ppm pour les oiseaux de proie des ces poissons.

La concentration est passée donc de 0,000002 ppm à 20 ppm ; soit multipliée par un facteur de 10 millions (Laffont, 1975).

## **9.5. La dégradation**

Elle regroupe les processus de transformation physiques et chimiques (dégradation abiotique) subis par les pesticides (Ristori et Fusi, 1995).

### **9.5.1. La dégradation chimique**

La dégradation abiotique chimique peut se faire dans la solution du sol ou dans l'eau, l'hydrolyse acide ou basique est la réaction la plus fréquente. Elle conduit le plus souvent à des produits intermédiaires polaires (Calvet et *al.*, 2005) et donc des hydrosolubles que le composé parent (Senesi, 1993).

Dans le sol le rôle de l'acide humique dans la transformation abiotique des pesticides est moins étudiée que celui des argiles (Metinnen, 1993). Pour les argiles la transformation est en fonction de cation ou du métal de transition impliqué dans l'adsorption (Fusi, 1991 ; Fusi, 1993).

Hormis son influence sur l'état d'ionisation de la matière active, le pH agit sur les processus de dégradation dont le mécanisme peut être différent selon que le milieu est acide ou basique (Hequet, 1995).

Dans certains cas les molécules d'eau se comportent en catalyseurs de l'hydrolyse abiotique, lorsqu'elles sont sous forme hautement polarisée à la surface d'un oxyde (Wolf, 1990).

Le pH et la température semblent également avoir un impact sur le processus d'hydrolyse qui est favorisé lorsque cette dernière augmente (Taylor, 1995 ; Dominique, 2000 ; El bakouri, 2002).

### **9.5.2. La dégradation physique**

Le premier facteur nécessaire à une transformation physique est un facteur qui apporte l'énergie. Le processus est basé sur une interaction entre la lumière et la matière, la lumière se manifestant par une radiation électromagnétique (Somasundaram et Coats, 1990).

Les pesticides sont absorbés souvent à des longueurs d'ondes différentes et la photodégradation peut être extrêmement significative à la surface des plantes, des débris végétaux, dans l'eau, dans l'atmosphère, où la durée de vie va également dépendre des conditions météorologiques et même à la surface du sol (Chester, 1989 ; Cui, 2002).

### **9.5.3. La dégradation biotique ou biodégradation**

La biodégradation comme la destruction partielle ou totale d'une substance sous l'effet du métabolisme de ces micro-organismes. Cette substance est une source de carbone fournissant l'énergie nécessaire aux réactions chimiques (Burgher, 1998). La dégradation biotique est réalisée par les micro-organismes. Dans la nature, il existe des souches qui sont résistantes aux effets des pesticides. Cette résistance se définit comme la capacité de certains individus, dans une population génétiquement hétérogène de survivre à des doses normalement létales de substances (Gobat, 2003).

On entend par résistance la faculté qu'acquièrent certains individus, races ou souches, de tolérer une dose de substance toxique qui aurait provoqué un effet létale chez la majorité des organismes composant la population normale de la même espèce (Albin, 1999).

La résistance aux pesticides est l'expression de la capacité des organismes à s'adapter à des nouvelles conditions. L'acquisition de la résistance à un pesticide est principalement liée à deux mécanismes : la modification du site d'action, la détoxification accrue (Le Clech, 1998).

### **9.6. La persistance**

Quand les pesticides ne sont pas dégradés ou partiellement dégradés, ils se stabilisent dans les sols en se liant essentiellement à la matière organique. Ces liaisons sont plus au moins fortes et évoluent dans le temps. D'autre part, la persistance d'un produit est influencée par les conditions environnementales (température, humidité, pH) et par l'activité de la biomasse microbienne et par la présence d'autres pesticides ou substances chimiques dans le sol. (Albin, 1999).

**Tableau 1-4.** Persistance de certains pesticides (Michel, 1976 in El bakouri, 2002)

| <b>FAMILLE DES PESTICIDES</b> | <b>PERSISTANCE</b> |
|-------------------------------|--------------------|
| Organochlorés                 | 2 à 5 ans          |
| Dérivés de l'urée             | 4 à 10 mois        |
| Triazines                     | 3 à 18 mois        |
| Acides benzoïques             | 3 à 12 mois        |
| Amides                        | 2 à 10 mois        |
| Phenoxy                       | 1 à 5 mois         |
| Toluidines                    | 6 mois             |
| Nitriles                      | 4 mois             |
| Carbamates                    | 2 à 8 semaines     |
| Acides aliphatiques           | 3 à 10 semaines    |
| Organophosphorés              | 7 à 84 jours       |

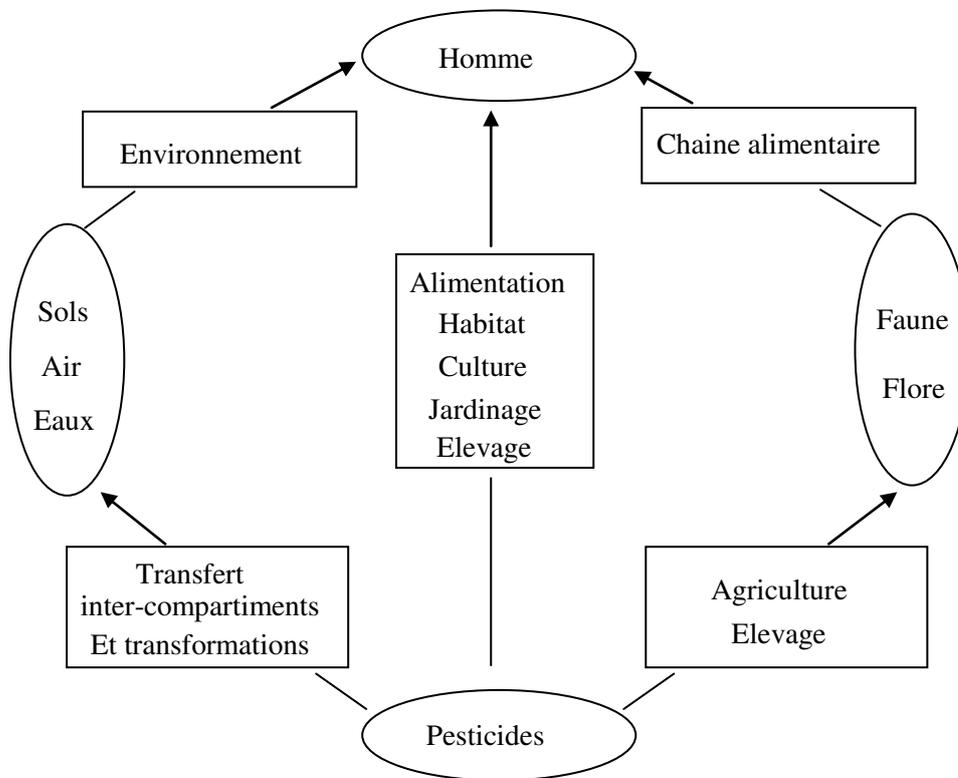
## **10. Toxicité et écotoxicité des pesticides**

### **10.1. Toxicité sur l'homme**

Les pesticides tuent chaque année 2000 personnes dans le tiers de monde tandis que 25 millions d'ouvriers d'agricoles sont gravement atteints car la concentration des pesticides est élevée dans l'organisme. Il a été observé des cas mortels et des cas intentionnels, lorsque le toxique est intégré sous forme de résidus dans la nourriture, l'absorption dans l'eau, inhalé par l'air, contact par la peau. Les effets provoqués sont de types carcinogènes, immunosuppresseurs, mutagènes, neurotoxiques et tératogènes. Il a été démontré récemment que les pesticides étaient capables d'endommager le système immunitaire ou de perturber la régulation hormonale. Aussi, il existe des liens entre existence des produits chimiques « perturbateurs endocriniens » et un taux accru de cancers du sein, de la prostate, du testicule, de malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin et réduction de nombre de spermatozoïdes (El Bakouri, 2002).

L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition, ces substances pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions des populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou

manipulateurs), ou de la population générale. La figure (1-4) résume les possibles modes d'exposition de l'environnement et de l'homme aux pesticides.



**Figure 1-4.** Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP, 2002).

## 10.2. Contamination des sols

La contamination des sols par différentes substances, dont les pesticides, a été reconnue comme l'une des principales menaces qui pèsent sur les sols. Les pesticides dans les sols peuvent provenir des activités agricoles mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH) et du pesticide. Par ailleurs, il n'existe pas de dispositif équivalent à ceux relatifs à l'eau et à l'air pour la caractérisation de la contamination des sols par les pesticides.

Il est connu que les insecticides organochlorés sont assez persistants dans l'environnement et certains, bien qu'interdits d'usage peuvent rester présents dans le sol pendant plusieurs années (Merhi., 2008).

A l'heure actuelle les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement, par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent stables. La pollution chronique par certaines substances minérales persistantes (cuivre dans les fongicides employés en viticulture) (Chaignon et *al.*, 2003) et l'existence éventuelle de "résidus liés" (non extractibles par les méthodes classiques d'analyse) pose la question du risque environnemental à long terme (Barraclough et *al.*, 2005), notamment dans le cas d'une réallocation des terres agricoles à d'autres usages.

### **10.3. Contamination des eaux superficielles et souterraines**

Une des conséquences environnementales majeures de l'agriculture intensive actuelle est la dégradation de la qualité des eaux. Cette dégradation se traduit, pour les eaux de surface comme pour les eaux souterraines, par une pollution liée à la dissémination des intrants agricoles que sont les produits phytosanitaires, les engrais minéraux azotés et phosphatés ou encore les effluents d'élevage. (Merhi., 2008). Différents auteurs ont mis en évidence des contaminations de produits phytosanitaires dans les eaux de surface et de profondeur de bassins viticoles (Lennartz et *al.*, 1997; Louchard et *al.*, 2001).

La contamination par les pesticides est le plus souvent un phénomène irrégulier. Il est à noter que des pics de concentration sont fréquemment observés dans les quelques heures qui suivent les épisodes pluvieux (Schulz, 2001; Neumann et *al.*, 2003) et que la contamination des eaux de surface est d'autant plus élevée que la surface des bassins versants est faible (Schulz, 2004). Par ailleurs, dans certaines régions, une part significative de la contamination des eaux peut parfois provenir du dépôt de substances transportées par voie aérienne (Blanchoud et *al.*, 2002) ou beaucoup plus fréquemment découler d'usages autres qu'agricoles, qu'il s'agisse du désherbage des infrastructures de transport ou industrielles, des parcs et jardins ou bien d'utilisations domestiques (Gerecke et *al.*, 2002 ; Revitt et *al.*, 2002 ; Schiff et *al.*, 2002; Blanchoud et *al.*, 2004).

Les eaux continentales sont les milieux pour lesquels les données sont les plus nombreuses, et font l'objet d'une compilation annuelle par l'IFEN. Ces données mettent en évidence une contamination quasi-généralisée des eaux de surface et des eaux souterraines par les pesticides, et la prépondérance des herbicides parmi les molécules les plus fréquemment détectées (du moins à l'échelle des "masses d'eau" au sens de la DCE). Une contamination

significative peut être générée par des pertes en pesticides très faible : une fuite de moins de 1/1000e de la masse d'herbicide épanchée sur une parcelle peut suffire par exemple pour contaminer l'eau qui s'en écoule au dessus du seuil de potabilité. Les données collectées ne permettent toutefois pas de quantifier avec précision les niveaux de contamination, ou de calculer l'exposition des organismes.

- Elles sont en effet souvent : très hétérogènes et difficilement comparables, car produites par des réseaux de suivi divers (ayant des objectifs différents : surveillance de l'eau potable, suivi de bassin versant...), avec des méthodes analytiques et des listes de molécules recherchées différentes
- Non représentatives, car les prélèvements sont peu fréquents, et ne permettent notamment pas la détection des pics de pollution - très incomplètes, puisque les molécules suivies sont surtout des molécules-mères (les métabolites ou les molécules mères employées à faible dose ne sont généralement pas recherchés de façon systématique), et que les interactions possibles entre les substances ne sont pas prises en compte ;
- Peu adaptées pour des études écotoxicologiques, la présence d'une substance n'étant pas nécessairement indicatrice de sa biodisponibilité, et la mesure de contamination n'étant jamais assortie de mesures d'impact.

Concernant les eaux marines côtières et les zones de transition, la connaissance de la contamination est très partielle, voire inexistante pour les substances autres que certains pesticides organochlorés, alors que ces milieux doivent être pris en compte dans le cadre de la mise en œuvre des directives nationales et internationales de l'eau.

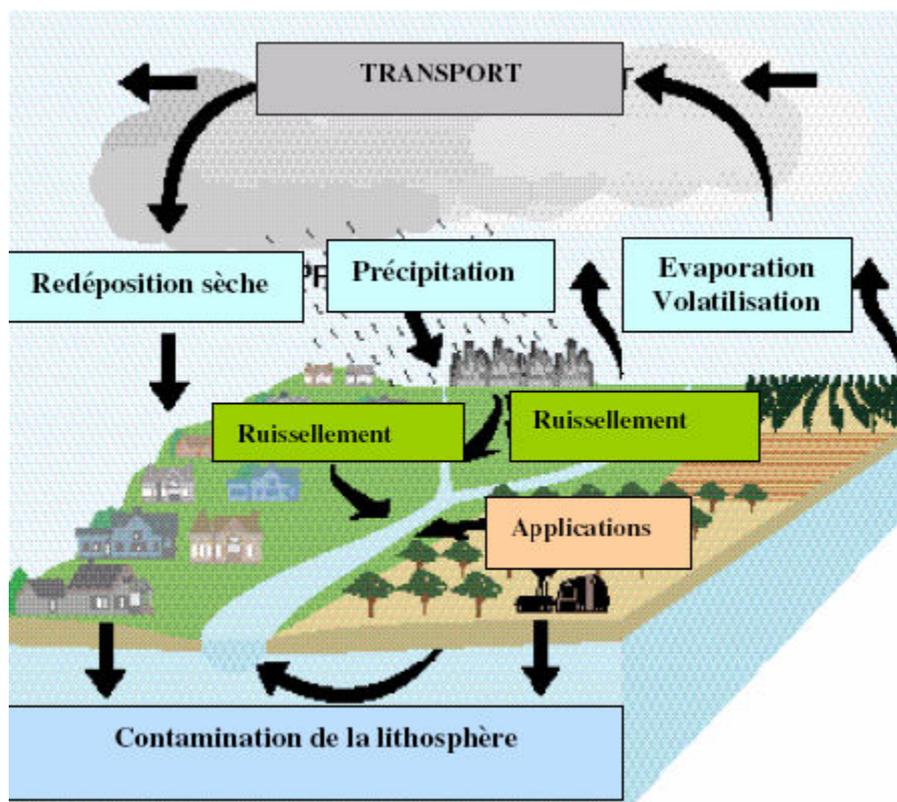
#### **10.4. Contamination de l'air**

La présence de pesticides est observée dans toutes les phases atmosphériques en concentrations variables dans le temps (avec parfois un caractère saisonnier, en lien avec les périodes d'application) et dans l'espace (selon la proximité des sources). L'air et l'eau pouvaient être contaminés, de manière locale, mais aussi à distance des lieux de traitement. Cette contamination est chronique. Des composés peu volatils ou interdits ont parfois été observés. Dans le cas spécifique de traitements en serre, des concentrations élevées ont pu être observées juste après l'application et malgré une décroissance, ces concentrations peuvent rester à un niveau significatif pendant plusieurs jours après le traitement (Merhi., 2008).

Des études émanant de divers groupes de recherche ont été menées en France depuis la fin des années 80 et se poursuivent à l'heure actuelle. Des réseaux de surveillance gérés par des Associations agréées pour la surveillance de la qualité de l'air (AASQA) ont commencé à réaliser des mesures, notamment dans le cadre de projets soutenus par l'ADEME, mais les données restent fragmentaires (campagnes de suivi ponctuelles dans le temps et dans l'espace) et les listes de molécules suivies sont limitées.

Les premières données permettent de constater la présence de pesticides dans toutes les phases atmosphériques, en concentrations variables dans le temps (caractère parfois saisonnier, lien avec les périodes d'application) et l'espace (proximité des sources) ; même des composés peu volatils ou interdits (lindane par exemple) sont parfois détectés.

Les difficultés méthodologiques sont nombreuses : absence jusqu'à présent de normes de prélèvements (en cours de définition), difficultés d'analyse (les concentrations étant relativement faibles, la partition gaz/particules restant difficile à estimer de manière fiable...), interprétation des observations (mise en relation avec les usages, corrélation avec les propriétés physico-chimiques...).



**Figure 1-5.**Cycle de contamination atmosphérique par les pesticides (Fenske, 2002)

## **10.5. Effets sur la flore**

### **10.5.1. Action sur la photosynthèse**

Des pesticides à site d'action nommé C agissent sur le PS II. Celui-ci transfère les électrons au complexe des cytochromes  $b_6$  par le biais d'un transporteur mobile, la plastoquinone (pq). A l'état oxydé, celle-ci se fixe sur une protéine du PS II, qui la réduit en plastoquinone. L'affinité de la  $pqH_2$  pour les protéines étant faible, elle s'en dissocie et diffuse vers le complexe des cytochromes  $b_6$ , qu'elle réduit.

Les pesticides de type C entrent en compétition avec la plastoquinone en se fixant au niveau de son site de réduction, cependant, la mort de la cellule ne résulte pas de l'interruption de la production de sucres, mais de réactions de photo oxydation provoquées par un état excité de la chlorophylle ainsi que par la production d'une forme réactive de l'oxygène (Hess, 2000).

Le site d'action de quelques pesticides est situé dans les chloroplastes au niveau du PS I. Ce dernier réduit le  $NADP^+$  par l'intermédiaire de sa ferredoxine, la ferredoxine est réduite par une protéine du PS I. La ferredoxine transfère l'électron ainsi acquis à une molécule de dioxygène et retourne à son état initial.

Le système d'inactivation est alors saturé, l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène s'accumulent et conduisent à la formation de radicaux hydroxyles qui sont de puissants oxydants. Ces produits chimiques hautement réactifs détruisent rapidement les cellules.

### **10.5.2. Action sur les membranes cellulaires**

Le site d'action de plusieurs pesticides appelé  $C_3$ , ces produits chimiques perméabilisent les membranes végétales aux ions  $H^+$  en les transportant à travers ces dernières (Frear, 1976).

Il se produit une entrée massive d'ions  $H^+$  dans le cytosol. Les ATPases plasmiques et tonoplasmique ont pour fonction d'expulser les ions  $H^+$  en excès dans le cytosol, respectivement vers la paroi et la vacuole.

Les membranes mitochondriales sont perméabilisées en bloquant ainsi la synthèse de l'ATP. La régulation du pH cytosolique ne peut donc s'effectuer et il en résulte une mort rapide de la cellule.

### **10.5.3. Action sur la division cellulaire**

Des pesticides agissent via le sol où ils bloquent la croissance des racines, où les divisions cellulaires sont bloquées au stade de la prophase. Cette action résulte d'une fixation de pesticide sur l'alpha – tubuline (Merhi., 2008).

### **10.5.4. Action sur l'auxine**

A faible dose, les pesticides agissent d'une manière similaire à l'auxine naturelle. A forte dose les plantes ne sont pas capables de régler leur concentration dans les différents tissus et ils occasionnent des perturbations de croissance. Il se produit aussi des fasciations ou épaississement des tiges, qui résultent des proliférations cellulaires dans les cambiums. On considère que cette action est responsable de la mort de la plante traitée. Le développement anarchique du cambium comprime les vaisseaux et déprime les mouvements de sève. Encore des déchirures apparaissant sur la tige par lesquels s'engouffrent les micro-organismes. Quelques pesticides sont des inhibiteurs de transport de l'auxine ; ils inversent aussi le géotropisme (Le clech, 1998).

### **10.6. Effets sur la faune**

Les effets des pesticides sur les êtres vivants sont de différentes natures : mort subite, mort prématurée, atteinte à la fertilité, malformations, baisse des défenses immunitaires...

De nombreuses observations convergentes montrent que les traitements phytosanitaires ont des effets importants sur les insectes pollinisateurs, ces derniers subissant des pertes immédiates ou différées qui affectent les adultes ou les larves. L'intoxication par du nectar, du pollen, de l'eau, voire du miellat de pucerons contaminés, peut provoquer la mort des adultes ou des larves d'abeilles par exemple. Il existe également des symptômes dits sublétaux (qui ne provoquent pas la mort immédiate mais ont des conséquences à terme sur les populations) : troubles du comportement, mort prématurée, dérèglement du système de transmission des informations.

L'insecticide imidacloprid, serait à l'origine de véritables hécatombes observées dans les ruchers du Sud-Ouest. Sous l'action des apiculteurs, l'utilisation de cette molécule a été suspendue en 1999 sur tournesol, puis en 2004 sur maïs.

Plusieurs études menées sur des espèces sauvages, dans la nature ou en laboratoire, indiquent que certains pesticides ont une action endocrinienne, entraînant des effets néfastes.

À titre d'exemple, l'atrazine, massivement utilisée par le passé sur le maïs, perturbe le développement sexuel des grenouilles à une concentration trente fois inférieure au niveau admis par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement. Certains têtards se transforment ainsi en hermaphrodites et chez les grenouilles mâles arrivées à maturité sexuelle, l'herbicide divise par dix le taux de testostérone, pour atteindre des taux inférieurs à ceux des grenouilles femelles normales

### **10.7. Effets sur la microflore microbienne des sols et des eaux**

Les pesticides ont des effets nocifs sur la microflore du sol, laquelle est essentielle au maintien de la fertilité. L'action du pesticide peut provoquer un ralentissement de l'activité de la biomasse microbienne et la sélection des populations les mieux dotés pour résister au pesticide ou pour l'utiliser comme source de carbone cela se traduit par des réajustements microbiens pouvant être associés à des modifications des caractéristiques physiologiques des sols et, peut-être aussi, à une diminution de la diversité des microorganismes (Rouard et *al.*, 1996 ; Soulas, 1996-c) De très nombreux travaux ont montré que les traitements faits correctement ont un effet limité sur le métabolisme microbien du sol, car les espèces les plus sensibles peuvent être remplacées par de plus résistantes (Gerber et *al.*, 1989). Un changement qui peut n'être pas dépourvu de conséquences néfastes à long terme, à cause des espèces phytopathogènes qui se trouvent parmi cette microflore (Elmholt et *al.*, 1991).

L'application répétée de pesticides sur les parcelles agricoles peut conduire à l'adaptation de la microflore du sol qui acquiert les gènes codant les enzymes cataboliques responsables de la dégradation des pesticides.. Du point de vue agronomique, la biodégradation accélérée peut, dans certains cas, être dommageable en diminuant l'efficacité du traitement phytosanitaire. Du point de vue environnemental, elle est en général intéressante parce qu'elle réduit la persistance du produit phytosanitaire dans le sol, limitant ainsi son transfert, vers les autres compartiments de l'environnement, notamment les eaux de surface et souterraines.

L'adaptation de la microflore du sol conduit à la mise en place du phénomène de biodégradation accélérée (BDA) qui se caractérise par la diminution de la demi-vie des molécules actives (Topp et *al.*, 2003). Ainsi dans un sol adapté à la biodégradation accélérée de l'atrazine, la demi-vie de cet herbicide est de seulement quelques jours alors que dans un

sol non adapté, sa demi-vie varie de quelques semaines à quelques mois. Du point de vue agronomique, la BDA peut, dans certains cas, être dommageable en diminuant l'efficacité du traitement phytosanitaire. La BDA représente donc à la fois un enjeu agronomique et environnemental.

**CHAPITRE II :**  
**ANALYSE DES PARAMETRES**  
**PHYSICOCHEMISTIQUES**

## 1. INTRODUCTION

Estimer les effets sur les différentes composantes de l'environnement d'une contamination liée aux pesticides s'avère difficile, car il existe de nombreuses familles de pesticides, soit des dizaines de milliers de pesticides. Ils sont en outre utilisés à faibles doses et leurs comportements sont très divers. Leur impact dépend à la fois de leur mode d'action (certains sont beaucoup plus toxiques que d'autres), de leur persistance dans le temps (certains se dégradent beaucoup plus rapidement que d'autres).

L'appréciation du degré de pollution d'un milieu est appréciée à l'aide d'un certain nombre de paramètres : Les paramètres de la matrice (sol ou eau), du composé (polluant) et les paramètres liés à l'environnement (facteurs climatiques du milieu : température, précipitation, humidité, vent) et les paramètres d'interactions polluants-sol. Toutes ces propriétés déterminent l'impact de la pollution et sa répartition entre les phases solides, liquides et gazeuses du sol.

Les propriétés chimiques et physiques du pesticide sont déterminées par la structure de la molécule et par les atomes qui la composent. Ces propriétés physiques et chimiques varient énormément selon la structure de la molécule. Des composés peuvent être très peu persistants, peu toxiques et rester immobiles, et donc peu susceptibles de présenter un risque pour l'environnement ou la santé humaine. Par contre, à l'autre extrémité du spectre, il y a des composés persistants, mobiles et toxiques, auxquels appartiennent les molécules toxiques et lipophiles.

Les propriétés physiques les plus importantes sont la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la constante d'Henry, le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{OW}$ ) et le coefficient de partage carbone organique/eau ( $K_{OC}$ ). La persistance dans l'environnement est l'autre propriété importante d'une substance, car le transport peut augmenter le rayon d'exposition à cette substance bien au-delà de l'endroit immédiat où elle est utilisée ou rejetée.

Certaines des propriétés physiques susmentionnées sont fortement influencées par les conditions du milieu. Les paramètres de la matrice sol ou eau influent sur le transport du composé, plus un pesticide est adsorbé au niveau du sol, moins son transport est important. Ainsi, la matière organique, principale phase adsorbante dans les sols est considérée comme l'un des facteurs-clefs influençant la mobilité des pesticides. En effet, de nombreux travaux ont montré que la matière organique réduit et retarde la migration des pesticides vers les eaux

souterraines (Weber et *al.*, 2007 ; Ariaz-Estevez et *al.*, 2008). Les autres paramètres du sol (humidité, perméabilité, la porosité, ont également un rapport sur les quantités de pesticides transférées vers les autres compartiments de l'environnement (eaux souterraines, eaux superficielles, atmosphère). En ce qui concerne les paramètres environnementaux, et à titre d'exemple, la température a beaucoup d'influence sur la pression de vapeur, la solubilité dans l'eau et, par conséquent, la constante d'Henry. Le sens net des échanges des substances dépend également des différences de température à la surface de l'eau et des concentrations atmosphériques. Les basses températures favorisent plutôt la distribution de ces composés dans les particules en suspension dans l'atmosphère que dans la phase vapeur. Ces contaminants se déposent, s'évaporent et se fractionnent continuellement selon leur volatilité. Il s'ensuit que les pesticides de volatilité intermédiaire, sont transportés relativement rapidement et que les composés moins volatils, migrent plus lentement. Par ailleurs, le vent peut considérablement affecter les échanges entre le sol et l'atmosphère. En effet les turbulences créées au niveau du sol permettent un renouvellement de l'air en contact avec le sol contaminé et augmente ainsi le taux d'échange entre les deux milieux (Guigon Moreau, 2006 ; Atienza et *al.*, 2001). La vitesse et la direction du vent favorisent la dispersion des polluants de milieu vers un autre.

Lorsque la vitesse du vent est réduite, la dilution est faible ; il y a persistance des polluants à proximité de la source de pollution. Lorsque la vitesse du vent est grande ; la dilution est appréciable (Semadi et Decormis, 1986).

Tous ces paramètres interviennent dans le transfert et la dispersion des polluants par les phénomènes de diffusion, percolation, lixivation...etc.

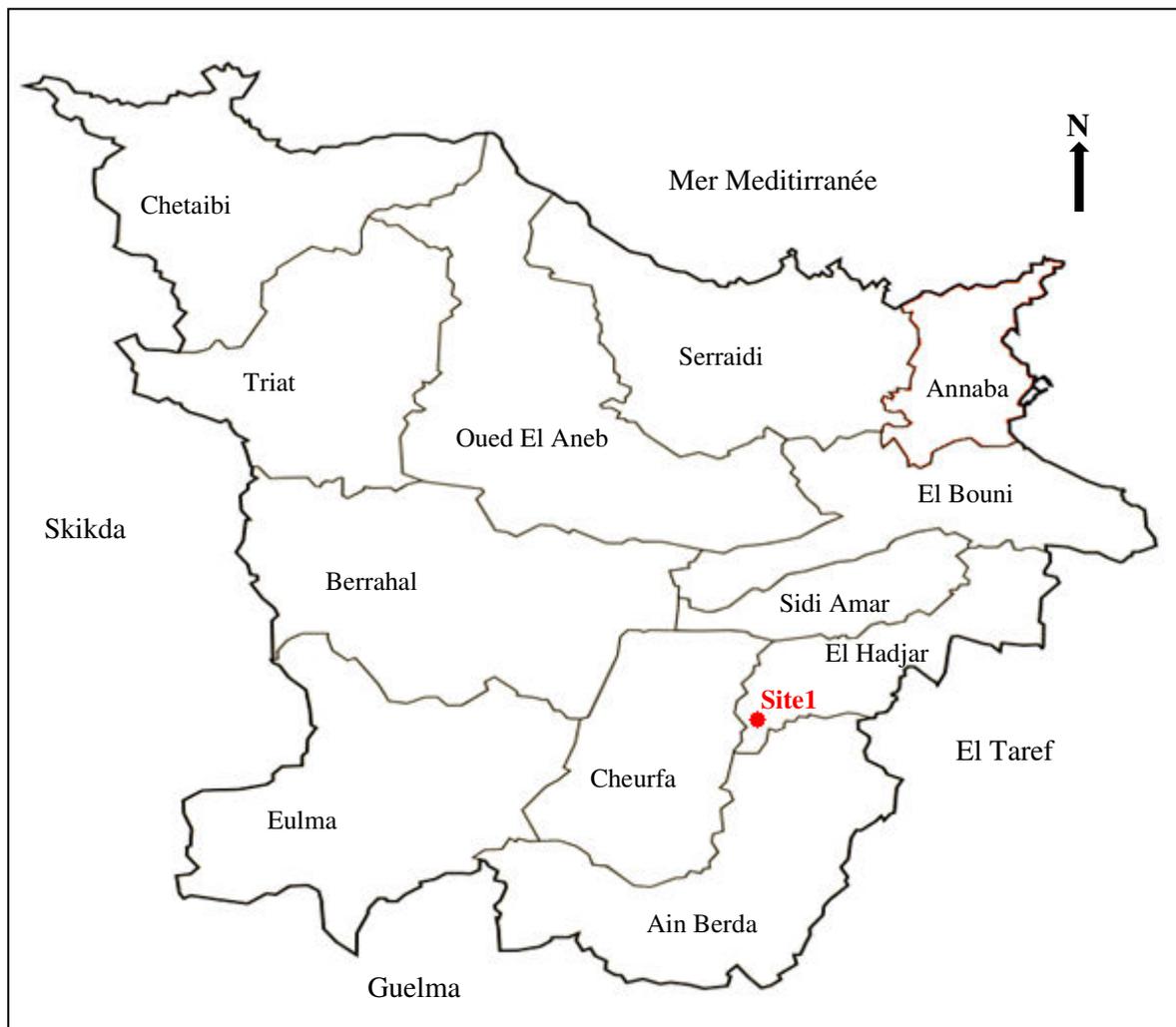
La présence de vapeur d'eau dans l'atmosphère crée une inversion de température importante pour la pollution et empêche la diffusion des polluants et favorise leurs concentrations.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Présentation et localisation de la zone et des stations d'étude

La présente étude concerne trois sites situés au niveau des wilayas du Nord-Est algérien (Site 1 ou El Karma wilaya d'Annaba, site 2 ou ITGC wilaya de Guelma et site 3 ou Aïn El Assel wilaya d'el Tarf).

El Karma et L'ITGC sont des sites à vocation agricole, Ils ont été soumis à des traitements répétés et massives par une multitude de pesticides (insecticides, fongicides et herbicides). Le troisième site servant de témoin est situé au niveau de la région d'Aïn El Assel (wilaya d'el Tarf), il a été retenu pour son éloignement de tout traitement par les produits phytosanitaires.



**Figure 2-1.** Carte de localisation géographique du site 1 contaminé : El Karma



**Figure 2-2.** Carte de localisation géographique du site 2 contaminé : Guelma



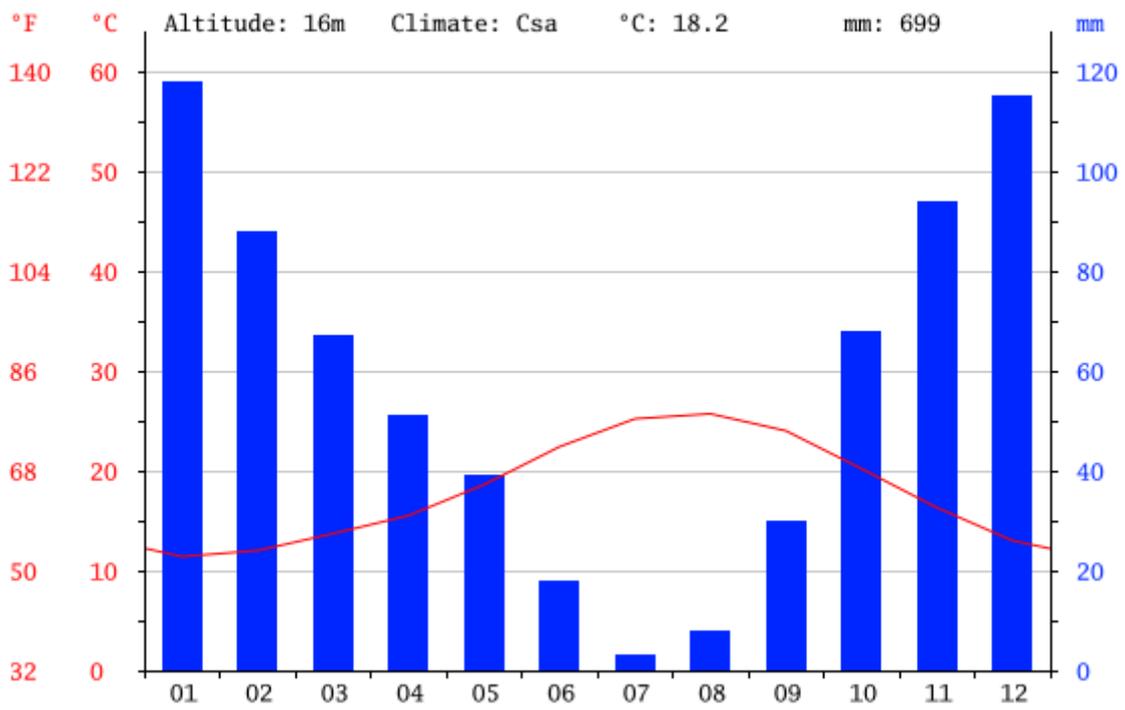
**Figure 2-3.** Carte de localisation géographique du site témoin : Aïn El Assel

### **El Karma (Annaba)**

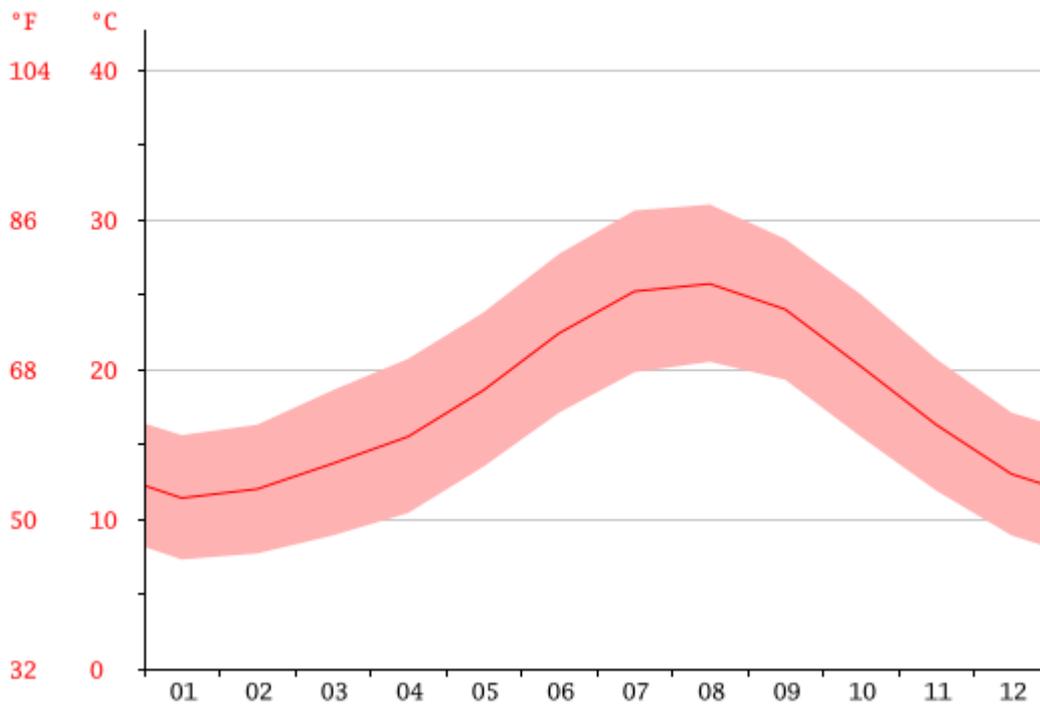
Le domaine d'el Karma, se situe au niveau de la daïra d'el Hadjar. La daïra est localisée au Nord-Est de l'Algérie, sur le littoral à quelques mètres d'altitude par rapport au niveau de la mer et à 16 km au sud de la ville et du port maritime de la ville d'Annaba. Elle compte 35.000 habitants pour une surface occupée de 62 km<sup>2</sup>.

Un climat tempéré chaud est présent à El Kerma. En hiver, les pluies sont bien plus importantes à El Kerma qu'elles ne le sont en été. La carte climatique de Köppen-Geiger y classe le climat comme étant de type Csa. El Kerma affiche 18.2 °C de température en moyenne sur toute l'année. Les précipitations annuelles moyennes sont de 699 mm.

Le mois le plus sec est celui de Juillet avec seulement 3 mm. Le mois de Janvier, avec une moyenne de 118 mm, affiche les précipitations les plus importantes.



**Figure 2-4.** Diagramme climatique de la région d'El Karma



**Figure 2-5.** Courbe de température de la région d'El Karma

Avec une température moyenne de 25.7 °C, le mois d'Aout est le plus chaud de l'année. Durant le mois de Janvier, la température moyenne est de 11.4 °C. Le mois de Janvier est de ce fait le mois le plus froid de l'année.

### **Guelma (ITGC)**

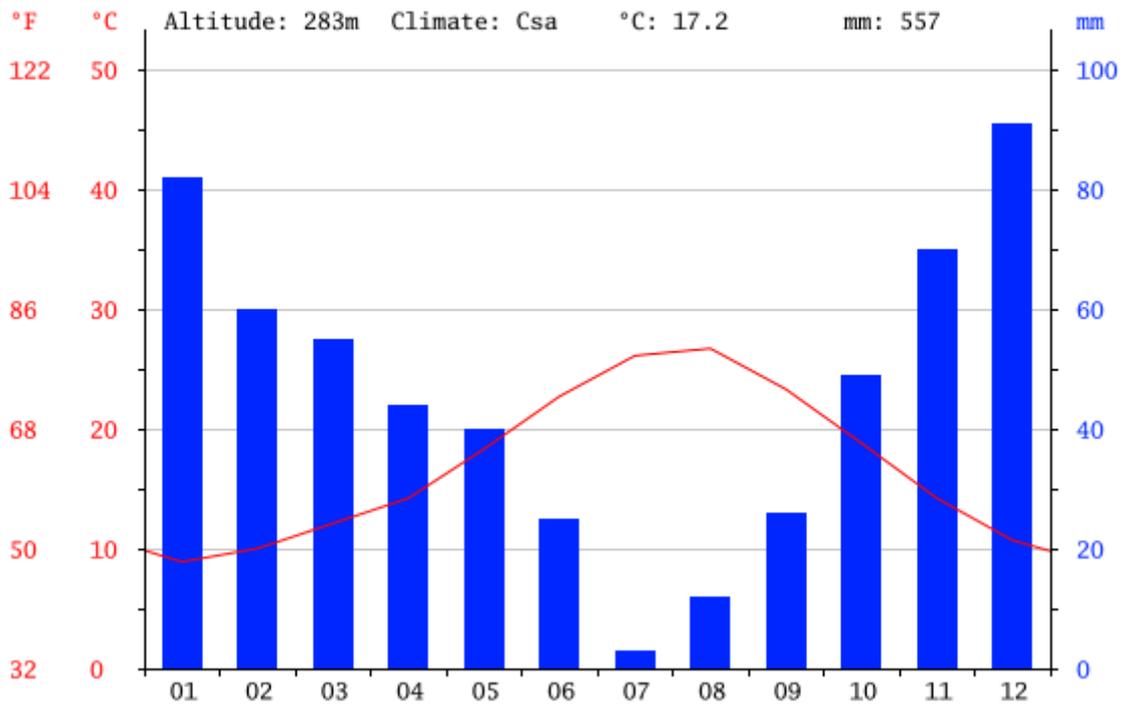
L'ITGC ou Institut Technique des Grandes Cultures est un site d'expérimentation au niveau de la daïra de Guelma. La ville s'étend sur une superficie de 3.686.84 Km<sup>2</sup> avec des coordonnées de 36 ° 21', 44 N. Elle se situe au Nord-Est de l'Algérie à 60 Km environ de la méditerranée et à 600 Km à l'Est d'Alger, elle occupe une position médiane entre le Nord du pays, les hauts plateaux et le sud. Elle est limitrophes aux villes d'Annaba au Nord, El Taref au Nord-Est, Souk Ahras au Sud-Est, Oum el Bouaghi au Sud, Constantine à l'Ouest, Skikda au Nord-Ouest (Zouaidia, 2006).

Le territoire de la wilaya se caractérise par un climat doux et pluvieux en hiver et chaud en été. La température qui varie de 4°C en hiver à 35,4°C en été est en moyenne de 17,2°C.

Quant à la pluviométrie, on enregistre 654 mm/an à la station de Guelma. Cette pluviométrie varie de 400 à 500 mm/an au Sud jusqu'à près de 1.000 mm/an au Nord. Près de 57% de cette pluviométrie est enregistrée pendant la saison humide allant d'octobre à mai.

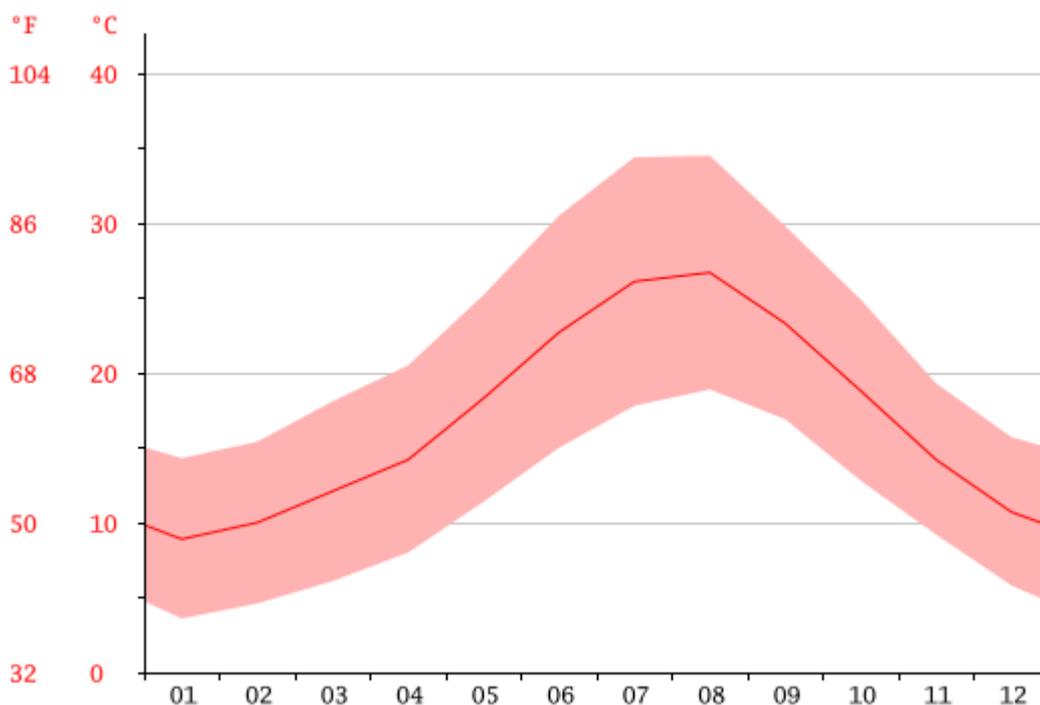
Pour ce qui est de l'enneigement, on enregistre 12,7 j/an et s'il neige sur les principaux sommets, les risques sur les plaines sont minimes.

Le nombre de gelées blanches est de l'ordre de 11 j/an à la station de Guelma. Par ailleurs, on relève 2,2 j/an de grêle. Mais on enregistre 36,2 j/an de Sirocco. Ce climat dont jouit la wilaya est assez favorable à l'activité agricole et à l'élevage.



**Figure 2-6.** Diagramme climatique de la région de Guelma

Des précipitations moyennes de 3 mm font du mois de Juillet le mois le plus sec. Une moyenne de 91 mm fait du mois de Décembre le mois ayant le plus haut taux de précipitations.



**Figure 2-7.** Courbe de température de la région de Guelma

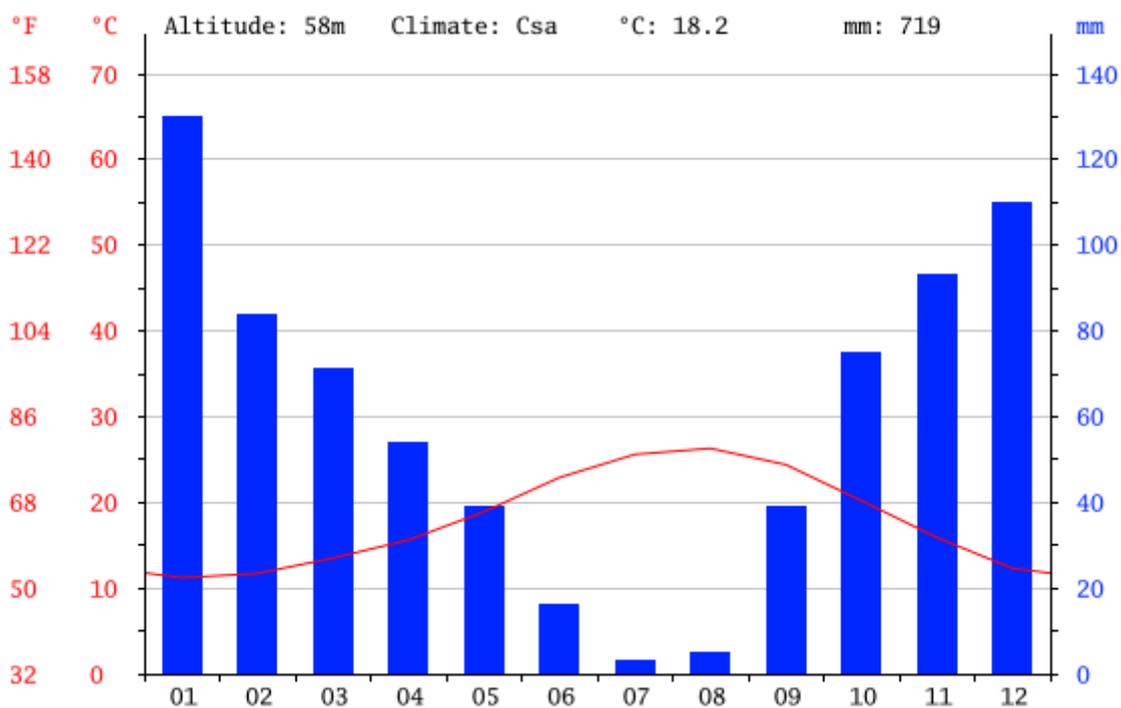
Le mois le plus chaud de l'année est celui d'Aout avec une température moyenne de 26.7 °C. 8.9 °C font du mois de Janvier le plus froid de l'année.

### **Aïn El Assel (El Taref)**

Le troisième site Aïn El Assel est situé au niveau de la daïra d'El Kala, à 20 km d'El Tarf, à l'extrême du Nord-Est de l'Algérie. Ses coordonnées géographiques sont comprises entre une latitude de 36.8956 et une longitude de 8.4433336° 53' 44" Nord, 8° 26' 36" Est., à environ 3km de la frontière algéro-tunisienne à l'Est, et à l'Ouest d'environ 80 km d'Annaba. Sa superficie est de 292 Km<sup>2</sup> (Raachi, 2007).

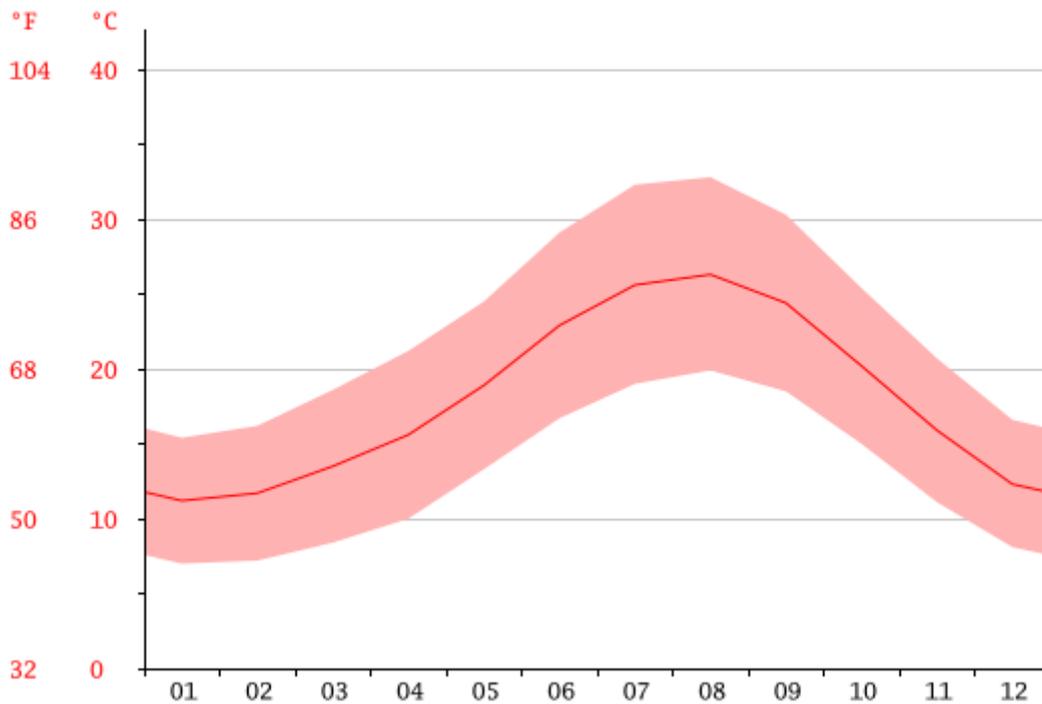
La région d'El Kala est une des régions qui jouissent d'une pluviosité des plus élevées, environ 1000 mm par an. Ces précipitations sont dues, principalement, à deux phénomènes météorologiques : les perturbations cycloniques d'origine atlantique de l'ouest et du nord-ouest, affectent le littoral Nord-est algérien après avoir traversé l'Espagne et une partie de la Méditerranée et les dépressions méditerranéennes se formant en méditerranée occidentale, et affectent en général toutes les chaînes montagneuses autour de la méditerranéenne, et particulièrement, la partie orientale du Tell algérien.

Un climat tempéré chaud est présent à Aïn El Assel. les pluies sont moins importantes qu'elles ne le sont en hiver. Selon la classification de Köppen-Geiger, le climat est de type Csa (André Hufty, 2001). La température moyenne annuelle est de 18.2 °C. Les précipitations annuelles moyennes sont de 719 mm.



**Figure 2-8.** Diagramme climatique de la région d'Aïn El Assel

Le mois le plus sec est le mois de Juillet, avec seulement 3 mm. Le mois de Janvier, avec une moyenne de 130 mm, affiche les précipitations les plus importantes.



**Figure 2-9.** Courbe de température de la région d'Aïn El Assel

Le mois d'Aout est le plus chaud de l'année avec une température moyenne de 26.3 °C. Pendant le mois de Janvier, la température moyenne est de 11.2 °C. Janvier est de ce fait le mois le plus froid de l'année.

## **2.2. Présentation du matériel d'étude utilisé**

### **2.2.1. Prélèvements des échantillons de sol**

Le sol est un milieu hétérogène et la précision des résultats fournis par l'analyse ne dépend pas uniquement de la méthode dont l'erreur est faible, mais surtout de l'échantillonnage.

Les prélèvements ont été effectués en automne, hors température froide et hors des périodes de stress hydrique. Les échantillons ont été collectés sur toute la profondeur du labour en éliminant les débris de surface. Les différents prélèvements (15 prélèvements pour chaque site) ont été prélevés à deux niveaux de sol, à une profondeur de 0 cm et 10 cm sur toute la superficie des parcelles. Ils ont été mélangés dans des bacs propres, puis placés dans des sachets stériles et emportés au laboratoire en vue des analyses.

### **2.2.2. Prélèvement des échantillons d'eau de ruissellement**

L'échantillonnage est primordial car il conditionne la pertinence de l'analyse. Il doit être de qualité mais également représentatif de ce que l'on veut analyser.

Les échantillons d'eau doivent être prélevés dans des récipients propres, rincés plusieurs fois avec l'eau à analyser, puis fermés hermétiquement sans laisser de bulles d'air dans le flacon.

La nature du matériau du récipient de prélèvement est importante, car celui-ci ne doit pas entrer en réaction avec l'eau à analyser et que pour qu'il n'y ait pas passage en solution d'éléments chimiques entrant dans la composition du flacon ou fixation de certains ions de l'eau sur les parois du récipient.

Les prélèvements ont été réalisés dans des récipients en verre ambré stériles conçus pour les prélèvements d'eau selon les normes internationales (Rodier, 1996 et Afnor, 1997). Après des périodes de pluies. Avant chaque prélèvement, le flacon est rincé plusieurs fois avec l'eau à analyser.

Nous avons constitué un échantillon " moyen " en mêlant plusieurs prélèvements effectués en divers points d'accumulation des eaux de ruissellement, afin de mieux connaître la chimie moyenne de l'eau. Les échantillons sont conservés à 4°C puis transportés jusqu'au laboratoire dans la même journée en vue des analyses.

### **2.2.3. Méthodes d'analyse des paramètres physico-chimiques du Sol**

La qualité d'un sol est approuvée à l'aide d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques, ces derniers nous donnent une première estimation du degré de fertilité et / ou de pollution.

#### **2.2.3.1. Les matières organiques**

La teneur en carbone organique varie avec la profondeur du sol et joue souvent un rôle au sein du milieu (adsorption des contaminants sur les particules du sol). La matière organique amplifie grandement la capacité d'échange cationique du sol et retient les nutriments assimilables par les plantes. Ainsi, la matière organique constitue un réservoir de nutriments lentement assimilables.

La teneur en matière organique du sol n'est pas une donnée utilisée pour effectuer des recommandations de fertilisation, mais elle joue néanmoins un rôle important dans la fertilité du sol.

La méthode de (Walkley-Black, 1934) suivie repose sur le principe que le bichromate de potassium oxyde le carbone contenu dans le sol. Le bichromate de potassium change de couleur selon la quantité de produits réduits et ce changement de couleur peut être comparé à la quantité de carbone organique présent dans le sol (Black et Evan, 1965).

### **2.2.3.2. Le calcaire total**

Selon (Mathieu et Lozet, 2002 ; Legros, 2007), les sols calcaires se détectent facilement par un test à l'acide chlorhydrique. Une goutte d'acide posée sur l'échantillon provoque un dégagement de  $\text{CO}_3$  visible dans le liquide et d'autant plus violent qu'il y a beaucoup de calcaire.

Les sols calcaires contenant du calcaire actif c'est-à-dire du carbonate de calcium à l'état de particules si fines que leur solubilisation continue par les acides de sol entretient dans la solution une concentration importante d'ions  $\text{Ca}^{+2}$ . Le complexe adsorbant de ces sols est en général bien pourvu, sinon saturé en calcium (Soltner, 2005 ; Gadjia, 2010).

La détermination du pourcentage du calcaire total a été réalisée selon la méthode de (Bonneau et Souchier, 1979), à l'aide de deux solutions : une solution acide (HCl à 0.5 N et une solution basique de NaOH à 0.25 N) en utilisant le réactif de la phénolphthaléine (Bonneau et Souchier, 1979).

### **2.2.3.3. Le pH eau**

C'est un paramètre très important. La connaissance du pH donne des indications sur le type du sol acide ou basique. Le pH a une grande influence sur l'activité biologique de la microflore du sol (optimum entre 5,6 et 7,5). Il influe également sur l'adsorption, absorption, dégradation et/ou biotransformation des polluants. Les lectures ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre type Wagtech 525043.

#### **2.2.3.4. Le pH kcl**

C'est la mesure de l'acidité d'une suspension de terre dans l'eau, avec un rapport terre/eau normalisé (1/5). Il indique aussi la concentration en ions « H<sup>+</sup> » présente dans l'eau. (Morel, 1996).

La mesure du pH est faite après un repos au moins d'une heure. Les valeurs mesurées sont comparées à une gamme de pH des sols (Gaucher, 1968).

#### **2.2.3.5. La conductivité électrique**

La conductivité électrique est un paramètre qui reflète également la salinité d'un sol étudié, la détermination de la conductivité électrique se fait sur l'extrait du sol (rapport sol/eau) à l'aide d'un conductimètre. C'est la mesure de la capacité de l'électrolyte à conduire le courant électrique. La mesure s'effectue grâce à une cellule de mesure que l'on plonge directement dans l'électrolyte. Un étalonnage préalable est nécessaire et la mesure est rapportée à une température standard, en général 25°C. Les valeurs calculées avec une sonde multi paramètres de type WTW 197i sont comparées à une échelle de salinité des sols (USSSL, 1954).

#### **2.2.3.6. L'humidité**

L'humidité du sol joue un rôle important dans la distribution et la mobilité des pesticides et par conséquent sur leur concentration dans les différentes phases : liquide, solide, vapeur. Elle peut avoir une grande influence sur la biodégradation et sur la DT50. La DT 50 peut être multiplié par 4 dans un sol humide à 50% (Barriuso et *al.*, 1996).

Le pourcentage de l'humidité du sol est déterminé selon la méthode gravimétrique qui consiste à dessécher l'échantillon de sol à 105°C pendant 24 h. La perte de poids après séchage est égale à la teneur d'eau du sol. Les valeurs obtenues peuvent être exprimées en pourcentage par rapport au poids de l'échantillon sec et humide selon l'équation suivante :

$$H\% = (P_1 - P_2 / P_1 - P_0) \times 100.$$

#### **2.2.4. Analyses des paramètres physico-chimiques de l'eau**

Pour apprécier le degré de pollution d'une eau, on doit recourir à l'analyse de quelques paramètres physico-chimiques. Pour cela nous avons procédé à l'analyse des paramètres suivants : pH, conductivité électrique, oxygène dissous, DBO5, DCO, nitrites et nitrates.

#### **2.2.4.1. Le pH**

Le pH d'une eau représente son degré d'acidité ou d'alcalinité. Le pH influe sur l'activité des organismes qui sont responsables de la transformation de la matière organique.

Le pH des eaux de ruissellement est lié à la nature des terrains traversés. Le pH (potentiel hydrogène), est le reflet de la concentration d'une eau en ions H<sup>+</sup> :  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ . Le calcul du pH des échantillons d'eau a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre de type Wagtech 525043.

#### **2.2.4.2. La conductivité électrique**

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.

#### **2.2.4.3. La demande biologique en oxygène (DBO5)**

La DBO5 exprime la consommation naturelle d'oxygène en gramme/litre des corps contenus 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 (O<sub>2</sub>). 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.

#### **2.2.4.4. 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 ( $\text{KMnO}_4$ ) pendant 2 heures.

#### **2.2.4.5. 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.

#### **2.2.4.6. L'oxygène dissous**

L'analyse de l'oxygène dissous mesure la quantité d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) dissous dans une solution aqueuse. La présence de l'oxygène dans l'eau est due à la diffusion de l'oxygène en surface, à l'aération. La présence d'oxygène dans l'eau est indispensable à la respiration des êtres vivants aérobies. L'oxygène de l'eau permet également le processus d'oxydation des matières organiques, mais cette décomposition appauvrit le milieu en oxygène. L'oxygène dissous est évalué grâce à un oxymètre de type 340i Multi / SET.

#### **2.2.4.7. Les nitrates et nitrites**

Les nitrates des eaux souterraines et des cours d'eau proviennent principalement d'origine agricole en raison du recours aux engrais azotés. 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).

Les nitrites et les nitrates sont des composés intermédiaires du processus de nitrification ou de dénitrification. Ils sont associés du fait que la transformation de l'un en l'autre s'opère par des bactéries du sol et de l'eau. Les nitrates proviennent de l'oxydation complète de l'azote organique sous l'action de bactéries nitrifiantes et les nitrites de l'oxydation incomplète sous l'action des Nitrosomonas.

Les nitrates et les nitrites proviennent généralement de l'utilisation des engrais, l'industrie chimique et de l'industrie alimentaire.

La teneur en nitrates dans l'eau est généralement plus élevée que celle des nitrites. Une forte concentration en nitrites indique une pollution d'origine organique. Une concentration de nitrates-nitrites supérieure à 5 mg/l indique généralement une influence du milieu agricole.

Les nitrates des eaux souterraines et des cours d'eau proviennent :

- Principalement d'origine agricole en raison du recours aux engrais azotés.
- en second lieu des rejets des stations d'épurations (transformation de la matière organique en nitrates). Certaines installations sont complétées par des traitements de dénitrification avant rejet.
- ou encore du milieu naturel, pour 3 et 7 mg/l. seulement, une quantité suffisante pour nourrir la vie aquatique des cours d'eau. (A delà c'est l'indigestion, le développement des algues, l'eutrophisation.)

Les nitrates posent problème en raison de leur trop grande introduction dans les eaux par l'agriculture industrielle. Il faut diviser par 4,43 le poids des nitrates pour déterminer le poids d'azote contenu par ces mêmes nitrates. Bien que les nitrates soient énormément moins nocifs que les nitrites, il ne doit pas y en avoir plus de 50 mg/l dans l'eau.

Pour la détermination des ions nitrates et nitrites, les nitrates sont d'abord réduits en nitrites en milieu alcalin par l'intermédiaire du sulfate d'hydrazine en présence de sulfate de cuivre, qui agit comme catalyseur. Ensuite, les nitrates réduits et les nitrites originaux réagissent avec le sulfanilamide pour former un composé diazoïque qui se combine en milieu acide avec le dihydrochlorure de N-(1-naphthyl)-éthylènediamine pour former un composé rosé à violet,

dont l'absorbance à 520 nm est proportionnelle à la concentration des ions nitrites et nitrates. (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2003).

### **2.2.5. 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).

#### **2.2.5.1. La solubilité (S)**

Les substances ayant une solubilité élevée sont rapidement distribuées 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.

#### **2.2.5.2. 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.

#### **2.2.5.3. 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 dissoute dans l'eau.

#### **2.2.5.4. 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.

#### **2.2.5.5. 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.

#### **2.2.5.6. 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.

#### **2.2.5.7. K<sub>OW</sub>**

Le K<sub>OW</sub> 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.

#### **2.2.5.8. Stabilité dans l'eau**

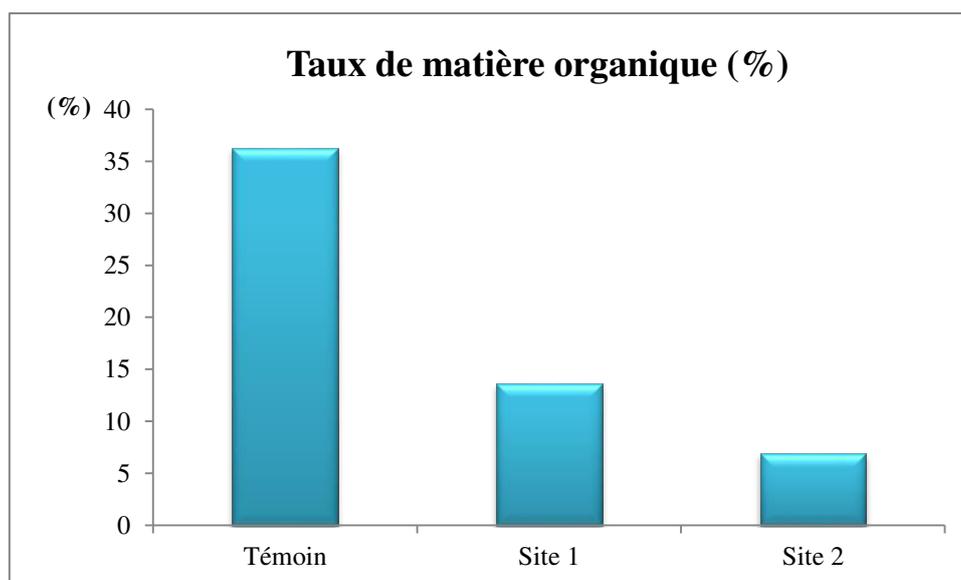
Elle est évaluée par le temps de dégradation de 50 % de la substance active (DT 50) dans l'eau et exprimée en jours ou en heures à un pH donné.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Analyses physico-chimique du sol

**Tableau 2-1.** Résultats des paramètres physico-chimiques du sol

| Paramètres / Echantillons                           | Site témoin | Site contaminé 1 | Site contaminé 2 |
|---|-------------|------------------|------------------|
| Taux de matière organique (%)                       | 36.31       | 13.58            | 6.90             |
| Taux de calcaire (%)                                | 19.37       | 19.87            | 13.88            |
| Taux d'humidité (%)                                 | 42.33       | 23.33            | 6.86             |
| pH eau  | 8.65        | 8.98             | 9.04             |
| pH Kcl  | 8.35        | 8.79             | 8.90             |
| Conductivité électrique ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ ) | 0.08        | 0.13             | 0.12             |

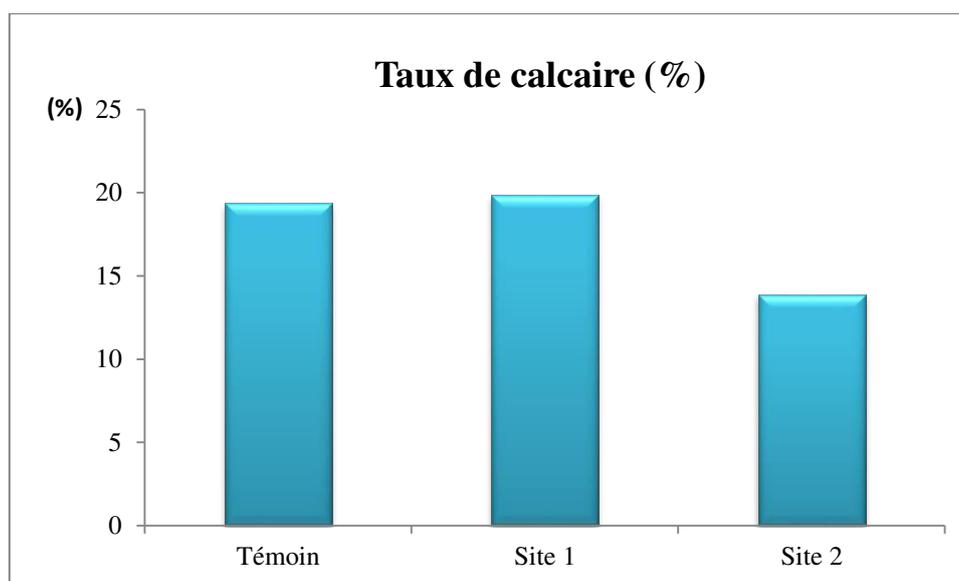


**Figure 2-10.** Taux de matière organique dans les sols traités et le sol témoin

**Tableau 2-2.** Classification des sols d'après leur teneur en matières organiques (Soltner, 1981)

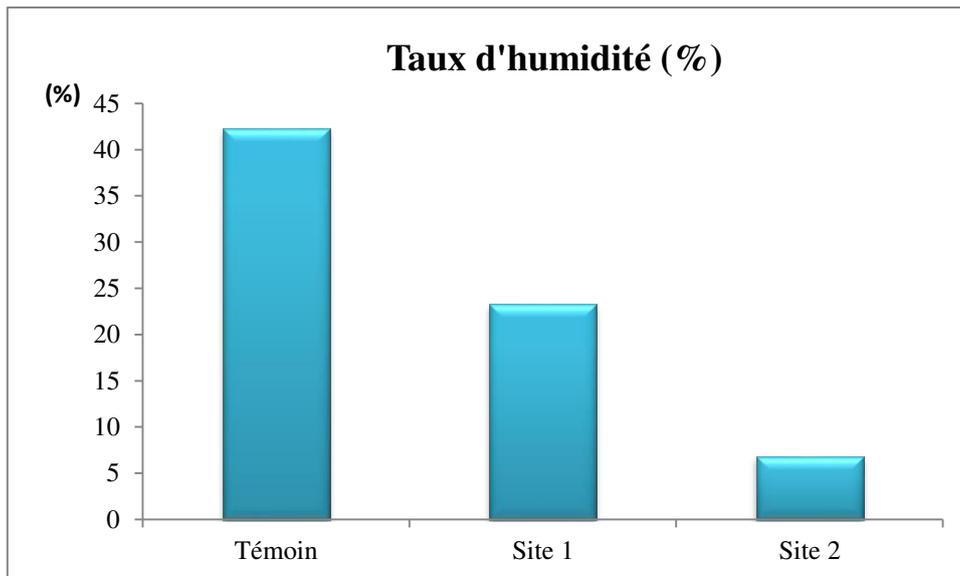
| <b>% des matières organiques</b> | <b>Appréciation</b> |
|----------------------------------|---------------------|
| < 1                              | Extrêmement faible  |
| 1-1.5                            | Très faible         |
| 1.5-2.5                          | Faible              |
| 2.5-3.5                          | Moyen               |
| 3.5-4.5                          | Moyennement élevé   |
| 4.5-5                            | Elevé               |
| > 5                              | Très élevé          |

Le pourcentage de matières organiques est de l'ordre de 13,58% pour le site 1 d'El Karma et de 6,90% pour le site 2 Guelma, cependant ces taux sont plus faibles par rapport au témoin (Aïn El Assel) 36,31%. La comparaison de ces résultats aux valeurs de l'échelle de (Soltner, 1981) indique que les sols étudiés sont très chargés en matières organiques. Le sol de la parcelle de l'ITGC Guelma est le plus pauvre



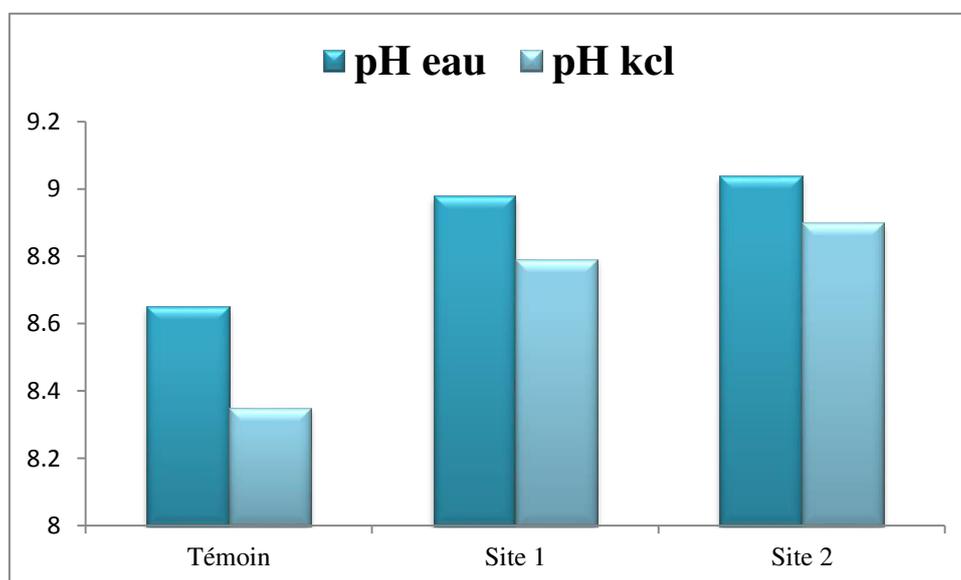
**Figure 2-11.** Taux de calcaire dans les sols traités et le sol témoin

En ce qui concerne le calcaire, les taux sont assez similaires entre le site 1 et le témoin avec respectivement 19,87% et 19,37%. Un pourcentage moins élevé toujours au niveau du site 2.



**Figure 2-12.** Taux d'humidité dans les sols traités et le sol témoin

La figure (2-12) montre que l'humidité du sol au niveau du site témoin est plus élevée que celle du site 1 et elle l'est beaucoup plus par rapport à celle du site 2. Un pourcentage d'humidité ne dépassant pas les 6,86 % au niveau de la région de Guelma.

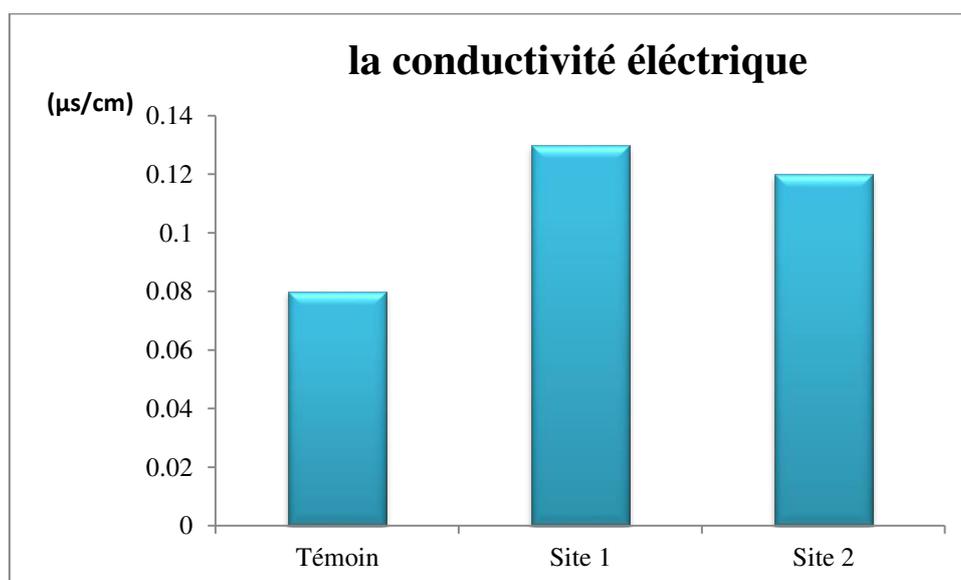


**Figure 2-13.** pH eau et pH kcl des sols traités et le sol témoin

**Tableau 2-3.** Gamme de pH des sols (Gaucher, 1981)

| pH        | Désignation des sols  |
|-----------|-----------------------|
| 3-4.5     | Extrêmement acides    |
| 4.5-5     | Très fortement acides |
| 5-5.5     | Très acides           |
| 5.5-6     | Acides                |
| 6-6.75    | Faiblement acides     |
| 6.75-7.25 | Neutre                |
| 7.25-8.5  | Alcalins              |
| >8.5      | Très alcalins         |

Les calculs des pH reflètent une forte alcalinité de tous les échantillons de sol analysés, et ce, par comparaison à la gamme de pH des sols (Gaucher, 1981). Des pH basiques compris entre 8,65 et 9,04 pour pH eau et entre 8,35 et 8,90 pour pH KCl. Les valeurs les plus basiques sont enregistrées au niveau du site 2.



**Figure 2-14.** Conductivité électrique des sols traités et le sol témoin

**Tableau 2-4.** Echelle de salinité du sol (USSS, 1954).

| Conductivité électrique (M0.0s/cm) | Salure    |
|------------------------------------|-----------|
| 0-0.6                              | Non salé  |
| 0.6-1.4                            | Peu salé  |
| 1.4-2.4                            | Salé      |
| 2.4-6                              | Très salé |

La figure (2-14) montre que la conductivité électrique des différents prélèvements s'échelonne entre 0,12 et 0,13  $\mu\text{s}/\text{cm}$  au niveau des deux sites contaminés et de 0,08  $\mu\text{s}/\text{cm}$  pour le site témoin d'Aïn El Assel. Toutes les valeurs enregistrées indiquent le non salinité des sols analysés.

Les analyses réalisées sur les échantillons de sol des trois régions étudiées montrent une variabilité dans les résultats. Des sols très riches en matières organiques avec cependant de légères variations d'un site à l'autre. Les teneurs enregistrées au niveau du site témoins sont les plus importantes. La matière organique est d'une grande utilité pour les microorganismes et constitue la source de carbone et d'énergie qui se transforment en nouveau corps et produits du métabolisme et également joue un rôle dans la solubilité des pesticides. L'adsorption des pesticides sur la matière organique augmente leur solubilité et leur stabilité dans les profils. (Chiou et *al.*, 1986) . Les teneurs en matières organiques dans le sol influent énormément sur l'adsorption des pesticides en entraînant une diminution du  $K_d$  et une augmentation du  $K_{oc}$  (Graber et *al.*, 2001) . Les pesticides et leurs métabolites ont tendance à s'adsorber sur les composés humiques du sol en présence de fortes teneurs en matières organiques par la microflore fongique (Haider et *al.*, 1975 ; Duchaufour, 1971 ; Duchaufour, 1977 ) et par voie de conséquence, les différentes réactions chimiques peuvent conduire à la formation de résidus liés (Robert et Berthelin, 1986).

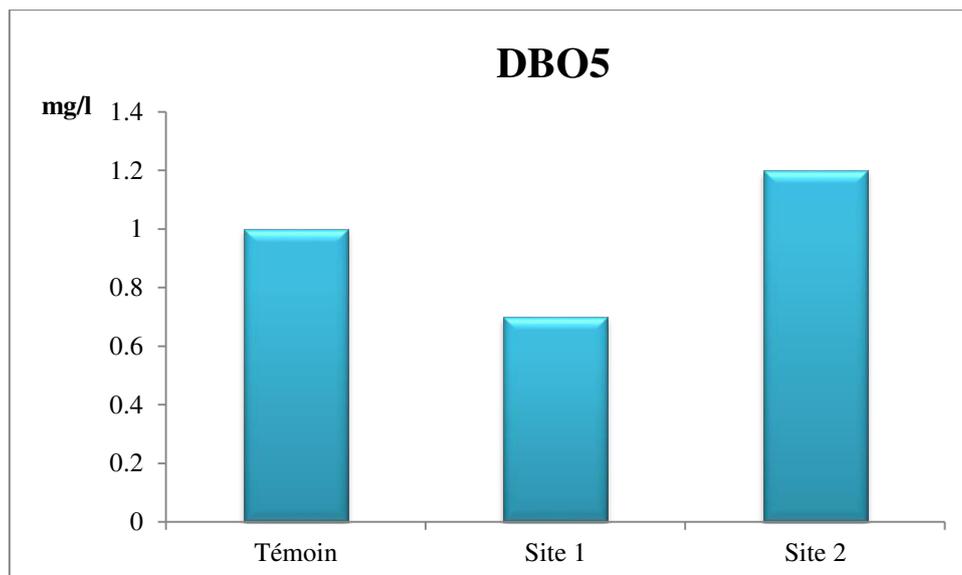
Ainsi tous les pH sont situés dans la zone optimale d'activité biologique ce qui est très favorable à l'installation d'une microflore riche est variée. En outre, la mesure de  $\Delta \text{pH} = \text{pH}_{\text{eau}} - \text{pH}_{\text{KCl}}$ , nous a permis d'estimer l'acidité potentielle ou l'acidité d'échange. Les valeurs enregistrées du  $\Delta \text{pH} = \text{pH}_{\text{eau}} - \text{pH}_{\text{KCl}}$  sont compris entre 0,14 et 0,30 ce qui montre qu'en est en présence d'un sol moyennement désaturé. Le  $\Delta \text{pH}$  est d'autant plus grand que le sol est désaturé en bases ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ). Toutefois, il n'y a pas de proportionnalité rigoureuse entre le pH et la valeur de désaturation. Les faibles conductivités électriques

détectées reflètent l'absence de sels. Cette baisse de salinité est très favorable pour la fertilité des sols. En effet, L'excès de teneur en sel est l'un des soucis principaux avec l'eau utilisée pour l'irrigation. Une concentration élevée en sel dans l'eau ou dans les sols affectera négativement le rendement des récoltes, provoquera une dégradation des sols et une pollution des eaux souterraines (Hattori, 1988 ; Andreux, 1978, Dommergues et Mangenot, 1970)

### 3.2. Analyses physico-chimique des eaux

**Tableau 2-5.** Résultats des paramètres physico-chimiques des eaux

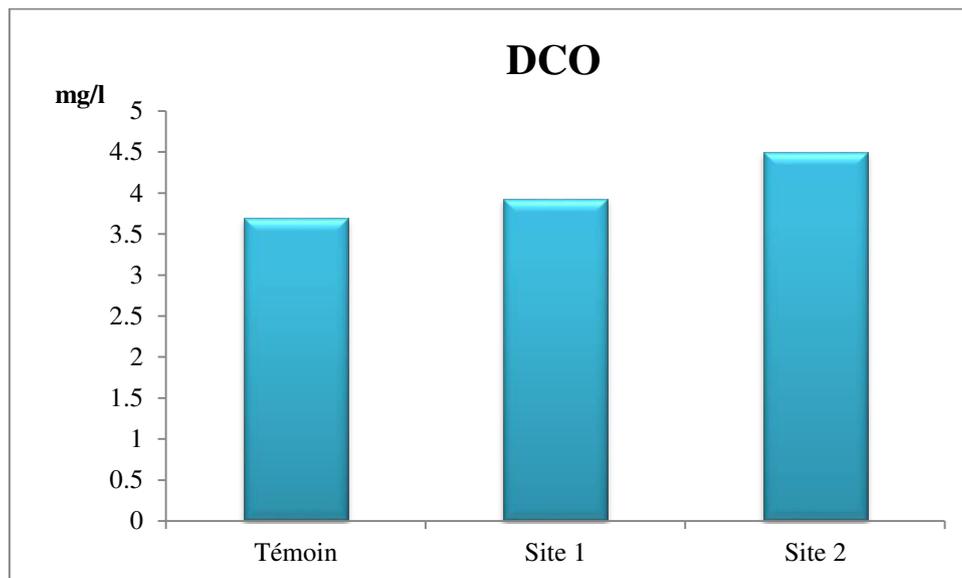
| Parametres /echantillons | DBO 5 mg/l | DCO mg/l | Oxygene dissous mg/l | Nitrate mg/l | Nitrite mg/l | pH      | Conductivite Electrique Ms/cm | DCO/D BO5 |
|--------------------------|------------|----------|----------------------|--------------|--------------|---------|-------------------------------|-----------|
| Normes                   | 3540       | 120-130  | 8                    | 50           | 0,1          | 6,5-8,5 | 1000                          | 3,38      |
| Site témoin              | 1          | 3,70     | 2,92                 | 1,37         | 4,08         | 7,80    | 1169                          | 3,70      |
| Site contaminé 1         | 0,7        | 3,93     | 2,62                 | 1,50         | 1,67         | 9,06    | 1817                          | 5,61      |
| Site contaminé 2         | 1,2        | 4,50     | 2,54                 | 1,32         | 3,35         | 7,82    | 1667                          | 3,75      |



**Figure 2-15.** Teneurs de la DBO5 des eaux de ruissellement

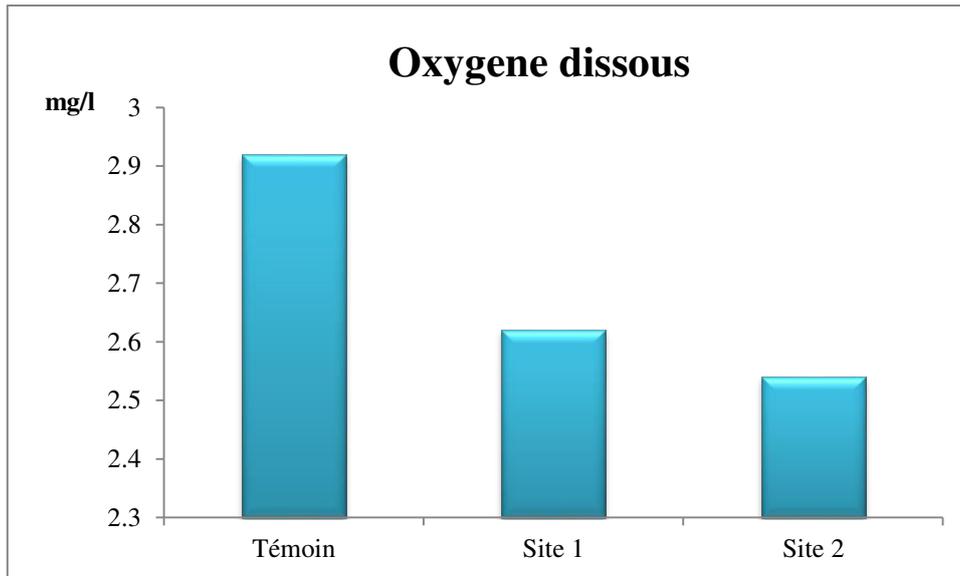
La demande biochimique en oxygène après 5 jours est faible et ne dépasse 1,2mg/l au niveau des trois sites. Ces valeurs enregistrées sont très inférieures aux concentrations minimales autorisées (2 à 20 mg/l). Plus la DBO5 est élevée, plus la quantité de matières organiques présentes dans l'échantillon est élevée (IBGE, 2005).

Au bout de 5 jours, seulement des quantités minimales d'oxygènes ont été utilisées par les microorganismes afin de transformer les matières organiques biodégradables.



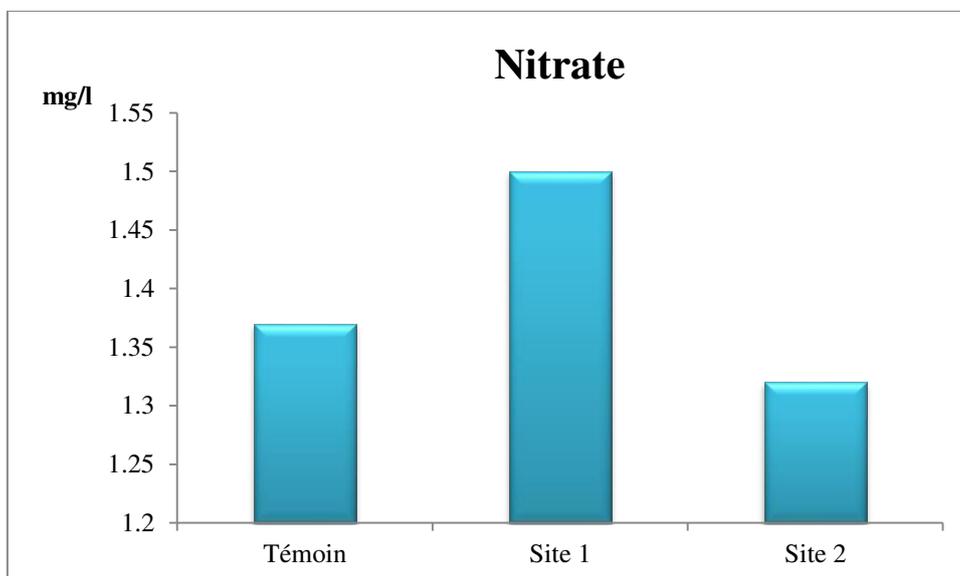
**Figure 2-16.** Teneurs de la DCO des eaux de ruissellement

Les teneurs en DCO observées dans la figure (2-16) montrent que la valeur la plus élevée est celle du site 2 (Guelma) avec 4,5 mg/l, qui indique une pollution relativement importante contrairement à celle notée au niveau du site 1, elle moins élevée avec 3,7 mg/l et peut témoigner d'une contamination moins forte



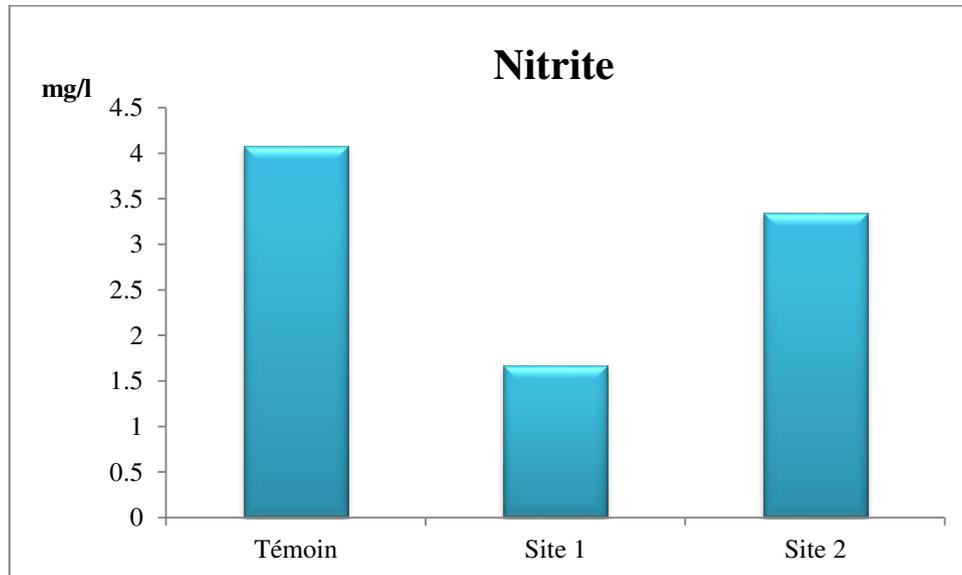
**Figure 2-17.** Taux d'oxygène dissous des eaux de ruissellement

Les taux d'oxygène dissous s'échelonnent entre 2,62 mg/l pour le site 1 et 2,92 mg/l pour le site témoin. Un taux moins élevé a été enregistré au niveau du site 2. Les eaux de ruissellement analysées sont en dessous des normes admissibles par comparaison à celles préconisées par l'OMS qui sont d'environ 8,1 mg/l. jusqu'aux environs de 20 mg/l.



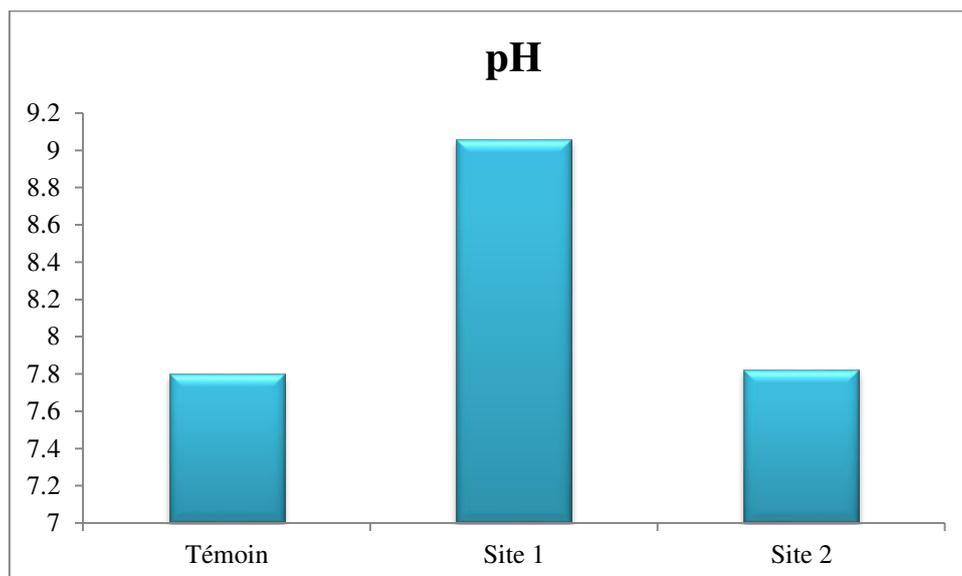
**Figure 2-18.** Teneurs en nitrates des eaux de ruissellement

Les eaux étudiées présentent des teneurs en nitrate largement inférieures aux normes prescrites par l'OMS (50 mg/l). Les valeurs sont uniquement de l'ordre de 1,32 mg/l et 1,50 mg/l.



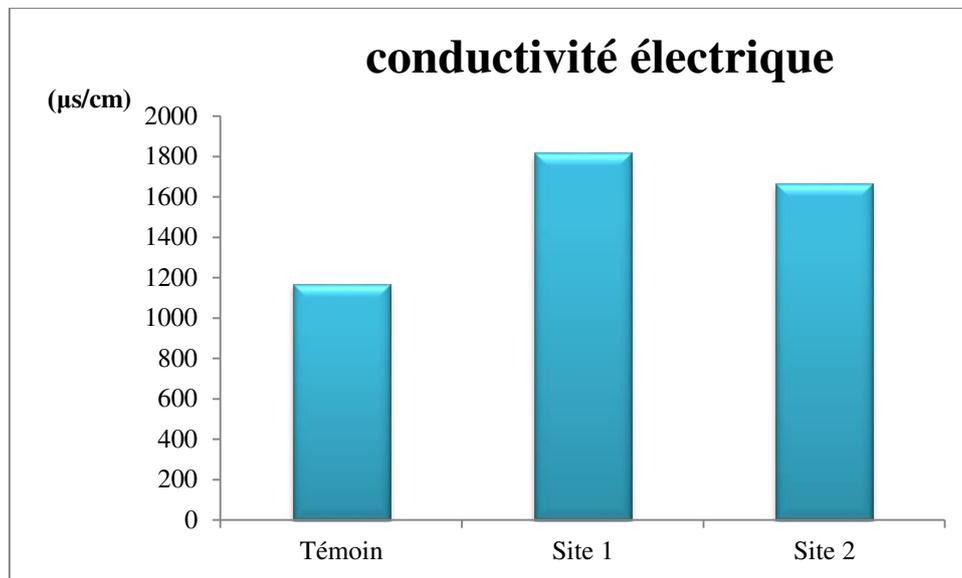
**Figure 2-19.** Teneurs en nitrites des eaux de ruissellement

Les teneurs en nitrites enregistrées montrent que les valeurs enregistrées sont au-dessus de la concentration maximale autorisée qui est uniquement de 0,1mg/l. 1,67mg/l enregistrée au niveau du site 1 et 3,35 mg/l au niveau du site 2. Une teneur encore plus élevée avec 4,08 mg/l pour les échantillons témoins.



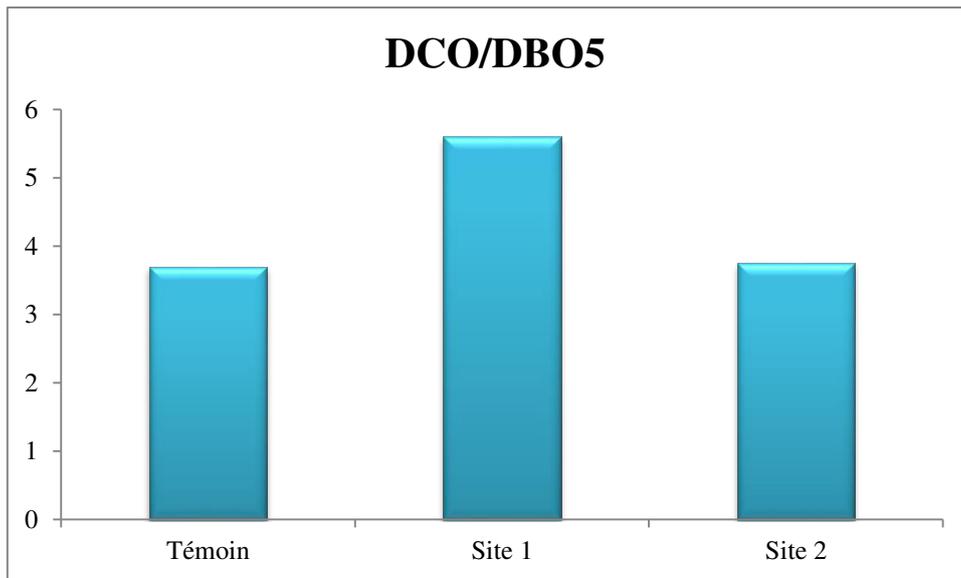
**Figure 2-20.** pH des eaux de ruissellement

Les valeurs des pH des eaux analysées représentées dans la figure (2-20) varient entre 7,8 et 9,06. Ceci indique qu'on est en présence d'eaux à pH alcalin. Les eaux de ruissellement prélevées de la région d'el Karma ou site 1 est la plus alcaline, le chiffre enregistré dépasse de loin les valeurs prescrites (6,5 à 8,5).



**Figure 2-21.** Conductivité électrique des eaux de ruissellement

Les normes de la conductivité électriques des eaux superficielles préconisées par les organisations mondiales sont comprises entre 60 et 100µs/cm alors que la conductivité électrique des différents prélèvements s'échelonne entre 1169 (µs/cm) et 1817 (µs/cm). Tous les chiffres calculés dépassent ainsi les limites maximales. Comme pour les sols, une salinité très importante est détectée également à partir des eaux de ruissellements des régions d'étude.



**Figure 2-22.** rapport DCO/DBO5 des eaux de ruissellement

Les résultats retrouvés pour les rapports DCO/DBO5 et représentés dans la figure (2-22) montrent des valeurs assez élevées, supérieur à 3, en dessus des normes proposées par les organisations mondiales. Ils indiquent une forte pollution par des composés toxiques d'origine organique et/ou inorganique. Ils sont tous supérieur à 1 ; la valeur la plus élevée est celle du site 1 (5,61), contrairement à celle enregistrée au niveau du site témoin (3,7) qui est la plus basse.

Le rapport DCO/DBO5 indique une forte pollution en matières organiques et inorganiques non biodégradable, 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.

Les propriétés physico-chimiques des échantillons d'eau montrent tout d'abord que Les pH, l'oxygène dissous, le rapport DCO/DBO5, les nitrites et les nitrates sont différents des valeurs admissibles ce qui indiquent que les eaux de ruissellement sont de mauvaise qualité et sont très contaminées (Lisec, 2004 ; Rodier, 2005). Ces résultats nous informe sur la présence de substances toxiques et notamment les pesticides. Des conditions difficiles inhibant l'installation d'une flore microbienne biodégradante.

**Tableau 2-6.** Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées

| <b>Paramètres physico-chimiques</b>        | <b>Propinèbe</b>   | <b>Cymoxanil</b>  |
|--|--|---|
| Pression de vapeur                         | 0.16 mPa à 20 °C   | 0.15 mPa à 20 °C  |
| Constante de henry                         | 8 e-8 Pa*m3/mole à 20°C  | 3.3 10-5 Pa*m3/mole   |
| Solubilité                                 | <0.01 g/L pratiquement pas soluble à 20 °C                           | 0,89 g/L à 20 °C et au pH de 5  |
| Kow  | log P : -0.26 à 22 °C  | log P: 0,59 à 20°C et au pH de 5  |
| Koc  | Koc non mesurable car instable dans l'eau                            | Koc min: 38<br>Koc Max: 238   |
| Dissociation dans l'eau                    | absence de dissociation  | pKa : 9.3 à 20 °C   |
| Stabilité dans l'eau (DT50)                | 1 jour(s) à 22 °C et au pH de 4<br>2.2 jour(s) à 22 °C et au pH de 9 | 144 jour(s) à 25 °C et au pH de 5<br>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<br>DT 90: 13-15j  |

**Tableau 2-7.** Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées

| Paramètres physico-chimiques               | Mésosulfuron-méthyl  | Iodosulfuron-méthyl                                     | Méfenpyr-diéthyl  |
|--|--|---|---|
| Pression de vapeur                         | 0.011 nPa à 25 °C  | 6.7 e-9 Pa à 25 °C                                      | 14 µPa à 25 °C  |
| Constante de henry                         | 3.65 e-12 Pa*m3/mole à 20°C  | 2.29 e-11 Pa*m3/mole à 20°C                             | 1.18 e-4 Pa*m3/mole à 20°C  |
| Solubilité                                 | 7.24 mg/L à 20 °C et au pH de 5<br>15.39 g/L à 20 °C et au pH de 9     | 160 mg/L au pH de 5<br>65 g/L au pH de 9                | 20 mg/L à 20 °C et au pH de 6.2   |
| Kow  | log P: 1.39 à 25 °C et au pH de 5                                      | Log P: 1.96 à 25 °C et au pH de 4                       | log P: 3.83 à 21 °C et au pH de 6.3   |
| Koc  | Min : 26 mL/g<br>Max : 345 mL/g  | /   | /   |
| Dissociation dans l'eau                    | pKa : 4.35 à 20 °C   | pKa : 3.22  | Absence de dissociation   |
| Stabilité dans l'eau (DT50)                | 3.5 jour(s) à 25 °C et au pH de 4<br>319 jour(s) à 25 °C et au pH de 9 | 4 jour(s) instable au pH de 4<br>362 jour(s) au pH de 9 | >365 jour(s) à 25 °C et au pH de 4 à 5<br>0.31 - 0.35 jour(s) à 25 °C et au pH de 9 |
| Mobilité                                   | Min : 29.3 jours<br>Max : 114 jours                                    | /   | /   |
| Dégradation dans le système eau – sédiment | Min : 27.3 jours<br>Max : 70.4 jours                                   | Min : 7 jours<br>Max : 140 jours                        | Min: 1.0 jour<br>Max: 1.1 jours   |

Les caractéristiques physico-chimiques des substances actives étudiées reflètent leur faible mobilité et leur grande persistance au niveau de la matrice. En outre leur faible dissociation et leur instabilité dans l'eau montrent leur fort pouvoir toxique.

#### **4. Conclusion**

Des résultats obtenus à partir des analyses physico-chimiques, il ressort que les eaux de ruissellement d'origine agricole sont assez polluées par des substances toxiques telles que les pesticides. Cependant, en ce qui concerne le sol, il n'existe pas de différence significative entre les caractéristiques physico-chimiques de sols analysés pollués et non pollués. Seules les teneurs en matière organique diffèrent mais très peu. L'estimation du degré de pollution d'un sol par les facteurs physiques et chimiques est difficile et manque souvent de précision compte tenu, des incertitudes et l'insuffisance des données disponibles concernant les normes de la qualité des sols contaminés. En outre, les multiples interactions entre la nature des produits, le sol et les facteurs climatiques de l'environnement rendent l'évaluation de la qualité et le degré de pollution du sol plus difficile.

# **CHAPITRE III :**

# **ETUDE DE LA MICROFLORE**

## 1. Introduction

La microflore du sol, de taille inférieure à quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ , regroupe majoritairement des champignons et des bactéries. Les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait des milliers de bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces microbiennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne. Les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Pivato *et al.*, 2009), décomposition de la matière organique, recyclage du carbone et de nutriments minéraux (azote, phosphore, potassium) (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) dans le sol, et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). Dans le sol les bactéries sont soumises en permanence à des perturbations qui en modifient la structure des communautés.

La microflore du sol peut s'adapter aux traitements répétés avec des pesticides. Ainsi l'application de pesticide permet aux microorganismes adaptés d'échanger naturellement l'information génétique par transfert horizontal de gènes (Devers *et al.*, 2005). Ces mécanismes génétiques permettent l'établissement de voie de dégradation leur permettant d'utiliser les pesticides comme source de nutriments et d'énergie pour leur développement. Cette adaptation présente à la fois un intérêt fondamental ayant trait à l'adaptation des microorganismes aux changements de leur environnement et leur résistance vis-à-vis de plusieurs substances toxiques. Ces capacités acquises ouvrent de nouvelles perspectives dans le champ des techniques de bioremédiation pour décontaminer des sols et des eaux pollués.

Le nombre d'espèces et leur abondance varient en fonction du milieu, des caractéristiques du sol et de son usage. Malgré leur importance, la répartition des organismes du sol, ainsi que les effets de l'environnement et de l'Homme sur les sols et leur biodiversité reste peu connue. Depuis 2006, du fait du faible taux de cultivabilité des espèces microbiennes et des biais liés à l'extraction des cellules et de leur ADN hors de cette matrice complexe, seule une meilleure connaissance des composants biotiques et abiotiques du sol, des interactions entre microorganismes et ces environnements sera en mesure de permettre d'optimiser les

techniques d'extraction de l'ADN et d'accéder ainsi à une fraction plus importante de la diversité génétique que recèle le sol.

Bien que les communautés bactériennes et fongiques aient été largement étudiées indépendamment l'une de l'autre dans de nombreux habitats, quelques études ont examiné simultanément ces deux groupes de microorganismes (Costa *et al.*, 2006, Singh, 2007), sans toutefois tenter de comprendre les interactions entre ces deux communautés qui demeurent très difficiles à prendre en compte, bactéries et champignons vivant en étroite relation dans le sol. Les interactions champignons bactéries sont très certainement de tous types, positive négative ou neutre. Singh *et al.*, (2009) ont observé une forte corrélation entre les communautés bactériennes et fongiques indépendamment des facteurs abiotiques du sol (humidité, C et N) à l'échelle du champ (Singh, 2009). Des résultats précédents avaient déjà montré que la communauté fongique influence la structure de la communauté bactérienne au niveau des sols des graminées. (Singh *et al.*, 2007)

## **2. Les champignons**

Les champignons ou micromycètes sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique. D'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important.

Ces champignons sont appelés couramment « moisissures », véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers. Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes.

Globalement peu exigeants dans les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible. La contamination fongique d'un substrat provoque des modifications physiques et des modifications chimiques.

On peut distinguer deux grands types de champignons ou moisissures microscopiques:

- Les moisissures utiles qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium*

camemberti et *Penicillium roqueforti* en fromagerie, *Penicillium jensenii* ou *nalgioense* en salaisonnerie.

- Les moisissures nuisibles qui peuvent se développer sur différents substrats et entraîner une altération des qualités nutritionnelles et diététiques des produits. Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10% des récoltes mondiales (Filtenborg et *al.*, 1996).

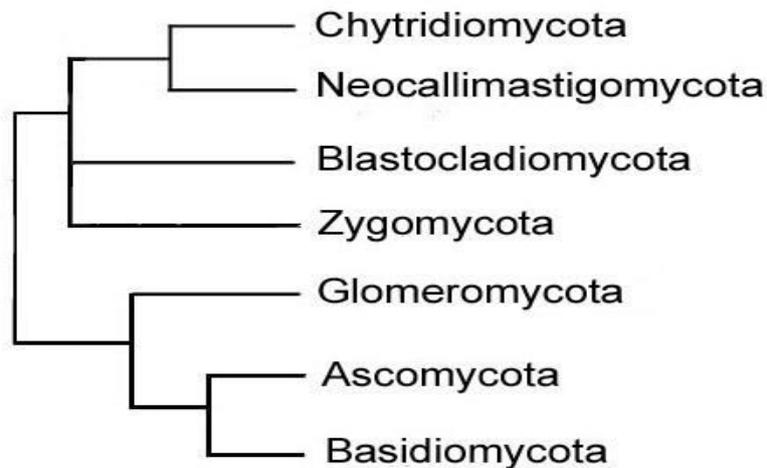
Par ailleurs, dans des conditions propices de température, humidité, pH, composition de substrat, les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction ; ils produisent un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification.

## **2.1. Classification des moisissures**

Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes. Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des eumycètes (figure 3-1) ou cinquième règne (Kendrick, 2000). Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (Adl et *al.*, 2005; Simpson et Roger 2002, 2004).

A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis en genres et espèces. Ces deux derniers termes étant utilisés pour les désigner. La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux : les Chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes ou Fungi imperfecti. Dans le présent travail nous ne parlerons que des champignons filamenteux microscopiques.



**Figure 3-1.** Les grands groupes des eumycètes (d'après Durrieu 2008)

## 2.2. Identification

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent).

Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006 ; Hinrikson et *al.*, 2005 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin et *al.*, 2004 ; Reiss et *al.*, 1998).

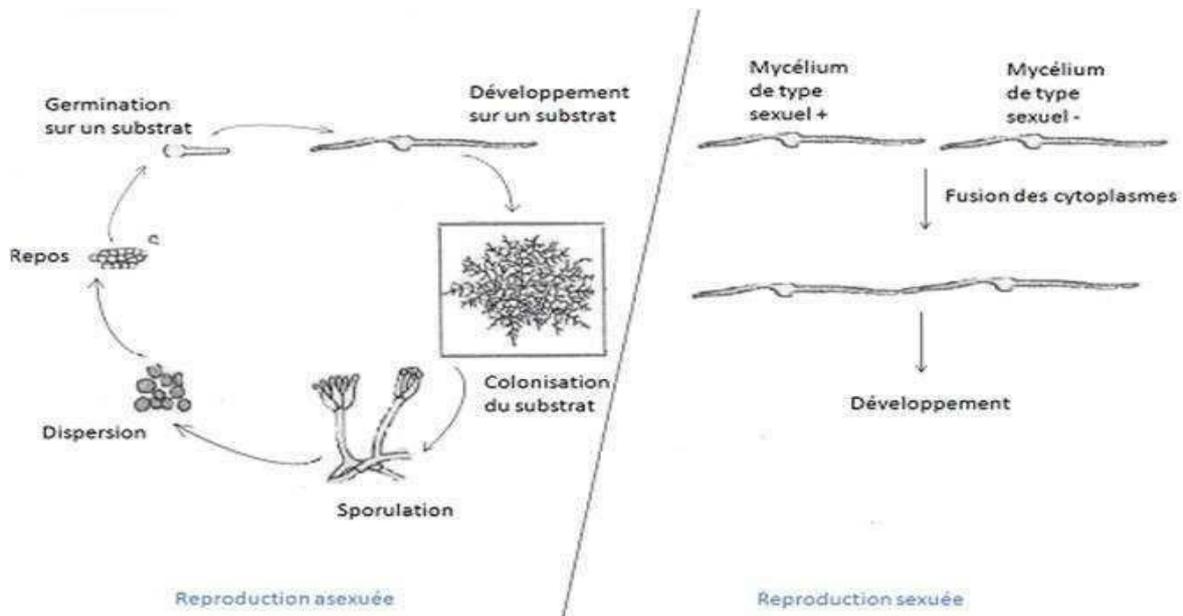
Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson et *al.*, 2005).

## 2.3. Modes de reproduction

Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction :

- une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croit et se développe sur un substrat (figure 3-2). Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées;
- la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à  $n$  chromosomes va rencontrer un autre mycélium à

polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à 2n chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.



**Figure 3-2.** Cycle de vie des champignons (d'après Roquebert 2002 modifié).

### 3. Les bactéries

Les bactéries sont présentes dans presque tous les types de biotopes rencontrés sur terre sont les organismes les plus ubiquitaires de notre planète. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs (Fredrickson et al., 2004), de la croûte terrestre, sur la peau et dans l'intestin des animaux mais elles peuvent également être rencontrées dans des environnements plus extrêmes tels que des lacs salés, des banquises, des sources d'eau chaude, etc...

il est estimé que le nombre de cellules bactériennes dans la biosphère se situerait entre 4 et  $6.10^{30}$  (Whitman et al., 1998). Si un millilitre d'eau douce contient environ 1 million de cellules bactériennes c'est au niveau du sol que se trouve le principal réservoir en termes de nombre de cellules et de diversité avec environ  $10^8$ - $10^9$  bactéries par gramme de sol.

Les bactéries jouent un rôle fondamental dans la fixation de l'azote atmosphérique, fonction qui a beaucoup été étudiée depuis plusieurs dizaines d'années (Vitousek, 1991). La plupart des bactéries sont inoffensives pour l'homme, certaines étant même essentielles au

bon fonctionnement de l'organisme. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine des maladies infectieuses.

Les domaines d'application sont très variés. En agroalimentaire, les bactéries comme *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou *Streptococcus*, combinées aux levures et moisissures interviennent dans l'élaboration d'aliments fermentés comme les fromages, les yaourts (Hanniffy et *al.*, 2009). La capacité des bactéries hétérotrophes à dégrader une large variété de composés organiques est exploitée pour le traitement des sols pollués dans des stratégies de bioremédiation ou pour le traitement des eaux usées (Furukawa, 2003). Des bactéries sont également utilisées dans les fosses septiques pour en assurer l'épuration. En agriculture, certaines bactéries peuvent être utilisées comme agent de protection des végétaux (biopesticides) à la place de pesticides en lutte biologique pour combattre les parasites des plantes (Lucy et *al.*, 2004) (ex : *Bacillus thuringiensis*), d'autres bactéries vont avoir un effet bénéfique sur la croissance de plantes comme les PGPR ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria désignant les bactéries de la rhizosphère bénéfiques à la croissance et à la santé des plantes (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Dans le domaine médical des isolats bactériens ont été sélectionnés sur leurs capacités de production de métabolites secondaires utilisables comme médicaments et le génie génétique a permis d'en améliorer les performances ou même de faire produire par des bactéries des composés initialement issus d'autres organismes (production d'antibiotiques, d'insuline, des hormones de croissance, ...) (Wong, 1995 ; Demain, 1999 ; Zhou et *al.*, 2009 ).

### **3.1. Approches traditionnelles d'identification**

Les techniques classiques de microbiologie par étalement d'un échantillon issu de l'environnement sur ou dans un milieu de culture ont été utilisées pour favoriser la croissance cellulaire et permettre ainsi la multiplication clonale des différentes bactéries.

Cette approche permet de dénombrer les colonies résultant de cette multiplication clonale et ainsi estimer le nombre initial de bactéries « cultivables » présentes dans l'échantillon. A partir d'un gramme de sol, par exemple, la culture sur milieu solidifié peut révéler la présence de  $10^8$  cellules. Une grande diversité de biotopes ont ainsi été étudiés mais la véritable révolution a eu lieu en 1980.

### **3.2. Identification bactérienne par analyse de l'ADN extrait de l'environnement (approche métagénomique)**

Depuis le début des années 90, la microbiologie environnementale s'est dotée d'un nouveau concept en restreignant l'étude des bactéries à leur ADN directement extrait de l'environnement (McHardy et Rigoutsos, 2007). L'ADN métagénomique obtenu est exploité soit par amplification par la technique de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) ciblée sur des gènes sélectionnés pour leur intérêt en analyse taxonomique (gène 16S rDNA) ou pour des fonctions écologiques particulières, soit par clonage dans un hôte cultivable avant sélection des clones d'intérêt de par la présence du gène recherché sur l'insert. Aujourd'hui, de nouvelles technologies facilitent l'étude de l'ADN métagénomique en proposant de séquencer directement l'ADN extrait s'affranchissant ainsi des étapes de clonage ou d'amplification (Shendure et Ji, 2008). L'émergence de la métagénomique présente l'une des plus grandes opportunités, peut être depuis l'invention du microscope, de révolutionner nos connaissances du monde microbien en permettant d'accéder à l'ensemble des bactéries d'un écosystème et non plus à la très faible minorité de celles cultivées *in vitro* et en permettant l'analyse quasi simultanée de ces différents organismes (Streit et Schmitz, 2004). C'est donc l'ensemble d'une communauté microbienne qui en théorie devient accessible grâce à l'approche métagénomique, permettant ainsi de définir de possibles interactions entre les différentes populations, celles toujours associées comme celles s'excluant mutuellement, de définir la spécificité ou au contraire la redondance des fonctions potentielles, la diversité des gènes codant ces fonctions. A cause de l'écrasante majorité de bactéries non cultivables dans le sol, les premières recherches basées sur le métagénome résultent toujours en l'identification de taxa bactériens et de gènes jusqu'à présent inconnus, confirmant le potentiel que représente le sol comme réservoir quasi infini de diversité populationnelle et fonctionnelle (Rappe et Giovannoni, 2003).

#### **3.2.1. Caractérisation des communautés bactériennes**

La caractérisation d'une communauté bactérienne permet de mettre en évidence des caractéristiques propres à cette communauté qui vont la différencier des autres. Les techniques d'empreintes moléculaires vont permettre la caractérisation de communautés bactériennes plus ou moins complexes, en obtenant des profils qui vont être dépendants des séquences d'ADN présentes dans la communauté bactérienne étudiée. Dans ces méthodes l'ADN métagénomique est extrait de l'échantillon environnemental et purifié.

Un fragment d'ADN cible est amplifié par PCR avec des amorces spécifiques ou universelles et le résultat peut être séparé de différentes manières. Le principe de chaque méthode va être brièvement décrit, puis une synthèse sur les avantages et limites de ces techniques ainsi que leurs applications, sera présentée.

- **DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis))**

Ce sont deux méthodes similaires permettant l'étude des communautés bactériennes. Le gène 16S rDNA est composé de zones plus ou moins conservées. L'amplification des zones conservées cible toutes les bactéries, tandis que l'amplification de zones variables permet de cibler un niveau taxonomique précis.

- **SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**

Dans cette technique, la région d'intérêt du gène 16S rDNA est amplifiée à partir d'une solution d'ADN extraite d'échantillons environnementaux à l'aide d'amorces marquées radioactivement. Les produits PCR sont ensuite soumis à dénaturation (Lee et *al.*, 1996).

- **RFLP (restriction fragment length polymorphism) / ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis)**

La RFLP aussi connue sous le nom d'ARDRA est une autre méthode reposant sur le polymorphisme de fragments d'ADN utilisée pour l'étude des structures des communautés microbiennes. La région d'intérêt est amplifiée à l'aide d'amorces à partir de l'ADN extrait d'un échantillon, les fragments obtenus sont digérés par une enzyme de restriction appropriée. On obtient alors des fragments d'ADN de longueurs différentes selon les individus.

- **T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Cette technique est basée sur le même principe que la RFLP, mis à part le fait que l'une des amorces est marquée avec un colorant fluorescent. Ceci permet seulement la détection des fragments de restriction terminaux marqués (Liu et *al.*, 1997), simplifiant le profil des bandes.

- **RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) /ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)**

Cette technique est basée sur l'amplification par PCR de la région IGS (intergenic spacer) située entre les sous unités ribosomales 16SrDNA et 23SrDNA, région d'ADN présentant une variabilité de taille et de séquences entre individus supérieure à celle des gènes, pouvant alors différencier des espèces très proches (Fisher et Triplett, 1999).

### **3.2.2. Apport des nouvelles technologies à haut débit**

- Principe et applications des puces à ADN
- Le séquençage
- La Technologie 454
- La technologie CRT Solexa/ illumina
- Le système SOLiD
- Helicos

### **3.3. Classification des bactéries**

La classification est généralement basée sur des caractères phénotypiques, comme la morphologie cellulaire (bâtonnets, bacilles...), la mobilité de la cellule, la structure de la paroi cellulaire (gram positif, gram négatif) et le métabolisme (bactéries hétérotrophes et autotrophes), la capacité à sporuler, la température de croissance, les besoins nutritionnels, le mode respiratoire, l'utilisation des différentes sources de carbone ou d'azote,

La classification se fait également selon les groupements fonctionnels des différentes bactéries, car ils donnent plus d'informations sur les propriétés de l'espèce. Cette classification divise les bactéries en quatre groupes selon la source d'énergie (réactions redox) et la nature du donneur d'électrons (organique ou inorganique) : les photo-lithotrophes, les photo-organotrophes, les chimio-lithotrophes et les chimio-organotrophes.

Les bactéries peuvent être classées selon leurs caractères : biochimiques (classification en biotypes ou biovars), antigéniques (classification en sérotypes ou sérovars), pathogéniques (classification en pathotypes ou pathovars), enzymatiques (classification en zymotypes ou zymovars), de sensibilité aux antibiotiques (classification en antibiotypes), de sensibilité aux bactériophages (classification en lysotypes ou lysovars), moléculaires : identification de

l'ADN par ribotypie, hybridation ADN-ADN, hybridation ADN-ARN, séquençage de l'ARN ribosomique, etc..

Les bactéries du sol peuvent être classées en deux grands groupes :

- **Espèces autochtones**

Elles sont caractéristiques d'un sol et leur nombre demeure pratiquement constante, à l'exception de certaines appelées bactéries zymogènes, qui ne prolifèrent qu'en présence d'un substrat spécifique.

- **Espèces étrangères**

A la différence des précédentes, elles ne participent pas activement aux fonctions biochimiques de la communauté. Elles atteignent le sol par les précipitations, des résidus contaminés ou des eaux usées. Elles peuvent être également regroupées selon leurs groupements fonctionnels les plus importants du point de vue agronomique.

- **Les bactéries ammonifiantes** : elles décomposent les substances organiques azotées en ammoniac ou en ions ammonium.
- **Les bactéries nitrifiantes** : elles provoquent l'oxydation de l'ammoniac en nitrate.
- **Les Bactéries fixatrices d'azote** : elles captent l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) et le transforment en composés utilisables par les plantes (ammoniac). Ce sont notamment les bactéries symbiotiques localisées dans la rhizosphère des plantes cultivées (rhizobium chez les légumineuses).
- **Les Bactéries cellulolytiques** : elles dégradent la cellulose. C'est le groupe le plus important dans la dynamique de la matière organique, car elles décomposent la cellulose, molécule structurelle la plus répandue chez les végétaux.
- **Les Bactéries pectinolytiques** : elles dégradent la pectine et ses dérivés. Les bactéries les plus abondantes sont du genre *Arthrobacter*.

### 3.4. Reproduction des bactéries

La reproduction, toujours asexuée chez les bactéries, peut se faire de deux manières : par multiplication des cellules ou scissiparité, chaque cellule se divisant par cloisonnement en deux autres cellules qui s'allongent en restant unies et constituent des chaînes ou bâtonnets plus ou moins allongés, ou bien se séparent et constituent des organismes distincts. Ce mode de reproduction, qui se confond avec l'accroissement, est le mode normal, celui qui se continue indéfiniment lorsque l'on maintient le micro-organisme dans son milieu habituel où il trouve les conditions d'existence qui lui sont le plus favorables.

Le second mode de reproduction est celui par spores endogènes ou exogènes, qui ne se produit que dans certaines circonstances, lorsque le milieu nutritif se trouve épuisé par dessiccation ou par défaut des principes nutritifs indispensables à l'accroissement de l'organisme. Le protoplasme intérieur de chaque cellule se concentre alors sous forme de spores qui constituent de petites granulations très réfringentes, arrondies, brillantes, formées de protoplasme entouré d'une membrane épaisse dont les deux couches sont appelées exospore et endospore. La présence de ces spores donne aux bactéries une forme renflée dans le point où la spore s'est formée, soit au milieu (bactéries fusiformes, ex. Clostridium), soit à l'une des extrémités (Hélobactéries), soit aux deux extrémités (Dispora). La formation de deux spores dans une même cellule, toujours alors très allongée, est un fait assez rare. Les spores résistent, beaucoup mieux que les bactéries dont elles proviennent, à la dessiccation et à une température très élevée ou très basse, variable du reste suivant les espèces, et peuvent rester ainsi très longtemps sans perdre leur vitalité et la faculté de germer. Si, au bout de ce temps, elles rencontrent de nouveau le milieu liquide favorable à leur multiplication, elles y germent et donnent naissance à une nouvelle colonie de bactéries. Chaque spore se gonfle aux dépens du liquide qui l'imbibe, rompt son épaisse exospore et s'allonge en un filament tantôt perpendiculaire au grand axe (Bacillus subtilis), tantôt, et c'est le cas le plus ordinaire, dirigé dans le même sens (Bacillus amylobacter), et reproduisant ainsi la forme primitive de la bactérie mère. Ce filament s'allonge, se cloisonne et se multiplie de nouveau par scissiparité, jusqu'à ce que l'épuisement du liquide nutritif le force à fournir de nouvelles spores.

## **4. Matériel et Méthodes**

### **4.1. Dénombrement de la microflore des sols**

L'analyse de la microflore a été conduite selon la technique des suspensions – dilutions telle qu'elle est décrite par (Rapilly, 1968).

Dans un Erlenmeyer de 100 ml contenant 10 ml d'eau distillée stérile sont ajoutés aseptiquement 1 g de sol (après séchage à 30°C pendant une nuit puis tamisage à 5mm). Ce mélange est agité mécaniquement à l'aide de barreaux magnétiques pendant 30 minutes afin de mettre en suspension les particules de sol ainsi que les spores et mycéliums qui y sont attachés. À partir de la suspension mère ainsi obtenue, une série de dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) au dixième a été ensuite réalisée à partir de la suspension mère. 1ml de la suspension mère est prélevé aseptiquement et versé dans 9ml d'eau distillée stérile ; la suspension obtenue correspond à la dilution  $10^{-1}$  qui est agitée pendant deux minutes avant de prélever 1 ml que l'on ajoute à 9 ml d'eau distillée stérile donnant ainsi la dilution  $10^{-2}$  et ainsi de suite jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ .

#### **4.1.1. Etalement et incubation**

Après agitation, les différentes dilutions préparées sont utilisées pour réaliser des étalements sur différents milieux de culture : Czapek, PDA, MEA, Sabouraud, Mueller-Hinton. 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 boîtesensemencées sont incubées dans une étuve à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours.

### **4.2. Dénombrement de la microflore des eaux de ruissellement**

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 en suivant le même protocole que celui réalisé pour le sol.

#### **4.2.1. Etalement et incubation**

Après agitation, les différentes dilutions préparées sont utilisées pour réaliser des étalements sur différents milieux de culture : Mueller-Hinton, Czapek, PDA, MEA, Sabouraud. Un ml de chaque suspension-dilution est déposé dans une boîte des boîtes de pétri contenant le milieu

de culture stérile. L'expérimentation est réalisée en triplicata. Les boîtesensemencées sont incubées dans une étuve à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours.

#### **4.3. Purification et conservation des isolats du sol et des eaux**

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).

#### **4.4. 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) / g de sol 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 gramme de sol ;  $\sum$ 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.

#### **4.5. Identification de la microflore fongique isolée des eaux et des sols**

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.

#### **4.5.1. 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)

#### **4.5.2. 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 macro et microscopiques, effectuer l'identification en se référant à différentes clés de détermination : (Barnett, 1960 ; Ellis, 1971 ; Ellis, 1976 ; Domsch et *al.*, 1980 ; Wang et Zabel, 1992).

#### **4.6. Identification de la microflore bactérienne**

##### **4.6.1. 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 ...

#### **4.6.1.1. 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.

#### **4.6.2. Observation microscopique morphologique**

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés.

##### **4.6.2.1. Réalisation du frottis à l'état frais**

Le frottis est obtenu à partir d'une suspension bactérienne, agitée et homogénéisée tout en évitant la formation d'un culot au fond du tube. Quelques gouttes sont ensuite prélevées et étalées sur lame désinfectée en faisant des rotations ou mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur au moins 2/3 de la lame jusqu'à séchage. Après cette étape, on peut alors effectuer une coloration. Le dépôt est ensuite recouvert d'une lamelle désinfectée et observé au microscope à l'objectif 40.

##### **4.6.2.2. 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 : fréttillement 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.

#### **4.6.3. 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).

#### **4.6.4. 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.

#### **4.6.5. Test catalase**

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 ( $\text{O}_2$ ) (Marchal et *al.*, 1991).

#### **4.6.6. 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 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  $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 heures.

Le 21ème 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.

La lecture des réactions se fait d'après le tableau de lecture fourni 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 3-1.** 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           | Ornitine DèCarboxylase                                      | Jaune  | Rouge / orange (2)        |
| <u>[CIT]</u> | Trisodium citrate                   | 0.756         | Utilisation du CITrate                                      | Vert pâle/jaune  | Bleu-vert /bleu (3)       |
| <u>H2S</u>   | Sodium thiosulfate                  | 0.075         | Production d'H2S  | Incolore / grisâtre  | Dépôt noir/fin liserè     |
| <u>URE</u>   | Uree                                | 0.76          | UREase  | Jaune  | <u>Rouge / orange (2)</u> |
| TDA          | L-tryptophane                       | 0.38          | Tryptophane DèAminase                                       | <u>TDA / immédiat</u><br>Jaune morron-rougeâtre                    |                           |
| IND          | L-tryptophane                       | 0.19          | Production d'INDole   | <u>JAMES / immédiat</u><br>incolore<br>rose<br>vert pale /jaune    |                           |
| <u>[VP]</u>  | Sodium pyruvate                     | 1.9           | Production d'acétone (Voges Proskauer)                      | <u>VP 1 + VP 2 / 10 mln</u><br>Incolore/rose pale   rose /rouge(5) |                           |
| <u>[GEL]</u> | Gelatine (origine bovine)           | 0.6           | Gèlatinasa (Gèlatine)                                       | 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 (MANnitro) (4)                     | Bleu/bleu-vert   | Jaune                     |
| INO          | Inositol                            | 1.9           | Fermentation / oxydation (INOsitol) (4)                     | Bleu/bleu-vert   | Jaune                     |
| SOR          | D-sorbiol                           | 1.9           | Fermentation / oxydation (SORbitol) (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)                                      |                           |

#### **4.6.7. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 NE**

C'est une série de test qui permet d'identifier les 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 le milieu. 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.

##### **4.6.7.1. Test NO<sub>3</sub>**

La révélation des deux tests NO<sub>3</sub> 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 NO<sub>3</sub>. 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 NO<sub>3</sub>. Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.

##### **4.6.7.2. 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.

##### **4.6.7.3. Test d'assimilation**

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

##### **4.6.7.4. 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.

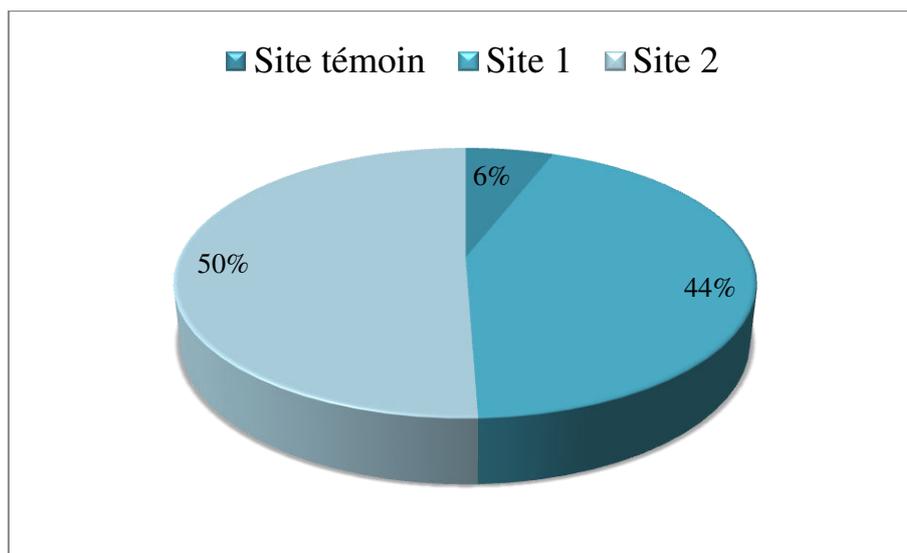
**Tableau 3-2.** Tableau de lecture des tests du système API 20 NE

| TESTS           | COMPOSANTS ACTIFS                  | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES   | RESULTATS                     |                           |
|-----------------|------------------------------------|---------------|---|-------------------------------|---------------------------|
|                 |                                    |               |   | NEGATIF                       | POSITIF                   |
| NO <sub>3</sub> | potassium nitrate                  | 0.136         | Reduction des Nitrates en nitrites                        | NIT 1 + NIT 2 / 5 min         |                           |
|                 |                                    |               | Reduction des Nitrates en azote                           | incolore                      | rose-rouge                |
| TRP             | l-tryptophane                      | 0.2           | Formation d'indole (tryptophane)                          | Zn / 5 min                    |                           |
|                 |                                    |               |   | incolore<br>vert pâle/jaune   | incolore<br>rose          |
| GLU             | D-glucose                          | 1.92          | Fermentation (GLUcose)                                    | Bleu à vert                   | Jaune                     |
| ADH             | L-arginine                         | 1.92          | Arginine DHydrolyase                                      | jaune                         | orange/rose/rouge         |
| URE             | 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                     |
| [GLU]           | D-glucose                          | 1.56          | Assimilation (GLUcose)                                    | transparence                  | trouble                   |
| [ARA]           | L-arabinose                        | 1.4           | Assimilation (ARAbinose)                                  | transparence                  | trouble                   |
| [MNE]           | O-mannose                          | 1.4           | Assimilation (ManNosE)                                    | transparence                  | trouble                   |
| [MAN]           | D-mannitol                         | 1.36          | Assimilation (MANnitol)                                   | transparence                  | trouble                   |
| [NAG]           | N-acétyl-glucosamine               | 1.28          | Assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)                       | transparence                  | trouble                   |
| [MAL]           | D-maltose                          | 1.4           | Assimilation (MALtose)                                    | transparence                  | trouble                   |
| [GNT]           | potassium gluconate                | 1.84          | Assimilation (potassium GlucoNaTe)                        | transparence                  | trouble                   |
| [CAP]           | acide caprique                     | 0.78          | Assimilation (acide CAPrique)                             | transparence                  | trouble                   |
| [ADI]           | acide adipique                     | 1.12          | Assimilation (acide ADIrique)                             | transparence                  | trouble                   |
| [MLT]           | acide malique                      | 1.56          | Assimilation (MaLaTe)                                     | transparence                  | trouble                   |
| [CIT]           | trisodium citrate                  | 2.28          | Assimilation (trisodium CITrate)                          | transparence                  | trouble                   |
| [PAC]           | acide phénylacétique               | 0.8           | Assimilation (PhényLACétique)                             | transparence                  | trouble                   |
| OX              | (voir notice du test oxydase)      | -             | cytochrome-oxydase  | (voir notice du test oxydase) |                           |

## 5. Résultats et discussion

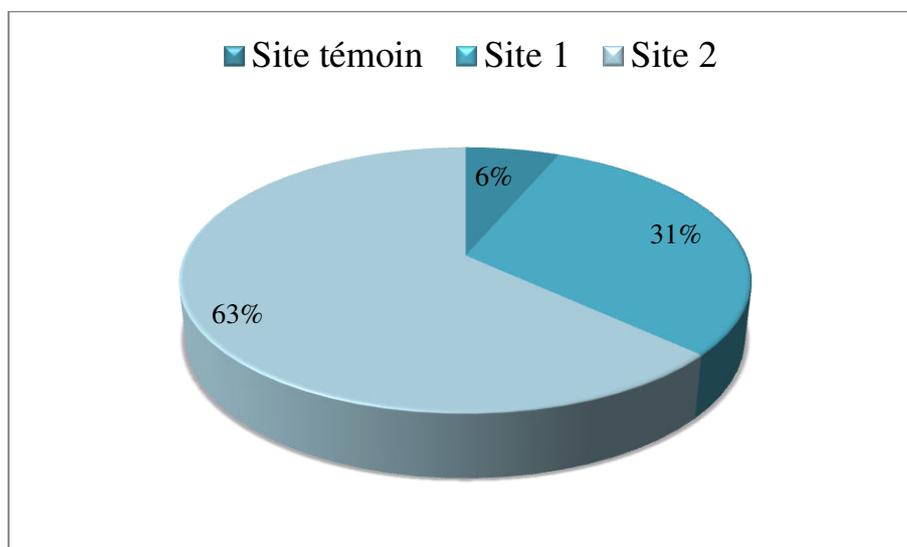
La distribution de la microflore est irrégulière dans les différents prélèvements des eaux et des sols analysés sur le plan quantitatif. Elle ne varie pas trop d'un prélèvement à un autre du point de vue qualitatif, on retrouve les mêmes souches dans presque la totalité des échantillons avec des fréquences plus au moins élevées. Les eaux renferment une microflore microbienne riche avec 30320 isolats bactériens dont 11180 au niveau du site 1, 17180 isolats dénombrés à partir des échantillons du site 2 et 1960 isolats détectés des eaux du site 3 témoin. 14886 isolats fongiques dont 5680 sont détectés à partir des échantillons du site 2, 8522 du site 1 et 684 du site témoin

Le dénombrement réalisé à partir des échantillons de sol a fait ressortir une microflore très riche avec un total de 21087 isolats bactériens et 12822 isolats fongiques. Les bactéries sont réparties d'une manière hétérogène au niveau des trois sites étudiés. Un nombre assez important évalué à 13450 isolats dans les prélèvements du site 2, une population non négligeable cependant moins abondante détectée au niveau du site 1. Par contre le site témoin s'avère le moins riche en matière de bactéries avec seulement une population composée de 1152 Isolats. Pour ce qui est de la microflore fongique, On enregistre 7950 Isolats à partir des prélèvements du site 2, 3870 isolats au niveau du site 1 et 1002 isolats dans le sol témoin.



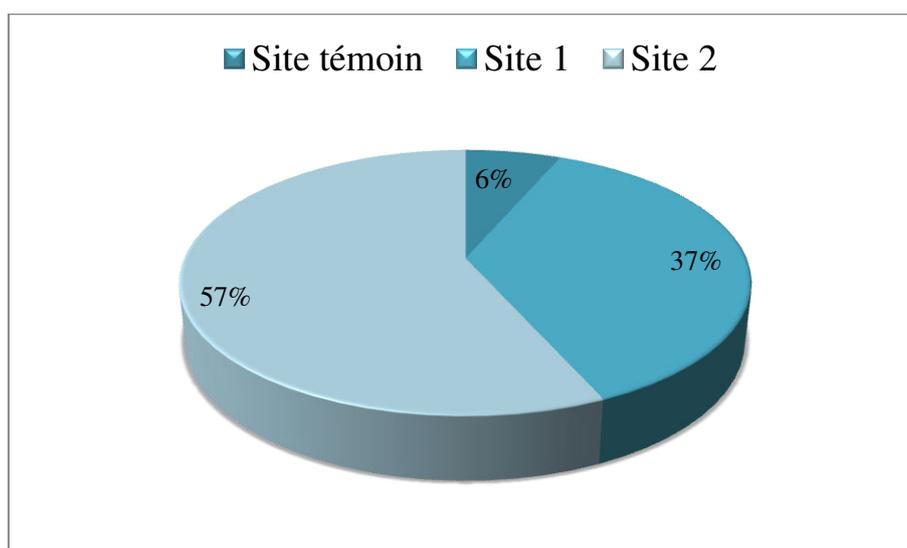
**Figure 3-3.** Microflore totale des eaux de ruissellement

La figure (3-3) exprime la microflore totale des eaux de ruissellement représentée en pourcentage. Les 50% de la microflore totale des eaux appartiennent au site 2. Les 44% et 6% de cette microflore appartiennent respectivement aux sites 1 et site 3 témoin.



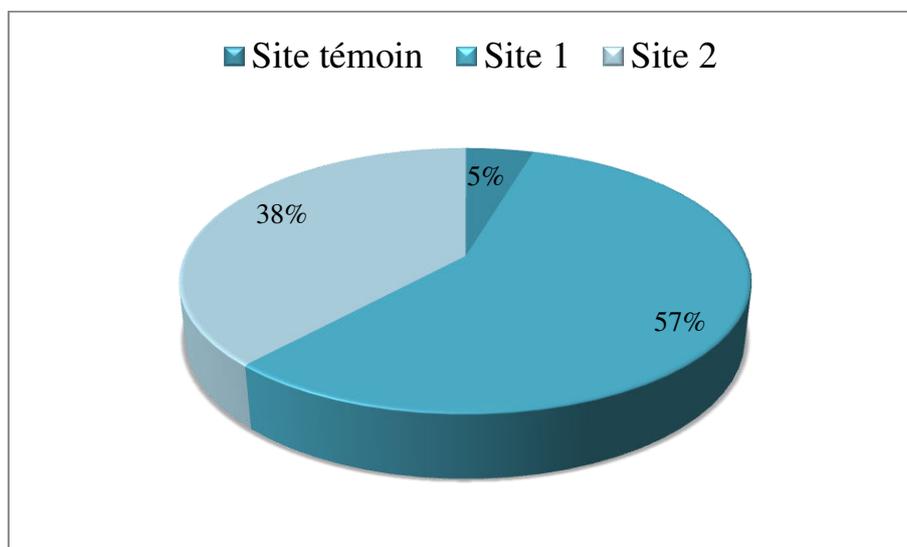
**Figure 3-4.** Microflore totale des sols

La microflore totale des sols étudiés est présentée par la figure (3-4). Les résultats obtenus indiquent que le site 2 est le plus riche avec 63%, suivi du site 1 avec 31%. La microflore la moins abondante est décelée au niveau du site témoin avec uniquement une présence évaluée à 6%.



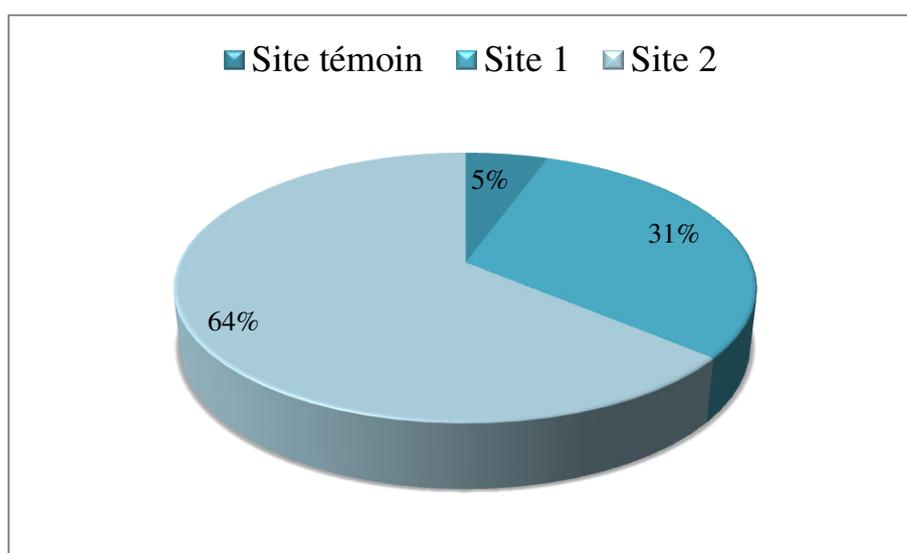
**Figure 3-5.** Nombre total d'isolats bactériens des eaux de ruissellement

La figure (3-5) montre le nombre total d'isolats bactériens des eaux de ruissellement, Les résultats obtenus révèlent un fort pourcentage égal à 57% pour le site 2, une fréquence moindre enregistrée pour le site 1 et la dernière position est occupée par la microflore bactérienne du témoin.



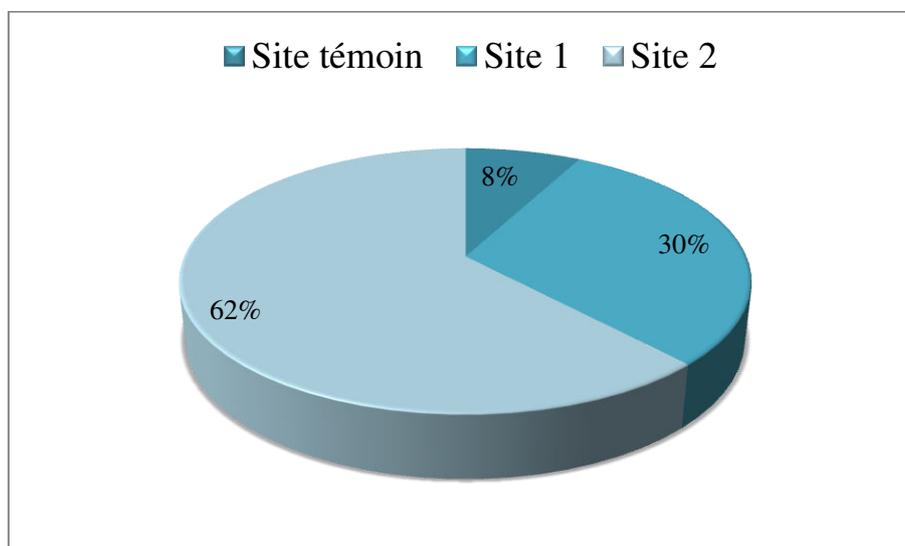
**Figure 3-6.** Nombre total d'isolats fongiques des eaux de ruissellement

Le nombre total d'isolats fongiques des eaux de ruissellement est exprimé par la figure (3-6), il indique que le site témoin est le plus pauvre en souches fongiques pendant que la première position est occupée par la mycoflore du site 2.



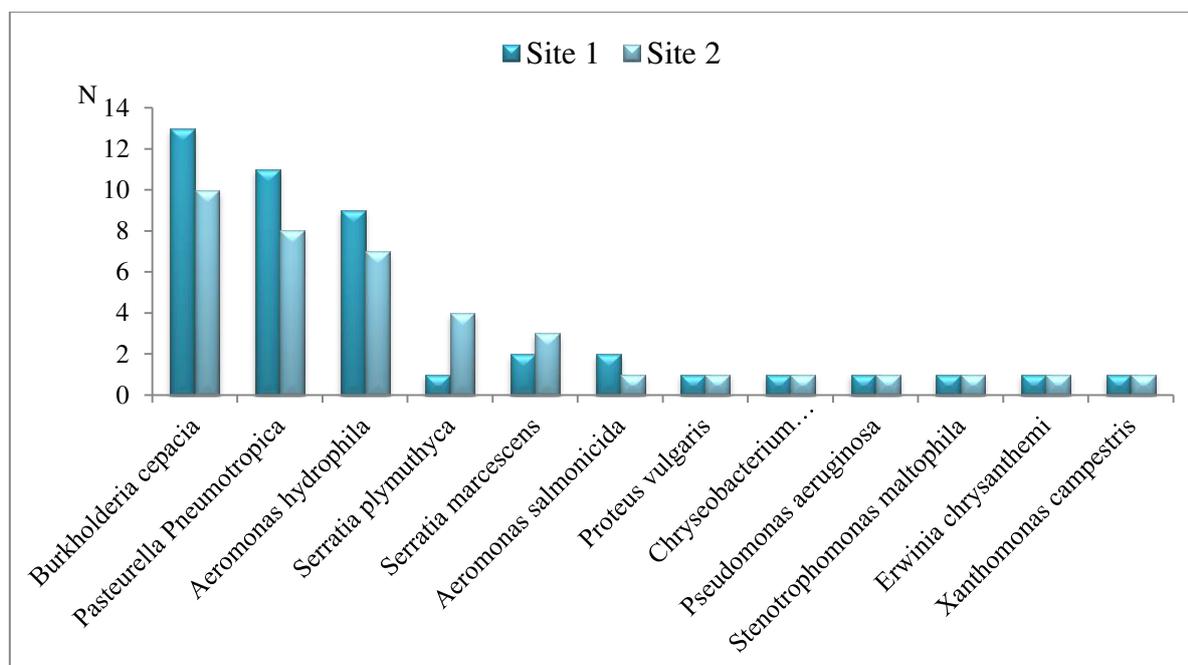
**Figure 3-7.** Nombre total d'isolats bactériens des sols

La figure (3-7) dévoile le nombre total d'isolats bactériens des sols. Les résultats obtenus révèlent des pourcentages variant entre 64% pour le site 2 et 5% pour le site témoin, quant au site 1, il représente un pourcentage moyen de 31%.



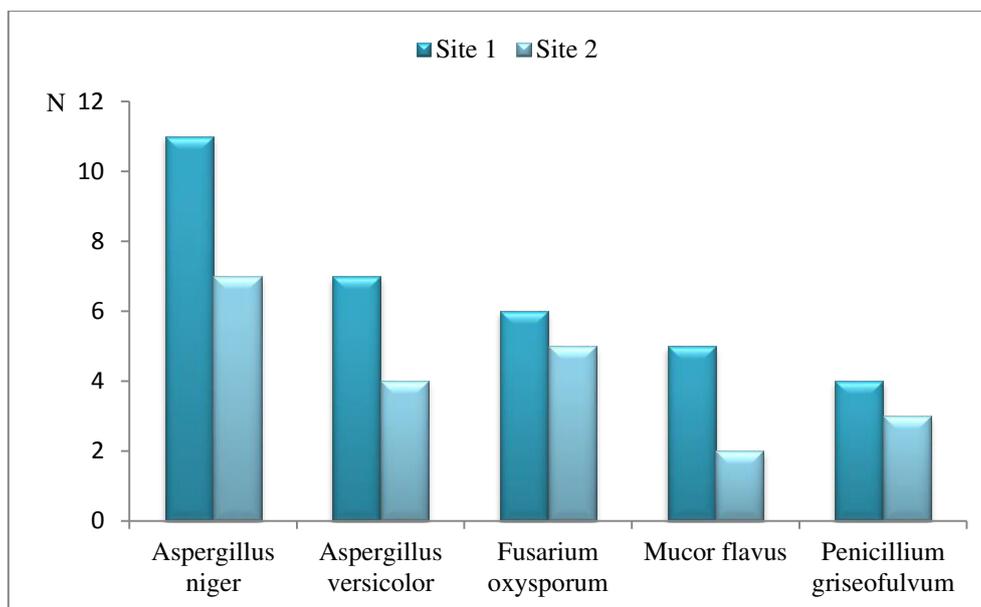
**Figure 3-8.** Nombre total d'isolats fongiques des sols

Les isolats fongiques des sols sont représentés de 62 % pour le site 2, 30 % pour le site 1 et uniquement 8 % pour le témoin. Comme pour la flore bactérienne, la mycoflore la plus significative est retrouvée également au niveau du site 2.



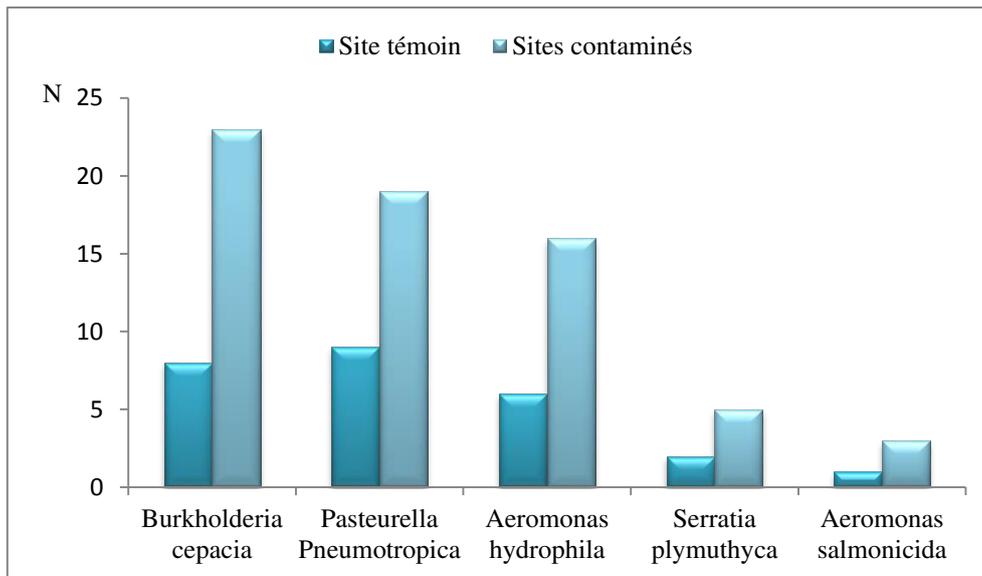
**Figure 3-9.** Les espèces bactériennes communes entre les sites contaminés des sols et des eaux de ruissellement

La figure (3-9) exprime les souches bactériennes communes entre les sites contaminés dans le sol et dans l'eau, le nombre le plus élevé est inscrit avec *Burkholderia cepacia* (13 souches) suivi par *Pasteurella pneumotropica* (11 souches). *Proteus vulgaris*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Erwinia chrysanthemi* et *Xanthomonas campestris* sont représentées chacune par une seule souche.



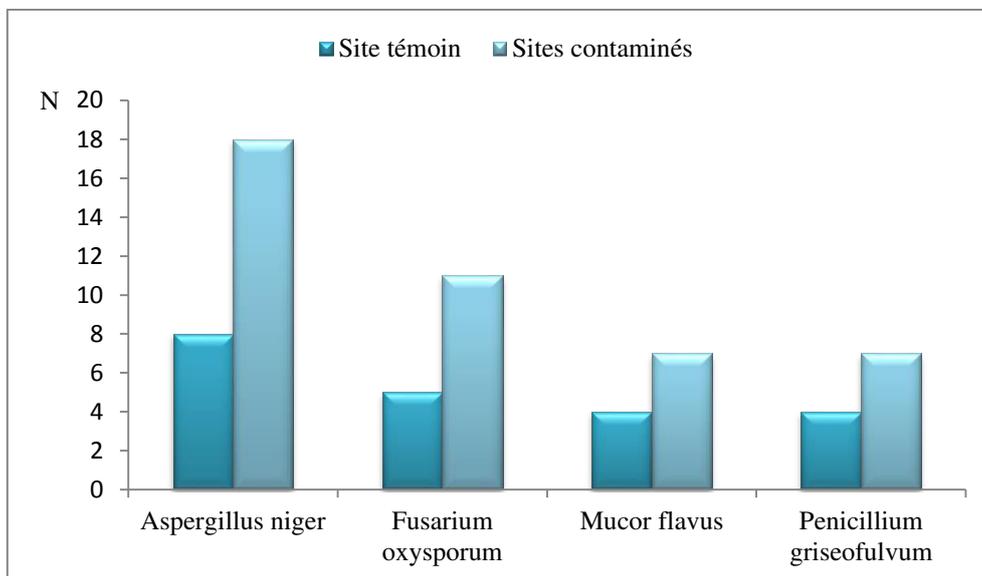
**Figure 3-10.** Les espèces fongiques communes entre les sites contaminés des sols et des eaux de ruissellement

Le nombre le plus élevé des souches fongiques communes entre les sites contaminés des sols et des eaux, est enregistré avec *Aspergillus niger* (11 souches). Les autres souches communes isolées des différents prélèvements des eaux et des sols (les *Aspergillus*, le *Fusarium*, le *Mucor* et le *Penicillium*), leurs nombres fluctuent entre 7 et 2.



**Figure 3-11.** Les espèces bactériennes communes entre les sites contaminés et témoin des sols et des eaux de ruissellement

Le dénombrement des souches bactériennes communes entre le site témoin et les sites contaminés est représenté dans la figure (3-11). Les résultats obtenus dévoilent que le nombre de souches le plus élevé est inscrit avec *Burkholderia cepacia* (23 souches), quant au nombre de bactéries le plus faible est noté avec *Aeromona salmonicida* (3 souches).



**Figure 3-12.** Les espèces fongiques communes entre les sites contaminés et témoin des sols et des eaux de ruissellement

Le nombre de souches fongiques communes exprimé par la figure (3-12) signale que c'est l'espèce *Aspergillus niger* qui occupe la première place avec 18 souches et les dernières positions sont occupées par *Mucor hiemalis* et *Penicillium griseofulvum*.

**Tableau 3-3.** Liste et taxonomie des espèces bactérienne identifiées au niveau des sols

| Souches bactériennes                    | Taxonomie |                |                         |                   |                    |                         |
|---|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
|   | Règne     | Division       | Classe                  | Ordre             | Famille            | Genre                   |
| <i>Burkholderia cepacia</i>             | Bacteria  | Proteobacteria | Beta<br>Proteobacteria  | Burkholderiales   | Burkholderiaceae   | Burkholderia            |
| <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | Bacteria  | Proteobacteria | Vlavobacteria           | Vlavobacteriales  | Vlavobacteriaceae  | <i>Chryseobacterium</i> |
| <i>Serratia plymuthica</i>              | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | Serratia                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | pseudomonadales   | pseudomonadaceae   | pseudomonas             |
| <i>Serratia marcescens</i>              | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | Serratia                |
| <i>Proteus vulgaris</i>                 | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | <i>Proteus</i>          |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>     | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Xanthomonadales   | Xanthomonadaceae   | <i>Stenotrophomonas</i> |
| <i>Agrobacterium</i>                    | Bacteria  | Proteobacteria | Alpha<br>Proteobacteria | Rhizodiales       | Rhizodiaceae       | Agrobacterium           |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>             | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | <i>Erwinia</i>          |
| <i>Xanthomonas campestris</i>           | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Xanthomonadales   | Xanthomonadaceae   | <i>Xanthomonas</i>      |
| <i>Rhizopus</i>                         | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Rhizopodales      | Rhizopodaceae      | Rhizopus                |

**Tableau 3-4.** Liste et taxonomie des espèces bactérienne identifiées au niveau des eaux de ruissellement

| Souches bactériennes                    | Taxonomie |                |                         |                   |                    |                         |
|---|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
|   | Règne     | Division       | Classe                  | Ordre             | Famille            | Genre                   |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>             | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Aeromonadales     | Aeromonadaceae     | Aeromonas               |
| <i>Burkholderia cepacia</i>             | Bacteria  | Proteobacteria | Beta<br>Proteobacteria  | Burkholderiales   | Burkholderiaceae   | Burkholderia            |
| <i>Vibrio fluvialis</i>                 | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Vibrionales       | Vibrionaceae       | Vibrio                  |
| <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> | Bacteria  | Proteobacteria | Vlavobacteria           | Vlavobacteriales  | Vlavobacteriaceae  | <i>Chryseobacterium</i> |
| <i>Pasteurella Pneumotropica</i>        | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Pasteurellales    | pasteurellaceae    | pasteurella             |
| <i>Serratia plymuthyca</i>              | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | Serratia                |
| <i>Vibrio vulgaris</i>                  | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Vibrionales       | Vibrionaceae       | Vibrio                  |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>            | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Aeromonadales     | Aeromonadaceae     | Aeromonas               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | pseudomonadales   | pseudomonadaceae   | pseudomonas             |
| <i>Serratia marcescens</i>              | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | Serratia                |
| <i>Proteus vulgaris</i>                 | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | <i>Proteus</i>          |
| <i>Stenotrophomonas maltophila</i>      | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Xanthomonadales   | Xanthomonadaceae   | <i>Stenotrophomonas</i> |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>             | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | <i>Erwinia</i>          |
| <i>Xanthomonas campestris</i>           | Bacteria  | Proteobacteria | Gamma<br>Proteobacteria | Xanthomonadales   | Xanthomonadaceae   | <i>Xanthomonas</i>      |

**Tableau 3-5.** Liste et taxonomie des espèces fongiques identifiées au niveau des sols

| Souches fongiques        | Taxonomie |            |                 |             |                |             |
|--------------------------|-----------|------------|-----------------|-------------|----------------|-------------|
|                          | Règne     | Division   | Classe          | Ordre       | Famille        | Genre       |
| Mucor hiemalis           | Fungi     | Zygomycota | Mucormycotina   | Mucorales   | Mucoraceae     | Mucor       |
| Aspergillus niger        | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Aspergillus |
| Aspergillus fumigatus    | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Aspergillus |
| Aspergillus versicolor   | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Aspergillus |
| Fusarium oxysporum       | Fungi     | Ascomycota | Sordariomycetes | Hypocreales | Nectriaceae    | Fusarium    |
| Penicillium griseofulvum | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Penicillium |
| Trichoderma harzianum    | Fungi     | Ascomycota | Sordariomycetes | Hypocreales | Hypocreaceae   | Trichoderma |

**Tableau 3-6.** Liste et taxonomie des espèces fongiques identifiées au niveau des eaux de ruissellement

| Souches fongiques        | Taxonomie |            |                 |             |                |             |
|--------------------------|-----------|------------|-----------------|-------------|----------------|-------------|
|                          | Règne     | Division   | Classe          | Ordre       | Famille        | Genre       |
| Mucor hiemalis           | Fungi     | Zygomycota | Mucormycotina   | Mucorales   | Mucoraceae     | Mucor       |
| Aspergillus niger        | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Aspergillus |
| Aspergillus versicolor   | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Aspergillus |
| Fusarium oxysporum       | Fungi     | Ascomycota | Sordariomycetes | Hypocreales | Nectriaceae    | Fusarium    |
| Penicillium griseofulvum | Fungi     | Ascomycota | Eurotiomycetes  | Eurotiales  | Trichocomaceae | Penicillium |

La flore bactérienne isolée appartient à plusieurs familles (Tableau 3-3 et 3-4). La famille des *Burkholderiaceae* occupe la première place avec une proportion de 23 souches entre le site 1 et 2 suivie de la famille des *Aeromonadaceae* avec 19 souches. Les autres familles sont très peu représentées avec un nombre d'isolats très faible. La flore fongique est représentée par 4 grandes familles de moisissures des eaux et des sols agricoles (Tableau 3-5 et 3-6), *Mucoraceae*, *Trichocomaceae*, *Nectriaceae*, *Hypocreaceae* avec une abondance de la famille des *Trichocomaceae*.

La flore microbienne des échantillons témoins est également assez importante avec quelques différences et plus particulièrement pour les bactéries. Quelques espèces (*Proteus vulgaris*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Erwinia chrysanthemi*, *Xanthomonas campestris*) bactériennes rencontrées au niveau des sites contaminés ne sont pas détectées au niveau du témoin.

D'autres espèces fongiques et bactériennes nouvelles apparaissent par contre seulement au niveau des échantillons témoins (*Mucor hiemalis*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Vibrio vulgaris*, *Vibrio fluvialis*). La fréquence des isolats au sein d'une même espèce varie selon les sites.

L'étude de la microflore des eaux et des sols des régions étudiées nous a permis d'obtenir une flore microbienne égale à 79115 souches composée de 51407 espèces bactériennes appartenant à plusieurs familles dont la plus significative est celle des *Enterobacteriaceae* et 27708 espèces fongiques réparties sur l'ensemble des échantillons des sols et des eaux dont les plus prédominantes sont classées dans la famille des *Trichocomaceae*. Leur fréquence est assez hétérogène selon la nature et le lieu de prélèvement.

Les espèces les plus abondantes sont *Burkholderia cepacia* et *Pasteurella Pneumotropica*, au niveau des sols et des eaux contaminés et non contaminés et une abondance de souches fongiques telles que, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* et *Fusarium oxysporum* au niveau des sols et des eaux de ruissellement. Parmi toutes ces espèces dominantes dans cette mycoflore, la plus prépondérante est *Aspergillus niger*. Elle est isolée à haute fréquence dans tous les sites étudiés Ceci est en parfaite concordance avec les résultats signalés par Bordjiba, 2003, Bordjiba et al., 2001.

Une présence rare sur l'ensemble des échantillons analysés de sols et des eaux de ruissellement des genres tels que : *Penicillium*, *Trichoderma*, *Serratia*, *Vibrio* et de *Pseudomonas*. Ces espèces sont également faiblement représentées même au niveau des échantillons témoin. Cette rareté de ces agents microbiens réputés pour leur abondance et leur fréquence au niveau des différentes matrices confirment les résultats enregistrés par Bordjiba et al., 2001 ; Chafai, 1996). Par ailleurs, certaines espèces microbiennes sont isolées à fréquence moyenne avec des taux de développement non négligeables. Il s'agit de *Mucor hiemalis*, *Mucor flavus* *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma pseudokoningii* et *Aeromonas hydrophila*.

La croissance de certaines espèces telles que *Vibrio vulgaris*, *Vibrio fluvialis*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Mucor hiemalis* est inhibée dans les sites contaminés. Nous pensons que cette inhibition est due probablement à la présence des pesticides dans le sol traité. Les fortes doses accumulées à la suite de traitements répétées pendant plusieurs années, deviennent toxiques pour certaines souches. Ce manque d'adaptation entraîne une certaine sélection des espèces à l'intérieur des populations microbiennes. Inversement, il y a des souches qui semblent au contraire être stimulées par la présence de pesticides puisque leurs taux de développement augmentent dans les sites contaminés. Il s'agit de *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* et *Mucor flavus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Erwinia chrysanthemi*.

*Aspergillus niger* est la seule espèce la plus performante de cette microflore fongique, elle est considérée par excellence comme souche ubiquiste. *Aspergillus niger* est un champignon saprophyte très répandue dans le monde, signalées dans plusieurs régions à climat tempéré chaud et tropical. Il a été isolé sur des substrats variés, à différentes profondeurs du sol. En outre il est très résistant aux divers polluants et supportent les concentrations élevées d'herbicides (Domsch et al., 1980 ; Pitt, 1979). Cette place prépondérante occupée par cette espèce dans la microflore fongique de différents substrats a été signalée également par de nombreux auteurs (Borut et Johnson, 1962 ; Ranzoni, 1968 ; Dunn et Baker, 1983 ; Steiman et al., 1995 Steiman et al., 1997 Guiraud et al., 1995 ; Mouchacca, 1982). Il a été isolé auparavant dans les eaux et les sédiments de l'Est Algérien (Chafai, 1996). On peut dire que c'est un micromycète doué d'un remarquable pouvoir d'adaptation aux conditions difficiles, il peut supporter les grandes variations de températures et de pH et n'est pas influencé par les facteurs climatiques et s'acclimate facilement aux biotopes de nature différentes. Il peut se développer généralement dans des zones humides comme au niveau des régions à potentiel hydrique très bas ainsi qu'à des pH acides ou basiques dans des matrices à faible ou à forte teneur en matières organiques (Chafai, 1996 ; bordjiba, 2003).

Parmi les espèces fongiques pathogènes, *Fusarium oxysporum* représente la seule espèce avec 16 souches de cette mycoflore. C'est un parasite vasculaire, très virulent pour les plantes, possédant des chlamydospores de longue durée. Il est considéré comme étant une espèce cosmopolite, largement répandue dans les régions à climat méditerranéen, tempéré ou tempéré tropical ou subtropical.

Le genre *Penicillium*, champignon à la fois saprophyte et pathogène dans certains cas ; il est représenté dans cet inventaire par une seule espèce à des taux non négligeables. C'est l'un des

genres les plus rares dans cet inventaire contrairement à ce qui a été signalé dans les différents travaux réalisés sur la microflore fongique des sols, des eaux et des sédiments. *Penicillium* est un des agents les plus commun et ubiquistes ; Il a été isolé à partir de sol organique et minéral (Balasooriya et Parkinson, 1967), dans les régions du nord (Nespiak, 1970) et dans les régions du sud ou tropicales (Kobayasi et *al.*, 1977). C'est un champignon très commun et très fréquent à la surface des sols cultivés ou non cultivés et dans les sols désertiques. Par ailleurs, il a été signalé comme l'une des espèces de microorganismes du sol qui dégrade certains polluants organiques et notamment les herbicides toxiques persistants de la famille des triazines.

La répartition de la microflore microbienne du sol 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 ont un retentissement sur la composition de la microflore aussi bien quantitativement que qualitativement, 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 matière organique et notamment pendant les premières étapes de décomposition (Bordjiba et *al.*, 2001). Par faute de chlorophylle, les champignons sont tous incapables d'assimiler le CO<sub>2</sub> par voie chimiosynthétique (photosynthèse), ils utilisent donc les composés organiques comme source de carbone. Selon (Davet, 1996), les champignons possèdent au niveau de leur paroi des enzymes (exp:  $\alpha$  amylase, pectinases secrétées par *Aspergillus niger*) qui leur permettent de dégrader les substrats organiques complexes qui ne peuvent pas franchir la paroi (kératine, cellulose, lignine, acide humique).

De l'ensemble de toutes ces données, il ressort que les sols des deux régions étudiées sont riches en matière organique avec des pH se situant dans la zone optimale de développement, des taux d'humidité assez faibles d'où une bonne aération. Tout ceci semble constituer un biotope favorable à l'installation d'une microflore fongique importante. 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).

En ce qui concerne les populations bactériennes dénombrées et leurs fluctuations d'un site à un autre, elles sont plus importantes que celles des champignons. Toutefois, la méthode utilisée ne permet pas d'obtenir toutes les espèces vivant dans un milieu, car elle ne permet pas de satisfaire les exigences physiologiques de toutes les espèces bactériennes présentes dans un échantillon donné. Elle permet une évaluation quantitative des bactéries viables sur un milieu de culture déterminé. Les bactéries dénombrées sont cultivées avec ou sans présence d'oxygène (aérobies et anaérobies). Cette méthode permet d'isoler et de dénombrer un groupe relativement varié d'espèces de bactéries dans des milieux pauvres en substances nutritives sans égard à leur pathogénicité.

Le nombre et la nature des espèces bactériennes 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 pour les nutriments, etc.

Néanmoins, cette méthode permet d'obtenir une appréciation globale de la contamination et une évaluation des populations présentes dans un milieu. La présence de microorganismes pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila* dans cet inventaire nous renseigne sur la nature du milieu (milieu contaminé). Cependant, ces espèces pathogènes favorisent la dégradation biologique.

Vu, le nombre d'isolats, la nature des espèces fongiques et bactériennes, leur fréquence au niveau des sols et des eaux, il s'avère que le biotope provoque une influence importante sur l'installation et la répartition de la biomasse microbienne.

## **6. Conclusion**

Les espèces inventoriées constituent d'une part, une liste de microorganismes susceptibles de survivre dans les conditions particulières de substrats fortement contaminés par la présence de plusieurs herbicides, fongicides et des rejets de composés toxiques émanant des différentes installations industrielles. D'autre part, des espèces vivant dans milieu non traité par les pesticides, ces espèces non acclimatées, sont généralement sensibles aux effets des substances toxiques et à leurs conditions difficiles.

Les populations fongiques et bactériennes isolées sont diversifiées dans la majorité des prélèvements, elles appartiennent à différentes classes et particulièrement marquées par la

présence de nombreux *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Burkholderia*, *Pasteurella* et *Aeromonas*.

Une part importante de cet inventaire est occupée par des espèces saprophytes, polyphages, ubiquistes, résistantes ou capables de s'adapter aux conditions difficiles (pollution par les herbicides, insecticides et fongicides). Une part non négligeable est représentée par des agents fongiques pathogènes. Certains d'entre eux sont redoutables pour les plantes et pour l'homme. Certains d'entre eux produisent des organes des résistances (*Chlamydozoospores*) qui leur permettent de se maintenir au niveau du sol à l'état latent pendant plusieurs mois voire même plusieurs années. C'est le cas par exemple de *Fusarium* et de *Trichoderma*.

Par ailleurs, la présence de bactéries pathogènes tels que *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *pasteurella pneumotropica* et *Aeromonas hydrophila* laisse supposer qu'on est en présence de milieux contaminés. Toutefois ces milieux constituent un biotope où la dégradation biologique ou la biodégradation est possible puisque ces deux espèces bactériennes sont très réputées dans le domaine de bioremédiation des différents polluants.

# **CHAPITRE IV : BIODEGRADATION**

## 1. Introduction

Selon leur cible (insecticide, herbicide ou fongicide) les pesticides sont des molécules de natures diverses : composés organophosphorés, organochlorés, organochlorés, dérivés de carbamate, triazines, phénylurées. A cause de leur utilisation importante et en raison de leur persistance dans l'environnement, les pesticides sont fréquemment détectés dans les eaux de surface et les eaux souterraines (IFEN, 2007). Ils se retrouvent également dans les aliments tels que les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale (œufs, lait, viande, poisson...).

Les faibles quantités de pesticides, en mélange, pendant des périodes longues posent de nombreux problèmes de santé puisqu'ils présentent des propriétés cancérigènes, mutagènes, tératogènes et allergènes. Afin de réduire l'impact de cette pollution sur l'environnement et la santé, liée notamment à la propagation des molécules dangereuses dans le milieu et leur transfert dans les nappes phréatiques et dans la chaîne alimentaire, la décontamination de l'environnement devient une priorité majeure.

Les traitements mis en œuvre sont nombreux et depuis des années déjà, de nouvelles technologies sont en développement. Sur le terrain, les techniques de traitement thermiques et physico-chimiques sont les plus répandues. D'autre part des coûts exorbitants sont engendrés par les projets de réhabilitation qui exigent souvent l'excavation des sols et le transport onéreux des terres vers les installations de dépollution. De plus, la nature complexe des pesticides rend les méthodes de décontamination existantes inefficaces. Non seulement elles sont onéreuses, mais elles produisent aussi des résultats imprévisibles.

Pour parvenir à une décontamination efficace des milieux, de nouveaux procédés ont été développés. Les traitements biologiques qui consistent en l'utilisation des microorganismes en vue de la biotransformation est un domaine en pleine expansion. L'intérêt de ces techniques réside essentiellement dans le fait qu'elles ne nécessitent ni excavation, ni transport, ce qui rend leur mise en œuvre bien moins coûteuse. Les traitements biologiques font appel aux capacités naturelles des microorganismes à dégrader certains polluants. Ces techniques se basent sur le fait que les microorganismes qui se développent dans un milieu y trouvent des conditions favorables et se nourrissent notamment du polluant présent qui est alors dégradé. En modulant des paramètres comme l'oxygène, l'humidité, la température et les éléments nutritifs, la croissance des microorganismes dépollueurs peut être optimisée.

La plupart des travaux réalisés jusqu'à présent traitent de la biodégradation des pesticides de la famille des triazines et des organochlorés et les composés aromatiques polycycliques par la biomasse totale des microorganismes ; très peu sont ceux qui concernent les autres familles de pesticides

C'est dans ce sens, que s'insère notre travail qui consiste à étudier des herbicides et des fongicides appartenant à trois familles : thiocarbamates, sulfonilurées et acétamides qui contaminent les sites agricoles de la région d'Annaba (Algérie) afin de rechercher les potentialités cataboliques des espèces bactériennes et fongiques isolées et d'élargir les investigations dans le domaine de la biodégradation.

## **2. Généralités sur la biodégradation**

### **2.1. Définition**

La biodégradation est la transformation du pesticide provoquant des modifications de la structure moléculaire avec apparition de métabolites. Ces transformations contribuent à diminuer la quantité de matière active dans le sol et donc à réduire les risques de pollution.

En d'autres termes, la biodégradation signifie tout simplement la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme (Grady, 1985). Cependant, lorsqu'on dit qu'un composé est biodégradable, cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé (conversion en dioxyde de carbone, eau et différentes formes inorganiques). La biotransformation est réalisée par des organismes supérieurs (végétaux) ou des microorganismes pour dégrader les composés organiques. La transformation par les microorganismes est considérée comme la composante majeure des réactions de transformation auxquelles sont soumis les polluants. En effet, ces microorganismes peuvent se développer dans des environnements très diversifiés et font appel à des mécanismes variés parfois unique au sein du règne vivant.

En général, sous l'action des microorganismes, les polluants organiques sont transformés en molécules de moins en moins polluantes (en termes de persistance et toxicité). En effet, les pesticides sont souvent classés comme biodégradables, persistants ou récalcitrants. De nombreux pesticides sont des composés aromatiques, c'est à dire des dérivés du benzène ou de cycles hydrocarbonés voisins. L'ouverture du noyau benzénique est une réaction chimiquement difficile qui demande des réactifs puissants, il est frappant de constater qu'à l'inverse, elle est facilement réalisée par des microorganismes. Cependant, Les

microorganismes peuvent seulement faire les choses pour lesquelles ils ont une « programmation » génétique. Par conséquent, il n'est pas garanti qu'un composé soit dégradé dans un environnement particulier. D'abord, un organisme susceptible de dégrader doit être présent; ensuite une opportunité doit exister pour que les enzymes nécessaires soient synthétisées; enfin, les conditions environnementales doivent être appropriées pour que les réactions enzymatiques s'effectuent à une vitesse significative (Grady, 1985).

## **2.2. Les mécanismes de l'adaptation**

L'application répétée de pesticides sur les parcelles agricoles peut conduire à l'adaptation de la microflore du sol qui acquiert la capacité de dégrader ces molécules par les gènes codant les enzymes cataboliques responsables de la dégradation des pesticides. L'adaptation de la microflore du sol conduit à la mise en place de ce qu'on appelle le phénomène de biodégradation accélérée. Du point de vue agronomique, la biodégradation accélérée peut, dans certains cas, être dommageable en traitement phytosanitaire en diminuant l'efficacité du traitement phytosanitaire. Du point de vue environnemental, elle est par contre intéressante parce qu'elle réduit la persistance ou la demi-vie du produit phytosanitaire (Topp et *al.*, 2003) dans le sol, limitant ainsi son transfert, notamment vers les eaux de surface et souterraines.

La spécificité enzymatique, quoique parfois très étroite, est rarement absolue. Ainsi, un produit chimique de synthèse pourrait être dégradé par des voies métaboliques déjà existantes et normalement affectées à la dégradation de composés naturels. Ceci semble plus particulièrement envisageable lorsqu'une certaine identité de structure entre l'analogie de synthèse et le produit naturel leur permet d'être indifféremment acceptés comme substrats par certains enzymes. Cependant, l'existence, dans la cellule microbienne de systèmes enzymatiques potentiellement efficaces n'entraîne pas obligatoirement une dégradation. En effet, la synthèse de nombreux enzymes des voies cataboliques est étroitement dépendante de la concentration en substrat (appelé aussi inducteur) qui en détermine le niveau de production. Or, la capacité pour un produit étranger à être accepté comme substrat accessoire ne se double pas forcément d'une capacité à induire la synthèse des enzymes appropriés, surtout lorsque ces enzymes sont empruntés à des voies métaboliques distinctes, donc séparément régulées (Mortlock, 1981). Les mécanismes qui permettent de débloquent (déréprimer) cette synthèse sont de deux sortes:

- la duplication des gènes codant pour la synthèse des enzymes correspondants. L'expression simultanée de plusieurs gènes identiques entraîne, même sans induction,

un relèvement du niveau de base de synthèse enzymatique tel que la transformation peut devenir possible. La duplication des gènes est un phénomène fréquemment observé, qui probablement joue un rôle déterminant dans l'évolution génétique des microorganismes (Mortlock, 1981).

- une mutation dans les gènes (dits régulateurs) qui contrôlent la transcription et l'expression de gènes (dits structuraux) codant pour la production de certaines enzymes. Les mutants «constitutifs" issus de telles mutations se caractérisent par une production continue d'enzymes à des niveaux élevés (Hegeman et Rosenberg, 1970; Mortlock, 1981 ; Dagley, 1975).

### **2.3. Les principales catégories de microorganismes dégradants**

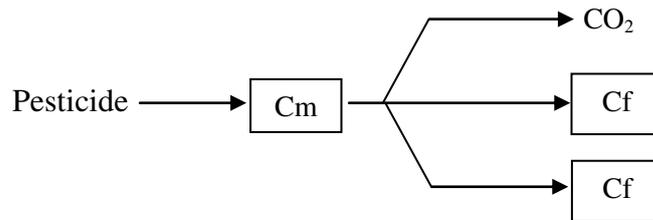
La conséquence la plus immédiate de la théorie précédente est que les microorganismes dégradant un xénobiotique pourraient se regrouper en deux catégories principales : ceux, probablement les plus nombreux, qui seraient capables d'entamer la séquence réactionnelle sans pouvoir la mener à son terme en raison d'un équipement enzymatique incomplet et ceux qui, au contraire, rassembleraient l'intégralité du génome, permettant ainsi la transformation du nouveau substrat de progresser jusqu'à un stade où il peut intégrer les voies du métabolisme central énergétique et biosynthétique (Kilbane et *al.*, 1982 ; Chatterjee et *al.*, 1982). Selon Soula (1985), ces deux catégories de micro-organismes ont été mises en évidence à partir de plusieurs expérimentations. Certains microorganismes, en effet, dégradent un pesticide donné avec accumulation concomitante d'un métabolite. Un tel microorganisme ne peut donc se développer que dans la mesure où il trouve dans le milieu un autre substrat plus facilement accessible. le pesticide ne peut être utilisé directement comme source de carbone ; ce mécanisme nécessite l'association de plusieurs souches complémentaires et la présence d'un co-substrat; ce phénomène est lent et peut être inachevé. On dit qu'il y a dégradation par co-métabolisme (figure 4-1, B).

Le cométabolisme demeure toutefois un phénomène complexe. En effet, cette complexité est liée au fait que différents co-substrats (glucose, xylose, glycérol, acétate) possèdent des effets différents sur la transformation des produits xénobiotiques par les microorganismes (Golovleva *et al.* 1980)

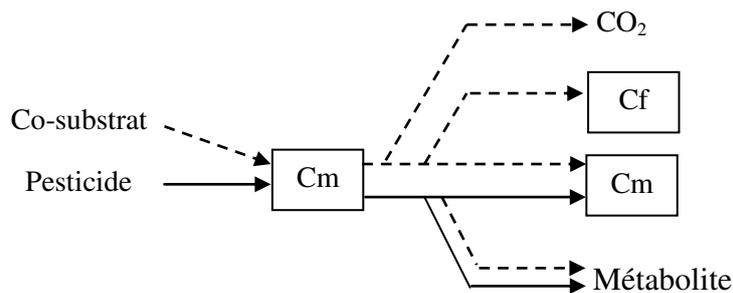
Au contraire, d'après Soula (1985), certains microorganismes sont capables de se développer à partir de la seule molécule de pesticide. On dit qu'il y a dégradation par métabolisme. Dans

le métabolisme : le pesticide est utilisé comme source d'énergie unique ou partielle (figure 4-1, A).

Le schéma suivant résume les deux voies, celle du métabolisme direct et du cométabolisme concerté qui contribuent, parfois de façon simultanée, à la biodégradation ultime d'un pesticide.



**A Métabolisme**

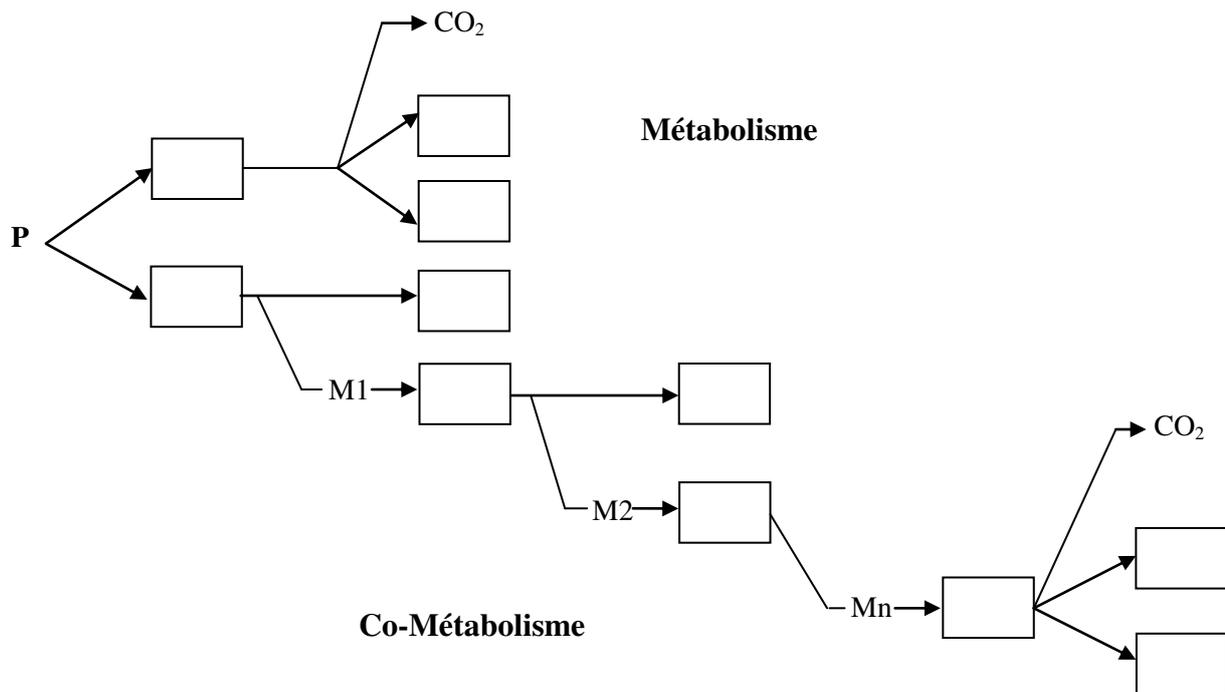


**B Co-Métabolisme**

**Figure 4-1.** Les deux voies de dégradation des pesticides (Soula, 1985)

A : la cellule-mère Cm utilise le pesticide comme source de C et d'énergie. Les « produits » de la dégradation sont du CO<sub>2</sub> et du « matériel » cellulaire (cellule-fille et).

B : la cellule Cm transforme le pesticide en métabolite sans possibilité de croissance. Celle-ci est normalement assurée par un co-substrat, source de C et d'énergie. (Les flèches en trait plein sont relatives aux transferts du pesticide et de ses métabolites. Celles en pointillé sont relatives au co-substrat).



**Figure 4-2.** La dégradation ultime (Soula, 1985).

Les rectangles représentent des cellules microbiennes et M1, M2 ... Mn des métabolites successifs.

Est-ce à dire que seuls les produits qui se dégradent par métabolisme sont susceptibles d'être minéralisés dans le sol? La réponse est négative car, dans le sol, la dégradation d'un pesticide est un phénomène communautaire associant toutes les souches susceptibles d'intervenir à un stade quelconque de la séquence réactionnelle qui conduit à la dégradation ultime du produit. La figure (4-2) schématise les deux voies, C'elle du métabolisme direct et du cométabolisme concerté qui contribuent, parfois de façon simultanée, comme c'est le cas pour 2, 4,-0 (Fournier et *al.*, 1981), à la dégradation ultime d'un pesticide (Soula, 2010).

La transformation des xénobiotiques par les microorganismes, qu'elle soit due à l'action d'un ou plusieurs organismes, met en jeu simultanément plusieurs de ces mécanismes. Elle s'effectue au travers des réactions de la phase de fonctionnalisation permettant l'introduction de groupes fonctionnels (OH, NH<sub>2</sub>, SH et CO<sub>2</sub>H) dans le composé parent et correspondent à des réactions d'hydrolyse, d'oxydation ou de réduction.

### 2.3.1. Réactions d'hydrolyse

Elle peut être catalysée par des cations métalliques dont les plus réactifs sont les métaux présentant un état d'oxydation +II en solution ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,...). Ce mécanisme a été décrit pour l'hydrolyse de divers pesticides organophosphorés (Meikle et Youngson, 1978).

En phase adsorbée, l'hydrolyse peut être favorisée par la formation d'un complexe de surface avec un atome métallique ou par l'augmentation de l'ionisation des molécules d'eau hydratant les cations compensateurs des minéraux argileux, entraînant une diminution du pH au niveau des surfaces adsorbantes (Mortland, 1970 ; Smolen et Stone, 1998). L'hydrolyse des organochlorés, des organophosphorés et des triazines est favorisée par la diminution de pH résultant de ce phénomène (Russell et *al.*, 1968).

Les composés organiques dissous semblent également influencer la vitesse d'hydrolyse. Par exemple, l'hydrolyse des 1,  $\gamma$ , 5-triazines augmente avec la teneur en acides humiques ou fulviques présents dans le milieu (Muir, 1991). Dans la solution du sol, l'hydrolyse acide peut être favorisée par les groupes fonctionnels acides de la matière organique (Gamble et Khan, 1985). L'influence de la matière organique peut être expliquée par un modèle catalytique micellaire. Pour des composés tels que la furanone et les esters du 2,4-D, les composés organiques pourraient jouer un rôle protecteur (Mietinnen et *al.*, 1993). Les argiles métalliques peuvent aussi jouer un rôle de catalyseurs à cause de leur pH de surface acide (Sánchez-Camazano et Sánchez-Martín, 1991).

### 2.3.2. Réactions redox

Elles ont un rôle important dans le devenir de certains composés (pesticides halogénés) même si elles ne sont pas quantitativement très bien décrites (Calvet et *al.*, 2005). Les réactions d'oxydation sont dues à l'oxygène moléculaire ou à des espèces actives d'oxygène comme l'ozone, l'oxygène singulet et ou les oxydes métalliques parmi lesquels les oxydes de manganèse et les hydroxydes sont les plus grands contributeurs. En effet, ils sont réactifs et sont très présents dans les sols (Li et *al.*, 2003). Le potentiel redox du  $\text{MnO}_2$ , par exemple, lui permet d'oxyder des contaminants organiques fonctionnalisés comme le phénol, l'aniline ou les triazines. Certains facteurs peuvent affecter la vitesse des réactions d'oxydation (pH, solutés tels que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Zhang et *al.*, 2008).

La matière organique en réduisant la surface des sites réactifs et en se liant de façon covalente au radical cation peut aussi affecter les réactions d'oxydation (Li et *al.*, 2000).

La réduction des pesticides se produit dans des conditions physico-chimiques favorables rencontrées dans les sédiments, les aquifères et dans les sols avec une hydromorphie temporaire ou permanente. Les réducteurs sont constitués par les métaux réduits, les sulfures et les composés organiques provenant de la matière organique ou de l'activité des microorganismes du sol (Borch et *al.*, 2010). Des études approfondies sur des composés nitroaromatiques (trifluraline, par exemple) utilisés comme sondes ont montré qu'ils sont réduits essentiellement par le fer (II) présent à la surface des minéraux de fer (Colón et *al.*, 2006). La matière organique, en particulier les groupements quinoniques peuvent jouer un rôle déterminant (Kappler et Haderlein, 2003). Zhang et Weber ont démontré que les contaminants organiques réductibles entrent en compétition avec les oxydes de fer pour les électrons générés par les processus d'oxydation microbiologiques du carbone organique (Zhang et Weber, 2009).

#### **2.4. Les caractéristiques de l'agent biologique (ou du microorganisme) de dégradation efficace**

L'agent biologique de dégradation efficace ou le microorganisme doit avoir certaines caractéristiques :

- Une aptitude à transformer une large gamme de composés chimiques : dans le sol, les polluants sont sous forme de mélanges. L'agent biologique devra produire les systèmes enzymatiques capables de catalyser la transformation d'un grand nombre de substrats xénobiotiques de structures chimiques distinctes. Ceci implique la multiplicité des systèmes enzymatiques, ou que ceux-ci montrent une faible spécificité de substrat et soient constitutifs (non induit par la présence du polluant).
- Une forte accessibilité aux polluants : dans les sols, les polluants sont partiellement dissous dans la phase aqueuse ou éventuellement dans la phase gazeuse, mais aussi à l'état adsorbé sur le complexe organo-minéral du sol, ou encore à l'état natif. Le microorganisme devra être capable d'atteindre le polluant quelle que soit sa localisation, ce qui implique qu'il possède des systèmes enzymatiques exo et intracellulaires.
- Une forte tolérance aux composés toxiques : beaucoup de polluants présentent une toxicité intrinsèque élevée. Leurs pouvoirs biocides sont encore renforcés par les très fortes

concentrations présentent sur les sites pollués, ainsi que par des synergies entre les composés. L'organisme aura pour première fonction de détoxifier ces polluants.

- Une possibilité d'hyperproduction d'un système enzymatique particulièrement actif vis-à-vis d'une classe de polluant et une action préférentielle sur une famille de molécules (Mougin, 1996).

## **2.5. Les facteurs influençant la biodégradation des pesticides**

Les facteurs influençant la biodégradation des pesticides sont entre autres : les propriétés physico-chimiques des molécules de pesticides, la distribution spatiale des microorganismes, la structure du sol et les facteurs environnementaux

### **2.5.1. Propriétés physico-chimiques des pesticides**

La diversité des phénomènes impliqués dans la biodégradation et la variété de structures des pesticides rendent difficile l'établissement d'une relation entre propriétés chimiques et vitesse de dégradation (Calvet et *al.*, 2005). Cependant, certains atomes (chlore en particulier) sont connus pour être toxiques pour les microorganismes même s'il ne s'agit pas d'une règle générale. Par exemple, la chlordécone n'est pas dégradée par les bactéries à cause de sa structure fortement chlorée la transformant en une pauvre source de carbone pour les bactéries.

### **2.5.2. Structure du sol**

Le travail du sol ou l'apport d'amendements organiques peuvent entraîner l'agrégation des particules du sol et la création de pores et influencer ses propriétés hydrauliques (Mapa et *al.*, 1986). Ainsi, l'observation d'une augmentation du phénomène de lixiviation peut être attribuée aussi bien à une mauvaise adsorption due à une faible teneur en matière organique qu'à une lente dégradation biologique (Alletto et *al.*, 2010).

La structure du sol peut protéger le pesticide de la biodégradation, lequel phénomène est amplifié lorsque le temps de séjour du pesticide dans le sol est élevé. Plusieurs études ont abouti à cette conclusion (Nam et *al.*, 1998). Les molécules hydrophobes peuvent devenir inaccessibles en s'incrétant dans la matière organique ou dans le réseau de micropores (Shaw et *al.*, 2002).

### **2.5.3. Distribution spatiale des microorganismes**

La distribution spatiale des microorganismes joue également un rôle important dans la persistance des pesticides. (Vieublé-Gonod et *al.*, 2003) ont observé une grande variation de la minéralisation du 2,4-D dans une même catégorie d'agrégats de sol qu'ils ont expliqué, essentiellement, par une répartition inégale de microorganismes impliqués dans la dégradation .

### **2.5.4. Facteurs environnementaux**

Une teneur en eau faible du sol affecte la diffusion des composés solubles et la mobilité des microorganismes alors qu'une humidité élevée limite la diffusion de l'oxygène, les deux situations affectant les activités microbiennes (Skopp et *al.*, 1990). Schroll et *al.*, (2006) ont montré une minéralisation optimale de l'isoproturon et du glyphosate pour un potentiel de la solution du sol égal à -0,015 MPa tandis qu'elle est considérablement réduite quand la teneur en eau s'approche de la saturation. La teneur en eau affecte aussi la diversité des microorganismes (Bouseba et *al.*, 2009).

La température est également susceptible d'influencer la dégradation des pesticides (Bouseba et *al.*, 2009). Levy et *al.*, (2007) ont montré que les conditions rudes de l'été  $\beta 00\gamma$  avaient altéré la structure des microorganismes impliqués dans la dégradation de l'isoproturon.

## **3. Quelques données sur les familles Thiocarbamates, Sulfonylurées, Acétamides**

### **3.1. Thiocarbamates**

#### **3.1.1. Généralités**

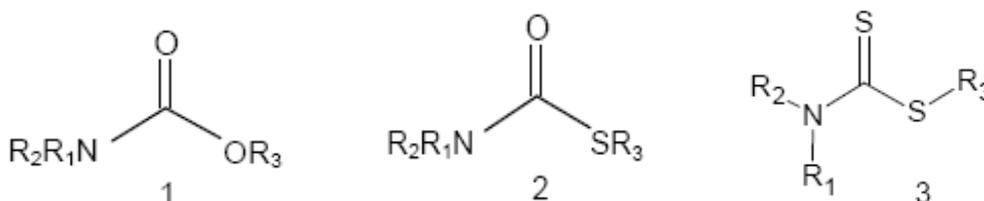
Les thiocarbamates sont utilisés principalement dans l'agriculture et font partie de l'ensemble du groupe des pesticides organiques de synthèse qui ont été développés et produits sur une grande échelle dans les derniers 30 - 40 ans.

En raison de leur activité insecticide, herbicide, fongicide et propriétés, thiocarbamates ont une large gamme d'utilisations et applications à travers le monde et, par conséquent, sont produites dans de grandes quantités.

Les thiocarbamates sont influencés par la nature de la molécule, la volatilité, le type de sol, l'humidité du sol, l'adsorption, le pH, la température et la photodégradation.

### 3.1.2. Nature chimique

Les thiocarbamates sont les analogues semi-soufrés de carbamates. Ce sont des sels ou esters de l'acide thiocarbamique, dont la formule est  $\text{NH}_2\text{-CO-SH}$  ou  $\text{NH}_2\text{-CS-OH}$ . La formule chimique des thiocarbamates est donc :  $\text{NH}_2\text{-COSR}$ . L'atome de soufre qui substitue un atome d'oxygène du groupe carboxylate peut occuper l'une ou l'autre des deux positions possibles. En fait, les thiocarbamates sont des carbamates dont un des atomes d'oxygène du groupe carboxylate est substitué par un atome de soufre. Tout comme dans le cas des carbamates, les hydrogènes reliés à l'atome d'azote peuvent être substitués par d'autres atomes, des chaînes, des cycles ou encore faire partie d'un cycle. À noter que dans le cas des esters, l'oxygène ou le soufre, selon le cas, du groupe carboxylate qui assure la liaison avec le radical  $R$  doit être obligatoirement lié à un atome de carbone de ce radical.



**Figure 4-3.** Structure chimique générale des carbamates (1), des thiocarbamates (2) et des dithiocarbamates (3)

### 3.1.3. Propriétés physiques et chimiques

A température ambiante, les thiocarbamates sont des liquides ou des solides avec un faible point de fusion. Tous les thiocarbamates herbicides sont volatils. Comme ils ont généralement un N, N -dialkylsubstitué et un atome de soufre à la place de l'oxygène, ils sont moins polaires que les méthylcarbamates et sont miscibles avec la plupart des solvants organiques avec une pression de vapeur élevée (IARC, 1976 ; Worthing et Walker, 1983). Sulfone dérivés sont également stables à pH 2, mais beaucoup moins à un pH de 10 (Casida et *al.*, 1974).

### 3.1.4. Mode d'action des carbamates

L'une des principales cibles des carbamates est l'activité acétyl cholinestérasique, comme pour les organophosphorés, mais de manière moins puissante puisque dans ce cas , le complexe

carbaryl-enzymatique est hydrolysable avec libération de CO<sub>2</sub>, le méthylamine et de l'enzyme régénérer, on observe donc les mêmes sortes de perturbations neuro-hormonales que pour les organophosphorés, mais le degré d'inhibition est atténué en proportion de la vitesse de régénération de l'enzyme, la conformation des dimensions des molécules à la topologie du site actif de l'enzyme est déterminante pour l'obtention d'une haute activité anticholinestérasique, alors le mode d'action des insecticides carbamate est très similaire à celui des insecticides organophosphorés car ils inhibent les enzymes cholinestérases. Cependant, l'inhibition des cholinestérases est plus rapide, contrairement aux organophosphorés où l'inhibition est plus lente (Zhang *et al.*, 1996 ; Bouraqui Idrissi 2006) .

La biodégradation des thiocarbamates est réalisée surtout par les plantes et les microorganismes. Les thiocarbamates subissent une hydrolyse suivie d'une sulfoxydation et transthiolation pour former du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

Chez les mammifères, deux principales voies existent pour le métabolisme des thiocarbamates. La première voie est réalisée par sulfoxydation et conjugaison avec le glutathion. Le produit de conjugaison est alors clivé en un dérivé de la cystéine, qui est métabolisé en un composé d'acide mercapturique. La seconde voie est l'oxydation du soufre en sulfoxyde, qui est alors oxydé en une sulfone, ou hydroxylation de composés qui entrent dans le métabolisme du carbone. Bien que les thiocarbamates et leurs produits métaboliques puissent être trouvés dans certains organes, comme le foie et les reins, leur accumulation est rare en raison de leur métabolisme rapide.

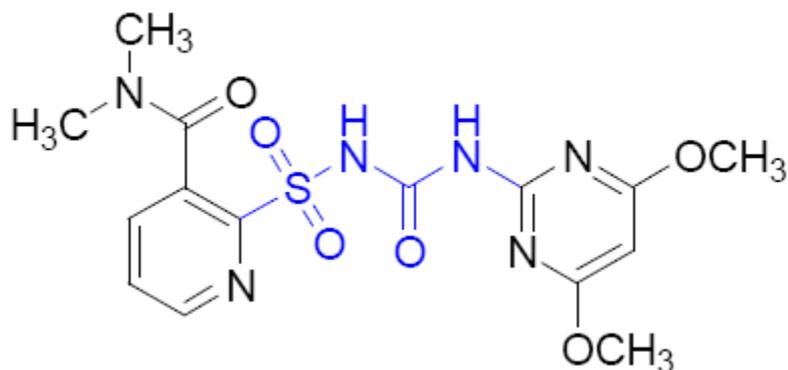
### **3.1.5. Photodégradation**

Peu de choses ont été signalées sur la photodégradation des thiocarbamates. Casida *et al.*, (1975) rapportent que l'absorption de lumière provoque la rupture du carbonyle C-S produisant deux radicaux. Ceux-ci peuvent se combiner avec des protons. En outre les thiocarbamates sont dégradés par les rayons ultraviolets par dialkyl-amination et élimination du monoxyde de carbone conduisant à des ponts dissulfures.

### **3.2. Les sulfonurées**

C'est le nom donné aux molécules renfermant un groupe urée (NH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>) dont un des atomes d'hydrogène est substitué par un groupe sulfonyle (SO<sub>2</sub>). La formule générale est

donc R-SO<sub>2</sub>-NH-CN<sub>2</sub>-R. Les atomes d'hydrogène liés aux atomes d'azote peuvent être substitués par d'autres atomes, chaînes ou cycles ou constituer un cycle.



**Figure 4-4.** Structure chimique générale des sulfonilurées

Le premier herbicide sulfoniluréé commercialisé fut le chloresulfuron en 1981 (Brown et Cotterman, 1994). Actuellement, la famille des sulfonilurées est composée d'une vingtaine d'herbicides développés principalement par Du Pont. Ces molécules sont caractérisées par une activité herbicide à des doses très réduites (10-100 fois moins que les herbicides conventionnels), ce qui a permis leur introduction rapide sur le marché des herbicides (Brown et Cotterman, 1994).

### 3.2.1. Activité herbicide

La structure chimique des sulfonilurées est composée de trois parties distinctes: groupement aryle, pont et hétérocycle. Chaque partie joue un rôle très important quant à l'action herbicide de la molécule.

Une action herbicide considérable est observée quand le cycle aromatique est ortho substitué (Brown, 1990). Les sulfonilurées portant en position ortho un groupement avec un proton acide, par exemple, groupement carboxylique ou phénolique ont en générale une faible action (Brown, 1990).

Les sulfonilurées qui contiennent un groupement aryle au lieu d'un phényle sont aussi des herbicides actifs (Brown, 1990). Concernant l'hétérocycle, les niveaux d'action les plus importants sont observés quand les sulfonilurées contiennent un groupement pyrimidin-2-yl ou 1,3,5-triazine-2-yl. Dans tous les cas, le maximum d'activité herbicide est obtenu quand le groupement hétérocyclique est substitué par des groupements alkyl ou alkoxy (Brown, 1990).

Les sulfonilurées avec un pont non substitué sont généralement les plus actives. Pour les sulfonilurées dont le pont est substitué, l'action dépend énormément des groupements aryle et hétérocycles constituant la molécule

### **3.2.2. Mode d'action**

Après absorption, l'herbicide migre dans les plantes sensibles, où il inhibe l'acétolactate synthétase, enzyme responsable de la biosynthèse d'acides aminés essentiels. L'acétolactate synthétase est présente uniquement chez les végétaux, ce qui explique, la forte phytotoxicité du produit et sa faible toxicité pour le règne animal en général, et l'homme en particulier.

L'inhibition de l'enzyme l'acétolactate synthétase entraîne, très rapidement après application, un blocage de la croissance des plantes sensibles et supprime donc toute compétition vis-à-vis de la culture.

Des études ont montré que la transpiration et le métabolisme, chez les adventices, devenaient quasi nuls quelques heures après application de l'herbicide. On observe en effet, dans les jours qui suivent des symptômes de jaunissement (chlorose) ou de rougissement (anthocyanose); ces symptômes précèdent la disparition des adventices.

La sélectivité dans les cultures semble attribuable à un métabolisme différentiel entraînant une désactivation rapide chez les plantes tolérantes. Les temps de demi-vie sont de 1 à 5 heures chez les plantes qui tolèrent les sulfonilurées et de plus de 20 heures pour les mauvaises herbes vulnérables (Brown, 1990).

Les réactions de transformation qui expliquent la désactivation dans les plantes sont : l'hydroxylation aliphatique et arylique suivie de l'hydrolyse de la fonction sulfonilurée, la rupture de la liaison sulfonamide et la O-déméthylation (Brown, 1990).

### **3.2.3. Propriétés physico-chimiques des sulfonilurées**

Les sulfonilurées sont des composés non volatils avec des pressions de vapeur inférieures à  $10^{-10}$  mmHg. Ils ont tous un proton acide adjacent au groupement sulfonyle et se comportent ainsi comme des acides faibles avec des valeurs de pKa allant de 3 à 5 (Blair et Martin, 1988).

Pour cette raison, leur solubilité dans l'eau à pH 7 est approximativement dix fois plus grande qu'à pH 5 (Beyer et *al.*, 1988). L'effet du pH sur le coefficient de partition octanol-eau (Kow)

est l'inverse de celui sur la solubilité dans l'eau. A 25°C, les valeurs de  $K_{ow}$  à pH 5 sont environ 100 fois supérieures à celles à pH 7 (Brown, 1990).

#### **3.2.4. Devenir des sulfonilurées dans l'eau et dans le sol**

Dans le milieu naturel, toute substance chimique se partage entre trois compartiments ; le sol, l'eau et l'air, auxquels on peut ajouter un quatrième le milieu biologique (faune et flore) (Prasad, 1992). Dans le cas des pesticides et de tous les polluants, il est nécessaire de connaître leur vitesse de dissipation dans l'environnement pour évaluer les risques d'intégration de ces produits dans la chaîne alimentaire et dans l'eau de consommation ou encore leur impact négatif sur l'écosystème. La dissipation peut se faire selon deux voies: la dégradation qui conduit à une transformation de la molécule organique pouvant aller jusqu'à la minéralisation et le passage dans un autre compartiment de l'environnement.

Deux caractéristiques de ces molécules permettent d'évaluer l'importance de ces voies de dissipation au niveau de la parcelle agricole: la persistance (relative aux voies de dégradation) et la mobilité (relative aux mouvements des pesticides au sein d'un même milieu ou d'un milieu à l'autre) (Buys et *al.*, 1991 ; Jamet et Cure, 1991, Bourgoïn et Konlein, 1994).

##### **3.2.4.1. Adsorption au sol**

Dans la plupart des sols agricoles (pH > 6), les herbicides sulfonilurées existent sous forme ionique et par conséquent leur adsorption aux constituants du sol est faible. En effet, Une faible adsorption au sol avec des valeurs de  $K_d < 1$  a été rapportée dans des études antérieures pour quelques pesticides appartenant à la famille des sulfonilurées (Smith 1995 ; Streck 1998-a et 1998-b ; Singles et *al.*, 1999).

L'adsorption ne dépend pas seulement du pH mais aussi de la teneur du sol en matière organique (Smith, 1995). Ainsi, dans des sols acides et des sols avec de fortes teneurs en matière organique l'adsorption est très importante (Brown, 1990 ; Harvey et *al.*, 1985). Selon Vicari et *al.*, 1996 ; Thirunarayanan et *al.*, 1985 et Wehtje et *al.*, 1987 ; Walker et *al.*, 1989, le coefficient d'adsorption  $K_d$  varie avec les teneurs en matière organique et le pH du sol. Plus le sol est riche en matières organiques plus le  $K_d$  est élevé et vice-versa.

#### **3.2.4.2. Mobilité dans le sol**

Comme conséquence de leur faible adsorption et de leur grande solubilité dans l'eau, dans des milieux neutres et alcalins, il y a un lessivage potentiel sous des conditions de champs en temps de pluie et en régime d'irrigation. Cependant, les sulfonilurées sont rarement trouvées dans les eaux souterraines à cause de leur grande instabilité dans l'eau (Martins et Mermoud, 1999). Ainsi les risques de contamination des eaux souterraines apparaissent faibles. Par contre, il faut tenir compte des métabolites qui sont parfois stables et peuvent atteindre la nappe phréatique surtout que leur toxicité n'est pas encore évaluée.

En outre, la rétention du composé dépend aussi de la teneur en matière organique. Selon les mêmes auteurs, la texture du sol joue aussi un rôle très important dans la rétention de l'herbicide. En effet, un sol avec des agrégats de faible taille engendre une grande surface d'activité qui facilite les interactions avec la molécule étudiée.

#### **3.2.4.3. Persistance et dégradation dans le sol**

Les sulfonilurées subissent une transformation dans le sol selon deux processus: microbiologique et hydrolyse chimique (Harvey et *al.*, 1985; Beyer et *al.*, 1988). Les deux processus de dégradation interviennent parallèlement dans le sol ce qui rend difficile leur distinction, car un même sous-produit peut avoir pour origine, pour une part un processus biotique et pour une autre part un processus d'hydrolyse chimique. Selon la structure chimique de l'herbicide et les conditions climatiques du sol, le processus biotique peut être prépondérant (Cambon et *al.*, 1992-a); ou minoritaire (Cambon et *al.*, 1992-b). Les études menées jusqu'à présent indiquent que la biotransformation et l'hydrolyse chimique des sulfonilurées dépendent principalement du pH, de la température et du degré d'humidité du sol (Walker et Brown 1983, Harvey et *al.*, 1985; Anderson et *al.*, 1985 et James et *al.*, 1995).

#### **3.2.4.4. Dégradation dans les milieux aqueux**

Il est connu que les cours d'eau sont la voie principale de contamination des réservoirs d'eaux douces et de l'eau de mer. La dispersion et le transfert des sulfonilurées par voie atmosphérique sont négligeables, compte tenu de la faible pression de vapeur de ces produits. La réaction d'hydrolyse implique la rupture de la fonction sulfonilurée pour former le sulfonamide, l'hétérocycle aminé et le gaz carbonique. Selon les substituants, l'amide sulfoné et l'hétérocycle aminé peuvent subir d'autres réactions d'hydrolyse. La vitesse de la réaction

d'hydrolyse dépend du pH et de la température. Elle est très rapide dans les milieux acides et lente dans les milieux neutres et basiques. La cinétique d'hydrolyse est 10 à 40 fois plus rapide à pH 5 qu'à pH 7. La réaction d'hydrolyse suit une cinétique de premier ordre avec des temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 1 à 8 semaines (Brown, 1990). En effet, dans des milieux à pH neutre ou basique, les sulfonyleurées existent principalement sous forme dissociée, ce qui limite la vitesse d'hydrolyse.

Les sulfonyleurées les plus persistants sont chimiquement hydrolysées en entraînant un clivage du pont sulfonyleurée suivi d'une Odéméthylation du cycle triazine (Sabadie, 1990 ; Sabadie, 1991 ; Sabadie, 1992 ; Reiser et *al.*, 1991), tandis que les sulfonyleurées les moins persistants présentent différents mécanismes d'hydrolyse chimique (Schneiders et *al.*, 1993).

### **3.2.5. Photodégradation**

Peu de données sont disponibles, à notre connaissance, sur les cinétiques et les mécanismes des réactions de photolyse des sulfonyleurées. Cela est probablement dû au fait que la photolyse est généralement considérée comme étant un processus de transformation minoritaire pour cette classe d'herbicides. Cependant, il a été montré récemment que la photodégradation peut être une voie de transformation aussi importante que l'hydrolyse (Choudhury et Dureja, 1996 et 1997, Pusino et *al.*, 1999 ; Scrano et *al.*, 1999). Elle peut même être envisagée, en la combinant avec la biodégradation et l'hydrolyse comme méthode de détoxification des sulfonyleurées dans l'eau (Pusino et *al.*, 1999). D'un autre côté, l'étude de la photolyse peut aider à mieux comprendre le devenir des sulfonyleurées dans l'environnement (Bhattacharjee et Dureja, 1999-a et 1999-b ; Scrano et *al.*, 1999). Schneiders et *al.*, 1993 ont observé des effets de la lumière naturelle sur la dégradation du rimsulfuron à pH 5. D'autres auteurs ont conclu que la cinétique de la réaction de photodégradation du triasulfuron exposé à la lumière simulant celle du soleil, était lente (temps de demi-vie 9,7 jours), mais très rapide par rapport à l'hydrolyse (temps de demi-vie 495 jours à pH 7) (Pusino et *al.*, 1999).

### **3.2.6. Toxicité**

Les sulfonyleurées sont toxiques pour la plantes par temps sec et pH élevé (pH >7); elles empêchent le fonctionnement de l'acétolactate synthétase. Cela stoppe la synthèse des acides aminés qui sont indispensable au développement de la plante et entraîne l'arrêt de la croissance et la mort de la plante. Par ailleurs, les travaux antérieurs indiquent que les

herbicides sulfonylurées sont des substances à faible toxicité aiguë pour les mammifères et d'autres espèces animales. Citons par exemple, les travaux de (Li et *al.*, 1999) qui ont observé qu'une toxicité assez faible sur les *Daphnia magna* des trois sulfonylurées étudiées même pour des solutions aqueuses saturées en herbicide.

### 3.3. Les Acétamides

#### 3.3.1. Définition

Les acétamides sont des molécules contenant une fonction amide ( $R\text{-CO-NH}_2$ ), où  $R$  est un radical organique se terminant par un atome de carbone. Cette fonction peut se trouver à l'intérieur d'une chaîne linéaire ou ramifiée, ou inscrite dans un cycle. Les atomes d'hydrogène liés à l'atome d'azote peuvent être substitués par d'autres atomes, des chaînes ou des cycles.

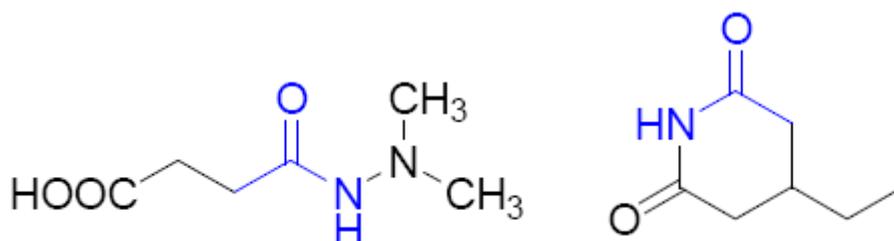


Figure 4-5. Structure chimique générale des acétamides

Un amide est le produit de la déshydratation "croisée" entre un acide hydroxylé (carboxylique, sulfonique, phosphorique, ...) et l'ammoniac ou une amine I ou II. Les plus importants proviennent de l'acide carbamique.

#### 3.3.2. Propriété physiques et chimiques des acétamides

##### 3.3.2.1. Propriétés physiques

Les amides dérivés des acides carboxyliques sont solides à température ambiante lorsqu'ils sont simples et peuvent être également liquides lorsqu'ils sont substitués, avec un point d'ébullition assez élevé. Les amides dérivés des acides sulfoniques sont en général solides à température ordinaire ce sont des solides ou des liquides huileux, fréquemment volatils et relativement instables à l'air et à la lumière. Ils présentent souvent une odeur ammoniacale.

Leur solubilité est variable, la fonction amide est hydrophile en raison d'une mésomérie faisant apparaître une forme dipolaire. Les premiers dérivés sont ainsi hydrosolubles, alors que les dérivés de haut poids moléculaire sont hydrophobes et liposolubles. Les amides sont des composés organiques qui peuvent être considérées comme des dérivés d'acides et d'amines.

Les amides dérivés des acides carboxyliques sont solides à température ambiante lorsqu'ils sont simples et peuvent être également liquides lorsqu'ils sont substitués, avec un point d'ébullition assez élevé. Les amides dérivés des acides sulfoniques sont en général solides (International Labour Organization, 1998).

### **3.3.2.2. Propriétés chimiques**

L'azote des amides est moins réactif que celui des amines en raison de la mésomérie citée plus haut. Tous ces dérivés sont néanmoins sensibles à l'hydrolyse.

En pratique les amides sont des composés neutres:  $pK_a$  (acétamide) = - 0,5, excepté les imides et les uréides qui ont un caractère acide dû au groupement -CO-NH-CO-

Moins aisée que pour les esters, l'hydrolyse rend toutefois les amides et leurs dérivés relativement instables, la zone de stabilité maximale étant comprise entre pH 6 et 8. Un grand nombre de substances de cette classe subit ainsi une inactivation partielle lors de leur administration. La sensibilité à l'hydrolyse est cependant variable; à titre d'exemple, la tension du cycle favorise la dégradation des bêta-lactamines. Diverses hydrolases peuvent également intervenir et catalyser l'hydrolyse des amides. Les amidases sont cependant moins actives que les estérases et en règle générale les amides sont considérés comme beaucoup plus stables que les esters.

### **3.3.3. Toxicité des amides**

Les acétamides agissent par absorption racinaire. Ils sont appliqués le plus souvent entre le semis et la levée de la plante. Mais, ils peuvent être employés avant le semis ou en post-levée précoce des cultures, à 2-3 feuilles de la culture

L'utilisation fréquente des amides présente un risque reconnu pour la santé et l'environnement. C'est pourquoi une quantification de la teneur en amides dans les aliments ainsi que dans le système aquatique et environnemental est une nécessité. Cette quantification

fait souvent appel à des méthodes limitées à l'analyse d'un seul amide, notamment l'acrylamide. Celui-ci, connu pour être toxique a fait l'objet d'études approfondies car il a été récemment détecté dans les produits alimentaires.

D'une part, les amides de type pesticides notamment les fongicides et les herbicides sont considérés comme des inhibiteurs du développement des plantes (Benoît et *al.*, 2005).

Ainsi, le fongicide de type cyazofamide est un inhibiteur respiratoire (inhibition du complexe mitochondrial III). De plus les herbicides de type benzamide tels que le propozamide et le tébutam sont des inhibiteurs de la division cellulaire et les herbicides de type chloroacétamides tels que l'alachlore et le métolachlore provoquent l'inhibition de la synthèse des lipides à longues chaînes (inhibition des élongases) (Benoît et *al.*, 2005).

Les données abondantes sur le métabolisme de divers amides ne permettent pas d'expliquer la nature de leurs effets toxiques au niveau moléculaire ou cellulaire. De nombreux amides simples sont probablement hydrolysés au niveau du foie par des amidases non spécifiques et l'acide produit est excrété ou métabolisé par les voies normales (International Labour Organization, 1998). Certains amides aromatiques comme, le N-phénylacétamide (acétanilide) subissent une hydroxylation du cycle aromatique et sont excrétés.

La variété de la structure chimique des amides est reflétée par la diversité de leurs effets biologiques. Certains amides sont tout à fait inoffensifs tels que les amides des acides stéarique ou oléique, tandis que plusieurs autres sont classés comme toxiques (cancérogènes, neurotoxiques et hépatotoxiques) et présentent un grand risque pour la santé et l'environnement. Des effets cancérogènes ont été observés lors des essais effectués sur des animaux montrent que certaines molécules acétamide et thioacétamide sont probablement cancérogènes pour l'humain (Benedetti et Weber, 2003).

D'autre part, l'acétamide et le thioacétamide provoquent des hépatomes chez les rats après une ingestion prolongée. Le thioacétamide est plus actif à cet égard; il est également cancérogène. D'autres études montrent que le glycidamide; principal métabolite de l'acrylamide, peut être toxicologiquement plus important que le composé initial du fait des propriétés cancérogènes et génotoxiques dont il fait preuve chez l'animal. Le taux de transformation de l'acrylamide en glycidamide varie en fonction de la quantité d'acrylamide présente dans l'organisme, plus la dose est faible, plus le taux d'acrylamide métabolisé en glycidamide est important (rapport de la FAO, 2002).

#### 4. Matériel et méthodes

Dans cette partie, 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 d'un fongicide, le milraz et celles d'un herbicide le chevalier. Afin de déterminer les capacités métaboliques des souches sélectionnées, deux objectifs ont été formulés

1. Vérifier la tolérance des souches microbiennes sélectionnées en déterminant l'effet des deux pesticides sur leur croissance en milieu liquide
2. Déterminer les taux de biodégradation des deux matières actives de pesticides servant comme source unique de carbone par les souches étudiées

##### 4.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué d'espèces bactérienne et fongiques isolées des sols et des eaux contaminés ou non par les pesticides. Après isolement, purification et identification (détails présentés dans le chapitre III), les souches ont été entretenues sur milieu de culture gélosé et conservées à la température de +4°C.

##### 4.2. Les milieux de culture

Les milieux nutritifs utilisés pour la culture des souches fongiques sélectionnées pour le processus de dégradation sont :

###### Milieu solide (PDA)

- pomme de terre .....200g
  - Agar.....15g
  - Dextrose.....20g
  - Chloramphenicol.....0,05g
  - Eau distillée q.s.p.....1000 ml
- pH 5,6

###### Milieu Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA, Pitt, 1973)

- $K_2HPO_4$ .....1,0g
  - Czapek concentré.....10ml
  - Autolysat ou extrait de levure.....5g
  - Sucrose.....30g
  - Agar.....15g
  - Eau distillée q.s.p.....1000ml
- pH : 6,8

### Milieu à l'extrait de malt- agar (MEA, d'après Blakeslee, 1915)

- Extrait de malt.....20g
- Peptone.....1g
- Glucose.....20g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000ml

pH : 5,6

### Milieu liquide de Galzy et Slonimski (GS) 1957.

- Solution de sels minéraux.....100 ml
- Solution d'oligo éléments.....1 ml
- Solution de FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O à 200mg/l....1 ml
- Solution de vitamines.....5 ml
- Solution de mésoinositol à 4 mg/l.....5 ml
- Glucose.....5g
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml

pH 4,1

#### Solution des sels minéraux

- (NH<sub>4</sub>) H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....60g
- (NH<sub>4</sub>) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....20g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....10g
- NaCl.....1g
- CaCl<sub>2</sub>.....1g
- MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....5g
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml

#### Solution de vitamines

- Pantothénate de calcium.....0,4g
- Thiamine chlorhydrate.....0,4g
- Inositol.....0,4g
- Pyridoxyne.....0,4g
- Acide nicotinique.....0,1g
- Biotine.....0,004g
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml

#### Solution d'oligo-éléments

- H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>.....0,5g
- MnSO<sub>4</sub>.....0,4g
- ZnSO<sub>4</sub>.....0,4g
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.....0,2g
- KI.....0,1g
- CuSO<sub>4</sub>.....0,04g
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml

### **4.3. 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 maraîchères et céréalières au niveau des régions du Nord-est algérien. Il s'agit d'un fongicide et d'un herbicide commercialisés en Algérie respectivement sous les noms de Milraz et de Chevalier.

#### **4.3.1. Milraz**

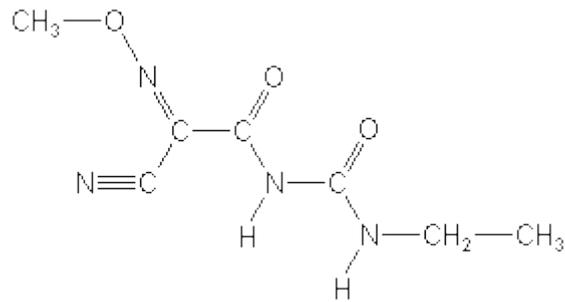
Le Milraz est un fongicide particulièrement approprié pour lutter contre les champignons de moisissure, etc. La combinaison de propinèbe et cymoxanil en tant que ingrédients actifs donne un excellent effet préventif et curatif.

- **Cymoxanil**

Le cymoxanil est une substance active appartenant à la famille de Acétamides et qui présente un effet fongicide contre les moisissures saprophytes et pathogènes. Sur une saison et sur la même parcelle, le nombre d'application du cymoxanil est de 2 et de 6 applications lorsqu'il est utilisé en association avec d'autres substances actives.

Il a un effet préventif en réduisant la production des conidies et en inhibant la croissance des tubes germinatifs des conidies et un effet curatif en stoppant la croissance du mycélium en cours d'incubation jusqu'à 48 h après la contamination. Sa persistance d'action n'est que de 7 à 10 jours. Concernés par la résistance, ce produit est utilisé en alternance avec d'autres matières active ; Le cymoxanil, toujours utilisé avec des fongicides multisites montre une efficacité renforcée grâce à un effet de synergie (Reynier, .(2011

Pour ce qui est de sa toxicité, il est dangereux pour l'environnement. Il est nocif par inhalation, irritant pour les voies respiratoires. Il provoque des effets cancérogènes suspects. Il est également très toxique pour les organismes aquatiques et peut entraîner des effets néfastes à long terme.



**Figure 4-6.** Structure chimique du cymoxanil

**Formule brute :**  $C_7 H_{10} N_4 O_3$

**IUPAC:** 1-[(E/Z)-2-Cyano-2-methoxyiminoacetyl]-3-ethyluree

**CA :** 2-cyano-N-[(ethylamino)carbonyl]-2-(methoxyimino)acetamide

**Pression de vapeur :** 0.15 mPa à 20 °C

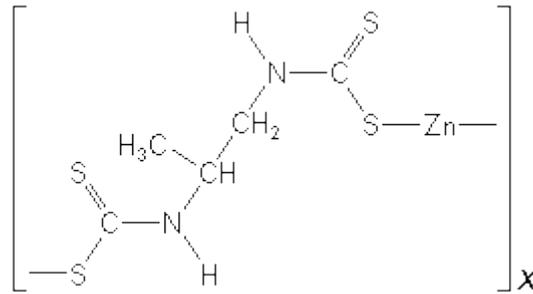
**Constante de Henry :**  $3.8 \cdot 10^{-5}$  Pa m<sup>3</sup>/mole

**DT 50 :** 110 jours à pH 5 et 0,5 jours à pH 7

- **Propinèbe**

Le propinèbe est une substance active appartenant à la famille des Dithiocarbamates qui présente un effet fongicide contre diverses maladies de cultures maraichères, cultures fruitières et viticultures. Le propinèbe est un nouveau type de fongicide de protection à haute efficacité, avec une teneur en zinc élevée de 15,8%. Il peut compléter le zinc des feuilles des plantes et améliorer la couleur ainsi que la qualité des fruits et légumes. De plus, il a une action de longue durée et n'entraîne pas des résistances de cultures. Les traitements à base de propinèbe se font généralement à partir de la croissance végétative jusqu'à la floraison. C'est un composé qui ne peut pas être mélangé avec des pesticides alcalins ; pour une application respective, l'intervalle de temps de plus de 7 jours est recommandé. Le délai d'attente avant la récolte est de 7 à 14 jours.

C'est un produit nocif, il peut entraîner des effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par inhalation, par ingestion et par contact avec la peau. Il est également très toxique pour les organismes aquatiques. Il est sans effets sur les plantes



**Figure 4-7.** Structure chimique du propinèbe

**Formule brute:**  $(C_5 H_8 N_2 S_4 Zn)_x$

**IUPAC:** Polymeric zinc 1, 2-propylenebis (dithiocarbamate)

**CA:** [[2-[(dithiocarboxy) amino]-1-methylethyl]carbomodithioato(2-)-kS,KS']zinc

**Pression de vapeur :** **0.16 mPa** à 20 °C et **0.31 mPa** à 25 °C

**Constante de Henry :** **8 e-8 Pam<sup>3</sup>/mole** à 20°C

#### 4.3.2. Chevalier

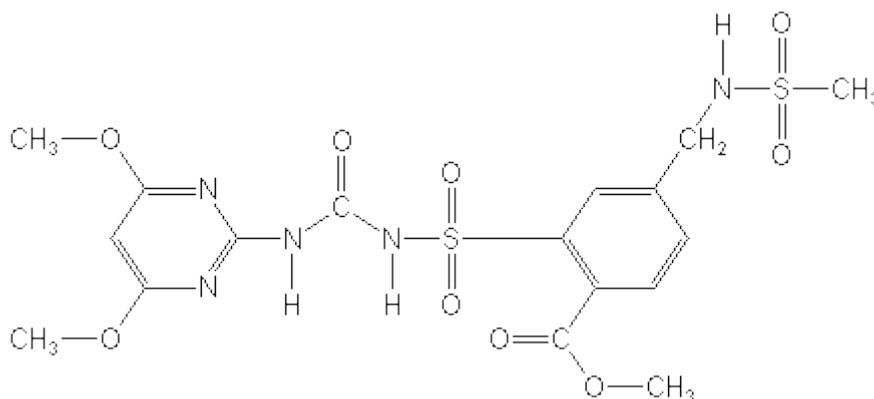
Le Chevalier est un herbicide à spectre complet et sélectif issu de la recherche de Bayer Crop Science. Grâce à la combinaison de deux substances actives et d'un phytoprotecteur. Sa matière active est composée de mésosulfuron-méthyl, d'iodosulfuron-méthyl-sodium et d'un phytoprotecteur, le méfenpyr-diéthyl.

C'est un herbicide de post levée actif sur les graminées et les dicotylédones adventices des blés tendres d'hiver et de printemps, des blés durs d'hiver et de printemps ainsi que du seigle et du triticale. Il est actif aussi sur d'autres espèces. Les meilleurs résultats sont obtenus à partir de 5°C avec une hygrométrie supérieure à 60%. L'efficacité et la rapidité d'action sont favorisées par des applications sur des adventices jeunes de graminées et de dicotylédones. Le chevalier s'utilise principalement en traitement sortie hiver /printemps sur blé tendre et blé dur d'hiver et de printemps ainsi que sur le seigle et les triticales, dès la reprise de la végétation, notamment au stade 3 feuilles à 2 nœuds de la culture. Le chevalier peut être appliqué seul ou en mélange avec de l'huile

- **Mesosulfuron-méthyl**

Le mésosulfuron-méthyl est un herbicide de la famille des sulfonilurées qui a une excellente efficacité sur graminées et dicotylédones, et également une substance dérivée de mésosulfuron. Il s'utilise au stade 3 feuilles à la fin du stade tallage des céréales. Il est

absorbé dans les 2 à 4 heures qui suivent l'application et donc, il n'y a pas de risque de lessivage au-delà. Il est appliqué sur les adventices dicotylédones et sur les graminées annuelles à la dose de 0,3 kg/ha. Le mésosulfuron est absorbé par voie foliaire et véhiculé par systémie ascendante et descendante dans l'adventice. Il bloque la synthèse des acides aminés responsables de la division cellulaire dans les méristèmes des plantes en inhibant l'acétolactase synthétase.



**Figure 4-8.** Structure chimique du mésosulfuron-méthyl

**Formule brute:** C<sub>17</sub> H<sub>21</sub> N<sub>5</sub> O<sub>9</sub> S<sub>2</sub>

**CA:** methyl 2-[[[(4, 6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]amino]-sulfonyl]-4 [[(methylsulfonyl) amino] methyl]benzoate

**IUPAC:** methyl 2-[(4, 6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbonyl) sulfamoyl]-alpha (methanesulfonamido)-p-toluate

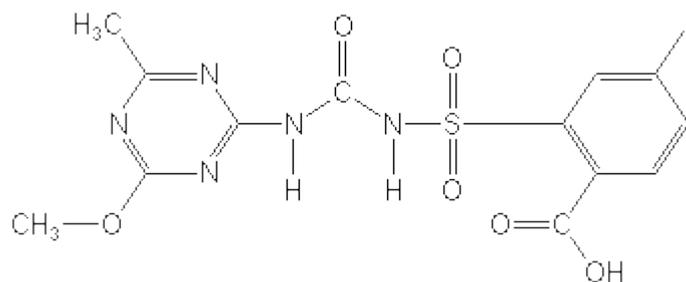
**Pression de vapeur :** 0.011 nPa à 25 °C

**Constante de Henry :** 3.65 e-12 Pam<sup>3</sup>/mole à 20°C

- **Iodosulfuron-méthyl**

L'iodosulfuron est un herbicide sulfonyleurée qui a une excellente efficacité sur graminées et dicotylédones, et également une substance dérivée de l'iodosulfuron. Lorsque cette substance est utilisée comme un ester ou un sel, son identité doit être indiquée, par exemple iodosulfuron-méthyl, l'iodosulfuron-méthyl-sodium. Comme le mésosulfuron, il est utilisé au stade tallage. Il bloque la synthèse des acides aminés responsables de la division cellulaire dans les méristèmes des plantes en inhibant l'acétolactase synthétase. La molécule est également absorbée par les feuilles puis véhiculée vers les autres organes.

C'est un produit très toxique pour l'environnement et la santé humaine. Il est assez persistant dans le sol, Sur l'homme, il peut provoquer des intoxications graves en cas d'ingestion et de pénétration dans les voies respiratoires. Des allergies cutanées et des lésions oculaires ont été également signalées. Il peut entraîner des effets néfastes à long terme sur les organismes aquatiques.



**Figure 4-9.** Structure chimique de l'iodosulfuron méthyl

**Formule brute:** C<sub>14</sub> H<sub>13</sub> I N<sub>5</sub> Na O<sub>6</sub> S

**IUPAC :** sodium ({[5-iodo-2-(methoxycarbonyl)phenyl]sulfonyl} carbamoyl)(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)azanide

**CA:** sodium salt of methyl 4-iodo-2-[[[(4-methoxy-6-methyl-1, 3, 5-triazin-2 yl)amino] carbonyl]amino]sulfonyl] benzoate

**Pression de vapeur :** 2.6 e-9 Pa à 20 °C, 6.7 e-9 Pa à 25 °C, 1.6 e-8 Pa à 30 °C

**Constante de Henry :** 2.29 e-11 Pam<sup>3</sup>/mole à 20°C

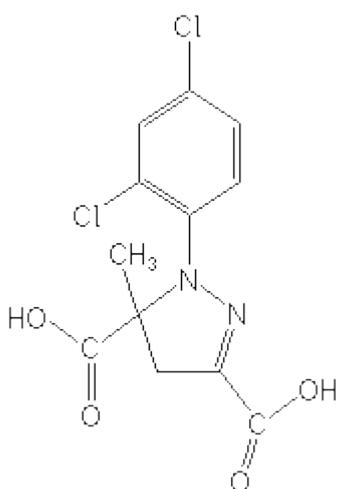
- **Méfenpyr-diéthyl**

Le méfenpyr-diéthyl est un phytoprotecteurs d'herbicides entrant dans la composition d'herbicides céréales ayant une action anti-graminées des sociétés respectives Syngenta et Aventis-Bayer Corp Science. Il assure une haute sélectivité sur Blé. Il agit comme un catalyseur, son action se traduit par les effets suivants :

La molécule de méfenpyr-diéthyl ne montre cette action que sur le maïs et en aucun cas sur les adventices et n'empêche donc pas la destruction des mauvaises herbes.

Les phytoprotecteurs sont préconisés en utilisation avec de l'huile. L'effet protecteur de ces produits est généralement spécifique à un herbicide et à une culture. Cependant, le méfenpyr-diéthylest utilisé avec plusieurs molécules herbicides des céréales.

Le mode d'action de ces phytoprotecteurs n'est pas connu avec certitude. Des hypothèses sont émises. Un phytoprotecteur pourrait réguler la quantité d'herbicide arrivant sur le site d'action au niveau cellulaire dans la plante cultivée. Il aurait aussi pour effet d'entrer en compétition avec l'herbicide sur son site d'action. Il apparaît en effet que les structures chimiques des phytoprotecteurs sont très proches de celles des herbicides associés. Selon (Gasquet et *al.*, 2008) dans une culture, l'herbicide sollicite l'action d'enzymes spécifiques pour sa dégradation en molécule inoffensive. Le phytoprotecteur produira les mêmes effets mais, en fait, il ne fera qu'activer la synthèse de certaines enzymes pour assurer la métabolisation de l'herbicide.



**Figure 4-10.** Structure chimique du Mefenpyr-diethyl

**Formule brute :** C<sub>16</sub> H<sub>18</sub> Cl<sub>2</sub> N<sub>2</sub> O<sub>4</sub>

**IUPAC :** diethyl 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-methyl-2-pyrazoline-3,5-dicarboxylate

**CA :** 1-(2,4-dichlorophenyl)-4,5-dihydro-5-methyl-1H-pyrazole-3,5-dicarboxylate acid, diethyl ester

**Pression de vapeur :** 6.3 µPa à 20 °C, 14 µPa à 25 °C, 0.57 mPa à 50 °C

**Constante de Henry :** 1.18 e-4 Pa\*m<sup>3</sup>/mole à 20°C, 2.61 e-4 Pa\*m<sup>3</sup>/mole à 25°C

#### 4.4. Préparation des précultures

A partir des souches de référence, sont prélevés quelques fragments mycéliens, spores, hyphes etc... Cet inoculum est ensemencé sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture czapeck ou à base de pomme de terre et dextrose additionné d'agar-agar (PDA). Les boîtes

ensemencées sont ensuite mises en incubation pendant une période de cinq à huit jours à la température de 37°C.

#### **4.5. Etude des capacités cataboliques des espèces microbienne isolées**

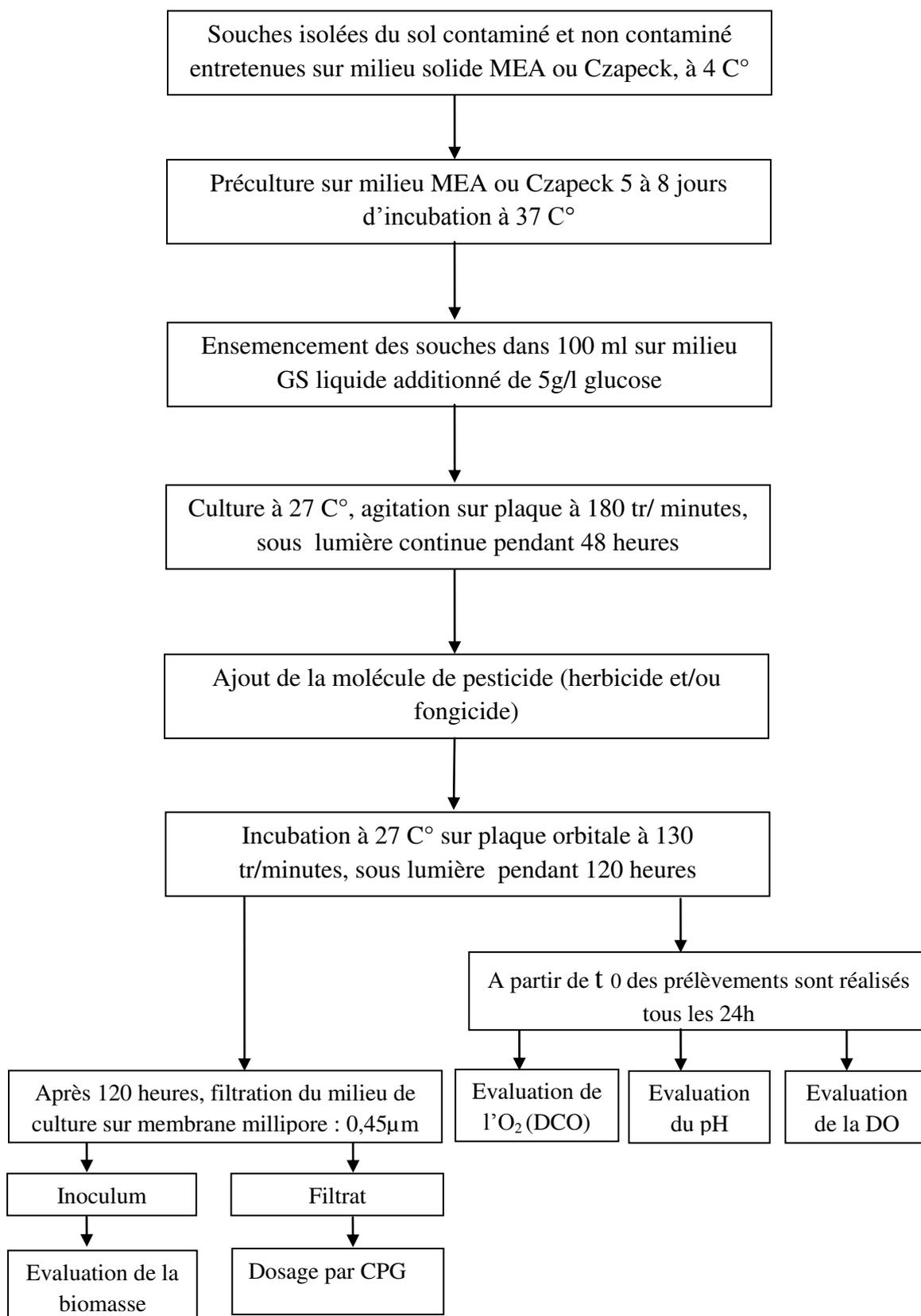
##### **4.5.1. Cultures**

Les 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 1200 Lux (12H/24H) et en condition agitée (sur plaque orbitale à une vitesse de rotation de 180 tr/mn) pendant deux jours.

Les molécules de fongicides ou herbicides 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 4-11.** Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradabilité des molécules de pesticides

#### **4.5.2. Evaluation de la croissance des souches bactériennes sous l'effet des pesticides (Tolérance de la souche vis-à-vis du pesticide)**

Dans cette partie, cinq souches bactériennes ont été testées séparément. Une population mixte constituée par l'ensemble des cinq souches bactériennes appelée consortium bactérien a été également étudié. À partir de  $t_0$  puis à tous les 24 heures, des prélèvements sont réalisés à partir des fioles des cultures batch figure (4-11) afin de suivre la croissance bactérienne en calculant les paramètres suivants :

##### **4.5.2.1. 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.

##### **4.5.2.2. Détermination de la de croissance par Turbidimétrie**

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 tous les 24 heures ou 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.

##### **4.5.2.3. Détermination du taux 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 (1978) 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 CO<sub>2</sub> 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.

#### **4.5.2.4. Calcul de la biomasse totale (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 :

$$Ps = (M - M_0)$$

M : poids de la membrane après séchage

M<sub>0</sub> : poids de la membrane vide

### **4.6. Evaluation des taux de biodégradation des pesticides par chromatographie en phase gazeuse**

L'évaluation de la disparition du produit (herbicide) 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 (t<sub>0</sub>) c.a.d au moment de l'ajout du pesticide, et après 120h.

Ces prélèvements sont filtrés sur membrane Millipore (0,45µm) et injectés directement sans extraction (trois injections pour chaque échantillon).

#### **4.6.1. Conditions chromatographiques**

Colonne OV-1701, L = 30 m, D = 0,32 mm, Ep = 0,25 µm, N<sub>2</sub> = 2 ml/min- Détecteur Abs à 300 °C, débit N<sub>2</sub>, 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.

#### 4.6.2. 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. Il s'agit d'un étalonnage externe dans lequel la concentration en produit testé est une fonction de la surface du pic obtenu. L'équation utilisée est la suivante :

$$Y = ax + b$$

a : constante

Y : concentration recherchée.

x : surface du pic.

### 5. Résultats et discussion

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

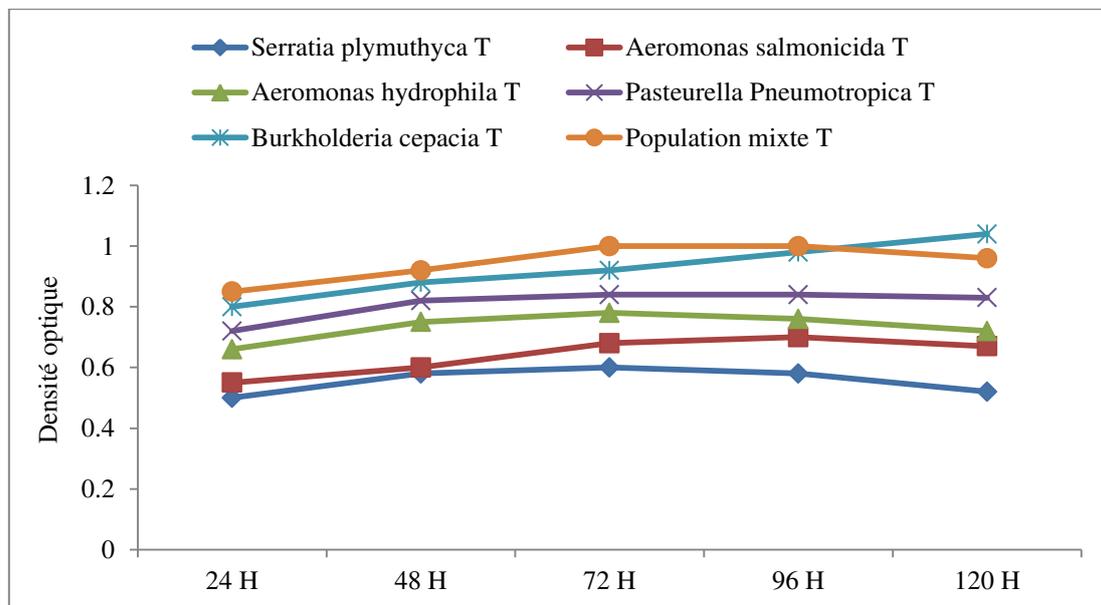
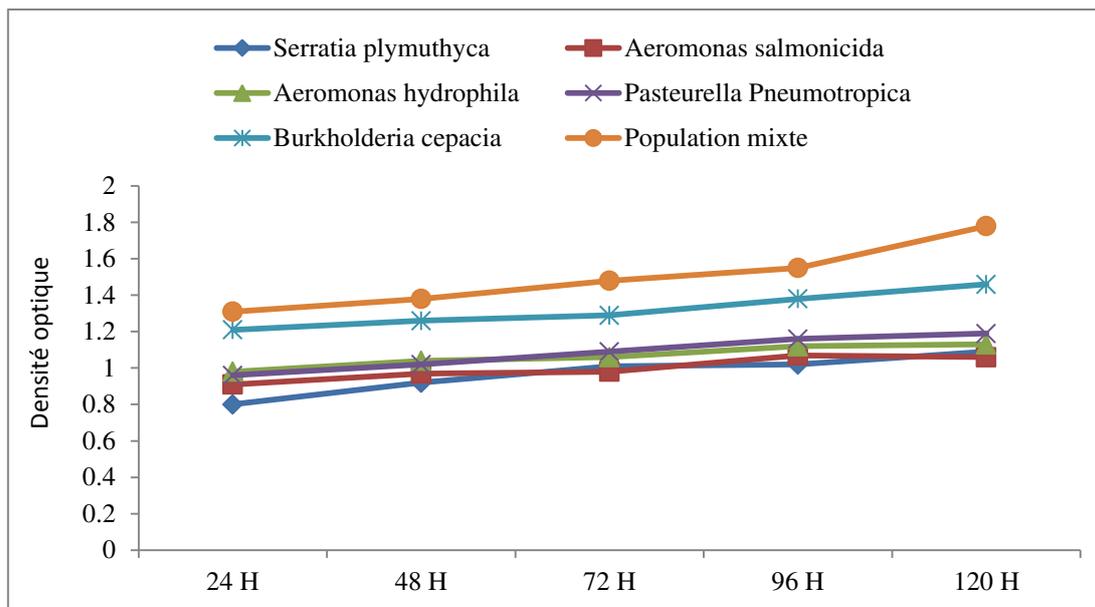
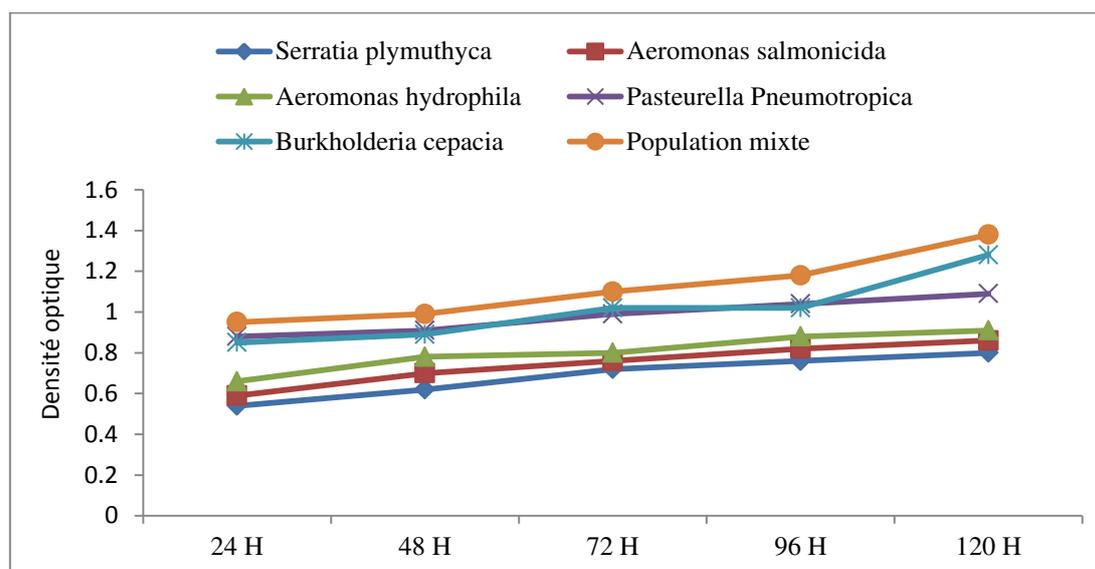


Figure 4-12. Turbidité (Do) des échantillons des cultures en absence du pesticide



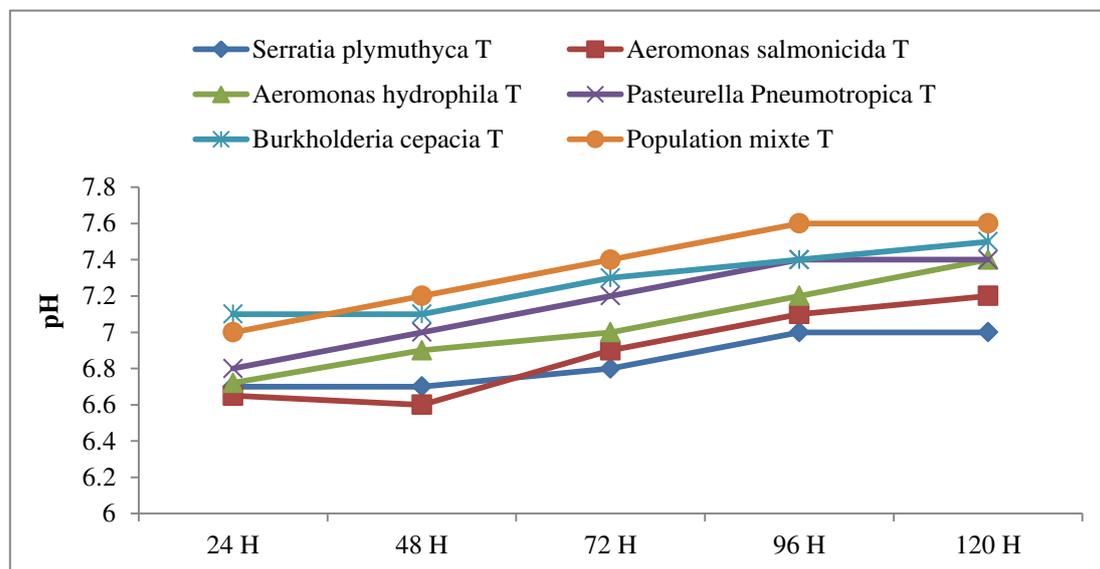
**Figure 4-13.** Turbidité (Do) des échantillons de cultures en présence du Milraz



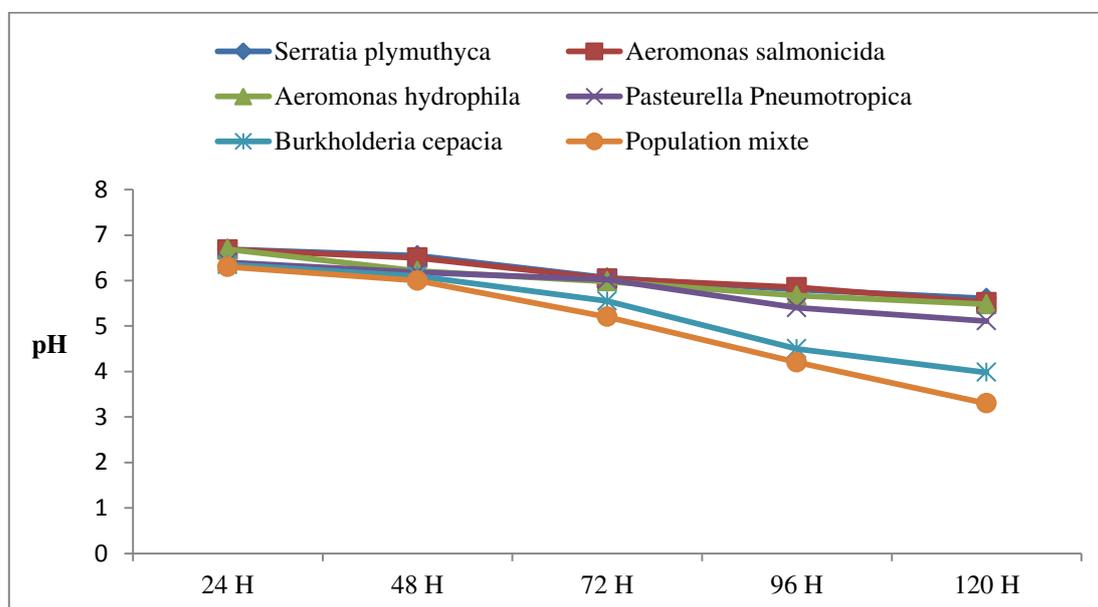
**Figure 4-14.** Turbidité (Do) des échantillons de cultures en présence du chevalier

Aussi bien pour le milraz que pour le chevalier, la densité optique la plus élevée est enregistrée avec la population mixte ; cette élévation de la D.O témoigne d'une bonne croissance sous les différentes conditions testées. *Burkholderia cepacia* arrive également à croître normalement dans le milieu ; une variation régulière dans le temps avec des densités optique croissante. La croissance arrive à son maximum au bout de 120 h. La cinétique de la courbe de croissance de *Pasteurella* traduit également une bonne croissance avec des densités

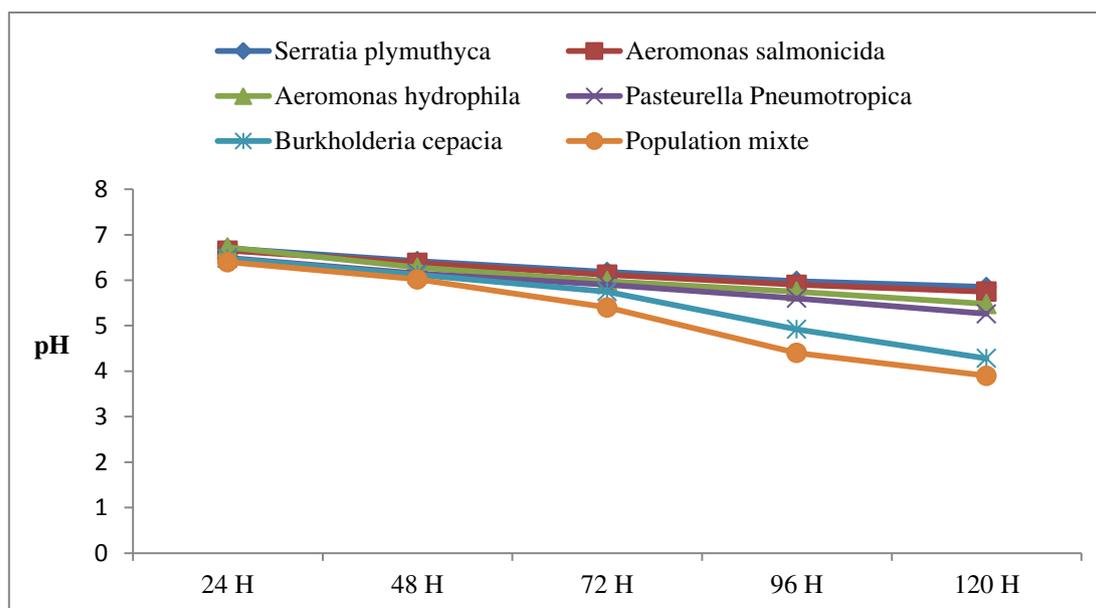
optiques se rapprochant de celles de *Burkholderia*. Les autres souches bactériennes affichent des courbes de croissance à allures très similaires avec des densités optiques moins importantes.



**Figure 4-15.** pH des cultures en présence des souches bactériennes et en absence du pesticide

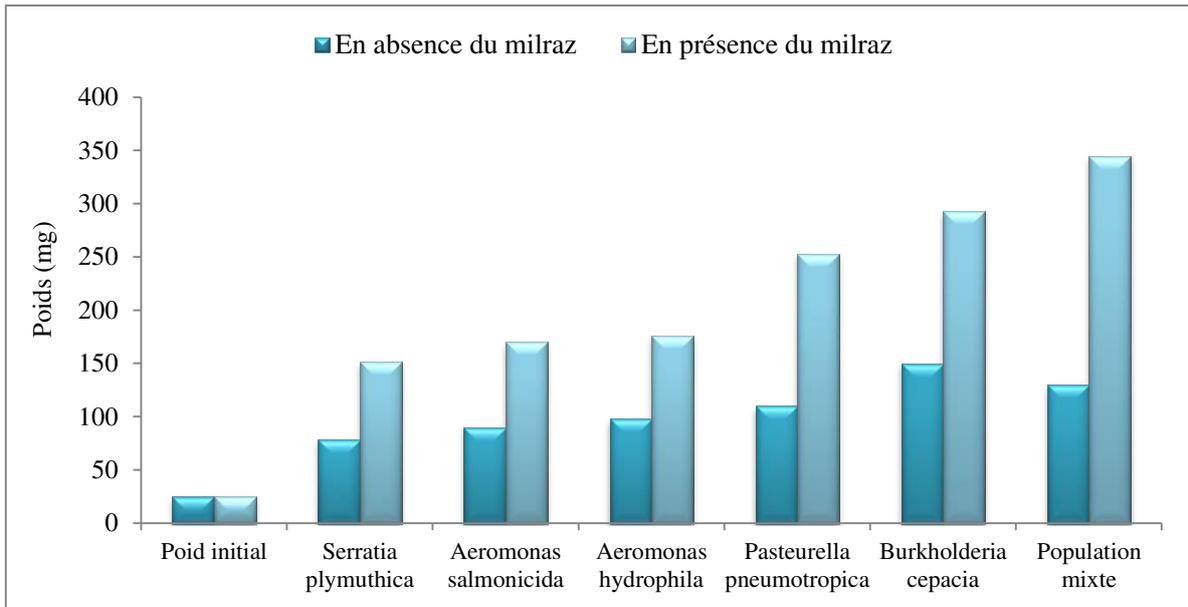


**Figure 4-16.** pH des culture en présence des souches bactériennes et du Milraz

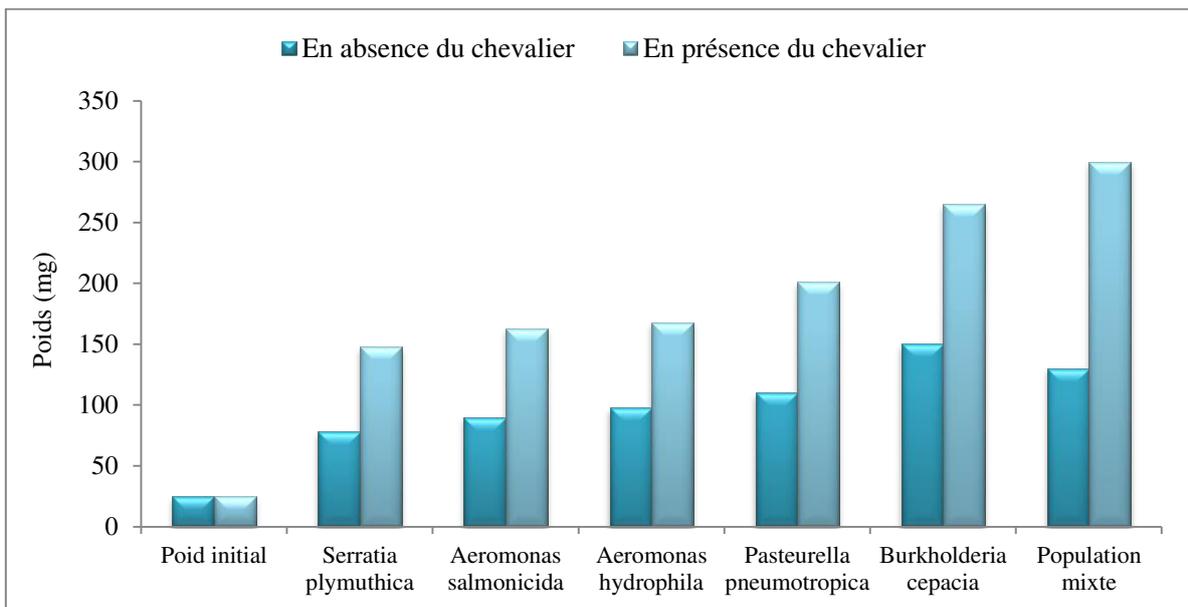


**Figure 4-17.** pH des culture en présence des souches bactériennes et du Chevalier

Les résultats présentés dans les figures (4-16 et 4-17) 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. Après 120 H et en présence de la population mixte, un pH de 3,3 est obtenu au niveau du milieu inoculé avec le milraz et 3,9 est enregistré dans celui contenant le chevalier. Une baisse légère à partir de 48h est enregistrée également avec les 5 autres bactéries. Après 120H, l'écart de pH entre *Burkholderia* et les autres souches ainsi que la population mixte et les autres souches devient non négligeable.



**Figure 4-18.** Poids sec de la biomasse total de l'inoculum



**Figure 4-19.** Poids sec de la biomasse total de l'inoculum

Les figures (4-18 et 4-19) 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. La biomasse bactérienne la plus élevée (345 mg) est celle de la population mixte aussi bien avec le milraz qu'avec le chevalier suivi de celle de *Burkholderia cepacia* (293 mg). Quant au poids de l'inoculum le plus faible (152 mg pour le milraz et 148 mg pour le chevalier) est celui de *Serratia plymuthica* précédé par ceux d'*Aeromonas hydrophila* (176 mg et 168 mg) et de *Pasteurella pneumotropica* (253 mg et 201 mg).

**Tableau 4-1.** Evaluation de la DCO en absence du pesticide

| La DCO (mg / l d'O <sub>2</sub> ) |                            |                              |                             |                                  |                            |                  |
|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|
| Temps                             | <i>Serratia plymuthica</i> | <i>Aeromonas salmonicida</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Pasteurella pneumotropica</i> | <i>Pseudomonas cepacia</i> | Population mixte |
| <b>T0</b>                         | 0,107                      | 0,109                        | 0,110                       | 0,110                            | 0,118                      | 0,120            |
| <b>120H</b>                       | 0,99                       | 0,99                         | 0,097                       | 0,096                            | 0,090                      | 0,099            |

**Tableau 4-2.** Evaluation de la DCO en présence du milraz

| La DCO (mg / l d'O <sub>2</sub> ) |                            |                              |                             |                                  |                             |                  |
|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------|
| Temps                             | <i>Serratia plymuthica</i> | <i>Aeromonas salmonicida</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Pasteurella pneumotropica</i> | <i>Burkholderia cepacia</i> | Population mixte |
| <b>T0</b>                         | 0,109                      | 0,106                        | 0,108                       | 0,116                            | 0,120                       | 0,120            |
| <b>120H</b>                       | 0,099                      | 0,099                        | 0,080                       | 0,082                            | 0,079                       | 0,088            |

**Tableau 4-3.** Evaluation de l'oxydabilité en présence du chevalier

| La DCO (mg / l d'O <sub>2</sub> ) |                            |                              |                             |                                  |                             |                  |
|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------|
| Temps                             | <i>Serratia plymuthica</i> | <i>Aeromonas salmonicida</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Pasteurella pneumotropica</i> | <i>Burkholderia cepacia</i> | Population mixte |
| <b>T0</b>                         | 0,106                      | 0,104                        | 0,102                       | 0,113                            | 0,117                       | 0,119            |
| <b>120H</b>                       | 0,101                      | 0,099                        | 0,087                       | 0,083                            | 0,081                       | 0,096            |

La DCO est la teneur en oxygène calculée, elle 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 subis de dégradation est faible. 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 milraz ou de chevalier et inoculés avec la souche *Burkholderia cepacia* est inférieure à celle des autres souches. Une diminution progressive des concentrations en fonction du temps dont le taux le plus bas est atteint à 120 h. Les concentrations d'oxygène détecté après 120 h convertis en pourcentage nous indique 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.

La plupart des pesticides sont généralement biotoxiques et inhibent la croissance des microorganismes, car ils s'accumulent dans les cellules et affectent leur membrane cellulaire (Inoue et Horikoshi, 1989-1991b; Sikkema *et al.* , 1992-1995).

Les analyses de ces paramètres font ressortir qu'il y a un bon développement de toutes les souches testées avec une biomasse qui augmente d'une manière assez importante et ce, en présence des deux molécules de pesticides étudiées. Cette augmentation est plus accentuée pour *Burkholderia* et *Pasteurella*. Cette augmentation du poids de l'inoculum peut s'expliquer par le fait que les espèces bactériennes en question possèdent une bonne tolérance vis-à-vis des molécules de pesticides et elles peuvent s'adapter aux conditions difficiles des milieux pollués.

Des pH modifiés sont observés dans tous les cas. 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 *Burkholderia* et la population mixte. L'acidification du milieu peut être engendrée par le processus de la biodégradation, suite aux différentes réactions des biotransformation et / ou biodégradation. Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus par (Gillian *et al.*, 2001). Selon (Kétif, 2008) qui signale un changement des pH du milieu durant le processus de biodégradation des herbicides par *Aspergillus niger* et *Aspergillus clavatus*.

Il est à noter qu'il existe une parfaite corrélation entre l'augmentation du poids sec et la baisse du pH. Les pH acides favorisent la croissance des nombreux microorganismes. Le pH reste un

paramètre important pour le développement et le maintien de la biomasse microbienne du milieu.

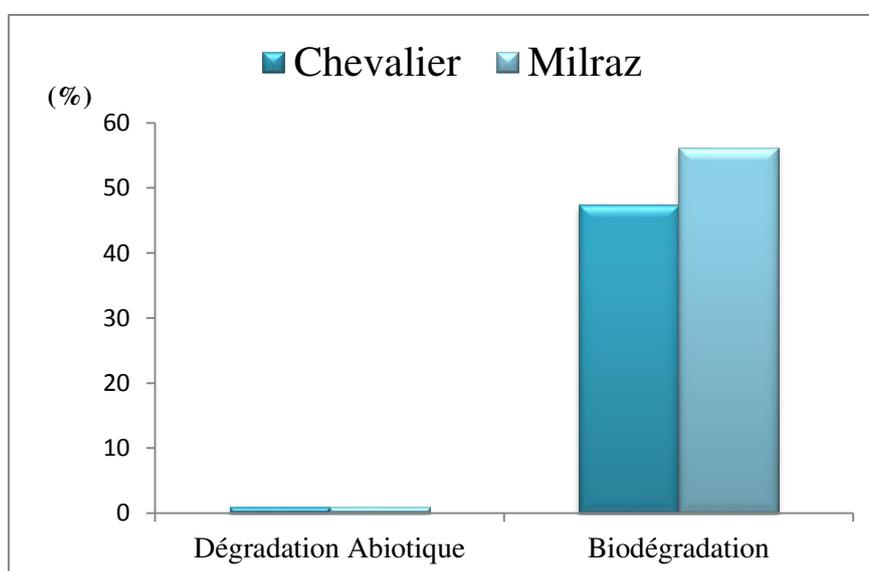
Si l'on se réfère aux résultats des taux d'oxygène nécessaires à la dégradation des composés organiques du milieu (DCO), ce paramètre indique que la population mixte n'est pas tolérante aux molécules de pesticides testées et n'est pas douée d'un fort pouvoir de biodégradation, contrairement à ce qui avait été remarqué pour les autres paramètres. Les valeurs d'O<sub>2</sub> déterminés à partir des milieux ensemencés par la population mixte sont relativement plus importantes. Ces chiffres indiquent qu'il reste des quantités importantes de matières organiques non dégradés dans le milieu après les 120 h d'incubation dues au fait que la consortium bactérien n'est 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. L'une des explications à ce type de comportement de la part de la population mixte pourrait s'expliquer par l'hypothèse de co-métabolisme avancée par (Soula, 1985) qui démontre que certains microorganismes, en effet, 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. Ce mécanisme est lent et nécessite la présence d'un co-substrat pour être achevé. Ces types de microorganismes sont pourvus d'équipements enzymatiques incomplets et par conséquent, ne peuvent pas mener à terme le processus de biodégradation (Kilbane *et al.*, 1982 ; Chatterjee *et al.*, 1982).

Les quatre paramètres analysés (Do, pH, biomasse et DCO) indiquent que l'espèce *Burkholderia cepacia* semble posséder des potentialités cataboliques intéressantes dues probablement à un équipement enzymatique riche qui pourrait être activé par la présence du pesticide.

Les potentialités métaboliques du consortium bactérien 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 pendant que de nombreux travaux ont montré que la plus part des molécules toxiques sont mieux oxydées et parfois minéralisées complètement lorsqu'elles sont mises en contact avec un consortium de souches. Selon (Melgarejo et Martínez 1992 ; Gillian *et al.*, 2001), 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

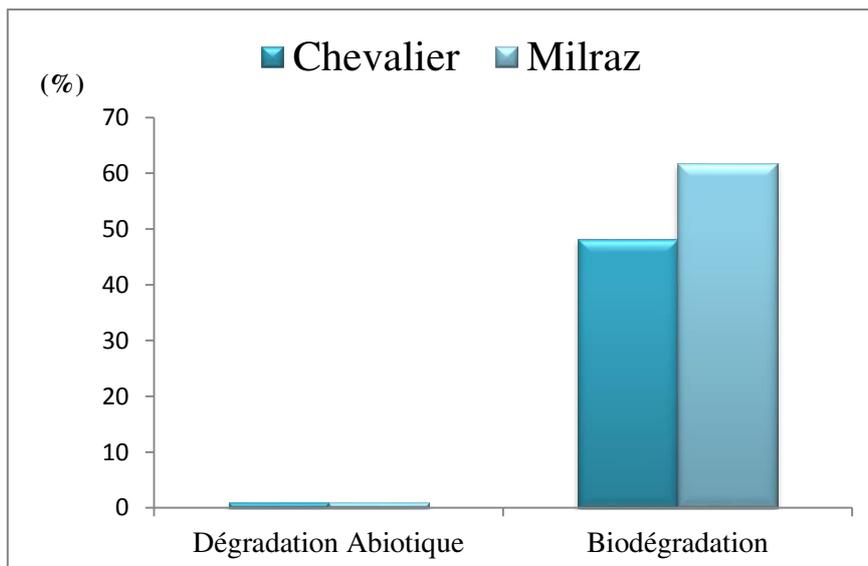
moins toxique que le produit initial. Une des explications à ce comportement du consortium utilisé dans notre travail pourrait être celles de la température utilisées pour l'incubation et la croissance des bactéries. L'élévation de la température influe sur la biodégradation (Taylor, 1995 ; Rouchaud et *al.*, 1997 ; Gawronski, 1987). Dans notre expérimentation, les souches ont été soumises à une température de 27 C°. Cependant, selon certains auteurs, les meilleurs résultats sur les populations mixtes ont été obtenus à la suite des expériences conduites à une température de 37 C°, température optimale de développement des micromycètes bien qu'elles ne reflètent pas les conditions réelles des écosystèmes naturels.

## 5.2. Evaluation des taux de biodégradation des pesticides par CPG



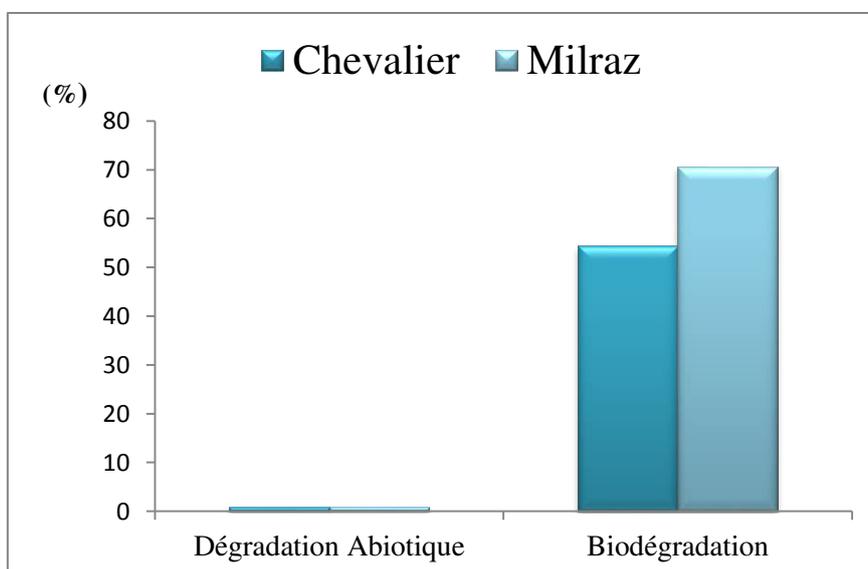
**Figure 4-20.** Pourcentage de biodégradation du chevalier et milraz par *Aeromonas hydrophila*

La figure (4-20) montre les taux de la biodégradation des molécules de pesticides par *Aeromonas hydrophila*. Ces taux de dégradation varient entre 47,4% pour l'herbicide chevalier et 56,2 % pour le fongicide milraz.



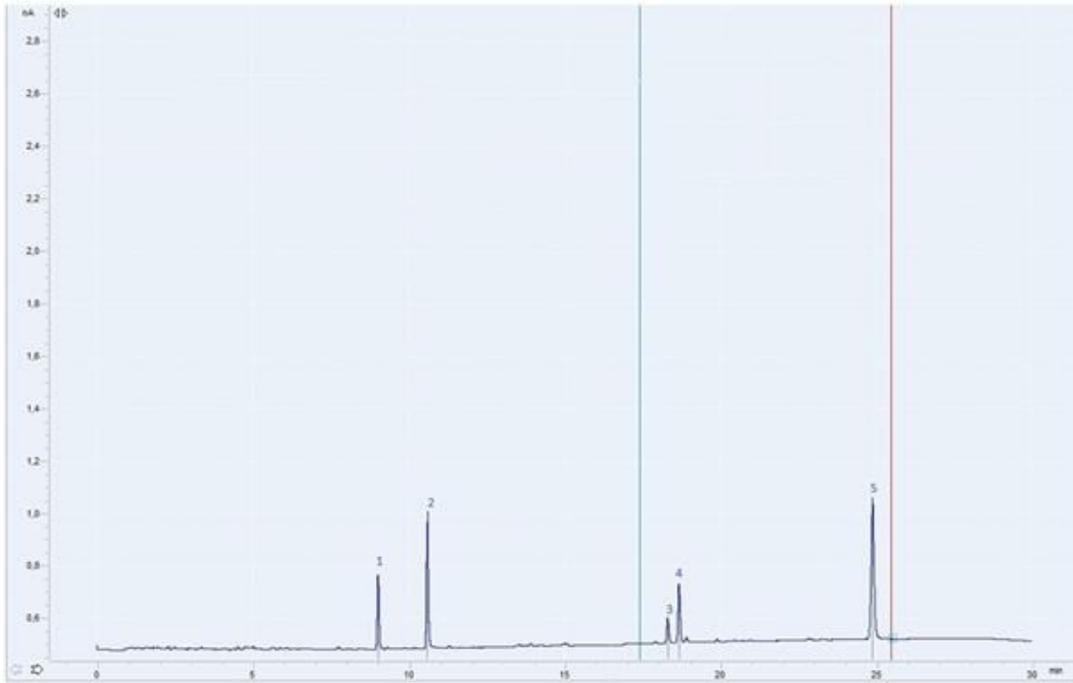
**Figure 4-21.** Pourcentage de biodégradation du chevalier et milraz par *Pasteurella pneumotropica*

Les taux de biodégradation des deux molécules de pesticides milraz et chevalier par *Pasteurella pneumotropica* présentés dans la figure ci-dessus montre des taux oscillant entre 48,3 % pour l’herbicide chevalier et 61,8 % pour le fongicide

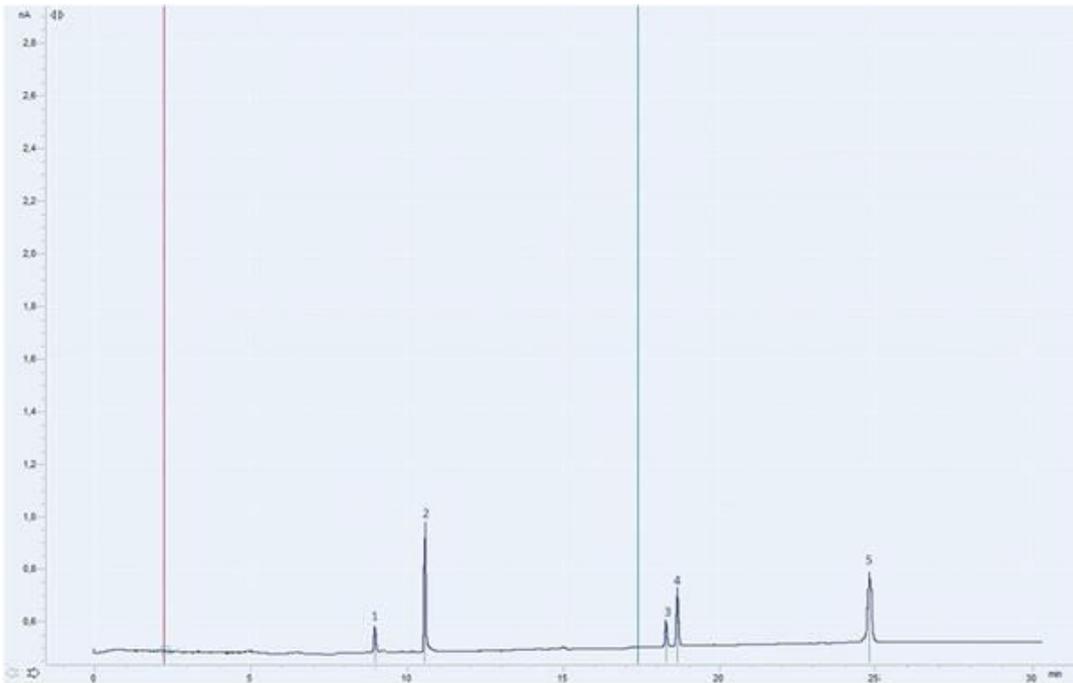


**Figure 4-22.** Pourcentage de biodégradation du chevalier et du milraz par *Burkholderia cepacia*

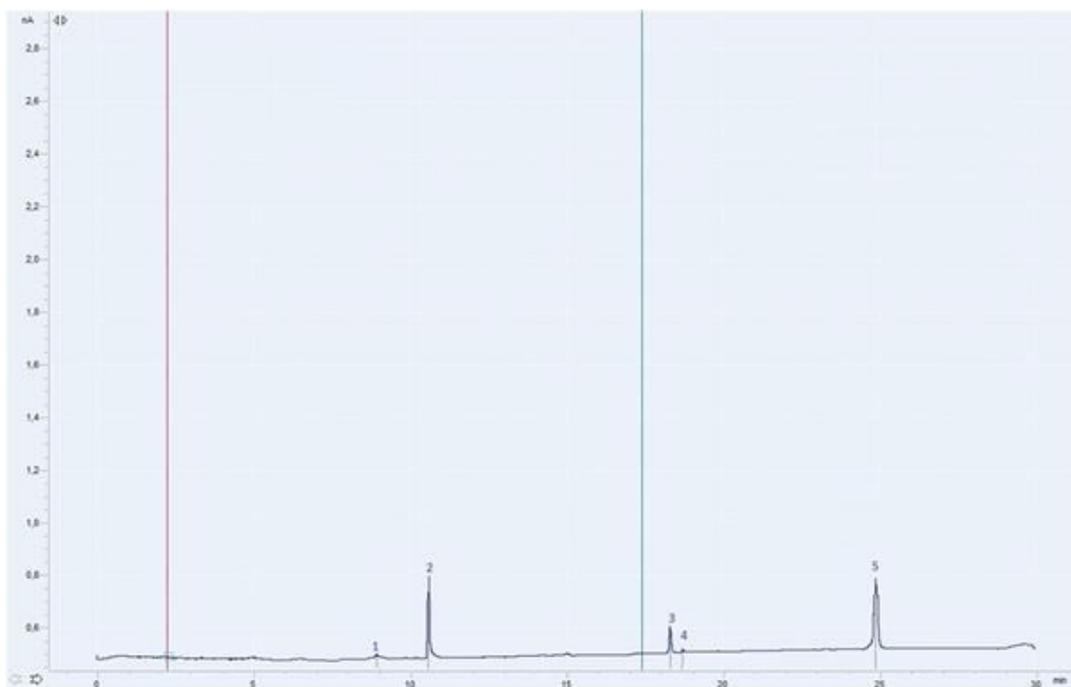
Les pourcentages de la biodégradation du milraz et du chevalier par *Burkholderia cepacia* sont indiqués par la figure (4-22). Le taux de biodégradation de l’herbicide est de 54,4%, celui du fongicide est par contre plus élevé avec 70,7%.



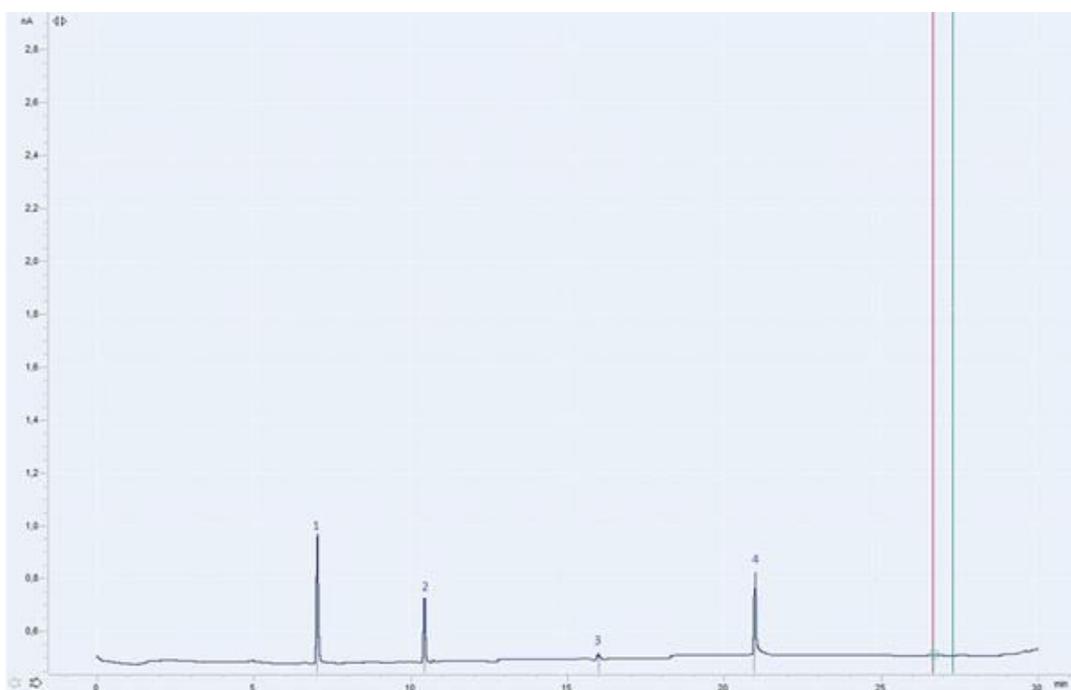
**Figure 4-23.** Chromatogramme des taux de biodégradation du chevalier par *Aeromonas hydrophila*



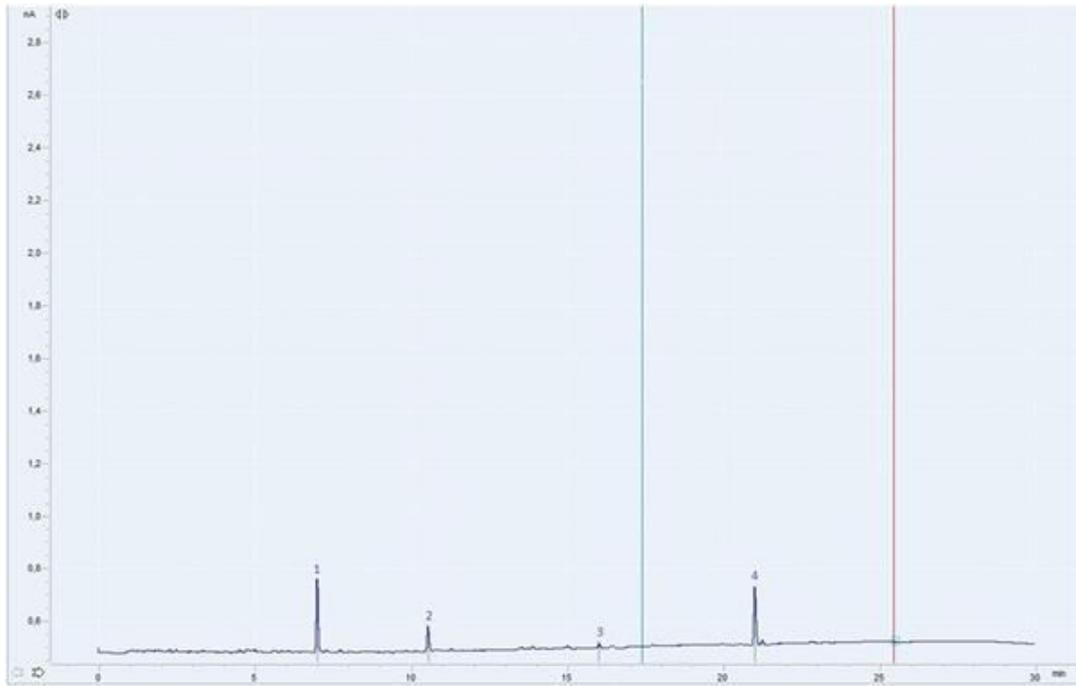
**Figure 4-24.** Chromatogramme des taux de biodégradation du chevalier par *Pasteurella pneumotropica*



**Figure 4-25.** Chromatogramme des taux de biodégradation du chevalier par *Burkholderia cepacia*



**Figure 4-26.** Chromatogramme des taux de biodégradation du milraz par *Aeromonas hydrophila*



**Figure 4-27.** Chromatogramme des taux de biodégradation du milraz par *Pasteurella pneumotropica*



**Figure 4-28.** Chromatogramme des taux de biodégradation du milraz par *Burkholderia cepacia*

Le milraz semblent être le composés le moins résistant, il est plus facilement dégradé par les trois espèces bactérienne (*Burkholderia cepacia*, *Pasteurella pneumotropica* et *Aeromonas hydrophila*). Les deux molécules de pesticides Milraz et chevalier bien qu'elles aient des structures chimiques différentes et appartenant à deux familles bien distinctes sont métabolisées par l'inoculum de chacune des trois souches isolément de façon à peu près analogue. Tout de même, le parallélisme n'est pas aussi parfait, il y a une correspondance bonne ou moyenne entre les aptitudes des trois souches à dégrader les deux composés. De plus, il existe une différence significative entre les taux de biodégradation du milraz obtenu avec *Burkholderia cepacia* et ceux du consortium bactérien constitué par la population mixte. *Burkholderia* semble avoir une affinité plus accrue pour le fongicide et l'utilise comme source unique de carbone et d'énergie en le transformant à un pourcentage plus élevé que ses homologues *Pasteurella* et *Aeromonas*.

Le cymoxanil est un fongicide non systémique de pré et post-levée agissant sur la formation de parois cellulaires. Il est composé de deux substances actives, le cymoxanil et propinèbe largement utilisé dans le traitement de plusieurs variétés de cultures. Ce composé est absorbé par les racines et agit par inhibition sur la photosynthèse des monocotylédones et dicotylédones. Son efficacité est liée au métabolisme du microorganisme. Il a une DT 50 de plusieurs mois à PH acide. La métabolisation du propinèbe du milraz engendre l'oxydation du soufre en sulfoxyde, qui est alors oxydé en une sulfone, ou hydroxylation de composés qui entrent dans le métabolisme du carbone (Zhang et al., 1996).

La biotransformation de ce fongicide par la microflore n'a pas fait l'objet de nombreuses recherches. Cependant, des travaux réalisés sous des conditions contrôlées aérobies montrent que le cymoxanil est rapidement dégradé dans le sol avec une bonne minéralisation qui atteint les 60,4 % après 92 jours et les résidus liés représente 22 à 47 % après 1 à 92 jours. À la suite de cette minéralisation, il y a apparition de métabolites majeures et mineures avec respectivement des pourcentages respectif de 24,7 % et 10,1 % après 1 jour.

D'après les travaux publiés par l'anses (2013), le cymoxanil est stable à l'hydrolyse à pH 4 mais se dégrade rapidement en six métabolites majeurs à pH 5, 7 et 9. Le cymoxanil est dégradé par photolyse en deux métabolites majeurs. Néanmoins, compte tenu de la vitesse de dissipation du cymoxanil dans le système eau-sédiment, la photolyse n'est pas considérée comme une voie de dissipation majeure du cymoxanil. Le cymoxanil n'est pas

facilement biodégradable. En systèmes eau-sédiment, le cymoxanil est rapidement dégradé, principalement par hydrolyse, en six métabolites majeurs (Anses, 2013).

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 bactéries étudiées. Les résultats sont illustrés par les figures (4-26, 4-27 et 4-28). Ceci indique que la disparition du fongicide est au moins due à sa biotransformation. En ce qui concerne le fongicide milraz, La souche *Burkholderia* l'a presque complètement transformé (70 %) suivi de *Pasteurella* (61 %), et d'*Aeromonas* (56 %). Quatre pics apparaissent ayant des temps de rétention respectifs de 7 min, 10 min 30 sec, 16, min et 21 min. Le pic 1 et le pic 4 représentent des métabolites secondaires issus de la biodégradation. Les pics formés lors de la biodégradation du milraz par *Burkholderia* sont tous des pics mineurs qui ne sont pas abondants.

Les mêmes métabolites sont probablement formés après la transformation de ce produit par *Aeromonas hydrophila* et *Pasteurella pneumotropica* puisque les mêmes pics avec les mêmes temps de rétention sont formés cependant avec cette fois-ci, 3 pics majeurs et 1 pic mineur.

Pour ce qui est de l'herbicide chevalier, le taux de dégradation le plus élevé est enregistré par la souche *Burkholderia* (54 %) suivi par *Pasteurella* (48 %) qui est sans doute dotée d'un équipement enzymatique présentant des affinités non négligeables pour cette sulfonyleurée.

Cet herbicide paraît plus résistant à la biodégradation que le milraz. Le pourcentage de biodégradation sont légèrement inférieurs à ceux du milraz et ce, pour toutes les souches testées. Ce résultat est en parfaite concordance avec la plupart des travaux antérieurs ; il confirme la faible biodégradabilité de tous les herbicides par de nombreux microorganismes par comparaison avec les fongicides et les insecticides.

Le chevalier est un herbicide de la famille des sulfonyleurées formés de deux substances actives le mesosulfuron-méthyl, l'iodosulfuron-méthyl et un phytoprotecteur le méfenpyr-diéthyl. Cet herbicide est très persistant et difficilement biodégradable. Les travaux publiés sur cette sulfonyleurée sont peu nombreux, une étude réalisée par (Harvey et al., 1985 ; Beyer et al., 1988) rapporte que sa transformation dans le sol est faite selon deux processus, l'un microbiologique et l'autre hydrolyse chimique. Les deux processus de dégradation interviennent parallèlement dans le sol ce qui rend difficile leur distinction, car un même sous-produit peut avoir pour origine un processus biotique et un processus d'hydrolyse chimique. Selon la structure chimique de l'herbicide et les conditions climatiques du sol, le

processus biotique peut être prépondérant (Cas du thifensulfuron, Cambon *et al.*, 1992-a), ou minoritaire (cas du sulfometuron, Cambon *et al.*, 1992-b). Les études menées jusqu'à présent indiquent que la biotransformation et l'hydrolyse chimique des sulfonyleurées dépendent principalement du pH, de la température et du degré d'humidité du sol (Walker et Brown 1983 ; Harvey *et al.*, 1985 ; Anderson *et al.*, 1985 et James *et al.*, 1995). Cambon *et al.*, (1998) ont montré qu'à 28°C la transformation du thifensulfuron méthyle est biologique et que la cinétique de biodégradation est d'autant plus rapide que la température augmente, puis elle diminue rapidement quand la température atteint 40-45°C. A des températures supérieures à 53°C, le processus majeur de transformation est chimique alors qu'à des températures inférieures à 53°C les deux processus de transformation peuvent avoir lieu. Les temps de demi-vie enregistrés varient entre 38,5 et 40 jours dans des sols non stérilisés et entre 495 et 680 jours dans des sols stérilisés. En ce qui concerne le primisulfuron méthyle et le metsulfuron méthyle les temps de demi-vie mesurés, dans le sol à différentes températures et à différentes teneurs en eau, sont de 13 à 29 jours et de 8 à 36 jours, respectivement (James *et al.*, 1995). Par ailleurs, Turbey *et al.*, (1998) ont étudié la dégradation du sulfometuron dans le sol et ils ont proposé un mécanisme de dégradation .

Les résultats obtenus par Singles *et al.*, (1999) permettent de démontrer que la dégradation du flupyrsuluron méthyle dans le sol est rapide que ce soit au laboratoire (temps de demi-vie 8-26 jours) ou en plein champ (temps de demi-vie 6-11 jours). A des valeurs de pH > 7, les produits de dégradation majoritaires sont ceux formés à partir d'une contraction du pont sulfonyleurée suivie d'un réarrangement intramoléculaire. Tandis qu'à des valeurs de pH < 7, l'hydrolyse de la fonction sulfonyleurée constitue le mécanisme majoritaire. En effet, l'influence du pH sur la dégradation a été confirmée pour le metsulfuron méthyle; les temps de demi-vie sont de 5 jours dans un sol acide (stérile ou non stérile) et de 139 et 69 jours dans un sol alcalin sous des conditions stériles et non stériles (Pons et Barriuso, 1998). La dégradation chimique des sulfonyleurées est plus importante dans les sols acides que dans les sols à pH>7 (Beyer *et al.*, 1988 ; Blair et Martin 1988 ; Brown 1990). Ainsi, Sous certaines conditions (sols alcalins, hors de la période de pluie) les sulfonyleurées peuvent persister assez longtemps et par conséquent porter atteinte aux plantes non visées (Beyer *et al.*, 1988).

Les sulfonyleurées les plus persistants chlorsulfuron, metsulfuron méthyle et chlorimuron sont hydrolysés en entraînant un clivage du pont sulfonyleurée suivi d'une Odéméthylation du cycle triazine (Sabadie, 1990 ; Sabadie, 1991 ; Sabadie, 1992 ; Reiser *et al.*, 1991), tandis que les sulfonyleurées les moins persistants présentent différents mécanismes d'hydrolyse

(Schneiders et al., 1993). Le pont du tribenuron méthyle se rompt facilement, quant au rimsulfuron l'hydrolyse est rapide que ce soit dans des solutions acides ou alcalines conduisant à une contraction du pont sulfonylurée (Cambon et Bastide 1996).

Dans tous les cas, le chevalier a montré une biodégradabilité moins importante face à toutes les souches testées. A notre avis, ceci pourrait être dû à la présence d'un second noyau cyclique benzénique dans sa structure chimique, et nous savons que l'ouverture du noyau benzénique est une réaction chimique difficile à réaliser. En outre, la présence d'un substituant méthylé qui semble t-il se dégrade plus lentement, peut augmenter la résistance à la décomposition.

Les 3 espèces de bactériesensemencées dans le milieu liquide contenant le chevalier servant comme source de carbone, sont susceptibles de provoquer une modification de la concentration initiale de ce composé avec des taux de disparition qui dépassent les 50 %.

Les principaux métabolites formés sont au nombre de cinq et ont des temps de rétention de 9 min, 10 min 30 sec, 18 min 20 sec, 18 min 40 sec, 24 min 52 sec. le pic 2 et 5 sont des pics majeurs. Le pic 5 est le plus abondant suivi du pic 2 dans les extraits de culture d'*Aeromonas*, tandis que chez *Pasteurella*, le pic 2 est le plus abondant suivi du pic 5 alors que pour *Burkholderia*, les deux métabolites majeurs libérés (pic 2 et pic 5) ont la même abondance.

La souche *Aeromonas hydrophila* a fait preuve d'une capacité de biodégradation de moindre importance face aux deux pesticides par comparaison avec celle exhibée par les deux autres espèces bactériennes testées. Cette espèce bactérienne est réputée pour ses hautes potentialités cataboliques vis-à-vis de divers polluants de l'environnement les plus récalcitrants, elle s'est révélée dans notre cas, non efficiente avec une métabolisation partielle avec des taux de biodégradation ne dépassant pas les 56 % pour le milraz (cymoxanil et propinèbe) et 47 % pour le chevalier (Mesosulfuron et iodosulfuron). Ce résultat 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 a été également reportées 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.

Par ailleurs, on pourrait évoquer la nature et le nombre des substituants de la substance chimique pour expliquer la biodégradabilité des molécules. Le milraz formé d'une part par le cymoxanil, substance active constituée d'une triple liaison C  $\equiv$  N, et il est fréquent que les triples liaisons (nitrile) aient une grande influence sur la résistance de la dégradation biotique. De la même manière, le chevalier composée de deux substances actives aromatiques le mésosulfuron et l'iodosulfuron possédant dans leur structure chimiques des cycles benzéniques et il est connu que l'ouverture du noyau benzénique est une réaction chimiquement difficile. En outre, les structures chimiques des quatre molécules (cymoxanil, propinèbe, mésosulfuron et l'iodosulfuron) présentent des groupes méthoxy et de substituants méthylés dans la structure des substances actives étudiés et qui semble t-ils se dégradent plus lentement et de ce fait, ils peuvent augmenter la résistance à la décomposition. Tout ceci, met en évidence l'importance du rôle que joue la nature d'une substance chimique lors de sa biotransformation.

## 6. Conclusion

Les essais de biodégradation révèlent les potentialités des trois souches microbiennes vis-à-vis des deux molécules de pesticides. Une meilleure tolérance et une grande affinité de *Burkholderia cepacia* pour les deux molécules ajoutées dans le milieu durant le début de la phase exponentielle de croissance. Un taux de disparition qui arrive à atteindre les 70 % pour le milraz. Des capacités cataboliques non négligeables ont été également notées de la part de *Pasteurella pneumotropica* et *Aeromonas hydrophila* face aux deux composés. Les trois espèces bactériennes possèdent un large spectre d'action avec un système enzymatique actif vis-à-vis de ces deux produits phytosanitaires classés parmi les pesticides les plus récalcitrants à biodégradabilité difficile. Elles pourraient devenir potentiellement intéressantes dans des conditions optimum favorables à la leur croissance pour qu'il y ait une induction de leur système enzymatique de biotransformation pour un large panel de produits. L'espèce *Burkholderia cepacia* est la plus performante parmi les autres souches, elle possède des capacités métaboliques intéressantes car elle est capable de survivre et de s'adapter dans des conditions difficiles du milieu (milieu pollué) et induire des enzymes intervenant dans les réactions de biotransformation. La majorité des profils des différents chromatogrammes de la

CPG ont révélé l'apparition de nouveau pics pendant la disparition de ces composés, indiquant leur biotransformation par les bactéries, 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 chromatographes qui prouvent que la biodégradation de ces deux produits n'est que partielle.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

Très peu de travaux ont été réalisés sur ces produits phytopharmaceutiques notamment en ce qui concerne leur dégradation biologique ou bioremédiation par la microflore bactérienne. Au travers des analyses physico-chimiques, il ressort que l'évaluation du niveau de contamination de l'eau et surtout du sol par les pesticides est très difficile et manque de précision compte tenu du manque de précision et de la non disponibilité des normes nationales et internationales d'une part et les nombreuses interactions entre les propriétés physiques et chimiques du fongicide, insecticide ou herbicide (dissociation, solubilisation, volatilsation, rétention, adsorption et désorption) et les différents paramètres physico-chimiques et microbiologiques du sol, d'autre part.

La distribution globale de la microflore microbienne isolée est diversifiée en termes de bactéries ou de champignons. Elle est particulièrement marquée par plusieurs espèces parfaites, plusieurs *Aspergillus* et seulement peu de *Penicillium* pour ce qui est de la microflore fongique, de nombreuses espèces appartenant aux *Burkholderiaceae*, *Pasteurellaceae* et *Aeromonadaceae*. Très peu de *Pseudomonadaceae* et d'*Entérobactériaceae* pour la microflore bactérienne.

Certaines espèces sont inhibées par la présence de pesticides (herbicides, fongicides, insecticides) dans les sites contaminés constituant un biotope défavorable à leur développement tels que les *Penicilliums*, et les Entérobactéries.

Pour ce qui est de l'influence des quatre substances actives ( cymoxanil, propinèbe, mésosulfuron et iodossulfuron) des deux produits phytosanitaires sur le développement des espèces étudiées dans les conditions de nos expérimentations, l'élément majeur qui ressort est le fait que les cinq souches testées soient en mesure de croître dans un milieu liquide en présence de ces molécules ajoutées lors de la phase exponentielle de croissance. La tolérance est meilleure pour les souches pures individuelles. Le consortium bactérien quant à lui, montre des potentialités de croissance intéressante acquises par synergie de tous les individus bactériens et exhibées par une cinétique meilleure que celle des souches pures individuelles. Cependant, le consortium bactérien n'a pas pu accéder facilement au pesticide et l'utiliser comme une source de carbone et d'énergie pour une éventuelle oxydation ou une minéralisation. Ceci est dû probablement à un équipement enzymatique pauvre et non actif de son génome.

Par ailleurs, les potentialités cataboliques de ces souches, il existe aussi une faible différence de comportement entre les souches pures individuelles. Ceci illustre de bonnes capacités de métabolisation face à ces produits et par conséquent, une stimulation de l'activité de leur système enzymatique produisant des enzymes capables de catalyser les diverses réactions de biodégradation. Il paraît que la présence de pesticides favorise la sélection des systèmes enzymatiques efficaces et leur activation, il s'agit de *Burkholderia cepacia*. En revanche, dans certains cas ; il y a une absence d'adaptation et par conséquent des capacités de dégradation faibles et une toxicité par les polluants, c'est le cas ici du consortium bactérien composé par l'ensemble des trois souches bactériennes.

De l'ensemble des souches testées, l'espèce *Burkholderia cepacia* semble beaucoup plus intéressante grâce à son pouvoir biodégradant qui est du probablement à un patrimoine génétique pourvu d'un équipement enzymatique riche capable de réaliser la bioconversion d'un grand nombre de substances chimiquement différentes par des réactions chimiques diverses. Nous pensons que cette souche possède les caractéristiques demandées d'agent biologique de dépollution ou de remédiation. Néanmoins, pour envisager son utilisation dans la bioremédiation des sites contaminés, il faut d'abord approfondir les recherches sur

- L'identification des enzymes impliqués dans les réactions de dégradation (oxydation, réduction, hydrolyse ou synthèse).
- L'étude de l'aspect moléculaire de ces enzymes.
- La détermination des gènes responsables de la dégradation des pesticides se trouvant dans les plasmides - transposons et/ou chromosomes.
- l'identification des principaux métabolites issus de la biodégradation et l'évaluation de leur degré de toxicité pour savoir si ces métabolites sont moins toxiques ou alors plus actifs que la molécule initiale.

Ce problème de contamination de l'environnement par les pesticides préoccupe les gouvernements des pays industrialisés. Il conviendrait que l'Algérie s'aligne sur les dispositions réglementaires préconisées. Il est du devoir des institutions concernés de définir une politique globale sur l'environnement et l'exécution d'un programme d'études en s'appuyant sur :

- Le recensement des sites régionaux et nationaux pollués par les pesticides.
- Une méthode d'analyse validée pour la détermination des résidus dans le sol, l'eau, les denrées végétales et les denrées animales et dans toute la chaîne alimentaire.

- Des méthodes validées pour la détermination des métabolites secondaires formés.
- Mettre en place un plan de surveillance des apparitions de résistance.
- Développer la recherche sur la dépollution biologique c'est-à-dire la décontamination par les microorganismes car elle est plus économique et écologique.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

**ACTA, 2005.** Index Phytosanitaire ACTA 2005. 41ème éd. Paris. Association de Coordination Technique Agricole. France. 820 p.

**Aderhold, D. et Nordmeyer, H.** 1995. Leaching of herbicides in soil macropores as a possible reason for groundwater contamination. BCPC Monograph n°62 : Pesticide movement to water, Warwick. 3-5 April.

**Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.** 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 399-451.

**Afnor, 1997.** Qualité de l'eau : Méthodes d'analyse 1 Tome 2°. AFNOR, Paris.

**Agritox, 2007.** Base de données de l'INRA sur les substances actives phytopharmaceutiques. [Online] <http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php>.

**Albin, O.M.** 1999. Encyclopédie universitaire. Dictionnaire de l'écologie. Ed.ISBN. France. 1399p.

**Alletto, L. Coquet, Y., Benoit, P., Heddadj D. et Barriuso, E.** 2010. «Tillage management effects on pesticide fate in soils. A review» *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 30, n°2, pp. 367-400.

**Anderson, J. J. et Dulka, J. J.** 1985. Environmental Fate of Sulfometuron Methyl in Aerobic Soils. *J. Agric. Food. Chem.* 33, 596-602.

**André, H.** 2001. Introduction à la climatologie: Le rayonnement et la température, l'atmosphère, l'eau, le climat et l'activité humaine, p 12, Presses Université Laval.

**Andreux, F.** 1978. Etude des étapes initiales de la stabilisation physico-chimique et biologique d'acides humiques modèles. Thèse D.E., Université Nancy 1, 174 p.

**Anses, 2013.** Anses-dossier n°2011-6420. ZETANIL WG Dossier lié n° 2010-1676 1/22Maisons-Alfort, le 16 décembre 2013

**Ariaz-Estevez, M., Lopez-Periago, E., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., Mejuto, J. et Garcia-Rio, L.** 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **123**, 247-260.

**Atienza, J., Taberner, M.T., Alvarez-benedi, J. et Sanz, M.** 2001. volatilisation of triallate as affected by soil texture and air velocity. *Chemosphere*, 261p.

**Bailey, G.W. et White, J.L.** 1970. Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soil. *Residue Rev.*, 33, 29-92.

- Bailey, G. W. et White, J. L.** 1964. Review of adsorption and desorption of organic pesticides by soil colloids, with implications concerning pesticide bioactivity: *J. Agr. Food Chem.* 12, 324~332.
- Balasooriya, I. et D. Parkinson.** 1967. Studies on fungi in pine wood soil. 2. Substrate relationships of fungi in the mineral horizons of the soil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 4:639–643.
- Barraclough, D., Kearney, T., et Croxford, A.** 2005. Bound residues: environmental solution or future problem. *Environ Pollut.* 133(1): 85-90.
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M. et Soulas, G.** 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols : transformation et dissipation. Forum «Le sol, un patrimoine menacé ?» Paris, 24 Octobre.
- Beck, A.J. et Jones, K.C.** 1996. The effect of particle size, organic matter content, crop residues and dissolved organic matter on the sorption kinetics of atrazine and isoproturon by clay soil. *Chemosphere*, **32**, 2345-2358.
- Beigel, C. et Di Pietro, L.** 1999. Transport of triticonazole in homogeneous soil columns: influence of non equilibrium sorption. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1999**, 1077-1086.
- Benedetti, J. L. et Weber, J. P.** 2003. Le point sur l'acrylamide dans les aliments, Institut national de santé public, Québec, toxicologie humaine, Communiqué de veille toxicologique, 10 février 2003.
- Benoît, M., Bonicelli, B., Guichard, L., Delorme, R., Faloya, V. et Ruelle, B.** 2005. Rapport de l'expertise réalisée par l'INRA et le Cemagref, «Pesticides, agriculture et environnement», chapitre 2, Connaissance de l'utilisation des pesticides.
- Beulke, S., Brown, C.D., Fryer, C.J. et Van Beinum, W.** 2004. Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. *Chemosphere*, **57**, 481- 490.
- Beyer, E. M., Duffy, M. J., Hay, J. V. et Schlueter D. D.** 1988. Sulfonylureas. In: *Herbicides: Chemistry, degradation, and Mode of Action* Eds. P. C; Kearny and D. D. Kaufman, Publishers: Marcel Dekker, Inc, New York 1988. Vol. 3, Chap. 3, 117-189.
- Black, C.A. et Evan, D.D.** 1965. Methods of soil analysis, American Society of Agronomy, Part 2, Agronomy 9, p. 917-918.
- Blair, A.M. et Martin D.** 1988. A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Sci.*, 22: 195-219.
- Blakeslee, AF.** 1915. Lindner's roll tube method of separation cultures. *Phytopathology* 5: 68–69
- Blanchoud, H., Farrugia, F., et Mouchel, J. M.** 2004. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. *Chemosphere*. 55(6): 905-913.
- Blanchoud, H., Garban, B., Ollivon, D. et 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.

- Bocquene, G. et Franco, A.** 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Mar. Poll. Bull.*, **51**, 612-619.
- Bonneau, M et Souchier, B.** 1979. Constituants et propriétés du sol. Tome2, Paris, 455p.
- 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.
- 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.
- Borut, S. Y., Johnson, T.W.** 1962. Some biological observations on fungi in estuarine sediments. *Mycologia* **54**, 1.81-793
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Ganthier, S., Gux, PH., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P.** 1990. Moisissure utiles et nuisibles importances industrielles. 2 Ed. 3 Ed. Milan Barcelone Mexico. Paris. 498p
- Bouraquadi Idrissi, A.** 2006. Extraction par solvant : Etude et modélisation du système Tributylphosphate-Acides monocarboxyliques, Thèse de doctorat, Toulouse, France.
- Bougouin, B. et Konlein, C.** 1994. La pollution diffuse par les produits phytosanitaires. *Revue de l'Agence de l'Eau Adour Garonne*, Automne, 23-29.
- Bouseba, B., Zertal, A., Beguet, J., Rouard, N., Devers, M., Martin, C. et Martin Laurent, F.** 2009. «Evidence for 2,4-D mineralisation in Mediterranean soils: impact of moisture content and temperature.» *Pest Manage. Sci.*, vol. **65**, n°9, pp. 1021-1029.
- Bray, L.D., Heard, N.E., Overman, M.C., Vargo, J.D., King, D.L., Lawrence, L.J. et Phelps, A.W.** 1997. Hydrolysis of prosulfuron at pH 5: evidence for a resonance-stabilized triazine cleavage product. *Pestic. Sci.* **51**, 56-64.
- Brouyère, S., Dassargues, A. et Hallet, V.** 2004. Migration of contaminants through the unsaturated zone overlying the Hesbaye chalky aquifer in Belgium : a field investigation. *J. Contam. Hydrol.*, **72**, 135-164.
- Brown, C.D., Hollis, J., Bettiston, R.J. et Walker, A.** 2000. Leaching of pesticides and a bromide tracer through lysimeters from five contrasting soils. *Pest Manag. Sci.*, **56**, 83-93.
- Brown, H. M. et Cotterman, J. C.** 1994. Recent advances in sulfonylurea herbicides. In: *Chemistry of Plant Protection*, Vol 10. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. pp 49-81.
- Brown, H.M.** 1990. Mode of action, crop selectivity and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Sci.*, **29**: 263-281.
- Buys, M., Guyot, C., Barciet, F.** 1991. Comportement des produits agropharmaceutiques dans le sol. *Phytoma*, **432**, 20-24.
- Cahagnier, B. et Richard-Molard, D.** 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158

**Calvet, R., Bariusso, E., Benoit, P., Bedos, C., Charnay, M.P. et Coquet, Y.** 2005. Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole. INRA. 46p.637p.

**Calvet, R.** 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* 83:145-177.

**Cambon, J. P. et Bastide. J.** 1992-a. Dégradation chimique ou microbiologique des sulfonylurées dans le sol. III. Cas du thifensulfuron methyl. *Weed Res.* 32, 357-362.

**Cambon, J. P., Zheng, S. Q. et Bastide J.** 1992-b. Dégradation chimique ou microbiologique des sulfonylurées dans le sol. I. Cas du sulfometuron. *Weed Res.* 32, 1-7.

**Cambon, J.P. et Bastide, J.** 1996. Hydrolysis kinetics of thifensulfuronmethyl in aqueous buffer solutions. *J. Agric. Food Chem.* 44, 333–337.

**Cambon, J. P., Bastide, J. et Vega D.** 1998. Mechanism of Thifensulfuron-methyl Transformation in Soil. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1210-1216.

**Casida, J.E., Kimmel, E.C., Ohkawa, H., et Ohkawa, R.** 1975. Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate sulfoxides in living mice and liver enzyme systems. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 5: 1-11.

**Casida, J.E., Gray, R.A., et Tilles, H.** 1974. Thiocarbamate sulfoxides: potent, selective, and biodegradable herbicides. *Science*, 184: 573-574.

**Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec**, 2003. Préparation des échantillons de sol agricole, DR–12–PEA, Ministère de l'Environnement du Québec, 8 p.

**Chafai, D.** 1996. Micromycètes des sédiments d'oued et d'effluents industriel de l'Est Algérien. Thèse de doctorat d'Etat. Université Joseph Fourier. Grenoble, France.

**Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B. et 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.

**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.

**Chen, W., Hertl, P., Chen, S. et Tierney, D.** 2002. A pesticide surface water mobility index and its relationship with concentrations in agricultural drainage watersheds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 298-308.

**Chester, M.** 1989. Environmental fate of alachlor and metolachlor. *Rev. Environ. Contam. T.* 110:1-74.

**Chiou, C.T., Malcolm, R.L., Brinton, T.I. et Kile, D.E.** 1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 502-508.

- Choudhury, P. P. et Dureja P.** 1996. Phototransformation of Chlorimuron-ethyl in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3379-3382.
- Choudhury, P. P. et Dureja P.** 1997. Studies on photodegradation of Chlorimuron-ethyl in soil. *Pestic. Sci.* 51, 201-205.
- Coast, S., Bocquene, G. et Godard, E.** 2006. Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquat. Living Resour.*, **19**, 181- 187.
- Colón, D., Weber, E. J., Anderson, J. L., Winget P. et Suárez, L. A.** 2006. «Reduction of nitrosobenzenes and N-hydroxylanilines by Fe(II) species: elucidation of the reaction mechanism,» *Environmental Science & Technology*, vol. 40, n°14, pp. 4449-4454.
- Conrad, A., Dedourge, O., Cherrier, R., Couderchet, M. et Biagianti, S.** 2006. Leaching of terbumeton and terbumeton-desethyl from mini-columns packed with soil aggregates in laboratory conditions. *Chemosphere*, **65**, 1600-1609.
- Cooke, C.M., Shaw, G. et Collins, C.D.** 2004. Determination of solid-liquid partition coefficients ( $K_d$ ) for the herbicides isoproturon and trifluralin in five UK agricultural soils. *Environ. Pollut.*, **132**, 541-552.
- Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. et Smalla, K.** 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol.* 56: 236-249.
- Cox, L., Cecchi, L., Celis, M., Hermosin, M.C., Koskinen, W.C. et Cornejo, J.** 2001. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. *Soil Sci. Am. J.*, **65**, 1688- 1695.
- Cox, L., Hermosin, M.C., Beker, A. et Cornejo, J.** 1997. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **65**, 151-161.
- CPP**, 2002. Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Comité de la Prévention et de la Protection .<http://www.ecologie.gouv.fr/PPP-Rapport-200202Risques.html>
- Cui, T.** 2002. Riboflavin- photosensitized degradation of Atrazine in a freshwater environment chemosphere. 47: 991-999.
- Cullum, R.F.** 2009. Macropore flow estimations under no-till and till systems. *Catena*, **78**, 87-91.
- Curtis, T.P., W. T. Sloan, et J. W. Scannell.** 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 10494–10499
- Dabène, E. et Marié, F.** 1993. Caractéristiques utiles pour l'évaluation du comportement de quelques matières actives dans l'environnement. Recueil de fiches synthétiques et guide de lecture. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, France.
- Dagley, S.** 1975. - A. biochemical approach to some problems of environmental pollution. *Essays Biochem.* (11), 81-138.

- Davet, P.** 1996. Vie microbienne des sols et production végétale, INRA, 385p.
- De Jonge, H., De Jonge, L.W. et Jacobson, O.H.** 2000. [<sup>14</sup>C]-Glyphosate transport in undisturbed topsoil columns. *Pest Manag. Sci.*, **56**, 909-915.
- Demain, AL.** 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52: 455-463.
- Devers, M., Henry, S., Hartmann, A. et Martin-Laurent, F.** (2005) Horizontal gene transfer of atrazinedegrading genes (atz) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maizecultivated soil. *Pest Management Science* 61: 870-880.
- Devillers, J., Farret, R., Girardin, P., Rivière, J.L. et Soulas, G.** 2005. Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides. Éditions TEC & DOC Lavoisier, 278 pages.
- Dgccrf.** 2006. Plan de surveillance des fruits et légumes. Direction générale de l'alimentation.
- Di Geronimo, S. I.** 1987. Les effets de la pollution sur les peuplements benthiques de substrats rocheux du port d'Angusta. In papers presented at the FAO/UNEP meeting on the effects of pollution on marine ecosystems, Spain, October, 1985, p. 64-75.
- Dommergues, Y., Mangenot, F.** 1970. Ecologie microbienne du sol. Paris, Masson.
- Dominique, Z.** 2000. Les résidus de pesticides dans les plantes. Ed INRA.
- Domsch, K.H., Gams, W. et Anderson, T.H.** 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press.
- Duchaufour, P.** 1977. Pédogénèse et Classification, Pédologie. Vol 1. 477p.
- Duchaufour, P.** 1971. Précis de Pédologie, 3e édition. Masson et Cie, Paris 1970.
- Dunn, P. H. et baker, G.E.** 1983. Filamentous fungi of the psammon habitat at Enewetak Atoll, Marshall Islands. *Mycologia* 75: 839-853.
- Durrieu, G.** (2008). [http://www.association\\_mycologique\\_Toulouse.upstlse.fr/spip.php?article\\_23](http://www.association_mycologique_Toulouse.upstlse.fr/spip.php?article_23)
- El arfaoui, B.A.** 2010. Etude des processus d'adsorption et de désorption de produits phytosanitaires dans des sols calcaires. Université de Reims Champagne-Ardenne. 217p.
- El Bakouri, H.** 2002. Etude de l'adsorption de l'endosulfan sur certaines matrices végétales. Rapport de stage. Réf : UFR/02-01. Thèse de doctorat Université de Tanger. Maroc
- Elliott, J.A., Cessna, A.J., Nicholaichuk, W. et Tollefson, L.C.** 2000. Leaching rates and preferential flow of selected herbicides through tilled and untilled Soils. *J. Environ. Qual.*, **29**, 1650-1656.
- Ellis, M. B.** 1971. Demataceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608 pp.

**Ellis, M. B.** 1976. More Demataceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 505 pp.

**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. Pesticide interactions in crop production: beneficial and deleterious effects. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 227-243.

**FAO, 2002.** «Health implications of acrylamide in food» Food and Agriculture Organization, Geneva, Switzerland, 25-27.

**Fenske, R.A., Kedan, G.Lu.C., Fisker-Andersen, J.A. et Curl, C.L.** 2002. Assessment of organophosphorus pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. *J. Exposure Analysis Environ. Epidemiol.* 12: 21-28.

**Feuilhade de Chauvin M.** 2005. New diagnostic techniques, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 19 (1), 20-24

**Filtborg O., Frisvad J.C., Thrane U.** 1996. Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.*, 33(1), 85-102

**Fisher, M.M. et Triplett, E.W.** 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4630-4636.

**Flores-Céspedes, F., Gonzalez-Pradas, E., Fernandez-Perez, M., Villafranca-Sanchez, M., Socias-Viciana, M. et Urena-Amate, M.D.** 2002. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *J. Environ. Qual.*, **31**, 880-888.

**Flury, M.** 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils : A review. *J. Environ. Qual.*, **25**, 25-45.

**Fouque-Brouard, C.M. et Fournier, J.M.** 1996. Adsorption-desorption and leaching of phenylurea herbicides on soils. *Talanta*, **43**, 1793-1802.

**Fournier, J.C., Codaccioni, P. et Soulas, G.** 1981. - Soil adaptation to 2,4-D degradation in relation to the application rates and the metabolic behaviour of the degrading microflora. *Chemosphere* (10), 977-984.

**Fournier, J.** 1988. Chimie des pesticides. Ed. Les Editions des Trois Moutiers. Vienne, 351p.

**Fredrickson, JK, Zachara, JM, Balkwill, DL.** 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4230-4241

**Frear, D.S.** 1976. Ioxynil and bromoxynil. In: Kearney P.J., Kaufmann D.D. (eds), *Herbicides (Vol 2.)* Marcel Dekker, New York, pp. 582-587.

**Fuchs, A. et Devries, F.W.** 1978. Bacterial breakdown of benomyl. I. Pure cultures. *US National Library of medicine National institutes of Health. Antonie Van Leeuwenhoek.* 44(3-4):283-92.

- Furukawa, K.** 2003. 'Super bugs' for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 21: 187-190.
- Fusi, P.** 1993. Interactions of two acetanilide herbicides with clay surfaces modified with Fe (III) oxyhydroxydes and hexadecyltrimethyl ammonium in Regnault- Roger 2005.
- Fusi, P.** 1991. Adsorption et décomposition catalytiques des pesticides sur les minéraux argileux in Regnault- Roger 2005.
- Gadja, H.** 2010. Etude de quelques formes d'accumulation de calcaire dans les sols de la région de Ouargla. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie saharienne. Université Kasdi MERBAH Ouargla.
- Gajbhiye, V. et Gupta, S.** 2001. Adsorption-desorption behaviour of flufenacet in five different soils of India. *Pest. Manag. Sci.*, **57**, 633-639.
- Galzy, P. et Slonimski, P.** 1957. Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. C.R. Acad. Sci. 245 D : 2423-2426.
- Gamble, D. et Khan, S.** 1985. «Atrazine hydrolysis in soils: Catalysis by the acidic fonctionnal groups of fulvic acid,» *Can. J. Soil Sci.*, vol. 65, pp. 435-443.
- Gauchers, F., et Soltser, H.** 1981. Base de la production végétale : le sol, Edition Techniques agricoles.
- Gaucher, A.** 1968. Traité de pédologie agricole. Le sol et ses caractéristiques agronomiques. 2-97
- Gawronski, S.W., Haderlie, L.C. et Strack, J.C.** 1987. Metribuzin metabolism as the basis for tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Weed. Research.* 27 : 49-55.
- 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. et Vonk, J.W.** 1989. Revision of recommended laboratory tests for assessing side-effects of pesticides on soil microflora. 4th Int. Workshop, Basle, Bundesforschungsanstalt, Braunschweig.
- Gerecke, A. C., Scharer, M., Singer, H. P., Muller, S. R., Schwarzenbach, R. P., Sagesser, M., Ochsenbein, U. et 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.
- Gevao, B., Semple, K.T. et Jones, K.C.** 2000. Bound residues in soils : a review. *Environ. Pollut.*, **108**, 3-14.
- Glotfelty, D.E., Seiber, J.N. et Liljedahl, L.A.** 1987. Pesticides in fog. *Nature*, 325, 602-605.
- Gobat, J.-M., Aragno, M. et Matthey, W.** 2003. Le Sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Golovleva.** 1980. Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. FEMS Symposium N°12 Leisinger, T. ed ., London : Academic Press for the Swiss Academy of

Sciences and the Swiss Society of Microbiology on behalf of the Federation of European Microbiological Societies. 415.

**Graber, E.R., Dror, I., Bercovich, F.C., Rosner, M.** 2001. Enhanced transport of pesticides in a field trial with treated sewage sludge. *Chemosphere*, 44 (4): 805-811.

**Grady, C.P.L.** 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.*, 27: 660-674

**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.

**Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. et Sage, L.** 1995. Mycoflora of soil around the Dead Sea. II. Deuteromycetes (except *Aspergillus* and *Penicillium*). *Syst. Appl. Microbiol.* 18:318–322.

**Gustafson, D.I.** 1989. Groundwater Ubiquity Score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 339-357.

**Haberhauer, G., Temmel, B. et Gerzabek, M.H.** 2002. Influence of dissolved humic substances on the leaching of MCPA in a soil column experiment. *Chemosphere*, 4, 495-499.

**Haider, K., Martin, J. P. et Filip, Z.** 1975. Humus biochemistry. In Paul, E.A et McLaren, A.D. Soil biochemistry, vol, 4. Marcel Dekker, Inc., NewYork.

**Hanniffy, SB., Pelaez, C., Martinez-Bartolome, MA., Requena, T. et Martinez-Cuesta MC.** 2009. Key enzymes involved in methionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 135: 223-230.

**Harvey, J., Dulka, J. J. et Anderson, J. J.** 1985. Properties of Sulfometuron Methyl Affecting its Environmental Fate: Aqueous Hydrolysis and Photolysis, Mobility and Adsorption on Soils, and Bioaccumulation Potential. *J. Agric. Food Chem.* 33, 590-596.

**Hattori, S.** 1988. Frullania flora of Mt. Albert Edward, Papua New Guinea. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 65: 411-453.

**Hegeman, D.G. et Rosenberg, S.L.** 1970. The evolution of bacterial enzyme systems. *Annu. Rev. Microbiol.* (24), 429-462.

**Hequet, F.** 1995. Approche méthodologique des conditions d'hydrolyse de l'Atrazine.

**Hess, F.D.** 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Science* 48:160-170.

**Hesterberg, D.** 1998. Biogeochemical cycles and processes leading to changes in mobility of chemicals in soils. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 67, 121-133.

**Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., De Aguirre, L. et Morrison, C.J.** 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, 43 (1), 129-137

**Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. et Read, D.J.** 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*, 411: 789-792.

**Horner-Devine, M. C., Leibold, M. A., Smithe, V. H., et Bohannon, B. J. M.** 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.*, 6: 613-622.

**IARC**, 1976. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 11, Cadmium, Nickel, Some Epoxides, Miscellaneous Industrial Chemicals and General Considerations on Volatile Anaesthetics, Lyon, pp. 225–229

**IBGE**, 2005. Qualité physico-chimique et chimique des eaux de surface. Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement.

**Ifen**, 2007. Institut français de l'alimentation. Les pesticides dans les eaux, données 2005, numéro D9. 43 p.

**Ifen**, 2006. Institut français de l'alimentation. Les pesticides dans les eaux.

**Inoue, A. et Horikoshi, K.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* , 338: 264-266

**Inoue, A. et Horikoshi, K.** 1991b. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P. *J. Ferment. Bioeng.* , 71: 194-196

**Inra et Cemagref.** 2005. Pesticides, Agriculture et Environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Synthèse du rapport d'expertise collective INRA-Cemagref. 714 p.

**International Labour Organization.** 1998. «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides.

**Isensee, A.R. et Sadeghi, A.M.** 1996. Effect of tillage reversal on herbicide leaching to groundwater. *Soil Sci.*, 161, 382-389.

**Jacobsen, O.H., Moldrup, P., Larsen, C., Konnerup, L. et Petersena, L.W.** 1997. Particle transport in macropores of undisturbed soil columns. *J. Hydrol.*, 196, 185-203.

**James, T. K., Klaffenbach, P., Holland, P. T. et Rahman, A.** 1995. Degradation of Primisulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in Soil. *Weed Res.* 35, 113-120.

**Jamet, P. et Cure, B.** 1991. Phytosanitaires Environnement. Un suivi "à la trace" dans le sol. *Cultivar*, 308 (1), 4à-41.

**Jin, J., Lee, Y.K. et Wickes B.L.** 2004. Notes Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (9), 4293-4296

**Jury, W.A., Focht, D.D. et Farmer W.J.** 1987. Evaluation of pesticide groundwater pollution potential from standard indices of soil-chemical adsorption and biodegradation. *J. Environ. Qual.*, 16, 422-428.

**Jury, W.A., Spencer, W.F., Farmer, W.J.** 1984. Behavior assessment model for trace organics in soil: III. Application of screening model. *J. Environ. Qual.*, 13, 573-579.

**Kappler, A. et Haderlein, S. B.** 2003. «Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants,» *Environmental Science & Technology*, vol. 37, n°12, pp. 2714- 2719.

**Kebe, I.B., Mpika, J., N'guessan, K.F., Hebbar, P.K., Samuels, G.S. et AKE, S.** 2009. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature* Vol.6 N°1: 71 - 82.

**Kendrick, B.** 2000. *The fifth kingdom*. Troisième Eds.

**Ketif, A.** 2008. Influence de trois pesticides (Hexaconazole, Bromuconazole et Fluzifop-p) sur les paramètres physio-biochimiques du blé : *Triticum durum*. Capacités métaboliques de quelques souches fongiques vis-à-vis de ces trois molécules. Mémoire de Magistère en biologie végétale. pp Université BADJI Mokhtar Annaba

**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.

**Kjaer, J., Olsen, P., Ullum, M. et Grant, R.** 2005. Leaching of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. *J. Environ. Qual.*, 34, 608-620.

**Kobayasi, Y., Matsushima, T., Takada, M. et Hagiwara, H.** 1977. Reports of the Japanese mycological expedition to Mts. Ruwenzori, Central Africa. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 18:64-94

**Koskinen, W.C., Rice, P.J., Sakaliene, O., Moorman, T.B. et Arthur, E.L.** 2002. Sorption-desorption of aged sulfonylaminocarbonyltriazolinone herbicides in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5368-5372.

**Kowalchuk, G.A. et J.R. Stephen.** 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.*, 55: 485-529.

**Kumar, S., Mukerji, K.G et Lal, R.** 1997. Molecular aspects of pesticides degradation by microorganisms. *Review. Microbiol.* 22(1) : 1-26.

**Laffont, R.** 1975. Le spectre de la pollution: Le monde des océans. *Encyclopédie Cousteau*.

**Lagaly, G.** 2001. Pesticide-clay interactions and formulations. *Appl. Clay Sci.*, 18, 205-209.

**Larson, S.J., Capel, P.D., Goolsby, D.A., Zaugg, S.D., Sandstrom, M.W.,** 1995. Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi River basin. *Chemosphere*, 31, 3305-3321.

**Leake, J.R., S.L. McKendrick, M. Bidartondo et D.J. Read.** 2004. Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropa hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Trichoderma* spp. *New Phytologist*, 163: 405-423.

**Le clech, H.B.** 1998. Environnement et agriculture. 2<sup>ème</sup> édition. Édition synthèse agricole. 341p.

**Lee, D.H., Zo, Y.G. et Kim, S.J.** 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* 62: 3112-3120.

**Legros, J.P.** 2007. Les grands sols du monde. Presses polytechniques et universitaires romandes. Espagne. 574 p.

**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.

**Leonard, R. A.** 1990. Movement of pesticides into surface waters. In pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America book. Madison, WI, USA. 2: 303 -349.

**Leonard, R. A., Langdale, G.W., Fleming, W.G.** 1979. Herbicide runoff from upland piedmont watersheds - data and implications for modeling pesticide transport. *J. Environ. Qual.*, 8, 223- 229.

**Levitan, L., Merwin, I., Kovach, J.** 1995. Assessing the relative environmental impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. *Agric Ecosyst Environ* ;55(3):153-68.

**Levy, W., Radl, V., Ruth, B., Schmid, M., Munch, J.C. et Schroll, R.** 2007. «Harsh summer conditions caused structural and specific functional changes of microbial communities in an arable soil,» *European Journal of Soil Science*, vol. 58, n°3, pp. 736-745.

**Li, H. Lee, L., Jafvert C. et Graveel, J.** 2000. «Effect of substitution on irreversible binding and transformation of aromatic amines with soils in aqueous systems,» *Environmental Science & Technology*, vol. 34, n°17, pp. 3674-3680.

**Li, H., Lee, L. Schulze, D. et Guest, C.** 2003. « Role of soil manganese in the oxidation of aromatic amines,» *Environmental Science & Technology*, vol. 37, n°12, pp. 2686-2693.

**Li, K., Xing, B. et Torello, W.A.** 2005. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environ. Pollut.*, 134, 178-194.

**Li, Y., Zimmerman, W. T., Gorman, M. K., Reiser, R. W., Fogiel, A. J. et Haney, P. E.** 1999. Aerobic Soil Metabolism of Metsulfuron-methyl. *Pestic. Sci.* 55, 434-445.

**Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. et Forney, L.J.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 63: 4516-4522.

**Louchard, X., Voltz, M., Andrieux, P., et Moussa, R.** 2001. Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. *Journal of Environmental. Quality.* 30: 982-990.

**Lucy, M., Reed, E. et Glick, BR.** 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 86: 1-25.

**Lugtenberg, B., et Kamilova, F.** 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 63: 541-556.

**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.

**Malone, R.W., Shipital, O.M.J., Wauchope, R.D. et Sumner, H.** 2004. Residual and contact herbicide transport through field lysimeters via preferential flow. *J. Environ. Qual.*, **33**, 2141–2148.

**Mapa, R. B., Green, R. E. et Santo, L.** 1986. «Temporal variability in soil hydraulic properties with wetting and drying subsequent to tillage,» *Soil Science Society of America Journal*, vol. 50, p. 1133–1138.

**Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL.** (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.

**Martins, J. M. F. et Mermoud, A.** (1999). Transport of Rimsulfuron and its Metabolites in Soil Columns. *Chemosphere.* 38(3), 601-616.

**Mathieu, C. et Lozet, J.** 2002. Dictionnaire de sol.4eme Ed. Lavoisier, Paris, 575.

**McHardy, A.C. et Rigoutsos, I.** 2007. What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. *Curr Opin Microbiol.* 10: 499-503.

**Meikle, R. W. et Youngson, C. R.** 1978. «The hydrolysis rate of chlorpyrifos, O,O-diethyl O- (3,5,6 trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate and its methyl analog, chlorpyrifos methyl, in dilute aqueous solution,» *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 7, pp. 13-22.

**Melgarejo, M. P. et Martínez, V. R.** 1992. El Granado. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.

**Merhi, M.** 2008. Doctorat de l'université de Toulouse 140 p.

**Meyer, A., Chrisman, J., Moreira, J.C. and Koifman, S.** 2003. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res.* 93: 264-271.

**Mietinnen, I., Martikainen, P., Vartiainen, T. et Lötjönen, S.** 1993. « Biochemeical and chemical degradation of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in surface and drinking water,» *Chemosphere* , vol. 27, pp. 1707-1718.

**Montoya, J.C., Costa, J.L., Liedl, R., Bedmar, F. et Daniel, P.** 2006. Effects of soil type and tillage practice on atrazine transport through intact soil cores. *Geoderma*, **137**, 161-173.

**Mora, M., Hermosin, M.C. et Cornejo, J.** 1997. Mobility of terbacil as influenced by soil characteristics. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **66**, 149 -161.

**Morel, R.** 1996. Les sols cultivés. Lovoisier. 2emeEd. Paris, 378p.

**Mortland, M. M.** 1970. «Clay-organic complexes and interactions,» *Advan. Agron.*, vol. 22, pp. 75-117.

- Mortlock, R.P.** 1981. Regulatory mutations and the development of new metabolic pathways by bacteria. *Evol. Biol.* (14), 205-267.
- Mouchacca, J.** 1982. Etude analytique de la mycoflore de quelques sols de régions arides de l'Egypte. (In French.) M.S. thesis. Univ. of Sciences, Paris, France.
- Mougin, C., Laugero, C., Asther, M., Dubroca, J., Frasse, P. et Asther, M.** 1994. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 705-708
- Mougin, M.** 1996. Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques. L'intérêt des champignons filamenteux. *Courrier de l'environnement*. INRA.
- Moussaoui,** 2001. Utilisation, Evaluation et Impacts des pesticides en Algérie - Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement école Nationale Polytechnique
- Muir, D.** 1991. « Dissipation and transformation of pesticides in water and sediment,» chez *Environmental Chemistry of Herbicides*, CRCP, Inc., pp. 1-87.
- Muller, K., Magesan, G.N. et Bolan, N.S.** 2007. A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **120**, 93-116.
- Nam, K., Chung, N. et Alexander, M.** 1998. «Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene,» *Environmental Science & Technology*, vol. 32, n°23, pp. 3785-3788.
- Nespiak, A.** 1970. Quelques observations sur les champignons isolés de l'intérieur des grottes polonaises dans les montagnes Tatras Sudetes. (In French.) *Schweiz. Z. Pilzk.* 48:107-110.
- Neumann, M., Liess, M., et 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.
- Nolan, B.T., Dubus, I., Surdyk, N., Fowler, H.J., Burton, A., Hollis, J.M., Reichenberg, S. et Jarvis, N.J.** 2008. Identification of key climatic factors regulating the transport of pesticides in leaching and to tile drains. *Pest Manag. Sci.*, **64**, 933-944.
- Papa, E., Castiglioni, S., Gramatica, P., Nicolayenko, V., Kayumov, O. et Calamari, D.** 2004. Screening the leaching tendency of pesticides applied in the Amu Daria Basin (Uzbekistan). *Wat. Res.*, **38**, 3485-3494.
- Peterson, S.W.** 2006. Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8.
- Pignatello, J.J. et Huang, L.Q.** 1991. Sorptive reversibility of atrazine and metolachlor residues in field soil samples. *J. Environ. Qual.*, **20**, 222-228.
- Pimentel, D. et Levitan, L.** 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *BioScience*, 36, 86-91.
- Pitt, J. I.** 1973. An appraisal to identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* 65 : 1135 - 1157.

- Pitt, J.I.** 1979 The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states: *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 p.
- Pivato, B., P. Offre, S. Marchelli, B. Barbonaglia, C. Mougel, P. Lemanceau, et G. Berta.** 2009. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19: 81-90
- Pons, Z., et Bariusso, E.** 1998. Fate of metsulfuronmethyl in soils in relation to pedo-climatic conditions. *Pestic. Sci.* 53: 311- 323.
- Pot, V., Simunek, J., Benoit, P., Coquet, Y., Yra, A. et Martinez-Cordon, M.J.** 2005. Impact of rainfall intensity on the transport of two herbicides in undisturbed grassed filter strip soil cores. *J. Contam. Hydrol.*, **81**, 63-88.
- Prasad, S. S.** 1992. Predicting the environmental distribution of compounds with unknown physicochemical properties from known pesticides properties. *J. AOAC Intern.* 75 (5), 916-924.
- Projet ArtWet. 2010.** (« Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution and phytoremediation in artificial wetland ecosystems ») est un projet européen life environment (référéncé LIFE 06 ENV/F/000133), qui a débuté le 1er octobre 2006 et s'est achevé le 30 septembre 2010.
- Pusino, A., Braschi, I., Petretto, S. et Gessa, C.** 1999. Photodegradation of herbicide triasulfuron. *Pestic. Sci.* 55, 479-481.
- Raachi, M.L.** 2007. Etude préalable pour une gestion intégrée des ressources du bassin versant du lac Tonga au Nord- Est Algérien. Mémoire de magister, Université du Québec à Montréal. 167p.
- Ranzoni, F. V.** 1968. Fungi isolated in culture from soils of the sonorân desert. *Mycologia* 60,356-371.
- Rappe, M.S. et Giovannoni, S.J.** 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 57: 369-394.
- Rapilly, F.** 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphytes.* INRA. Vol. 19, 102pp.
- Reiser, R. W., Barefoot, A. C., Dietrich, R. F., Fogiel A. J., Johnson, W. R. et Scoot M. T.** 1991. Application of microcolumn liquid chromatography- continous-flow fast atom bombardment mass spectrometry in environmental studies of sulfonylurea herbicides. *J. Chromatogr.* 554, 91-101.
- Reiss, E., Tanaka, K., Bruker, G., Chazalet, V., Coleman, D., Debeaupuis, J.P., Hanazawa, R., Latgé, J.P., Lortholary, J., Makimura, K., Morrison C.J., Murayama, S.Y., Naoe, S., Paris, S., Sarfati, J., Shibuya, K., Sullivan, D., Uchida, K., Yamaguchi, H.** 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections, 36 (1), 249-257
- Renaud, F.G., Brown, C.D., Fryer, C.J. et Walker, A.** 2004. A lysimeter experiment to investigate temporal changes in the availability of pesticide residues for leaching. *Environ. Pollut.*, **131**, 81-91.

- Revitt, D., Ellis, J. et Llewellyn, N.** 2002. Seasonal removal of herbicides in urban runoff. *Urban Water*. 4: 13-19.
- Reynier, A.** 2011. Manuel de viticulture: Guide technique du viticulteur
- Rillig, M.C. et Mummey, D.L.** 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171: 41-53.
- Robert, M. et Berthelin, J.** 1986. Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. in P.M. Huang et M. Schnitzer (eds). Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. S.S.S.A. spec. Publ., 17, Madison. 453-495.
- Rodier, J.** (1978). L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer, 6ème édition.
- Rodier, J.** 2005. Analyse de l'Eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 8<sup>ème</sup> édition. Dunod. Paris, 1384p.
- 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.
- Roquebert, M.-F.** 2002. Moisissures contaminant les biens culturels. Collection Patrimoine. Heritage Series.
- Rouard, N., Dictor, M.C., Chaussod, R. et Soulas, G.** 1996. Side-effect of herbicides on the size and activity of the soil microflora : DNOC as attest case. *Eur. J. Soil Sci*, sous presse.
- Roulier, S., Baran, N., Mouvet, C., Morvan, X., Stenemo, F., Albertchsen, H., Clausen, L. et Javis, N.** 2006. Controls on atrazine leaching through a soil-unsaturated fractured limestone sequence at Brévilles, France. *J. Contam. Hydrol.*, **84**, 81-105.
- Rouchaud, J., Neus, O. et Hermann, O.** 1997. Influence of application rate and manure amendment on chloridazon dissipation in the soil. *Weed Res.* 37: 121–127.
- Russell, J. D., Cruz, M. I. et White, J. L.** 1968. «The adsorption of 3-aminotriazole by montmorillonites,» *J. Agric. Food Chem.*, vol. 16 , n°1, pp. 21-24.
- Sabadie, J.** 1990. Chemical acidic hydrolysis of metsulfuron-methyl. *Weed Res.* 30, 413-419.
- Sabadie, J.** 1991. Alcoholysis and acid chemical hydrolysis of chlorsulfuron. *Weed Res.* 31, 309-316.
- Sabadie, J.** 1992. Degradation of the herbicide chlorsulfuron on various dry minerals. *Weed Res.* 32, 429-436.
- Sakaliene, O., Papiernik, S.K., Koskinen, W.C. et Spokas, K.A.** 2007. Sorption and predicted mobility of herbicides in Baltic soils. *J. Environ. Sci. Health*, **42**, 641 - 647.
- Sánchez-Camazano, M. et Sánchez-Martín, M.** 1991. « Hydrolysis of azinphos methyl induced by the surface of smectites,» *Clays & Clay Minerals* , vol. 39 , n°6, pp. 609-613.

- Samak, 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, 77p.
- Schiff, K., Bay, S., et Stransky, C.** 2002. Characterization of stormwater toxicants from an urban watershed to freshwater and marine organisms. *Urban Water*. 4: 215-227.
- Schneiders, G. E., Koeppe, M. K., Naidu, M. V., Horne, P., Brown, A. M. et Mucha C. F.** 1993. Fate of Rimsulfuron in the Environment. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2404- 2410.
- Schroll, R., Becher, H. H., Dorfler, U., Gayler, S., Grundmann, S., Hartmann H. P. et Ruoss, J.** 2006. «Quantifying the effect of soil moisture on the aerobic microbial mineralization of selected pesticides in different soils,» *Environmental Science & Technology*, vol. 40, n°10, pp. 3305-3312.
- Schulz, R.** 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review. *J Environ Qual.* 33(2): 419-448.
- 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.
- Scrano, L., Bufo, A. S., Perucci, P., Méallier P. et Mansour M.** 1999. Photolysis and hydrolysis of rimsulfuron. *Pestic. Sci.* 55, 955-961.
- Semadi, A. et Decormis, L.** 1986. Influence de la pollution atmosphérique fluorée sur la végétation de la région de Annaba (Algérie). *Pollution Atmosphérique.* 109p.
- Senesi, N., D'Orazio, V. et Miano, T.M.** 1995. Adsorption mechanisms of s-triazines and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*, 66, 273-283.
- Senesi, N.** 1993. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter: Molecular and mechanistic aspects. *Aatoasi series.* 32: 47-74.
- Senesi, N.** 1992. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Tot. Environ.*, 123-124, 36-76.
- Shendure, J. et Ji, H.** 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 26: 1135-1145.
- Shaw, L. J., Beaton, Y., Sousa, S., Glover, L. A., Killham, K. et Meharg, A. A.** 2002. «Mineralisation of 2,4-dichlorophenol and glucose placed into the same or different hydrological domains as a bacterial inoculant,» *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 34, n°4, pp. 531-539.
- Shirzadi, A., Simpson, M.J., Kumar, R., Baer, A.J., Yunping, X. et Simpson, A.J.** 2008. Molecular interactions of pesticides at the soil-water interface. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 5514-5520.
- Si, Y., Zhang, J., Wang, S., Zhang, L. et Zhou, D.** 2006. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethametsulfuron-methyl in acidic soils in China. *Geoderma*, 130, 66-76.

**Siczec, A., Kotowska, U., Liepec, J. et Nosalewicz, A.** 2008. Macro-porosity and leaching of atrazine in tilled and orchard loamy soils. *Chemosphere*, 70, 1973-1978.

**Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W.N. et de Bont, J.A.M.** (1992) Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J Bacteriol* 174: 2986–2992.

**Sikkema, J., de Bont, J.A.M. et Poolman, B.** (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59: 201–222.

**Simagref.** 2005. "Les pesticides dans l'eau potable". Direction générale de la santé.

**Simpson, A.G.B., et Roger, A.J.** 2004. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology* 14, R693-696.

**Simpson, A.G.B., et Roger, A.J.** 2002. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Current Biology* 12, R691-R693.

**Singh BK, Munro S, Potts J & Millard P.** 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl. Soil Ecol.* 36: 147-155.

**Singh, BK., Dawson, LA, McDonald, CA. et Buckland, SM.** 2009. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *App. Soil Ecol.* 41: 239-248.

**Singles, K. S., Dean, G. M., Kirkpatrick, D. M., Mayo, B. C., Langford-Pollard, A. D., Barefoot, A. C. et Bramble, F. Q. Jr.** 1999. Fate and behaviour of flupyr-sulfuron-methyl in soil and aquatic systems. *Pestic. Sci.* 55, 288-300

**Skopp, J., Jawson, M. D. et Doran, J. W.** 1990. «Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content» *Soil Science Society of America Journal*, vol. 54, n°6, pp. 1619-1625.

**Smith, A. E.** 1995. A Review of analytical Methods for Sulfonylurea Herbicides in Soil. *Intern. J. environ. Anal. Chem.* 59, 97-106.

**Smolen, J. et Stone, A.** 1998. «The Effect of Metal Oxide Surfaces on the Hydrolysis of Paraoxon and the Thionate and Oxonate Esters of Chlorpyrifos Methyl, » *Soil Sci. Soc. Am.J.*, vol. 62, pp. 636-643.

**Soltner, D.** 2005. Les bases de production végétale. 24 e Edition. Tome I, paris, 472 p.

**Soltner, D.** 1981. Les bases de la production végétale. Tome 1, le sol. Collection sciences et techniques agricoles 456p.

**Somasundaram, H. et Coast, K.** 1990. Pesticides transformation products in the environment. *ACS, symposium. Series.* 459: 2-9.

**Song, N.H., Chen, L. et Yang, H.** 2008. Effect of dissolved organic matter on mobility and activation of chlorotoluron in soil and wheat. *Geoderma*, 146, 344-352.

**Soulas, G.** 1985. La dégradation des pesticides dans le sol. Aspect microbiens et cinétiques. Science de sol 1985/2 – pp. 43 - Plaisir-France.

**Soulas, G.** 1996-c. Pesticides : New Trend in Side-effect Testing. In : Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 2<sup>nd</sup> INT. Symp. On Environnement Aspect Of Pesticide Microbiology, Setac-Europe, 12-21.

**Spencer, W.F. et Cliath, M.M.** 1990. Movement of pesticides from soil to the atmosphere. In D.A. Kurtz : Long range transport of pesticides. Lewis publishers, Chelsea, Michigan, USA, 1-16.

**Sposito, G.** 1989. The surface chemistry of soils. Ed. Oxford University Press. New York, 234 p.

**Steiman, R., Guiraud, P., Sage, L. et Seigle-Murandi, F.** 1997. Soil mycoflora from the Dead Sea Oases of Ein Gedi and Einot Zuqim. Antonie van Leeuwenhoek 72:261–270.

**Steiman, R., Guiraud, P., Sage, L., Seigle-Murandi, F. et Lafond, J.L.** 1995. Mycoflora of soil around the Dead Sea. I. Ascomycetes (including *Aspergillus* and *Penicillium*), basidiomycetes, zygomycetes. Syst. Appl. Microbiol. 18:310–317.

**Streit, W.R. et Schmitz, R.A.** 2004. Metagenomics--the key to the uncultured microbes. Curr Opin Microbiol. 7: 492-498.

**Strek, H. J.** (1998-a. Fate of Chlorsulfuron in the Environment. 1. Laboratory Evaluations. Pestic. Sci. 53, 29-51.

**Strek, H. J.** 1998-b. Fate of Chlorsulfuron in the Environment. 2. Field Evaluations. Pestic. Sci. 53, 52-70.

**Taylor, A.W.** 1995. The volatilization of pesticide residues. In : Environmental behaviour of agrochemicals. Vol. 9. Roberts T.R., Kearney P.C., (Eds.), Wiley J & Sons Ltd, Chichester, UK, p. 418.

**Taylor, A.W. et Spencer, W. F.** 1990. Volatilization and vapor transport processes. In Pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America Book Series, n°2, Madison, WI, USA, 213-269.

**Thirunarayanan, K., Zimdahl, R. L. et Smika, D. E.** 1985. Chlorsulfuron adsorption and degradation in soil. Weed Sci. 33, 558-563.

**Thornton, S.F., Bright, M.I., Lerner, D.N. et Tellman, J.H.** 2000. Attenuation of landfill leachate by UK Triassic sandstone aquifer materials. 2. Sorption and degradation of organic pollutants in laboratory columns. *J. Contam. Hydrol.*, **43**, 355-383.

**Topp, E., Zhu, H., Nour, S.M., Houot, S., Lewis, M. et Cuppels, D.** 2000. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. Applied and Environmental Microbiology 66, 2773–2782.

**Trubey, R. K., Bethem, R. A. et Peterson, B.** 1998. Degradation and Mobility of Sulfometuron-methyl (Oust Herbicide) in Field soil. J. Agric. Food Chem. 46, 2360-2367.

- UIPP.** 2009. Union des industries de la protection des plantes. Rapport d'activité 2008-2009. 32 p.
- U.S.S.L.** 1954. (United State Salinity Laboratory Staff): Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. US Department of Agriculture, Handbook n°60, U. S. Gov. Print. Office, Washington DC, 1954.
- Van Beinum, W., Beulke, S., Fryer, C.J. et Brown, C.** 2006. Lysimeter experiment to investigate the potential influence of diffusion-limited sorption on pesticide availability for leaching. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9152-9159.
- Veillerette, F.** 2001. Pesticides, 'le piège se referme'. ... Pour la première fois, en août 2001
- Vicari, A., Zimdahl, R. L., Cranmer, B. K. et Dinelli, G.** (1996). Primisulfuron and rimsulfuron degradation in aqueous solution and adsorption in six Colorado soils. *Weed Sci.* 44, 672-677
- Vieublé-Gonod, L., Chenu, C. et Soulas, G.** 2003. «Spatial variability of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) mineralisation potential at a millimetre scale in soil,» *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 35, n° 13, pp. 373-382.
- Vitousek, PM. et Howarth, R.W.** 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*. 13: 87-115.
- Walker, A. et Brown, P. A.** (1983). Measurement and prediction of chloresulfuron persistence in Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 365-372.
- Walker, A., Cotterill, E. G. et Welch, S. J.** 1989. Adsorption and degradation of chloresulfuron and metsulfuron-methyl in soils from different depths. *Weed Res.* 29, 281-287
- Walker, A., Rodriguez-Cruz, M.S. et Mitchell, M.J.** 2005. Influence of ageing of residues on the availability of herbicides for leaching. *Environ. Pollut.*, **133**, 43-51.
- Walkley, A. et Black, C. A.** 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposal modification of the chromic acid titration method, *Soil Science*, Volume 37, 1934, p. 29-38.
- Weber, W.J., Warren, R.L., Swain, L.R. et Yelverton, F.H.** 2007. Physicochemical property effects of three herbicides and three soils on herbicides mobility in field lysimeters. *Crop Prot.*, 26, 299-311.
- Wehtje, G. R., Dickens, J. W., Wilcut, B. F. et Hajek.** 1987. Sorption and mobility of sulfometuron and imazapyr in five Alabama soils. *Weed Sci.* 35, 858-864.
- Whitman, WB., Coleman, D.C. et Wiebe, W.J.** 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 6578-6583.
- Wietersen, R.C., Daniel, T.C., Fermanich, K.J., Girard, B.D., Mcsweeney, K. et Lowery, B.** 1993. Atrazine, alachlor, and metolachlor mobility through two sandy Wisconsin soils. *J. Environ. Qual.*, **22**, 811-818.

**Wolf, N.L.** 1990. Abiotic transformation of pesticides in naturel water and sediment. In: pesticides in the soil environnement: Processes, impacts and modiling. ChengH.H. Ed. SSSA Madison, Wisconsin Book, series 2 : 93-104

**Wong, S.L.** 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 6: 517-522.

**Zhang, H., Chen, W. et Huang, C.** 2008. « Kinetic modeling of oxidation of antibacterial agents by manganese oxide,» *Environmental Science & Technology* , vol. 42, n°15, p. 5548–5554.

**Zhou, Q.F., Li, M.Y., et Li, C.W.** 2009. Cloning and expression of a novel insulin-releasing peptide, brevinin-2GU from *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng.* 107: 460-463.

**Zouaidia, H.** 2006. Bilan des incendies de forêts dans l'Est Algérien cas de Mila, Constantine, Guelma, Souk Ahras. Memoire de magister, Université M'entourai. Constantine. 126p.