

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE



LABORATOIRE DES ANALYSES BIOGÉOCHIMIQUES

ET ÉCOLOGIQUES DES MILIEUX AQUATIQUES

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT 3^{ème} Cycle en

MICROBIOLOGIE

Thème :

**Isolement et Identification des Microorganismes
Intervenant dans la Bioremédiation et la Dépollution Des
Sols Contaminés par Les Pesticides**

Présentée par :

Mlle SLIMANI Hanane

Directrice de thèse : Mme. ABDI Akila

Professeur, Université BADJI Mokhtar-Annaba

Co-directeur de thèse : Mr. BRANES Zidane

Professeur, Université BADJI Mokhtar-Annaba

DEVANT LE JURY

Présidente : Mme. GACEMI KIRANE Djamila

Professeur, Université BADJI Mokhtar-Annaba

Examinatrice : Mme. CHETTIBI Houria

Professeur, Université BADJI Mokhtar-Annaba

Examinatrice : Mme. FEKNOUS Nesrine

MCA, Université Chadli Bendjedid-El Tarf

Année Universitaire : 2021-2022

Remerciements

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans la collaboration de plusieurs personnes et organismes, à qui je voudrais toute ma gratitude.

*Mes plus vifs remerciements vont à Mes deux Directeurs de thèse, **Madame ABDI Akila** et **Monsieur BRANES Zidane**, Professeurs à l'université BADJI Mokhtar d'Annaba, pour leurs gentillesse, leurs conseils avisés, et pour le temps qu'ils ont consacré à diriger cette thèse, en particulier **Monsieur Branès Zidane** pour son orientation et suivie durant toutes ces années malgré ses nombreuses responsabilités.*

Veillez trouver l'expression de mes sincères remerciements.

J'ai eu la chance d'être votre étudiante pendant mon parcours universitaire.

*Je témoigne ma reconnaissance à **Madame GACEMI KIRANE Djamila**, Professeur à l'université BADJI Mokhtar d'Annaba, pour m'avoir fait le grand honneur de présider le jury.*

*Je remercie vivement **Madame CHETTIBI Houria**, Professeur à l'université d'Annaba et **Madame FEKNOUS Nesrine**, Maitre de Conférences -A- à l'université Chadli Bendjedid d'El Tarf, pour m'avoir fait honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier vivement le Professeur **Christian AMBLARD**, Directeur de recherche au CNRS et **Isabelle BATISSION** Maitre de Conférences -A- au laboratoire Microorganismes Génome et Environnement (LMGE) de l'Université Clermont Auvergne, France pour l'identification moléculaire des souches bactériennes isolées.*

*Je tiens également à remercier le Professeur **Eric CHABRIERE**, Directeur de recherche de l'équipe Biocristallographie, biotechnologie et enzymologie, Faculté de Médecine, Université d'Aix Marseille, France d'avoir m'accueilli dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité d'approfondir mes connaissances en biologie moléculaire.*

Je tiens aussi à remercier les doctorants et l'ensemble du personnel de laboratoire de l'hôpital Méditerranée Infection d'Aix Marseille.

*Nous tenons aussi à remercier tout particulièrement Professeur **BENSLAMA**, ainsi que les doctorantes du Laboratoire Sol et Développement, Université Badji Mokhtar d'Annaba, qui ont participé à la réalisation de ce travail en nous montrant les techniques et nous fournissons l'équipement et réactifs qui nous ont servis à la réalisation de l'analyse pédologique.*

*Un immense merci à mes enseignants **Madame OUANAS Souheila** et **Monsieur CHEKIREB Djamel**, Professeurs à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba et mes chères collègues du Département de Biochimie pour leur aide, soutien amical et encouragements durant la période de réalisation de ce travail.*

Enfin, je tiens à exprimer mes sentiments les plus respectueux et ma profonde reconnaissance à ma famille :

***Ma mère ...** Je sais qu'un simple merci ne suffit pas pour t'exprimer toute ma gratitude, et mon amour. Je te remercie pour le soutien inconditionnel et moral, je te remercie d'être toujours là pour moi. Que dieu te garde pour nous.*

***Mes deux sœurs Aziza et Imen, mes frères Djamel, Abd el Ghani, Azzedin, Abd el Hamid et Makhlouf** pour leur présence, leur aide et leur compréhension et grâce à qui j'ai pu mener à bien ce travail que Dieu me les*

protège. Recevez cette thèse en guise de remerciements et témoignage de mon amour.

Enfin, je dédie cette thèse ... A la mémoire de Mon héro ... Mon très Cher PAPA ... tu es parti en laissant un grand vide dans ma vie et un grand chagrin ... si seulement tu étais à mes cotés pour partager la joie de ce succès avec moi, mais je suis certaine que tu aurais été très fier de ta fille qui a pu réalisée ton rêve ...

Cher PAPA, après toutes ces années, je suis devenue Docteur.

Résumé

Ces dernières décennies l'Algérie a utilisé d'énormes quantités de pesticides. Cet usage incontrôlé serait à l'origine de plusieurs problèmes environnementaux et de santé publique. L'accumulation des pesticides ainsi que leur rémanence dans les sols serait à l'origine de l'émergence de souches ayant la capacité de biodégrader ces polluants. L'objectif de notre étude était d'isoler et d'identifier des microorganismes autochtones 'telluriques' intervenant dans la bioremédiation des sols pollués par les produits phytosanitaires. Ces souches ont été isolées à partir de trois terres agricoles situées à l'est Algérien, et ayant subies régulièrement des traitements par différentes familles de pesticides. Quarante-huit souches obtenues, réparties entre Gram positif et Gram négatif, ont fait l'objet de test de croissance sur gélose minérale dont les quatre substances actives étaient l'unique source de carbone et énergie. Les souches les plus performantes, au nombre de douze, montraient différentes allures de développement en milieu minéral liquide, reflétant ainsi leur capacité à métaboliser efficacement les pesticides étudiés dans différents intervalles de temps. Nos bactéries semblent être très efficaces dans la bioremédiation des sites contaminés par ces xénobiotiques.

Les isolats sélectionnés ont été identifiés par les techniques microbiologiques standardisées, par MALDI-TOF-MS, ainsi que par séquençage du gène de l'ADNr 16S. Une analyse par le logiciel MEGA 5.0 a permis de générer une matrice de distance élaborée par comparaison de séquences d'ADN selon la méthode Neighbors-Joining. La matrice est ensuite représentée sous forme d'un arbre phylogénétique. Des analyses de bootstrap avec 1000 itérations ont été effectuées pour vérifier la robustesse de l'arbre.

Mots clés : *Identification, Souches de bactéries, Bioremédiation, Dépollution, Pesticides, Sol, Croissance.*

ملخص

في العقود الأخيرة ، استخدمت الجزائر كميات هائلة من المبيدات. يُعتقد أن هذا الاستخدام غير المنضبط هو سبب العديد من المشكلات البيئية والصحية العامة. الهدف من دراستنا هو عزل وتحديد كائنات حية دقيقة ترابية أصلية من أجل المشاركة في المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بمنتجات الصحة النباتية. سيكون تراكم المبيدات و ثباتها في التربة هو السبب في ظهور سلالات لديها القدرة على التحليل البيولوجي لهذه الملوثات. تم عزل هذه السلالات من ثلاث أراضي زراعية تقع بشرق الجزائر وخضعت لمعالجات منتظمة مع عائلات مختلفة من المبيدات. خضعت 48 سلالة تم الحصول عليها، مقسمة بين موجبة الجرام وسالبة الجرام، لاختبار النمو على وسط غذائي معدني حيث كانت المواد الفعالة الأربعة هي المصدر الوحيد للكربون والطاقة. أظهرت أفضل السلالات أداءً، وهي اثني عشر سلالة، معدلات نمو مختلفة في الوسط المعدني السائل، مما يعكس قدرتها على التمثيل الغذائي الفعال للمبيدات المدروسة في فترات زمنية مختلفة. يبدو أن بكتيريا التي قمنا بعزلها فعالة للغاية في المعالجة الحيوية للمواقع الملوثة بهذه المواد الحيوية الضارة.

تم التعرف على السلالات المعزولة المختارة من خلال التقنيات الميكروبيولوجية المعيارية ، بواسطة MALDI-TOF MS، وكذلك بواسطة التسلسل الجيني ADNr 16S. أتاح التحليل بواسطة برنامج MEGA 5.0 إمكانية إنشاء مصفوفة مسافة تم تطويرها من خلال مقارنة تسلسل الحمض النووي وفقاً لطريقة Neighbors-Joining. ثم يتم تمثيل المصفوفة في شكل شجرة النشوء والتطور. تم إجراء تحليلات Bootstrap مع 1000 تكرار للتحقق من متانة الشجرة.

الكلمات المفتاحية التشخيص ، سلالات البكتيريا ، المعالجة الحيوية ، إزالة التلوث ، مبيدات الآفات ، التربة ، النمو.

Abstract

In recent decades Algeria has used huge quantities of pesticides. This uncontrolled use is believed to be the cause of several environmental and public health problems. The accumulation of pesticides as well as their persistence in the soil would be at the origin of the emergence of strains having the capacity to biodegrade these pollutants. The objective of our study was to isolate and identify autochthonous 'telluric' microorganisms involved in the bioremediation of soils polluted by phytosanitary products. These strains were isolated from three agricultural lands located in eastern Algeria, and having regularly undergone treatment with different families of pesticides. Forty-eight strains obtained, divided between Gram positive and Gram negative, were subjected to growth test on mineral agar whose four active substances were the only source of carbon and energy. The best-performing strains, twelve in number, showed different growth rates in liquid mineral medium, thus reflecting their ability to effectively metabolize the pesticides studied in different time intervals. Our bacteria seem to be very efficient in the bioremediation of sites contaminated by these xenobiotics.

The selected isolates were identified by standardized microbiological techniques, by MALDI-TOF-MS, as well as by 16S rDNA gene sequencing. An analysis by the MEGA 5.0 software made it possible to generate a distance matrix elaborated by comparison of DNA sequences according to the Neighbors-Joining method. The matrix is then represented in the form of a phylogenetic tree. Bootstrap analyzes with 1000 iterations were performed to check the robustness of the tree.

Keywords: *Identification, Bacteria strains, Bioremediation, Depollution, Pesticides, Soil, Growth.*

Liste des abréviations et Acronymes

ACh	Acétylcholine
OMS	L'Organisation Mondiale de la Santé
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ABA	Abamectine
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
ARNr16S	Gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
BDA	Biodégradation Accélérée
BET	Bromure d'éthidium
BGN	Bacilles à Gram négatif
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BTS	Bacterial Test Standard
CM	Chlorpyrifos Méthyl
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DT 50	Temps de demi-vie du pesticide
Ecm	Enzymes impliquées dans le cométabolisme
EDS	Eau Distillée Stérile
Emd	Enzymes impliquées dans le métabolisme direct
Fh	Facteur d'humidité du sol
GN	Gélose nutritive

HCCA	Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid
HCH	Hexachlorocyclohexane
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISO	International Organisation for Standardization
ITCMI	L'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles
kHz	Kilohertz
LB	Lauria Bertani
m/z	ratio masse/charge d'un ion
MALDI-TOF-MS	Matrix Associated Lazer Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry
MBC	Méthyl Benzimidazol-2-yl Carbamate
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MO	Matière Organique
mS	milli siemens
Naf	Fluorure de Sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
rpm	rotation par minute
ST	Sables totaux
TBE	Tris-Borate-EDTA
TCP	3, 5, 6-TriChloroPyridinol
TFA	Trifluoracetic acid
TM	Thiophanate Méthyl

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Devenir des pesticides dans l'environnement après application	08
2	Comparaison entre la biodégradation des pesticides par métabolisme direct et la biodégradation par cométabolisme	11
3	Localisation des stations d'échantillonnage	23
4	Analyse MALDI-TOF	34
5	Protocole de la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS	37
6	L'extracteur EZ1 XL	38
7	L'ordre de positionnement des éléments de l'extracteur EZ1	39
8	Principe de l'amplification par PCR	43
9	Visualisation des bandes d'ADN sous un trans-illuminateur UV	43
10	Aspect des cultures sur MSM en présence des pesticides comme unique source de carbone et d'énergie	59
11	Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour le CM, (a) : souche S17, (b) : souche MC09, (c) : souche SDP1, (d) : ANT14	62
12	Aspect microscopique des souches sélectionnées pour le CM, après coloration de Gram, (a) : souche S17, (b) : souche MC09, (c) : souche SDP1, (d) : ANT14	63
13	Aspect colonies bactériennes des souches sélectionnées pour l'ABA sur la gélose COS, (a) : souche S04, (b) : souche C10, (c) : souche KP15, (d) : souche KP24	64
14	Aspect microscopique des souches sélectionnées pour l'ABA, après coloration de Gram, (a) : souche S04, (b) : souche C10, (c) : souche	65

	KP15, (d) : souche KP24	
15	Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour la deltaméthrine sur la gélose COS, (a) : souche B02, (b) : souche MC01	66
16	Aspect microscopique des souches sélectionnées pour la deltaméthrine, après coloration de Gram, (a) : souche B02, (b) : souche MC01	66
17	Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour le TM, (a) : souche B05, (b) : souche ANT02	67
18	Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour le TM sur le milieu LB, (a) : souche B05, (b) : souche ANT02	67
19	Résultats obtenus par les galeries biochimiques, (a) : API 20 E ; (b) : API 20 NE ; (c) : API Staph	68
20	Résultats de l'identification bactérienne obtenus avec le logiciel API Web (version 2011), (a) : API 20 E ; (b) : API 20 NE ; (c) : API Staph	69
21	Relations évolutives entre les espèces intéressantes et l'ensemble des taxons identifiés	73
22	Croissance des souches de <i>P. mediterranea</i> isolate strain PSB47 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie	75
23	Croissance des souches de <i>P. migulae</i> strain OKB3 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie	75
24	Croissance des souches de <i>Pseudomonas</i> sp. OX1 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie	76
25	Croissance des souches de <i>Pseudomonas</i> sp. clone 6A4 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie	76
26	Croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> strain 261ZG8 en présence de 25 mg/l de deltaméthrine comme seule source de carbone et d'énergie	79
27	Croissance de <i>Bacillus</i> sp. strain GL5 (1) en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie	80

28	Croissance de <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> strain WJB99 en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie	80
29	Croissance de <i>Bacillus</i> sp. strain GL5 (2) en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie	81
30	Croissance de <i>Bacillus</i> sp. H1-80 en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie	81
31	Croissance de <i>Bacillus</i> sp. strain JDMASP42 en présence de 50 mg/l de TM comme seule source de carbone et d'énergie	83
32	Croissance d' <i>Arthrobacter</i> sp. dv7 en présence de 50 mg/l de TM comme seule source de carbone et d'énergie	84
33	Croissance d' <i>Achromobacter marplatensis</i> strain EY-T10 en présence de 25 mg/l de deltaméthrine comme seule source de carbone et d'énergie	85

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Substances actives suspectes dans le cancer du sein	21
2	La gamme de pH des sols	25
3	Echelle de la texture proposée par Gauchers	26
4	Classification des sols d'après leurs teneurs en matière organique	27
5	Echelle de salinité du sol	28
6	Les résultats d'identification sous Biotyper	37
7	Composition du Mix de la PCR standard	41
8	Programme PCR standard	42
9	Composition du Mix de la PCR BigDye	44
10	Programme de la PCR BigDye	44
11	Propriétés physicochimiques chlorpyrifos-méthyl	47
12	Propriétés physicochimiques du deltaméthrine	48
13	Propriétés physicochimiques de l'abamectine	49
14	Propriétés physicochimiques du thiophanate-méthyl	50
15	Composition du milieu minéral	51
16	Résultats des analyses physicochimiques des échantillons de sols	53
17	Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de	55

	différentes doses de chlorpyrifos méthyl comme seule source de carbone et d'énergie	
18	Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses de deltaméthrine comme seule source de carbone et d'énergie	56
19	Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses de thiophanate méthyl comme seule source de carbone et d'énergie	57
20	Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses de thiophanate méthyl comme seule source de carbone et d'énergie	58
21	Description macroscopiques et microscopiques des souches intéressantes	60
22	Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF (les cases en rouge représentent le témoin négatif)	70
23	Résultat des identifications biochimiques et MALDITOF-MS	70

TABLE DES MATIÈRES

Résumés

Liste d'abréviation et acronymes

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1. Les pesticides

4

2. Classification des pesticides

4

2.1. Les pesticides organiques

5

2.1.1. Les organophosphorés

5

2.1.2. Les organochlorés

6

2.1.3. Les carbamates

6

2.2. Les pesticides inorganiques

7

2.3. Les biopesticides

7

3. Devenir des pesticides dans l'environnement

7

3.1. Dégradation des pesticides

9

3.1.1. Dégradation biologique 'Biodégradation' des pesticides

9

3.1.1.1. Le métabolisme direct

10

3.1.1.2. Le cométabolisme

11

3.1.2. Facteurs agissant sur la biodégradation

12

3.1.2.1. Propriétés physico-chimiques des pesticides

12

3.1.1.3. La conjugaison et la condensation

12

3.1.2.2. Structure du sol, distribution spatiale des microorganismes et temps de séjour

13

3.1.2.3. Facteurs environnementaux

13

3.1.3. Dégradation abiotique	13
3.1.3.1. Hydrolyse	14
3.1.3.2. Les réactions redox	14
3.1.3.3. Réactions avec des composés organiques	15
3.1.4. Photodégradation des pesticides	15
4. Risques environnementaux liés à l'utilisation des pesticides	16
4.1. Risques de pollution des sols	16
4.2. Risques de pollution des eaux	17
4.3. Risques écotoxicologiques	19
4.4. Risques toxicologiques	19
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	
1. Sites d'études et échantillonnage	22
2. Détermination des paramètres physico-chimiques des stations d'études	24
2.1. La température	24
2.2. pH eau	24
2.3. pH KCl	25
2.4. Texture et humidité	25
2.5. Carbone et Matière organique	26
2.6. Conductivité électrique	27
2.7. Granulométrie	28
3. Analyses microbiologiques	29
3.1. Isolement des microorganismes telluriques	29
3.2. Identification de souches purifiées	30
3.2.1. Etude des caractères cultureux	30
3.3.2. Coloration de Gram	31
3.3.3. Etude des caractères biochimiques	31
3.3.3.1. Test catalase	31
3.3.3.2. Test de l'oxydase	32
3.3.3.3. Identification par les micro-galeries : API système (bio-Mérieux)	32
a. API 20E	32

b. Api 20NE	32
c. Api Staph	33
3.3.3.4. Conservation des souches	33
4. Identification des souches par MALDI-TOF-MS	33
4.2. Réalisation de l'analyse	34
4.2.1. Nettoyage de la cible	34
4.1. Principe de la méthode	34
4.2. Réalisation de l'analyse	34
4.2.1. Nettoyage de la cible	34
4.2.2. Préparation de la matrice MALDI	35
4.2.2.1. Réactifs nécessaires	35
4.2.2.2. Mode opératoire : HCCA saturée pour bactéries	35
4.2.2.3. Préparation du témoin positif (T+)	35
4.2.2.4. Réalisation du dépôt sur la cible	36
4.2.2.5. Introduction de la cible dans la spectrométrie de masse Microflexe LT et lacement de l'application	36
4.2.2.6. Validation des résultats d'identification Biotyper	37
5. Analyses moléculaires	37
5.1. Extraction de l'ADN à partir des cultures bactériennes	37
5.2. Protocole	38
5.3. La PCR de l'ADNr 16S	39
5.3.1. Protocole	41
7.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	41
5.4.1. Protocole	41
5.4.1.1. Préparation du gel	41
5.4.1.2. Electrophorèse des produits d'amplification	41
5.5. Séquençage	42
5.5.1. Purification du produit de PCR	44
5.5.2. PCR BigDye	44
5.5.3. Préparation de la plaque de Séphadex	45

5.5.4. Purification de la réaction de séquence	45
6. Correction et analyses phylogénétique des séquences	45
7. Pesticides utilisés et leurs propriétés physicochimiques	46
8. Essais biodégradation des pesticides	51
8.1. Sélection des souches sur milieu gélosé	51
8.2. Etude des phases de croissance des souches sur MSM liquide	52
Chapitre 3 : Résultats et Discussion	
1. Les analyses physicochimiques	53
2. Analyses microbiologiques	54
2.1. Les bactéries telluriques	54
2.2. Identification macro et microscopique	60
2.3. Identification des souches sélectionnées : Biochimique et MALDI-TOF-MS	67
2.4. Identification moléculaire ADNr16S	71
2.4.1. Analyses phylogénétiques	72
3. Croissance des bactéries sélectionnées en présence des pesticides	74
3.1. Premier groupe bactérien	74
3.2. Deuxième groupe bactérien	79
3.3. Troisième groupe bactérien	83
Conclusion et Perspectives	87
Références Bibliographiques	89

INTRODUCTION

La diffusion de l'industrialisation, la naissance de nouvelles technologies, l'augmentation de la population et le développement de l'agriculture ont obligé l'Algérie à améliorer ses productions agricoles dans le but de résoudre les problèmes liés à l'auto-insuffisance alimentaire. Cette amélioration était fortement liée à la consommation des quantités énormes de pesticides (Ayad Mokhtari, 2012). Toutefois, l'utilisation de ces macromolécules présente deux volets ayant des conséquences totalement opposées. En effet, les produits phytosanitaires, tout en réduisant les dégâts causés aux cultures par les agents phytopathogènes, participent également à la dégradation de la qualité des eaux de surface et souterraines, la contamination du sol et de l'atmosphère. L'usage des pesticides est donc confronté à plusieurs problématiques en relation avec la pollution de l'environnement et la santé humaine (IFEN, 2007, Foong *et al.*, 2020).

Ce sujet est au centre des préoccupations des chercheurs. Les travaux effectués dans ce domaine sont de plus en plus nombreuses et profondes. Elles permettent progressivement de prévoir le comportement de ces substances dans l'environnement de manière assez précise.

Les pesticides, classées en fonction de leur cible comme insecticide, herbicide, fongicide ..., sont des molécules de natures diverses : composés organophosphorés, organochlorés, dérivés de carbamate, les triazines, l'acide barbiturique... (Mirsal, 2004 ; Aktar, Sengupta et Chowdhury. 2009). Ces composés présentent des propriétés cancérigènes, mutagènes et allergènes. Une fraction importante des pesticides passe par le sol où ils seront apportés directement ou indirectement par l'eau et les retombées atmosphériques. Ainsi, lorsque la molécule est à la surface du sol, elle peut être soumise à un phénomène de volatilisation et se retrouver ainsi dans l'atmosphère (Bedos *et al.*, 2002). Le phénomène de volatilisation implique une diffusion des pesticides car ceux-ci seront redéposés avec les eaux de pluie à un autre endroit que celui où la contamination ou l'application a eu lieu. Les produits phytosanitaires sont des molécules ayant des compositions et des structures très variées, souvent complexes, leur propriétés physico-chimiques et biologiques le sont aussi ce qui explique les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols. Une fois que la molécule atteint le sol, elle sera soumise à des phénomènes de rétention, d'adsorption, d'infiltration, de diffusion qui sont contrôlés par les propriétés du pesticide et du milieu. Elle peut également être transportée par le lessivage du sol et s'infiltrer dans les eaux souterraines par des processus d'infiltration et de lixiviation. Une fois dans le sol, le pesticide peut être dégradé par des processus abiotiques (photo-décomposition, réactions

d'oxydoréduction, d'hydrolyse...) ou biotiques réalisés par les microorganismes du sol, limitant ainsi les contaminations (Yaron *et al.*, 1996; Mirsal, 2004).

L'Algérie est actuellement classée parmi les pays qui utilisent d'énormes quantités de pesticides. On compte environ 400 produits phytosanitaires homologués en Algérie dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Bouziyani, 2007).

L'usage des pesticides en Algérie ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est l'agriculture d'abord qui utilise des tonnes de pesticides. Malheureusement, la détermination du niveau de contaminations des compartiments naturels n'est pas faite systématiquement. Les analyses effectuées sur des échantillons d'eau prélevés dans la région de Staouli (Alger) et d'Annaba ont montré que dans plus de 30% des échantillons, la concentration de certaines molécules organochlorées et organophosphorées dépasse les valeurs préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'usage national des produits phytosanitaires en agronomie, fait craindre une pollution massive des sols, des eaux superficielles, des nappes phréatiques et de tous les milieux physiques dans toutes les régions du pays (Bouziyani, 2007).

Dans le but de résoudre ces problèmes récurrents, de nombreuses recherches ont été mises en œuvre, d'une part afin de diminuer le pouvoir polluant (toxicité et rémanence) des xénobiotiques utilisés, et d'autre part afin de traiter les eaux et les sols pollués de façon efficace. Actuellement, il existe plusieurs techniques servant à dépolluer les eaux et les sols chargés en pesticides. Il s'agit le plus souvent de traitements physiques ex. : adsorption sur charbon actif (Martin-Gullon et Font, 2001), ou chimique ex. : procédés d'oxydation variés (Acero *et al.*, 2000). Ces procédés relativement coûteux, ne sont finalement que très peu mis en œuvre et des alternatives moins onéreuses ont été imaginées. Les traitements biologiques entraînent la consommation par biodégradation ou minéralisation des substances polluantes par une biomasse capable d'utiliser le pesticide comme source nutritive (Merrah, 2010 ; Kumar *et al.*, 2018) entre autre la bioremédiation, qui est une technique très intéressante 'amie de l'environnement', dont elle utilise les microorganismes et les plantes pour dégrader les polluants *in situ*. La bioremédiation se définit comme étant l'usage intentionnel de la biodégradation ou du processus de l'accumulation des contaminants afin d'éliminer les polluants du site contaminés par ceux-ci (Burker et Schnoor 1998, Odukkathil et Vasudevan, 2013 ; Abbassy *et al.*, 2017; Bose *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021).

Ces dernières années, la bioremédiation des sols pollués par les contaminants inorganiques et organiques (dont les hydrocarbures polycycliques et les pesticides) est devenue le centre d'intérêt des scientifiques. Se sont essentiellement des études qui portent sur la capacité

intrinsèque des microorganismes et certaines plantes à détoxifier les environnements pollués. Les microbes les plus communément reportés dans la bioremédiation des pesticides incluent *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp., *Pandoraea* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Mycobacterium* sp., ainsi que d'autres bactéries appartenant aux genres *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia* (Mulbry et Kearney 1991 ; Odukkathil et Vasudevan, 2013 ; Rayu, Nielsen, Nazaries, et Singh, 2017; Farhan *et al.*, 2021).

L'objectif de notre étude consiste à isoler et identifier des microorganismes autochtones intervenants dans la bioremédiation des sols contaminés par les pesticides agricoles. Les essais d'isolement ont été réalisés à partir de terres à vocation agricoles, traitées périodiquement par différentes familles de produits phytosanitaires, situées à l'est Algérien au niveau de la wilaya d'El Tarf sous la direction de l'Institut Technique des Cultures Maraichères (ITCMI). Les souches ont fait l'objet de test de croissance en présence de quatre substances actives (abamectine, chlorpyrifos méthyl, deltaméthrine et thiophanate méthyl) à diverses concentrations, afin de déterminer leur phase de croissance ainsi que leur aptitude de se développer en présence de ces xénobiotiques comme unique source de carbone, et enfin confirmer éventuellement leur capacité à les biodégrader en milieu minéral. La caractérisation des bactéries a été réalisée selon les méthodes microbiologiques standardisées (identification morphologique et biochimique culture dépendante) puis une caractérisation moléculaire via l'identification des protéines par MALDI-TOF-MS ainsi que le séquençage de l'ADNr16S d'après Sanger.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les pesticides

Les pesticides sont des substances dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques permettent de détruire ou de limiter le développement et la croissance d'un organisme vivant souvent phytopathogène. Cependant leur mise en œuvre est encadrée par tout un ensemble de règlements relatifs à la mise sur le marché, au stockage, au transport et à la réalisation des traitements ainsi que la mise en place de plusieurs réseaux de surveillance de la qualité des eaux, de l'air et du sol (IFEN, 2007).

Un **pesticide** est une substance émise dans une culture pour lutter contre des organismes nuisibles. C'est un terme générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. Ils englobent donc les substances « phytosanitaires » ou « phytopharmaceutiques ».

Un pesticide est une préparation composée d'un ensemble de molécules comprenant :

- ✓ **Une (ou plusieurs) substance active** (anciennement dénommée **matière active**) à laquelle est due, en tout ou en partie, l'effet toxique.
- ✓ **Un diluant** qui est une matière solide ou un liquide (solvant) incorporé à une préparation et destiné à abaisser la concentration en matière active. C'est un ensemble d'agents de formulation qui permettent de diluer la matière active pour permettre d'épandre les pesticides plus facilement. Ce sont le plus souvent des huiles végétales dans le cas des liquides, de l'argile ou du talc dans le cas des solides. Dans ce dernier cas le diluant est dénommé charge.
- ✓ **Des adjuvants** qui sont des substances dépourvues d'activité biologique, mais susceptibles de modifier les qualités du pesticide et d'en faciliter l'utilisation (IFEN, 2007).

2. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. D'une manière générale, les pesticides peuvent être classés en fonction de :

- ✓ La nature de l'espèce à combattre (premier système de classification) ;
- ✓ La nature chimique de la principale substance active qui les compose (deuxième système de classification).

- 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. À celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématicides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscicides (contre les limaces et les escargots essentiellement), les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout les corbeaux) et enfin les répulsifs (ACTA, 2005).

- **Les insecticides** les plus utilisés en Algérie sont des produits capables de provoquer la mort des insectes, parmi les insecticides on peut citer : les carbamates, les pyréthrinoïdes, les organophosphorés, et les organochlorés (Devillers, 2005).

- **Les herbicides** sont des produits chimiques complexes destinés au contrôle des mauvaises herbes et des 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 (Devillers, 2005).

- **Les fongicides** sont des produits chimiques utilisés pour lutter contre les champignons et les moisissures pathogènes. Ils sont le plus souvent de nature synthétique (Anonyme 5, 2005). Les fongicides ont plusieurs actions, une action biochimique, action sur les métabolites, et une action sur les liaisons Van der Wals, hydrogènes, ioniques, covalentes (Devillers, 2005).

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. On distingue les pesticides organiques dont les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les triazines et les urées substituées, les pesticides inorganiques et les biopesticides (ACTA, 2005).

2.1. Les pesticides organiques

2.1.1. Les organophosphorés

Les organophosphorés incluent tous les insecticides contenant du phosphore. Ces derniers sont tous issus de l'acide phosphorique et sont généralement les plus toxiques de tous les pesticides. Ces composés constituent une famille de pesticides agissant sur l'enzyme acétylcholinestérase (George et Shukla, 2011). Ils inactivent cette enzyme par phosphorylation d'un résidu sérine du site actif. L'accumulation du neurotransmetteur 'acétylcholine'(ACh) qui en résulte est responsable d'un déséquilibre dans la neurotransmission et des symptômes observés (hyperexcitation, convulsions, paralysie) qui se

terminent par la mort de l'insecte. Les effets ne sont pas immédiats mais l'inactivation de l'enzyme est irréversible, contrairement aux carbamates (Bloomquist, 1996). Il s'agit d'un groupe d'insecticides peu sélectifs, généralement assez toxiques pour les Vertébrés (Farahat *et al.*, 2003). La majorité est classée comme étant très dangereux pour les abeilles et leur emploi est interdit durant la floraison. Leur persistance sur les surfaces traitées est plutôt faible car leur dégradation en composés non toxiques par la lumière se fait en quelques heures ou quelques jours. Ils ont ainsi peu à peu remplacé les organochlorés. Ils sont toutefois de moins en moins utilisés car considérés dangereux en se basant sur les critères d'homologation actuels (Pedigo, 2002).

Les organophosphorés aliphatiques possèdent une longue chaîne carbonée. On trouve dans ce groupe le malathion, le diméthoate, le trichlorfon, l'acéphate ou le méthamidophos. Les dérivés phénolés sont plus stables et donc plus rémanents que les dérivés aliphatiques. Les dérivés hétérocycliques (dont les cycles contiennent des atomes de soufre ou d'azote) sont les composés les plus stables. Figurent dans ce groupe le diazinon, le phosmet, le méthidathion ou le chlorpyrifos (Bloomquist, 1996).

2.1.2. Les organochlorés

La famille des organochlorés constitue la plus vieille classe d'insecticides de synthèse; ce sont les premiers à avoir été largement utilisés. Ils sont d'une grande efficacité mais leur très grande persistance et leur accumulation dans l'écosystème et la santé humaine font que leur usage a été progressivement et presque totalement abandonné. (ACTA, 2005; Pedigo, 2002).

Les pesticides organochlorés sont des composés qui contiennent du carbone, du chlore, et un atome d'hydrogène. La liaison chlore-carbone est forte qu'ils ne se décomposent pas facilement et peuvent rester longtemps dans l'environnement après leurs applications et en organismes longtemps après l'exposition. Les insecticides les plus puissants et les plus efficaces sont des organochlorés. On trouve dans cette famille le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), le chlordane, ou en encore le pentachlorophénol. Ils sont très persistants dans les sols, et ils se concentrent également dans les tissus biologiques. Beaucoup de composés de cette famille sont interdits en raison de leur neurotoxicité (George et Shukla, 2011).

2.1.3. Les carbamates

Les carbamates sont des insecticides à large spectre utilisés couramment depuis leur mise au point dans les années cinquante. Ce sont des esters de l'acide carbamique

généralement non hydrosolubles; cependant certaines molécules (aldicarbe, carbofurane par exemple) sont aliphatiques, ce qui leur confère un caractère hydrosoluble plus marqué et des propriétés systémiques. Ces insecticides sont généralement doués d'une toxicité marquée envers les Vertébrés et les Hyménoptères auxiliaires comme l'abeille (Bloomquist, 1996). Ce sont des molécules neurotoxiques appartenant au groupe des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Les carbamates agissent en inactivant (de façon réversible) cette enzyme par le biais de la carbamylation d'un résidu sérine du site actif; l'acétylcholine n'est plus dégradée et s'accumule alors dans l'espace inter-synaptique. Cela crée une hyperstimulation post-synaptique aboutissant à des symptômes tels des convulsions, tremblements, hyperexcitabilité évoluant vers la mort (Bloomquist, 1996).

2.1.4. Les triazines

Cette famille couvre un grand champ d'utilisation. La plupart sont utilisés comme herbicides sélectifs. Comme herbicides, les triazines peuvent être utilisés seuls ou combinés avec d'autres composés afin d'augmenter leur efficacité. Le caractère sélectif des triazines vient du fait que certaines plantes peuvent métaboliser ces composés tandis que d'autres ne le peuvent pas. Les triazines comptent parmi les plus anciens herbicides, les recherches sur ces composés ayant commencé dans les années 50 (APE USA, 2007).

2.2. Les pesticides inorganiques

En général, ce sont des éléments chimiques qui ne se dégradent pas. Leur utilisation entraîne souvent de graves effets toxicologiques sur l'environnement par accumulation dans les sols. Le plomb, l'arsenic, et le mercure sont forts toxiques (Ben Hassine et Ben Ameer, 2012).

2.3. Les bio-pesticides

Ce sont des substances dérivées de plantes ou d'animaux. Elles peuvent être constitués d'organismes tels que les : moisissures, bactéries, virus, nématodes, composés chimiques dérivés de plantes, phéromones d'insectes (Ayad Mokhtari, 2012).

3. Devenir des pesticides dans l'environnement

L'évolution des pesticides dans l'environnement dépend de leurs propriétés physicochimiques (solubilité, DT50 (temps de demi-vie d'un pesticide) etc. ...) ainsi que des caractéristiques pédoclimatiques et topographiques du sol (structure, texture du sol, matière organique, biodiversité, microorganismes...). Après épandage, ils atteignent le sol où ils peuvent être soumis à des processus de rétention, de transfert vers les eaux souterraines et de

transfert vers l'atmosphère par volatilisation ou érosion (Fig. 1). Ils peuvent aussi faire l'objet de dégradation biologique par les microorganismes du sol (biodégradation) et de dégradation abiotique (réactions d'hydrolyse, d'oxydoréduction, de photodégradation) (Diop, 2013).

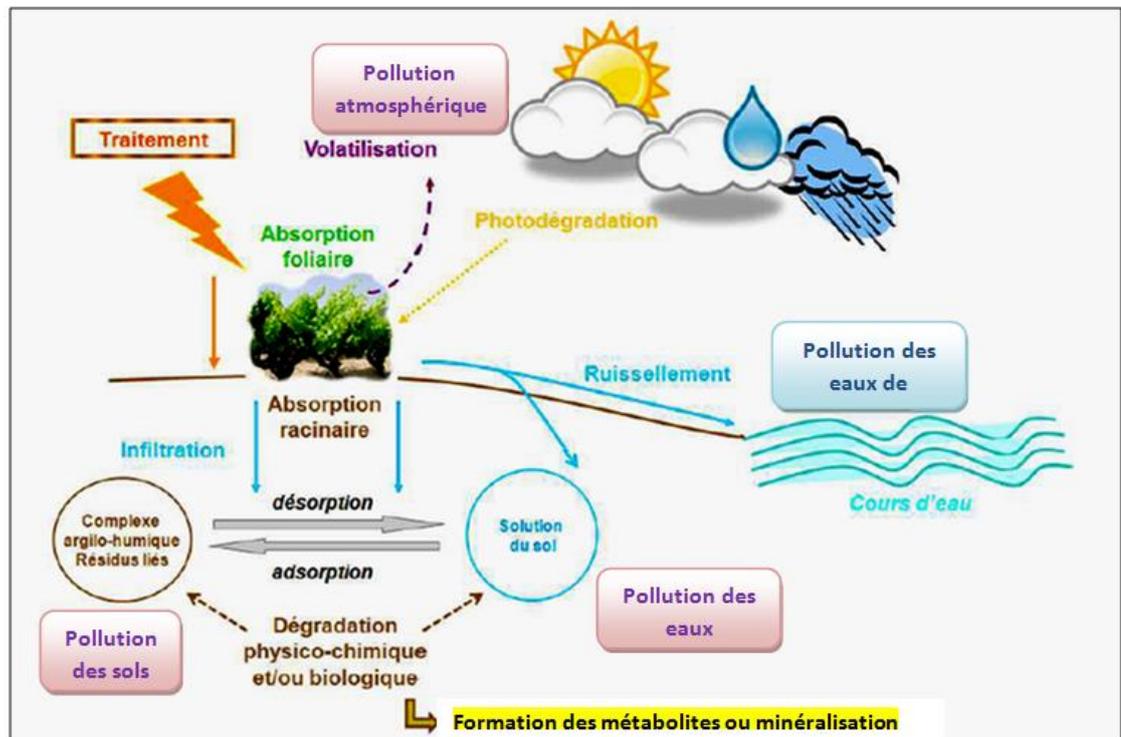


Figure 1 : Devenir des pesticides dans l'environnement après application (Diop, 2013).

Une fois pulvérisés, les pesticides peuvent :

- Dériver vers l'atmosphère avant même que le produit n'ait atteint le sol. Ce type de phénomène est bien évidemment accentué en période de grand vent ou dans le cas d'une application aérienne (par avion ou par hélicoptère).

- Atteindre le sol et ensuite :

- ✓ Se volatiliser : 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. Les molécules de pesticides en forme de vapeurs pouvaient être concentrées dans les gouttelettes de brouillard puis redéposées sur les végétaux (Jury, 1984 ; Glotfelty, 1987 ; Spencer et Cliath, 1990 ; Dabène et Marié, 1993).
- ✓ Être emportés par ruissellement vers les eaux superficielles ou percoler vers les nappes phréatiques.

- ✓ Rester en solution dans l'eau contenue dans le sol où ils peuvent alors entamer leur processus de biodégradation.
- ✓ Être "adsorbés" par certains constituants du sol (colloïdes minéraux et organiques), c'est-à-dire stockés puis "désorbés" c'est-à-dire relargués dans l'eau contenue dans le sol.
- ✓ Atteindre des animaux et/ou des plantes "non cibles" et être absorbés par eux, stockés dans les graisses animales ou dans les tissus végétaux puis en partie rejetés (sueur selles, évapotranspiration) (Merrah, 2010).

3.1. Dégradation des pesticides

La dégradation joue un rôle important dans le devenir des pesticides en ce qu'elle assure la transformation de la molécule initiale d'une manière plus ou moins prononcée, pouvant aller jusqu'à sa minéralisation. En fonction de la distribution du pesticide, de la nature des surfaces mises en jeu, de l'activité biologique et des propriétés physico-chimiques, diverses réactions chimiques et/ou biochimiques peuvent se produire et conduire à la transformation partielle ou complète du pesticide.

3.1.1. Dégradation biologique 'Biodégradation' des pesticides

La dégradation biotique fait intervenir l'action de divers microorganismes qui agissent suivant un mécanisme enzymatique spécifique. Elle a lieu généralement dans les milieux naturels comme les sols, les sédiments, l'eau. Ce processus de biodégradation est particulièrement important puisque les quantités de substances présents dans le milieu est susceptible d'être absorbée et donc d'avoir une action biologique sur l'environnement. Ces microorganismes dégradant les pesticides sont en majorité des bactéries. Leur activité dans le processus de dégradation dépend à la fois de leur patrimoine enzymatique qui détermine la nature des réactions chimiques et de son environnement qui exerce une influence sur son développement et sur sa survie (Calvet, 2005).

Ces bactéries impliquées dans la biodégradation des pesticides agissent suivant cinq mécanismes d'action.

- ✓ Le métabolisme, direct qui fait des pesticides une source d'énergie utilisée pour la croissance des micro-organismes.
- ✓ Le cométabolisme, il s'agit d'une transformation chimique des pesticides mais ils ne sont pas une source d'énergie pour les microorganismes.

- ✓ La conjugaison, ce sont des réactions chimiques, catalysée par des enzymes exocellulaires, entre les pesticides et d'autres pesticides ou d'autres molécules présents dans la solution du sol.
- ✓ L'accumulation, les pesticides ou leurs métabolites sont stockés dans leur corps microbien.
- ✓ Les effets secondaires dus à l'activité des micro-organismes qui peuvent entraîner des modifications de l'environnement chimique et de l'environnement physico chimique qui facilitent ou limitent les transformations chimiques des pesticides. Ils sont à l'origine de la dégradation des pesticides.

Les trois premiers mécanismes aboutissent à des modifications de la composition et de la structure chimique des pesticides. Ils sont directement liés à la dégradation des pesticides. En effet, les microorganismes ont besoin d'éléments nutritifs (C, N, P...) d'eau et d'énergie pour leur croissance et le maintien de leur activité, en l'absence d'absorption d'énergie lumineuse, la production d'énergie résulte d'échange d'électrons entre des donneurs d'électrons (composés organiques et inorganiques oxydable) et des accepteurs d'électrons (oxygène moléculaire, nitrates, sulfates, composés féerique et composés organiques) (Calvet, 2005).

3.1.1.1. Le métabolisme direct

Le composé organique est utilisé par les microorganismes comme source de carbone et d'énergie à des fins de croissance. Le stade ultime correspond à une minéralisation du composé organique (acide 2,4-D, atrazine, isoproturon, organophosphorés...) se traduisant généralement par l'apparition de CO₂, d'H₂O et/ou de sels inorganiques. Dans la plupart des cas, ce processus de dégradation n'entraîne pas l'accumulation de métabolites. La courbe de dégradation est caractérisée par une période de latence suivie d'une phase exponentielle d'accélération (Soulas, 1990 ; Radosevich *et al.*, 1995 ; El Sebaï, 2004). La vitesse de minéralisation du produit phytosanitaire augmente avec la répétition de son application. La cinétique de dégradation est sous la dépendance de différents paramètres : (i) les facteurs climatiques, (ii) la taille initiale de la microflore dégradante, (iii) la dose de pesticide appliquée, (iiii) la fréquence et le nombre des apports du produit phytosanitaire. Ainsi, ce processus de dégradation va tendre vers la sélection et le développement progressif d'une communauté microbienne tellurique dégradante susceptible d'entraîner une biodégradation accélérée (BDA) (Daughton et Hsieh, 1977 ; Soulas, 1990). La biodégradation des pesticides dans le cas du métabolisme direct se fait suivant une chaîne de réaction chimique dont la

première est une hydrolyse ou une oxydation ; une réduction ou une addition suivie par d'autres types de transformations (Calvet, 2005).

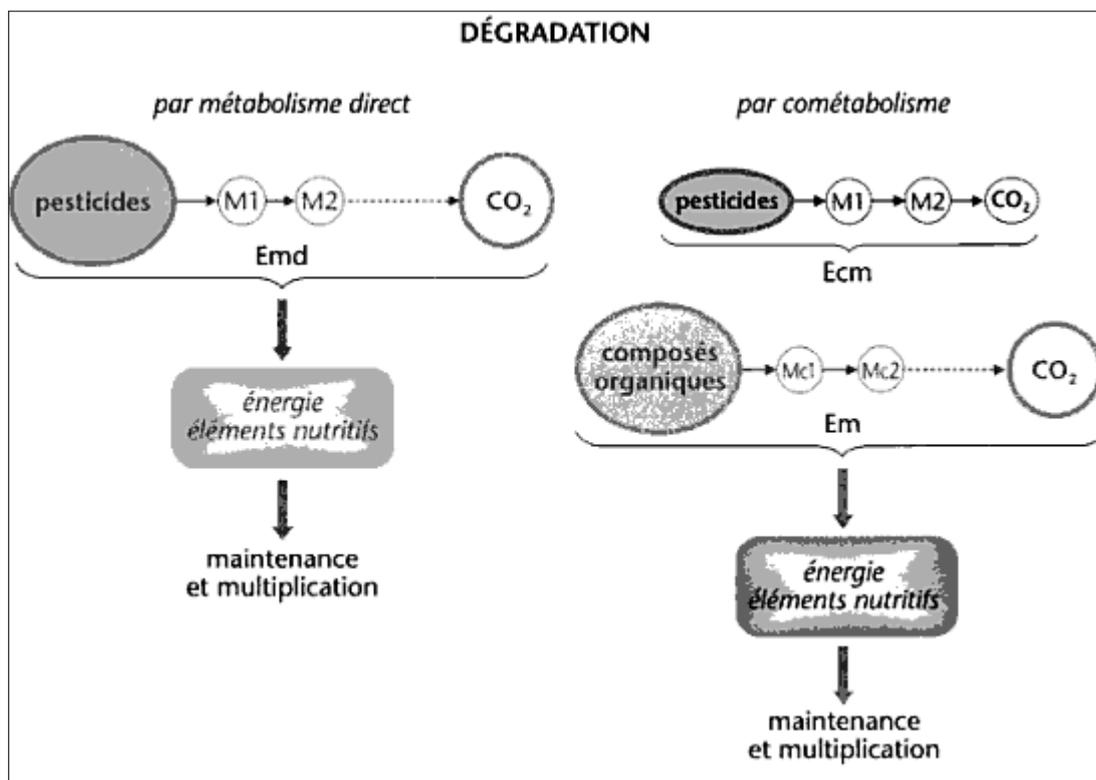


Figure 2 : Comparaison entre la biodégradation des pesticides par métabolisme direct et la biodégradation par cométabolisme (Calvet, 2005).

Emd : Enzymes impliquées dans le métabolisme direct ; **Ecm :** Enzymes impliquées dans le cométabolisme.

3.1.1.2. Le cométabolisme

Le cométabolisme est un processus au cours duquel des microorganismes assurent leur maintenance et leur multiplication aux dépens d'un substrat organique tout en dégradant les pesticides sans que ceux-ci soient une source d'énergie et d'éléments nutritifs (fig. 2) (Calvet, 2005). La matière organique, présente sous différentes formes dans les sols, est souvent utilisée comme cosubstrat (Houot *et al.*, 1998). Il s'agit d'un « métabolisme fortuit » dont les réactions initiales sont catalysées par des enzymes peu spécifiques (Calvet, 2005).

Le cométabolisme combine l'action de deux sortes d'enzymes Ecm et Em. La survie, la multiplication et la croissance des bactéries est assurée par la minéralisation de composés organiques outre que le pesticides, cette minéralisation fait intervenir les enzymes Em. La dégradation des pesticides en métabolites (M1, M2...) différents ou identique au cas précédent met en jeu les enzymes Ecm, et se déroule parallèlement la minéralisation des

composés organiques. Les métabolites produits peuvent éventuellement être minéralisés (Calvet, 2005).

Cependant, ces mécanismes restent bien souvent partiels et entraînent une accumulation de produits de dégradation qui peuvent être à leur tour transformés ou stabilisés en résidus liés (Horvath, 1972). Dans certains cas, les métabolites produits peuvent être plus toxiques et plus mobiles que le produit phytosanitaire dont ils sont issus (Somasundaram et Coats, 1990).

De plus, les microorganismes dotés d'enzymes à large spectre d'activité (champignons par exemple) sont souvent impliqués dans ce type de processus métabolique.

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la dégradation dite cométabolique : (i) soit les microorganismes ne possèdent pas toutes les enzymes nécessaires à l'ensemble des étapes métaboliques, (ii) soit les enzymes présentes sont peu efficaces vis-à-vis du substrat, (iii) soit un métabolite présente une toxicité particulière et son accumulation nuit au fonctionnement métabolique et éventuellement à la viabilité de la cellule microbienne (Janke et Fritsche, 1985). Dans ce cas, la courbe de dégradation s'apparente à une transformation chimique catalysée sans point d'inflexion. Ainsi, l'absence de croissance des populations responsables de la dégradation, jointe à leur faible taille, fait du cométabolisme une voie lente de dégradation dont la vitesse n'augmente pas au cours du temps (Soulas, 1990). Il s'agit là d'une caractéristique cinétique essentielle des transformations cométaboliques. La plupart des produits phytosanitaires sont dégradés par ce type de voie cométabolique.

3.1.1.3. La conjugaison et la condensation

Les enzymes produits par la microflore sont susceptibles de favoriser les réactions de conjugaison et de condensation des molécules composant les pesticides, entre elles ou avec des métabolites ou d'autres composés organiques naturellement présents dans le sol (Calvet, 2005).

3.1.2. Facteurs agissant sur la biodégradation

3.1.2.1. 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 en forme de cage la transformant en une pauvre source de carbone pour les bactéries (Cabidoche *et al.*, 2009).

3.1.2.2. Structure du sol, distribution spatiale des microorganismes et temps de séjour

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 (Vieublé-Gonod *et al.*, 2003). 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.

La structure du sol peut protéger le pesticide de la biodégradation, lequel phénomène est amplifiée 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).

3.1.2.3. 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 faible potentiel de la solution du sol 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. 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 avaient altéré la structure des microorganismes impliqués dans la dégradation de l'isoproturon.

3.1.3. Dégradation abiotique

Elle a été surtout étudiée dans des conditions expérimentales contrôlées au laboratoire et semble jouer un rôle mineur dans les processus de transformation des pesticides. Etant d'origine chimique et/ou photochimique, elle peut prendre effet dans la solution du sol ou

plus souvent au niveau des surfaces des constituants du sol : argiles, matières organiques et oxydes métalliques (Calvet *et al.*, 1980 ; Senesi, 1993).

3.1.3.1. Hydrolyse

Elle peut être catalysée par des cations métalliques dont les plus réactifs sont les métaux présentant un état d'oxydation +2 en solution (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , 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,γ,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).

3.1.3.2. Les 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 très réactifs et sont très présents dans les sols (Li *et al.*, 2003). Le potentiel redox du 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 Mn^{2+} , 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 physicochimiques 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 nitro-aromatiques (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 (2009) 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.

3.1.3.3. Réactions avec des composés organiques

Les composés organiques susceptibles de réagir avec les pesticides sont, outre les additifs ajoutés lors de la formulation, ceux provenant de diverses sources (matière organique du sol, résidus végétaux, amendements organiques ou déchets industriels et urbains). Les réactions peuvent avoir lieu entre pesticides (peu fréquentes), entre pesticides et constituants du sol (substances humiques, acides fulviques libres) ou entre pesticides et d'autres molécules organiques (composés organiques issus de déchets urbains, industriels et agricoles) (Calvet *et al.*, 2005).

3.1.4. Photodégradation des pesticides

Les réactions photochimiques (induites par le rayonnement UV ou visible) impliquent deux types de processus: la photolyse directe et la photolyse indirecte. Dans le cas de la photolyse directe, le pesticide absorbe de l'énergie lumineuse, passe à l'état excité et peut subir une transformation si l'énergie absorbée est suffisante. Dans la photolyse indirecte, le pesticide à l'état fondamental réagit avec d'autres espèces produites photochimiquement et susceptibles de transférer de l'énergie, un électron ou un hydrogène ou de conduire à la formation d'entités réactives (oxygène singulet, radical). Les réactions peuvent avoir lieu dans l'air, les eaux de surface, sur les couverts végétaux et à la surface du sol et impliquent des pesticides gazeux, dissous ou adsorbés (Calvet *et al.*, 2005).

La photodégradation des pesticides dans les sols exposés à la lumière solaire apparaît à de faibles profondeurs dépendant des caractéristiques du sol et des mécanismes impliqués comme démontré par Hebert et Millert sur des sols sableux (Hebert et Miller, 1990).

Les substances humiques ont tendance à défavoriser la photolyse directe pour celle indirecte. Elles peuvent, également, réduire la photodégradation en servant d'écran à la lumière ou en réagissant avec les espèces réactives (Tajeddine *et al.*, 2010). Les complexes argilo-métallo-substances humiques peuvent aussi impacter négativement sur la photodégradation (Mountacer *et al.*, 2011).

L'eau joue, également, un rôle majeur en agissant directement comme réactif générant des espèces actives ou indirectement comme solvant des ions métalliques et favorisant leur diffusion. Ainsi si le sol est sec, il y a moins de possibilité de photodégradation indirecte, par contre la photolyse directe des pesticides est favorisée (Ciani *et al.*, 2005).

Comparée à d'autres processus de dégradation biotique ou abiotique, la photodégradation peut être dominante sur les surfaces sèches exposées à la lumière solaire tandis que les autres voies de dissipation prévalent dans les couches profondes.

Au total, les pesticides atteignant directement ou indirectement le sol sont soumis à divers processus qui conditionnent leur devenir. Ainsi, ils peuvent être immobilisés dans le sol principalement par adsorption ou y être dégradés totalement ou partiellement par des agents chimiques ou biologiques. Ils peuvent aussi être transférés vers d'autres compartiments tels que les eaux souterraines par lixiviation ou transport particulaire et l'atmosphère par volatilisation et érosion. Les substances les plus persistantes peuvent laisser des résidus qui peuvent persister longtemps dans le sol adsorbés sur les matières organiques et minérales engendrant des risques environnementaux énormes. Ces résidus sont susceptibles d'être absorbés par les plantes et les animaux et entrer dans la chaîne alimentaire. Il en résulte des risques toxicologiques non négligeables pour l'homme (Diop, 2013).

4. Risques environnementaux liés à l'utilisation des pesticides

Lors des traitements ou des transferts ultérieurs, les pesticides pénètrent dans les compartiments de l'environnement entraînant différents types de pollution pouvant avoir des effets négatifs sur les organismes vivants.

Pour l'homme, seuls les risques toxicologiques indirects provenant de son environnement et dus à la présence de substances toxiques dans le milieu naturel, les aliments et l'eau de boisson sont considérés comme risques environnementaux.

4.1. Risques de pollution des sols

Les pesticides se retrouvent dans le sol par application directe, retombées atmosphériques, dérive au moment des applications. Leur transport, persistance ou dégradation dans ce milieu dépend de leurs propriétés physico-chimiques et des propriétés physico-chimiques et

biologiques du sol. Ces facteurs vont affecter l'adsorption/désorption, la volatilisation, la dégradation, l'absorption par les plantes, le ruissellement et la lixiviation des pesticides.

Certains pesticides comme les organochlorés ont une persistance dans le sol pouvant varier de quelques heures à plusieurs années. Ainsi, bien que leur utilisation ait été interdite ou restreinte depuis des années dans beaucoup de pays, ils continuent d'être détectés dans les sols (Hildebrandt *et al.*, 2009 ; Jiang *et al.*, 2009). En Inde, Mishra *et al.* (2013) ont rapporté des concentrations moyennes en HCH (hexachlorocyclohexane) total et DDT assez élevées dépassant 705 ng/g. En Chine, dans une étude réalisée dans des parcs urbains, Li *et al.* ont trouvé des teneurs élevées en pesticides organochlorés, en particulier le DDT et le HCH. Cette contamination a été attribuée à l'usage de l'HCH technique, du lindane, du DDT technique et du dicofol contenant des impuretés de DDT (Li *et al.*, 2008). Dans la même rubrique, des pesticides de la famille de l'endosulfan et du DDT figuraient parmi les pesticides les plus détectés dans les sols bien que leur application récente n'ait pas été signalée (Plaza-Bolaños *et al.*, 2012).

Dans le sol, les pesticides peuvent s'adsorber sur la matière organique ou les particules d'argile qui les rendent moins mobiles, moins biodisponibles, moins accessibles à la biodégradation et par conséquent plus persistants. Ce processus peut aboutir avec le temps et une répétition des applications à la formation de résidus liés non-extractibles. Bien que ces résidus liés n'aient qu'une faible signification en raison de leur caractère inactif et non biodisponible, ils peuvent être parfois libérés en cas de changement du pH du sol ou d'addition d'engrais azotés. Des possibilités d'absorption et de remobilisation de ces résidus par les plantes et les vers de terre existent également (Gevao *et al.*, 2005).

4.2. Risques de pollution des eaux

Les pesticides entrent en contact avec l'eau par dérive au moment de l'application, ruissellement à partir des surfaces traitées, lixiviation au cours des infiltrations, ou par dépôts atmosphériques humides ou sèches. La contamination des eaux dépend essentiellement des propriétés du pesticide, des caractéristiques du sol, des conditions climatiques mais aussi de la distance du site d'application à la source d'eau. Sa distribution spatiale et temporelle est fonction des schémas d'exploitation de la terre et des pesticides utilisés.

Des contaminations des eaux de surface et de puits ont été notées au niveau de sites proches de terres agricoles dans le monde (Gilliom, 2007 ; Añasco *et al.*, 2010). En général, les

composés fréquemment retrouvés étaient l'atrazine, la simazine, l'alachlor, le métolachlor, le trifluraline, le diazinon, le parathion méthyle, le lindane, l'endosulfan et l'aldrin.

Les eaux superficielles étaient généralement plus polluées que les eaux souterraines surtout près des sites agricoles ou urbaines.

En France, des pesticides ont été détectés dans 91% des points de suivi de la qualité des cours d'eau, 75 % des points de suivi des plans d'eau et 70 % des points de suivi des eaux souterraines entre 2007 et 2009. Le niveau de contamination était plus important dans les rivières que dans les eaux souterraines. La concentration totale en pesticide était supérieure à 0,5 µg/L sur 18% des points de mesure en rivières et sur 3,8% des points en eaux souterraines. Les régions les plus touchées étaient les zones de grande culture céréalière et viticole. Les substances les plus fréquemment rencontrées aussi bien dans les cours d'eau que dans les eaux souterraines étaient, dans la quasi-totalité des cas, des herbicides. Pour les cours d'eau, 11% des points de prélèvement ne respectaient pas les normes pour au moins une des 18 substances ou groupe de substances retenus. Deux substances, le diuron et l'isoproturon, sont responsables des trois-quarts des dépassements de norme. Dans le cas des eaux souterraines, près de 18% des points suivis ne respectaient pas les normes de qualité et cette situation concernait l'ensemble du territoire métropolitain, la contamination n'épargnant que les zones de socle. L'essentiel des dépassements des normes était dû à l'atrazine déséthyl, métabolite principal de l'atrazine et dans une moindre mesure de l'atrazine elle-même. Le glyphosate et son métabolite l'AMPA (acide aminométhylphosphonique) sont la troisième cause de déclassement (Dubois *et al.*, 2010).

Des teneurs élevées de chlordécone ont été, également, détectées au niveau des côtes, des rivières, des sédiments et des eaux souterraines de la Martinique dues à son application massive dans les plantations de bananes (Bocquené et Franco, 2005).

Dans une étude conduite dans le district de Washington aux USA en 2005 et 2008, l'U.S. Geological Survey (USGS) a rapporté la présence de 27 pesticides dans les eaux souterraines. Les molécules détectées étaient des herbicides ou des insecticides dont certains étaient interdites d'utilisation. Les classes d'herbicides les plus fréquemment détectées étaient celles des triazines (atrazine, simazine, l'atrazine déséthyl), des chloroacétanilides (métolachlor, acétochlor) et des urées substituées (diuron, fluométuron, metsulfuron). Pour les insecticides qui étaient détectés dans 38% des puits, les principales familles représentées étaient les organochlorés (DDT, chlordane, dieldrine...) et les organophosphorés (chlorpyrifos) (Koterba *et al.*, 2010).

L'atrazine et l'endosulfan ont été très souvent retrouvés dans les eaux de surface en Australie en raison d'une forte utilisation. Les autres pesticides retrouvés incluaient le profénofos, le diméthoate, le chlordane, le diuron, le prométryne et le fluométuron (Cooper, 1996).

4.3. Risques écotoxicologiques

Les organismes et microorganismes du sol sont essentiels pour le maintien de la structure du sol, la transformation et la minéralisation de la matière organique permettant de rendre disponibles les nutriments à la plante. Les produits phytosanitaires appliqués de manière écologiquement irrationnelle peuvent avoir des impacts négatifs sur ces populations.

Des effets toxiques de certains fongicides sur les champignons du sol et les actinomycètes ont été rapportés (Pal *et al.*, 2005). Les bactéries nitrifiantes sont très sensibles à l'influence des pesticides et une inhibition de la nitrification a été observée par des herbicides de la famille des sulfonylurées (Gigliotti et Allievi, 2001).

Des études récentes réalisées par Shahla et D'Souza ont mis en évidence des effets négatifs de plusieurs pesticides sur la reproduction et la croissance des vers de terre (Shahla et D'Souza, 2010).

Cette dernière a été, par exemple, influencée négativement par une exposition chronique au chlorpyrifos et à l'azinphos méthyle (Reinecke et Reinecke, 2007). Les effets des pesticides sur les abeilles sont étroitement surveillés. Ainsi, un déclin de la richesse en espèces d'abeilles sauvages a été noté après des applications répétées de fénitrothion (Brittain *et al.*, 2010). Russel et Schultz (2009) ont démontré que l'utilisation d'herbicides pouvait réduire significativement la survie, l'aile et le poids de la nymphe de papillon au niveau des zones traitées.

De même, leur toxicité sur les amphibiens et les poissons a été mise en évidence. Par exemple, le carbaryl a été retrouvé toxique pour plusieurs espèces d'amphibiens (Relyea, 2003).

4.4. Risques toxicologiques

Les pesticides peuvent se retrouver dans l'organisme humain directement par ingestion, inhalation ou pénétration cutanée ou indirectement par l'intermédiaire des sols, des poussières, d'eau ou d'aliments contaminés. Une fois dans l'organisme, ils ont la propriété de provoquer des dommages en altérant les fonctions normales. Leurs effets peuvent se manifester immédiatement ou quelques heures après l'intoxication (intoxication aiguë) ou sur le long terme (intoxication chronique). Les effets délétères des pesticides peuvent se manifester localement (effets locaux) ou affecter tout l'organisme (effets généraux). Selon,

l'OMS, les pesticides sont responsables de près de trois millions de cas d'empoisonnements graves et de 220 000 décès chaque année dans le monde (OMS, 1992). Les perturbations auxquelles l'organisme est confronté peuvent être de divers ordres (affections neurologiques, endocriniens, du système immunitaire, cancers, troubles de la reproduction...).

C'est ainsi que plusieurs études ont mis en évidence un risque accru de maladie de Parkinson associé à l'exposition à des insecticides ou des herbicides et ce risque serait élevé en cas d'exposition aux organochlorés, organophosphorés ou carbamates (Gorell *et al.*, 1998 ; McCormack *et al.*, 2002).

Baldi *et al.* ont montré, dans une étude réalisée en France, que l'exposition professionnelle à un pesticide a été associée à deux fois plus de risque de développer la maladie d'Alzheimer. Elle a également été associée à un dysfonctionnement cognitif léger et à un risque de démence chez les parkinsoniens (Bosma *et al.*, 2000).

Une part significative des substances identifiées comme perturbateurs endocriniens sont des pesticides. Ils agissent en interférant avec les hormones naturelles à cause de leur potentiel de liaison élevé avec les récepteurs ostrogéniques et androgéniques (Tabb et Blumberg, 2006). Ils peuvent aussi interférer dans la synthèse, le transport, le métabolisme et l'élimination de ces hormones entraînant une diminution de leur concentration. Par exemple, la production d'hormones thyroïdiennes peut être inhibée par certains pesticides (cyhalothrine, fipronil) (Sugiyama *et al.*, 2005).

Les pesticides perturbateurs endocriniens sont susceptibles d'affecter le développement sexuel avec une sensibilité particulière chez le fœtus et l'enfant. Généralement, les dommages se produisent au cours de la gamétogénèse et au stade initial du développement fœtal mais les effets n'apparaissent qu'à l'âge adulte. La résidence à proximité des zones agricoles a été citée comme un facteur explicatif des anomalies du développement au cours de plusieurs études (faible poids de naissance, mort fœtale, cancers chez l'enfant, cryptorchidie, hypospadias) (Carbone *et al.*, 2006).

Une série d'études épidémiologiques réalisées depuis 2000 a permis de conclure que l'exposition aux pesticides peut affecter la spermatogénèse réduisant la fertilité masculine (Roeleveld et Bretveld, 2008).

D'autres études tendent à établir un lien entre l'exposition environnementale aux pesticides et le risque de cancers hormono-dépendants. Par exemple, une étude réalisée en Espagne entre 1999 et 2009 montre que sur une population de 2661 femmes atteintes de cancer du sein, 2173 cas (81%) provenaient de zones fortement contaminées en pesticides (tableau 1).

Tableau 1. Substances actives suspectes dans le cancer du sein (Watts, 2007).

<i>Organochlorés</i>	aldrin, chlordane, chlordecone, DDT/DDE, dicofol, dieldrin, endosulfan, endrin, HCB, heptachlor, lindane, methoxychlor, mirex, toxaphene
Triazines	Atrazine*, cyanazine, propazine, simazine, terbumeton, terbutylazine, terbutryn
<i>Pyréthroides synthétiques</i>	allethrin, cyfluthrin, cyhalothrine*, cypermethrine*, deltamethrine*, fenvalerate, flucythrinate, permethrin, pyrethrins, sumithrin
<i>Organophosphates</i>	bromophos (éthyle et méthyle), butamifos, chlorpyrifos*, cyanofenphos, dichiofenthion, diazinon, dichlorvos, ethion, isotenphos, isoxathion, leptophos, malathion, methyl parathion*, monocrotophos, omethoate, parathion*, phenthoate, phosmet, primiphos-methyl, prothiophos, quinalphos, tolclofos-methyl
<i>Carbamates</i>	aldicarb, methiocarb, primicarb, propamocarb
<i>Autres herbicides</i>	alachlor, chlornitrofen, 2,4-D*, diclofob-methyl, diuron, ethalfluraline, fluazifop-butyl, oryzalin, paraquat, pendimethalin, prosulfuron, silvex, sulfallate, thenychlor, tribenuron methyl, triclopyr, trifluralin
<i>Fongicides</i>	biphenyl, captan*, captafol, dodemorph, fenarimol, folpet, mancozeb*, maneb*, triademefon, triadimenol*, triphenyltin, vinclozolin

Les pesticides en gras avec * représentent les pesticides les utilisés en Algérie (Ayad Mokhtari, 2012).

De nombreux auteurs adhèrent à l'hypothèse selon laquelle l'exposition aux pesticides influe sur le risque de développer un cancer du sein mais peu d'études sont réellement concluantes en raison de l'inconsistance des données (Cohn, 2011).

MATERIEL ET METHODES

1. Sites d'études et échantillonnage

Le sol, écosystème très complexe et hétérogène renfermant une grande partie de la biodiversité présente sur terre, était l'origine de prélèvement dans notre travail afin d'isoler une diversité de microorganismes destinée à la biodégradation des pesticides.

L'échantillonnage a été effectué à partir de terres agricole situées à l'est Algérien (Fig. 3), la région d'El Kous – Wilaya El-Tarf, dirigées par l'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (ITCMI) (36°47'16.34''N 7°52'00''E).

Trois stations ont été choisies ;

Station 1 : champ ouvert destiné à la culture des tomates,

Stations 2 et 3 : deux serres réservées à la culture des courgettes.

Le choix de cet écosystème se trouve être justifié. En effet, un sol, longuement et périodiquement en contact avec le même pesticide, a plus de chance, de renfermer dans sa communauté microbienne, une multitude de microorganismes préalablement adaptés aux pesticides utilisés dans la présente recherche.

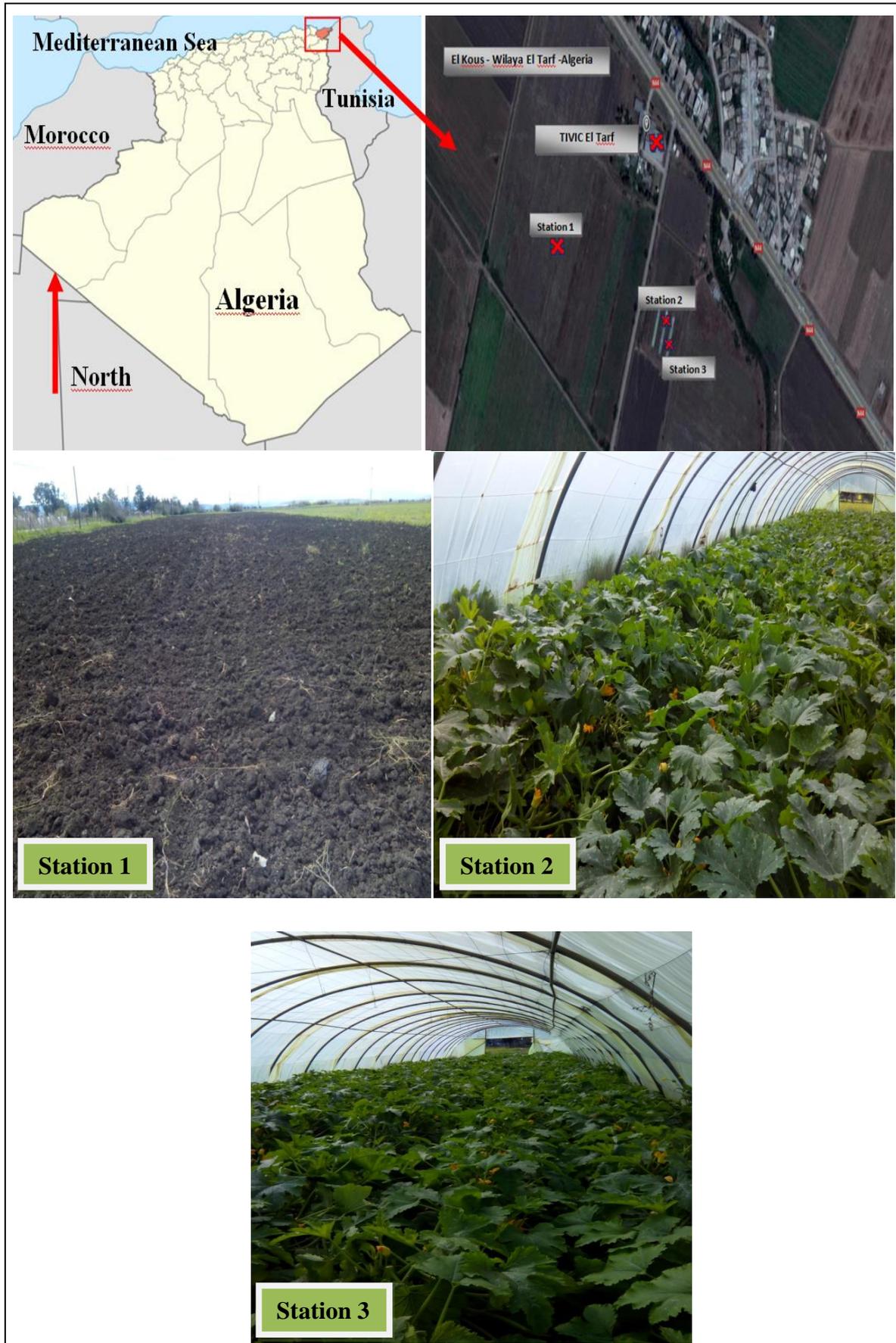


Figure 3 : Localisation des stations d'échantillonnage (Google Maps, 2016).

2. Détermination des paramètres physico-chimiques des stations d'études

Les analyses pédologiques et physico-chimiques des sols ont été effectuées au sein du Laboratoire Sol et Développement Durable, département de Biologie, Université Badji Mokhtar Annaba, selon des protocoles standardisés.

Les paramètres physico-chimiques étudiés étaient : la température, l'humidité, pH eau et pH KCl, conductivité électrique, carbone et matière organique ainsi que l'analyse granulométrique. Les prélèvements de sol ont été effectués manuellement, à l'aide d'une spatule en acier (Koranteng-Addo *et al.*, 2011) sur une profondeur d'environ 25 cm, conservés dans des récipients en plastique, acheminés au laboratoire sans aucunes mesures particulières.

Le sol a été séché à l'aire libre pendant plusieurs jours, broyé à l'aide d'un mortier en porcelaine, et tamisés à 2 mm afin d'obtenir de la terre fine qui par la suite, va servir à la réalisation des différentes analyses.

2.1. La température

La température *in situ* a été mesurée en plongeant un thermomètre de terrain sur une profondeur de 10 cm d'à peu près. On laisse stabiliser le thermomètre pendant une quinzaine de minutes, et on prend la mesure manuellement sur place.

2.2. pH eau

C'est la mesure de l'acidité d'une suspension de terre dans de l'eau, avec un rapport terre/eau normalisé (1/5). Il indique aussi la concentration en ions « H⁺ » présente dans l'eau (Morel, 1986).

- 25 ml d'eau distillée sont ajoutés aux échantillons du sol (5 g).
- Le mélange eau-sol est par la suite agité dans un agitateur culbuteur pendant deux heures à la température ambiante (20°C).
- Après un repos de 24 heures, déterminer le pH eau de la solution à l'aide d'un pH mètre (Hanna Instruments).
- Comparer les valeurs du pH eau du sol selon (Denis, 2000) (Tab. 2).

Tableau 2 : La gamme de pH des sols (Denis, 2000)

Valeur du pH (eau)	Qualification du sol
< 3,5	Hyper acide
3,5 - 4,2	Très acide
4,2 - 5,0	Acide
6,5 - 7,5	Neutre
7,5 - 8,7	Basique
> 8,7	Très basique

2.3. pH KCl

Celui-ci a été calculé avec le même rapport sol/solution que pour le pH eau, soit 1/5, avec 5 g de sol et 25 ml de solution de KCl 1N (Mc Lean, E.O. 1982). La lecture du pH KCl s'effectue après un repos de 24 heures, la mesure du pH était réalisée avec un pH mètre (Hanna Instruments).

2.4. Texture et humidité

La méthode par saturation (Gauchers, 1968) qui consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol (**Y**) et le comparer à une échelle qui détermine la texture lui correspondant. Cette technique permet d'avoir une idée sur l'humidité *in situ*. Selon les étapes suivantes :

- Peser une capsule vide (P1).
- Prendre une petite quantité de sol mouillé et la mettre dans la capsule puis repeser (P2).
- Mettre à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.
- Peser une troisième fois la capsule à la sortie de l'étuve (P3), le poids correspond donc au poids de la capsule vide + le poids du sol sec.

Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$X1 = P2 - P3 \text{ (poids de l'humidité).}$$

$$X2 = P3 - P1 \text{ (poids du sol sec).}$$

P1 : poids de la capsule vide (g).

P2 : poids de la capsule + sol mouillé (g).

P3 : correspond au poids de la capsule vide + le poids du sol sec après la sortie de l'étuve (g).

X1 → X2 g de sol sec.

Y → 100 g de sol sec.

Calculer le facteur d'humidité **Fh% : 1 + X1/X2**

Enfin comparer (Y) au tableau 3 pour déterminer la texture.

Tableau 3 : Echelle de la texture proposée par Gauchers (1968).

Humidité (%)	Texture du sol
< 12	Sableuse
12 – 24	Sablo-limoneuse
24 - 37,5	Limono-sableuse
37,5 - 45	Limono-argileuse
45 - 75	Argilo-limoneuse
> 75	Argileuse

2.5. Carbone et Matière organique

La teneur en carbone organique est déterminée selon la méthode de Anne (1945), basée sur le titrage de la solution avec le sel de Mohr (0,2 N) jusqu'au virage de la couleur du violet au vert, comparant avec un témoin négatif.

La matière organique est déterminée comme suit :

- Dans un erlenmeyer de 250 ml, mettre 1 g de terre fine.
- Ajouter 10 ml de Bichromate de potassium (8%) avec 15 ml d'acide sulfurique concentré. Laisser le mélange sur la plaque chauffante jusqu'à voir les premières gouttes de la vapeur, puis laisser refroidir le mélange.
- Transférer le contenu dans une fiole de 100 ml, et ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Ces manipulations s'effectuent sous la haute chimique.
- Rajouter à 20 ml de la solution, 100 ml d'eau distillée, 3 gouttes de diphénylamine et une pincée de Naf (fluorure de sodium).
- Titrer la solution avec le sel de Mohr (0,2 N) jusqu'à virage de la solution qui passera de la couleur violette à la couleur verte, la quantité de sel de Mohr utilisée est **X**.
- Un témoin négatif est réalisé et traité dans les mêmes conditions que l'échantillon, mais sans sol, soit **Y** la quantité de sel de Mohr utilisée pour le titrage du témoin.

La matière organique est calculée à partir de la relation suivante :

$$C\% = (Y-X) \times 0,615 \text{ mg} \times (100/20) \times (100/P) \times (1/1000).$$

Y : la quantité de sel de Mohr utilisée pour titrer le témoin.

X : la quantité de sel de Mohr utilisée pour l'échantillon à doser.

0,615 : facteur d'équivalence entre le sel de Mohr et le carbone (en mg).

100/20 : on utilise 20 ml à partir de 100 ml.

1/1000 : facteur de conversion.

P : poids du sol sec (1 g).

1,72: coefficient de passage du carbone à la matière organique.

% matière organique = % C x 1,72

La classification de la matière organique se fait selon le tableau 4.

Tableau 4 : Classification des sols d'après leurs teneurs en matière organique (méthode Anne ISO : 10693).

Matière organique (%)	Appréciation
< 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

2.6. Conductivité électrique

La conductivité électrique est en relation avec le degré de salinité du sol étudié. La détermination de la conductivité électrique se fait sur un extrait de sol (rapport sol/eau = 1/5) à l'aide d'un multi-paramètre (Hanna Instruments). Les valeurs sont comparées à une échelle de salinité (Delaunoy, 1976) illustrée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Echelle de salinité du sol (Delaunois, 1976).

Conductivité électrique (mS/cm)	Salinité
0 – 0,6	Non salé
0,6 - 1,4	Peu salé
1,4 – 2,4	Salé
2,4 – 6	Très salé

2.7. Granulométrie

L'analyse granulométrique a été effectuée selon la méthode de prélèvement par la pipette de ROBINSON sur des échantillons de sols séchés à l'air libre et tamisés à 2 mm. Cette méthode consiste à prélever, à une profondeur choisie et à des intervalles de temps bien déterminés, une fraction de suspension en cours de sédimentation à l'aide d'une pipette de 20 ml. Cela est réalisé après une destruction de la matière organique et du carbonate de calcium et une dispersion des particules élémentaires (Dugain, 1961).

- 10 g de terre fine sont additionnées de 15 ml d'eau oxygénée à 30 volumes dans un erlenmeyer de 500 ml dans le but de détruire la matière organique.
- Laisser l'attaque s'effectuer d'abord à froid, avec agitation régulière tous les jours. L'attaque est terminée une fois la terre prend une couleur claire et que l'échantillon colle au fond de l'erlenmeyer.
- Transférer la solution du sol est dans un autre erlenmeyer et rajouter 10 ml d'eau oxygénée à 30 volumes.
- Chauffer modérément dans un bain de sable pendant 4h.
- Quelques gouttes d'éthanol sont additionnées à la solution pour éviter le séchage des échantillons.
- Ajouter 1 ml de solution de HCl 0.2 N et chauffer au bain de sable pendant 4h.
- Transférer le contenu des erlenmeyers dans des flacons en verre et remplir avec de l'eau courante jusqu'au moitié.
- Agiter pendant 2h et laisser reposer pendant 24h.
- Transférer le mélange sol-eau dans une burette et compléter le volume jusqu'au trait de jauge 1L.
- Décantation pendant 6h.

- La profondeur (P) du prélèvement varie selon la température du laboratoire.
A T° = 23°C, P = 8.3 cm.
- Peser trois capsules vides pour chaque échantillon.
- Effectuer trois prélèvements à l'aide de pipette de ROBINSON avec un intervalle de temps t = 4.28 sec.

Prélèvement 1 : argile

Prélèvement 2 : argile + limon

- Faire passer le contenu de la burette à travers un tamis 50µm afin de récupérer les particules de sables.

Prélèvement 3 : sable

- Sécher les prélèvements à 105°C pendant 24 heures jusqu'à déshydratation.
- Peser une deuxième fois les capsules à la sortie de l'étuve, le poids correspond donc au poids de la capsule vide + le poids sec de chaque constituant.
- Calculer le pourcentage de sables totaux (ST%) selon l'équation suivante :

$$ST\% = (Ps - P) * 100 / Pe * Fh$$

Ps: poids de la capsule vide + sables totaux

P: poids de la capsule vide

Pe: poids de prise d'essai (10 g)

Fh : facteur d'humidité du sol (déjà calculé dans l'analyse hygrométrique)

- Déterminer le taux d'argile et limon : **A+L % = P' * 250**

P': poids de l'échantillon après séchage à l'étuve.

3. Analyses microbiologiques

Les échantillons servant aux analyses bactériologiques, à partir des trois stations, ont été prélevés à l'aide de spatule en acier stérile sur une profondeur de 25 cm. La terre a été récupérée dans des erlenmeyers en verre préalablement stérilisés de capacité 500 ml.

Les échantillons ont été immédiatement transportés au laboratoire de microbiologie ; département de Biochimie de l'université Badji Mokhtar d'Annaba, conservés à 4°C avant analyse.

3.1. Isolement des microorganismes telluriques

L'isolement des microorganismes a été effectué selon la méthode proposée par Calvayrac, 2011 ; Bhatt *et al.*, 2016 avec quelques modifications:

- 10 g de sol ont été suspendus dans 90 ml d'eau physiologique stérile constituant ainsi une dilution mère 10^0 .
- Le mélange eau physiologique + sol a été agité dans un *shaker* pendant 30 min, 150 rpm et à la température ambiante, pour détacher au maximum les microorganismes attachés aux particules du sol.
- Une série de dilution décimale a été réalisée dans de l'eau physiologique stérile de 10^0 jusqu'à 10^{-6} .
- Pour chaque dilution, 1 ml a été ensemencé par incorporation de deux milieux : la Gélose Nutritive (GN) et le milieu Lauria Bertani (LB) solide.
- Les boîtes sont par la suite incubées dans une étuve, à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 48 h.
- Après la période d'incubation, des colonies bien isolées ont été purifiées par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.

3.2. Identification de souches purifiées

3.2.1. Etude des caractères cultureux

L'aspect macroscopique est déterminé à partir de colonies isolées et purifiées pour chaque souche après 24 h d'incubation à 30°C . L'identification macroscopique permet d'obtenir des informations sur l'aspect des colonies, c'est-à-dire leur taille, leur pigmentation, leur forme, leur consistance, et l'opacité, ainsi que leur odeur.

3.3. Etude microscopique

3.3.1. Mobilité

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité et la forme des microorganismes (Prescott *et al.*, 2013).

- Sur une lame de verre propre, déposer une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une fraction de colonie cultivée sur gélose (de préférence au bord de la colonie).
- Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau physiologique.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air.
- Observer rapidement en faible luminosité à l'objectif x 40.

On doit observer :

- ✓ Présence ou l'absence de mobilité,
- ✓ Les caractères de cette mobilité : frétillement des bactéries à ciliature polaire par flagelles ou tournoiement des bactéries à ciliature péritriches.

3.3.2. Coloration de Gram

L'analyse microscopique après une coloration différentielle de Gram des souches purifiées, nous a permis de déterminer la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement, le type de Gram (Gram+ ou Gram-), ainsi que la présence ou non de spores (Prescott *et al.*, 2013).

Des frottis ont été préparés par dépôt d'une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame, avec une fraction d'une colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine stérilisée. La préparation a été fixée par flambage au bec Bunsen.

- Coloration du frottis avec le Violet de Gentiane pendant 30 secs à 1 min.
- Elimination de l'excès du colorant, et rinçage à l'eau courante.
- Mordançage avec du Lugol pendant 1 min.
- Elimination du Lugol et rinçage à l'eau courante.
- Décoloration à l'aide de l'alcool éthylique absolu pendant 1 min ou bien jusqu'à l'obtention de gouttelettes transparentes.
- Elimination de l'éthanol et rinçage à l'eau courante.
- Contre coloration avec de la fuchsine pendant 30 secs à 1 min selon la concentration.
- Elimination de l'excès du colorant et rinçage à l'eau distillée.
- Séchage avec du papier absorbant.
- L'observation de la préparation colorée a été réalisée au microscope optique avec l'objectif X100 après ajout d'une goutte d'huile d'immersion sur la lame.
- ✓ Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet.
- ✓ Les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose-rouge.

3.3.3. Etude des caractères biochimiques

3.3.3.1. Test catalase

Ce test, standardisé pour les identifications bactériologiques, a été réalisé sur des colonies pures et bien isolées.

Cette enzyme ferro-protéique, présente chez de nombreuses bactéries, est capable de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène (O_2) et eau (H_2O) (Prescott *et al.*, 2013).

- Sur une lame de verre propre, déposer une goutte d'eau oxygénée.
- Prélever une colonie isolée avec une pipette Pasteur à partir du milieu de culture.
- Mettre la colonie en contact avec de l'eau oxygénée à 10 volumes.

- ✓ S'il y a formation de bulles d'air sous forme de mousse, la bactérie possède la catalase.
- ✓ Si rien n'est observé, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

3.3.3.2. Test de l'oxydase

Comme pour la recherche de la catalase, le test a été réalisé sur des colonies pures et bien isolées.

Il permet de mettre en évidence l'existence d'une chaîne respiratoire fonctionnant avec le cytochrome C membranaire (Cytochrome oxydase). Cette réaction est très utile chez les bactéries à Gram négatif.

Il s'agit d'une réaction colorée, qualitative, pour la mise en évidence de la phénylène diamine oxydase des bactéries, à partir d'une culture réalisée sur milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif: N diméthyl paraphénylène diamine (incolore en absence d'oxydation). Cette oxydation se manifeste par l'apparition d'une coloration mauve (Prescott *et al.*, 2013).

- Déposer stérilement le disque d'oxydase au centre d'une lame de verre propre.
- Humidifier le disque par une goutte d'eau physiologique.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile un fragment de la colonie bactérienne, et l'étaler au centre du disque.

La lecture se fait immédiatement par apparition de coloration violette.

3.3.3.3. Identification par les micro-galeries : API système (bio-Mérieux)

a. API 20E

C'est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae, bacilles à Gram négatif (BGN) non fastidieux, et des bacilles à Gram positif du genre *Bacillus*, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés dans des microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

b. Api 20NE

C'est aussi un système standardisé pour l'identification des BGN non entérobactéries et non fastidieux, elle comporte 20 microtubes combinant 8 tests conventionnels qui sont inoculés avec une suspension bactérienne et 12 tests d'assimilation inoculés avec un milieu minimum.

c. Api Staph

Un système d'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (Api Web bio-Mérieux 2010).

3.3.3.4. Conservation des souches

Les souches ont été conservées par plusieurs méthodes :

** Sur gélose inclinée en tubes à 4°C pour l'usage quotidien au laboratoire.

** Dans du glycérol (1,5% rapport glycérol/bouillon nutritif), conservé à la congélation des tubes 'ependorfs'.

** Dans un milieu spécial réservé à la conservation des microorganismes à une température comprise entre – 20°C et – 80°C.

4. Identification des souches par MALDI-TOF-MS

Le MALDI-TOF-MS est un spectromètre couplant une source d'ionisation laser MALDI (*Matrix Associated Lazer Desorption Ionization*) avec un détecteur TOF (*Time Of Flight*) ou « temps de vol ». Les ions produits par le mélange matrice échantillon sont introduits simultanément dans un tube de vol et retenus dans une région libre avant d'être accélérés par une impulsion électrique pouvant aller jusqu'à 20 kilo-électron Volt, grâce à l'application d'une différence de potentiel. Cette différence de potentiel est utilisée de manière à extraire les fragments positifs ou les fragments négatifs.

En microbiologie, ce sont les ions positifs qui sont le plus souvent étudiés. Les protéines ionisées passent ensuite dans le tube de vol maintenu sous vide et « volent » jusqu'au détecteur situé à l'autre extrémité, en fonction de leur vitesse et donc de leur masse. Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. Ainsi les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. Leur arrivée au bout du tube de vol est enregistrée par un multiplicateur d'électrons, puis le signal obtenu est traité informatiquement. Les protéines de l'échantillon sont analysées par un analyseur de masse, donnant un rapport m/z . Cette mesure électrodynamique des rapports m/z permet de générer un spectre (Fig. 4). Des ions de cinétique différente peuvent ainsi avoir le même m/z .

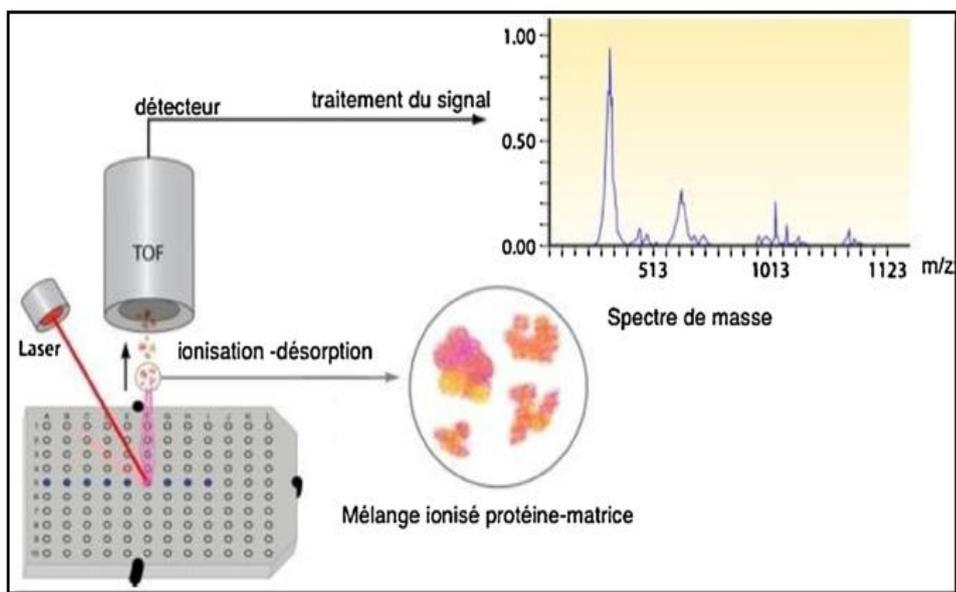


Figure 4 : Analyse MALDI-TOF (Clark *et al.*, 2013).

Le mélange échantillon/matrice Co-cristallisé est bombardé par un faisceau laser, permettant ainsi l'ionisation et la désorption des molécules du mélange matrice/échantillon. Les molécules ionisées passent alors dans un tube de vol et sont séparées selon leur ratio masse/charge (m/z) en fonction de leur temps de vol (TOF).

Les ions arrivent sur un détecteur qui amplifie le signal. Le résultat est traduit sous la forme d'un spectre de masse (Clark *et al.*, 2013).

L'identification des souches par la technique MALDI-TOF-MS a été effectuée au laboratoire *Culturomics* de l'hôpital Méditerranée Infection d'Aix Marseille, France.

4.1. Principe de la méthode

Préparation de la matrice MALDI et du témoin positif, puis dépôt des échantillons sur la cible. Lancement d'une acquisition MALDI-TOF-MS via le logiciel Biotyper RTC. Validation des résultats d'identification. Nettoyage de la cible MALDI.

4.2. Réalisation de l'analyse

4.2.1. Nettoyage de la cible

- Rincer la cible sous l'eau chaude du robinet en frottant avec le papier de précision (type Kim Wipes) afin de ne pas la rayer, puis rincer avec de l'éthanol à 70% en frottant avec du papier de précision.
- Répéter la première étape.
- Placer la cible dans un petit réservoir en inox ou en céramique et la recouvrir d'éthanol à 70%.

- Laisser agir pendant 15 min puis éliminer l'éthanol dans la poubelle appropriée.

4.2.2. Préparation de la matrice MALDI

Préparation à réaliser sous hotte chimique avec des gants lors de la manipulation des produits chimiques. La matrice doit être préparée avant chaque série d'analyses et conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

4.2.2.1. Réactifs nécessaires

- ✓ Alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) (Sigma aldrich).
- ✓ Trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma aldrich).
- ✓ Eau HPLC (High Performance Liquid Chromatography).
- ✓ Acétonitrile HPLC (ACN).
- ✓ Ethanol HPLC.
- ✓ Acide formique HPLC à 70%.
- ✓ Bacterial test standard (#255343, Bruker).

4.2.2.2. Mode opératoire : HCCA saturée pour bactéries

- Dans un tube polypropylène, introduire 2 pointes spatules d'HCCA.
- Ajouter 500 µl d'ACN.
- Ajouter 250 µl de TFA à 10%.
- Ajouter 250 µl d'eau HPLC.
- Vortexer ou secouer vigoureusement.
- Soniquer dans un bain à ultrason (sonicateur) pendant 10 min à 50 kHz (la solution doit être trouble).
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm.
- Transférer le surnageant dans un tube polypropylène 1.5 ml propre. Ainsi la matrice est prête à être utilisée.

4.2.2.3. Préparation du témoin positif (T+)

- Préparer 1 ml de (solution stock) : 475 µl d'eau HPLC + 25 µl de TFA + 500 µl d'acétonitrile HPLC.
- Mélanger la solution stock.
- Ajouter 500 µl de cette solution stock dans un tube de bacterial test standard (BTS) (#255343, Bruker).
- Fermer les tubes et mélanger. Laissez reposer 5 minutes.

- Le BTS est prêt à l'emploi et peut être conservé en aliquotes de 10 µl pendant 6 mois à – 20°C.

4.2.2.4. Réalisation du dépôt sur la cible

- Se placer sous PSM avec des gants.
- compléter le plan de dépôts.
- Déposer 2 spots de 1.5 µl T+ et recouvrir chaque dépôt de 1.5 µl de matrice saturée.
- Sur la ligne suivante même colonne, déposer 2 spots de T- (1.5 µl de matrice).
- Sur les lignes suivantes, déposer les échantillons en fine couche homogène en deux exemplaires minimum : prélever une petite quantité de colonies bactériennes de 24 heures différentes pour un même échantillon à l'aide d'une pointe du cône de pipette 10 µl.
- Ajouter 15µl d'acide formique 70% puis mélanger par pipetage.
- Une fois tous les dépôts effectués, déposer 1.5 µl de matrice sur chaque spot.
- Laisser sécher sous PSM puis ranger la cible MALDI dans sa boîte.

4.2.2.5. Introduction de la cible dans la spectrométrie de masse Microflexe LT et lancement de l'application

- Introduire la cible dans le spectromètre de masse Microflexe.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control et lancer le spectromètre de masse (Fig. 5).

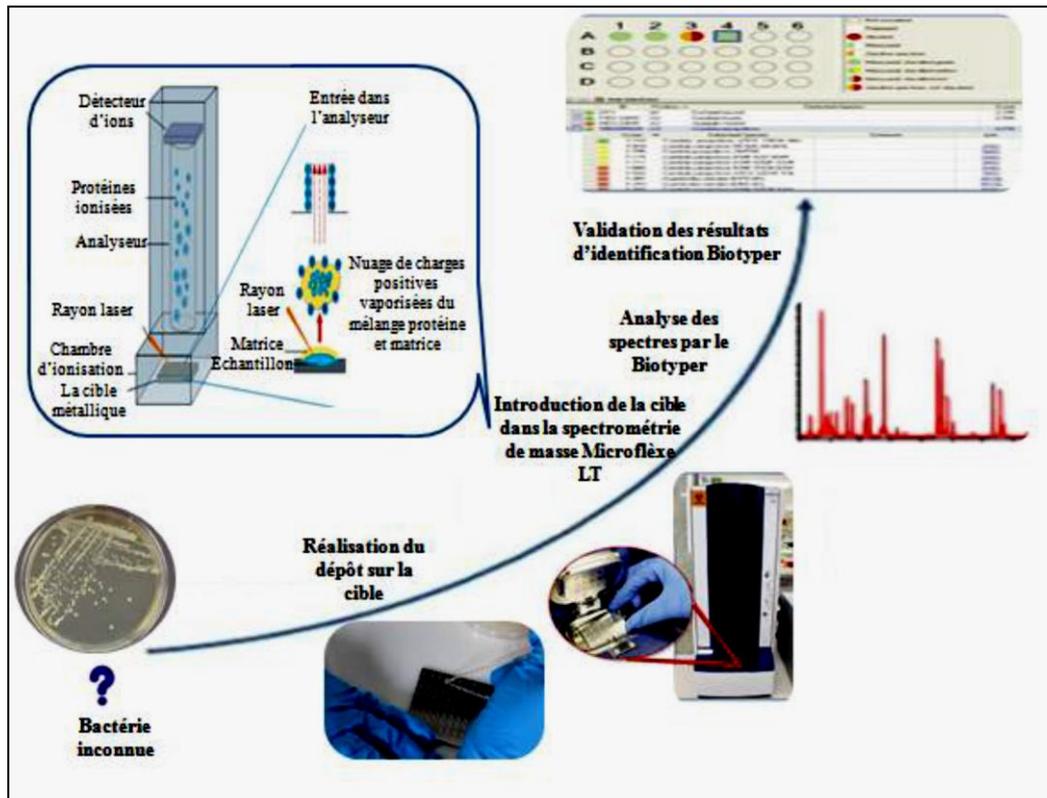


Figure 5 : Protocole de la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS.

4.2.2.6. Validation des résultats d'identification Biotyper

Le résultat d'identification par MALDI-TOF est donné avec le logiciel MALDI Biotyper par un score compris entre zéro et trois. On considère qu'une bactérie est identifiée de façon fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9.

Les résultats sont exploitables seulement si les T+ correspondent à *E. coli* avec un score > 1.9 et les T- correspondent à un score sans identification < 1.7 (Tab. 6) (Seng *et al.*, 2010).

Tableau 6 : Les résultats d'identification sous Biotyper.

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.00 - 3.00	Identification avec une haute confiance	(+++)	vert
1.70 - 1.99	Identification avec une faible confiance	(+)	jaune
0.00 - 1.69	Aucune identification possible	(-)	rouge

5. Analyses moléculaires

5.1. Extraction de l'ADN à partir des cultures bactériennes

L'extraction de l'ADN génomique de toutes les souches a été réalisée en utilisant le kit de tissus EZ1® ADN (Qiagen, Court a boeuf, France) avec l'extracteur EZ1 avancée XL et la carte de bactéries d'ADN (Qiagen) selon les instructions du fabricant (Fig. 6).

5.2. Protocole

- Réaliser une lyse externe des échantillons :
 - ✓ 200 µl d'une suspension préparée dans de l'eau distillée stérile à partir d'une culture bactérienne récente.
 - ✓ 200 µl Tampon G2.
 - ✓ 20 µl Protéinase K.
 - ✓ 2h ou over night à 56°C.
 - ✓ Transférer 200 µl dans un tube échantillon (fond plat).
- Ne jamais insérer ou changer une carte si l'appareil est éclairé.



Figure 6 : L'extracteur EZ1 XL.

1 : Panneau de commande avec écran ; **2 :** Fente pour la carte EZ1 XL ; **3 :** Porte de l'EZ1 XL.

- Homogénéiser les cartouches de réactifs avant de les introduire dans les rails du support
- Suivre les instructions données par l'appareil.
- Volume de l'échantillon : 200 µl (précis).
- Volume d'éluion : 50 µl, 100 µl ou 200 µl. Le volume varie en fonction de la concentration en ADN de l'échantillon.

- S'assurer que chaque élément (tubes, tips ou hold tips) est correctement positionné, puis on lance le protocole. L'extraction dure 15 minutes.

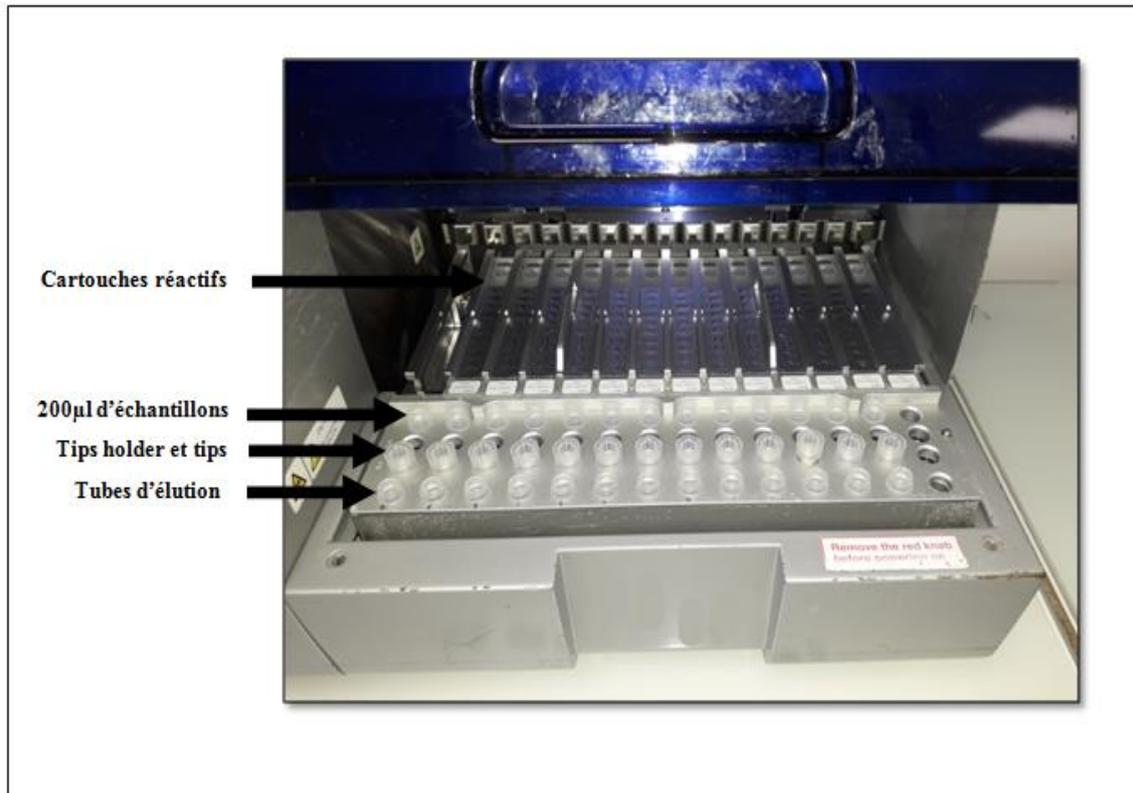


Figure 7 : L'ordre de positionnement des éléments de l'extracteur EZ1.

- Recueillir les acides nucléiques purifiés dans les tubes d'élution.
- Pour une conservation à long terme, de plus de 24 heures, il est recommandé de conserver l'ADN entre -20 et -80 °C.

5.3. La PCR de l'ADNr 16S

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro* (Ennadir *et al.*, 2014). Il existe deux principales approches de la *Polymerase Chain Reaction* :

- ✓ Une approche ciblée sur un microorganisme, utilisant des amorces spécifiques ("on sait ce que l'on cherche") ;
- ✓ Une approche large spectre, en ciblant un gène commun à toutes les bactéries, le gène ARNr 16S ("on ne sait pas ce que l'on cherche"), puis séquençage et comparaison aux banques de données pour identifier la bactérie en cause.

Le gène 16 S : Ce gène code la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) et est essentiellement utilisé en raison de sa structure, très conservée dans toutes les bactéries. En

effet, il est constitué d'une succession de domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour le séquençage de ce gène, et d'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures (espèce, genre, famille).

Le choix de l'ARN 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. Enfin, l'identification est fiable : les résultats obtenus par séquençage du gène 16S sont similaires à ceux obtenus avec le génome entier.

La PCR est constituée de trois étapes : une dénaturation de l'ADN, une hybridation des amorces spécifiques aux extrémités du gène du 16S, puis une élongation. Ce cycle est répété 35 fois afin d'en obtenir une quantité suffisante de gène cible pour le détecter et l'étudier (Fig. 8).

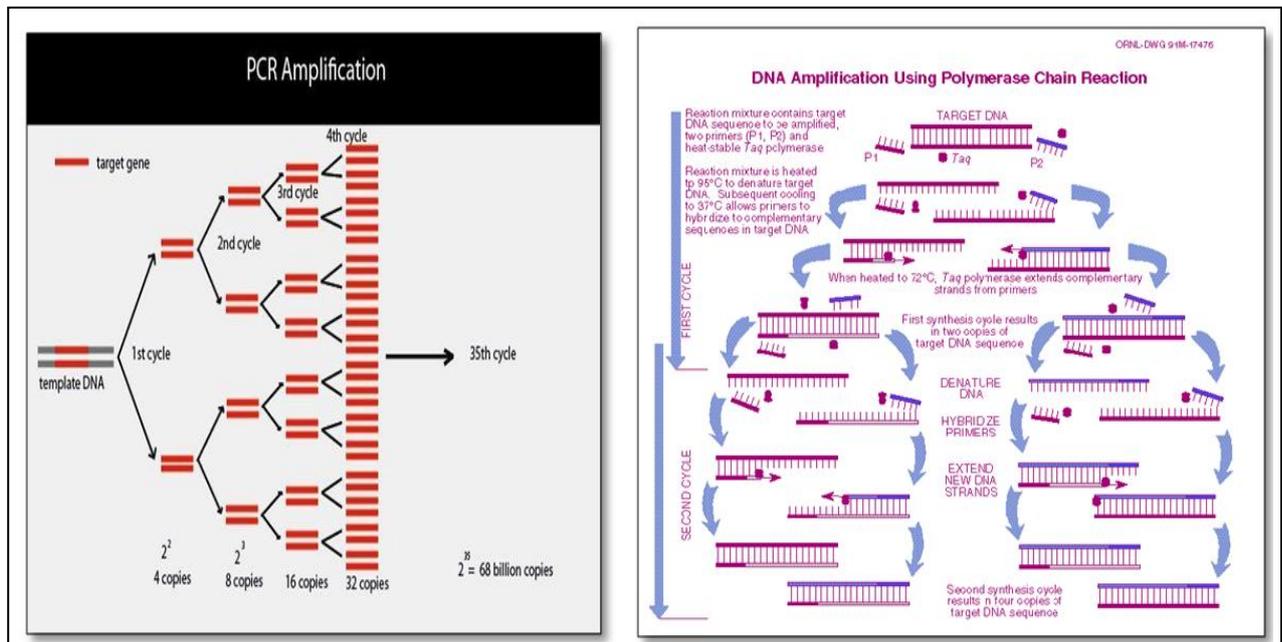


Figure 8 : Principe de l'amplification par PCR.

L'identification des microorganismes par PCR et séquençage de l'ADNr 16S selon la méthode de SANGER, a été effectuée dans deux laboratoires différents : le laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement de l'Université Clermont Auvergne, France et le laboratoire *Genomics* de l'hôpital Méditerranée Infection d'Aix Marseille, Université d'Aix Marseille, France.

5.3.1. Protocole

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, la PCR standard a été réalisée dans un Thermocycleur automatisé.

On dépose 50 µl du mélange réactionnel (Tab. 7) dans chaque puits d'une cupule de PCR Standard, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

Tableau 7 : Composition du Mix de la PCR standard.

ATG Master Mix (2X)	25 µl
H₂O distillée	17 µl
DNAase/RNAase free	
Amorce Forward (10µMol)	1.5 µl
Amorce Reverse (10µMol)	1.5 µl
Mix : 45 µl	ADN : 5µl

Un **master mix**, également connu sous les dénominations premix, super mix ou ready mix, désigne un mélange préconçu disposant de tous les éléments nécessaires à la PCR, prêt à être dispatcher dans les microtubes PCR ou les plaques PCR. Il est composé des éléments récurrents et invariables des réactions de PCR/qPCR. Pour les mélanges disponibles dans le commerce ce sont en règle générale une polymérase ADN ou ARN dépendante, des dNTPS, le MgCl₂ et le tampon de réaction. Mais selon le cas, la terminologie **master mix** peut aussi inclure la matrice ADN/ARN ou des amorces. L'utilisation d'un mélange de type **master mix** a pour avantage de diminuer le temps de préparation des réactions et de réduire le nombre d'étapes de pipetage. Autant la réduction, certes appréciable, de la durée de manipulation, n'a aucun effet substantiel sur la PCR/qPCR, il n'en est pas de même pour la diminution du nombre d'étapes de pipetage. Limiter le nombre d'étapes limite non seulement le risque de contaminations croisées, mais assure également une meilleure reproductibilité des résultats. Une telle approche permet de facilement multiplier et diversifier les réactions de PCR, tout en conservant un dispositif d'amplification inchangé. Un **master mix** se caractérise par les propriétés et la concentration de ses éléments constitutifs (dna-polymerase.com/master-mix).

Le thermocycleur est programmé à des températures choisies et pour des périodes déterminées (Tab. 8). La réaction dure environ 3 heures.

Tableau 8 : Programme PCR standard.

Dénaturation	95°C	15 min	
Dénaturation	95°C	30 sec	} 35 cycles
Hybridation	T _m = 52°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min 30 sec/1500 pb	
Elongation finale	72°C	5 min	
	15°C ou 4°C	+ ∞	

* La température d'hybridation des amorces dépend de celles-ci.

** Le temps d'élongation dépend de la longueur du fragment à amplifier (30 sec pour chaque 500 pb).

7.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification de toutes les PCR standards décrites précédemment sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5% pour vérifier et s'assurer de la présence d'une bonne amplification du gène cible.

5.4.1. Protocole

5.4.1.1. Préparation du gel

- La manipulation se fait sous une hotte chimique et avec des gants bleus en nitrocellulose.
- Dans une bouteille en verre, mélanger 3g de poudre d'agarose avec 200ml de TBE (Tris-Borate-EDTA) à 0.5X.
- Faire fondre le mélange au four à la micro-onde (sans bouchon) jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent et laisser refroidir.
- Le BET (bromure d'éthidium), intercalant de l'ADN, est remplacé par le **Sybr Safe**.
- Verser dans un flacon de 50ml et ajouter le Sybr Safe sous la hotte.
- Mélanger délicatement et couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes et laisser refroidir jusqu'à solidification de gel.
- La polymérisation se fait en 10 à 15min à température ambiante.

5.4.1.2. Electrophorèse des produits d'amplification

- Retirer les peignes après solidification du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.

- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5X (le gel doit être totalement émergé).
- Mélanger 6 µl du produit de PCR et 2 µl de bleu de charge (Blue Juice loading buffer). Puis, déposer 6µl de ce mélange dans un puits. Procéder ainsi pour chaque échantillon.
- Déposer 3 µl du marqueur de poids moléculaire VI.
- Déposer le témoin négatif dans le puits qui suit le marqueur.
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur.
- Mettre l'alimentation sous tension à 220V et régler la durée de migration (pendant 45min).
- Une fois la migration terminée. Placer le gel sous un trans-illuminateur UV pour la visualisation des bandes d'ADN.
- La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de poids moléculaire (100 paires de base) en utilisant le témoin.

5.5. Séquençage

Après vérification de l'amplification des gènes recherchés et la présence des bandes d'ADN (Fig. 9), on a effectué une purification des produits des PCR standards par des plaques à filtre. PCR BigDye, été ensuite réalisée, et les produits de cette réaction ont été purifiés en utilisant du Sephadex (Sigma). Les produits purifiés sont séquencés en utilisant le séquenceur (Automate ABI 3730, Applied, Biosystems, Foster City, California, United States).

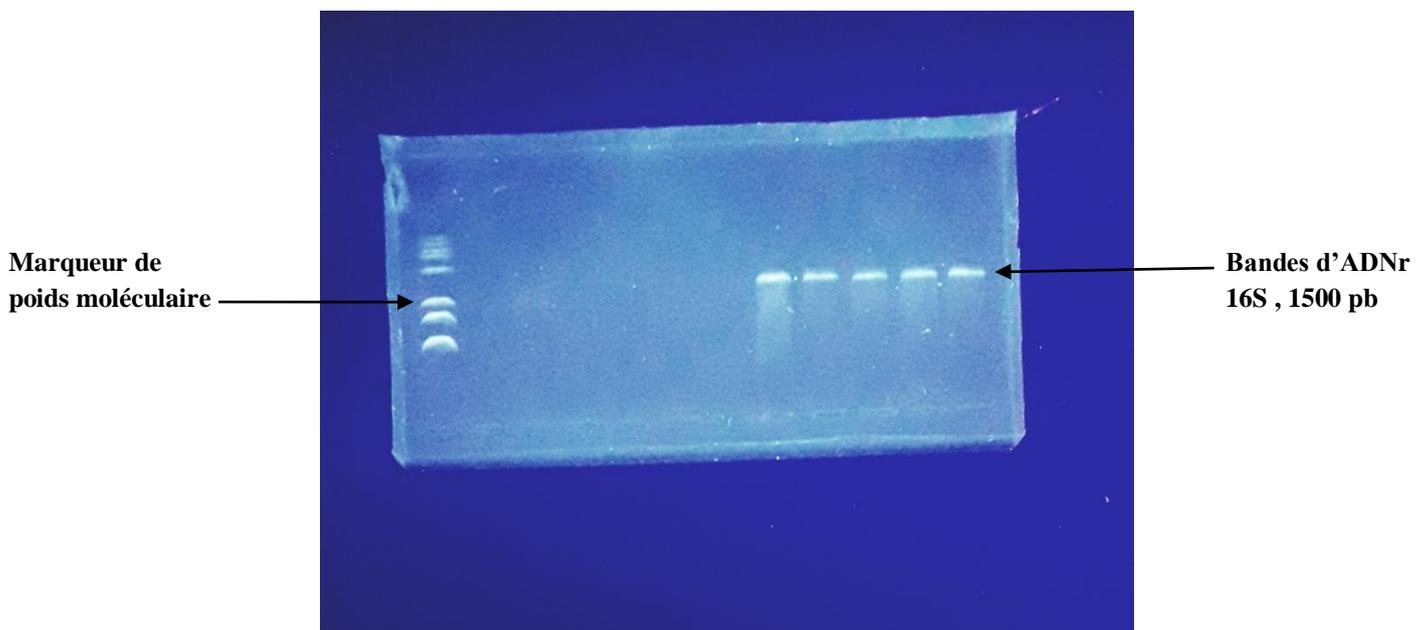


Figure 09 : Visualisation des bandes d'ADN sous un trans-illuminateur UV. Les souches de sont codées : S04, KP24, KP15, C10, B02 de gauche à droite respectivement.

5.5.1. Purification du produit de PCR

- Ajouter 50µl d'eau distillée stérile (EDS) au produit de PCR à purifier.
- Déposer la totalité du mélange sur une plaque blanche *Macherey Nagel*.
- Mettre la plaque en aspiration dans une pompe à vide et sous agitation pendant 20 min, vitesse 600 rpm.
- La sécher sur du papier filtre avant d'ajouter 50 µl EDS.
- Récupérer les 50 µl de produit de PCR purifié dans un tube préalablement identifié.
- Le produit est purifié et prêt pour la PCR BigDye.

5.5.2. PCR BigDye

Cette PCR consiste à amplifier le *Forward* et le *Reverse* séparément pour les séquencer par la suite. La réaction se déroule dans un mélange réactionnel BigDye à un volume final de 20 µl (Tab. 09), pareil que pour la PCR standard.

Tableau 09 : Composition du Mix de la PCR BigDye.

BigDye	2 µl
Tampon BDV1	3 µl
Amorce F/R 10 µMol	1 µl
H₂O distillée DNAase/RNAase free	10 µl
ADN purifié	4 µl

Le mélange réactionnel est réparti dans les puits de cupules à PCR et placé dans le thermocycleur préalablement programmé (Tab. 10).

Quatre couples d'amorce ont été utilisés pour séquencer la totalité du gène de l'ADNr 16S :

1. 27f/1492r
2. 338f/r
3. 518f/r
4. 986f/r

Le thermocycleur a été programmé comme suit :

Tableau 10 : Programme de la PCR BigDye.

Dénaturation	96°C	1 min	
Dénaturation	96°C	10 sec	} 30 cycles
Hybridation	50°C	5 sec	
Elongation	60°C	3min	
15°C ou 4°C		+ ∞	

* Une cupule par amorce.

** La température d'hybridation est constante quelle que soit l'amorce utilisée.

5.5.3. Préparation de la plaque de Séphadex

- Mettre la résine dans la plaque noire, remplir les puits et éliminer le surplus.
- Y poser une plaque *Millipore MAHV5*. La caler en butée puis retourner le tout pour faire tomber la résine dans les puits.
- Ajouter 300µl d'EDS. Laisser gonfler la résine pendant 2h 30 à 3 heures.
- Cette plaque se conserve une journée à température ambiante.
- Pour une durée plus importante, la placer à +4°C et penser à la sortir du réfrigérateur au moins 15 min avant utilisation.

5.5.4. Purification de la réaction de séquence

- Centrifuger la plaque de Séphadex avec son couvercle après l'avoir posée sur une plaque «poubelle déjà utilisée» afin d'éliminer l'excédent d'eau. 2 min à 1238g. Veillez à l'équilibrage.
- Poser la plaque de Séphadex sur une plaque de séquençage de type *MicroAmpN801-560* qui aura été préalablement identifiée. Bien faire coïncider les A1.
- Déposer les 20 µl de produits de séquence, bien au centre des mini colonnes, sans toucher les parois.
- Centrifuger avec couvercle. 2 min à 1238g. Veiller à l'équilibrage.
- La plaque *MicroAmp* peut être placée sur le séquenceur.
- Ne laisser aucune cupule vide sur un run de 16 échantillons.
- Mettre de l'eau dans la ou les cupules vides.

Le produit récupéré est alors prêt à être séquencé mais avant de lancer le séquençage, on doit :

- Introduire toutes les données concernant le produit à séquencer dans l'ordinateur lié au séquenceur.
- Préparer la plaque pour le séquençage (mettre le septa en dessus des échantillons).
- Mettre la plaque dans le séquenceur (Automate ABI 3130XL) et lancer le séquençage.

6. Correction et analyses phylogénétique des séquences

Les séquences brutes obtenues par séquençage ont été d'abord analysées et corrigées avec le logiciel Chromas Pro. Les séquences sont ainsi soumises via Internet et comparées avec celles présentes dans la banque de données *GenBank database* du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) grâce à l'outil d'alignement *Basic Local Alignment*

Search Tool (BLAST), permettant ainsi l'identification de la séquence par homologie avec des séquences connues.

Après identification moléculaire des souches, une analyse phylogénétique a été réalisée.

Les séquences ont été dans un premier temps alignées à l'aide du logiciel Clustal X2.1 (Thompson *et al.* 1997), et analysé avec le logiciel 'MEGA 5.05' (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) qui permet d'établir une matrice de distance élaborée par comparaison de séquences d'ADN selon la méthode de Neighbor-Joining (relation évolutive entre les différentes souches). La matrice est représentée sous forme d'arbre phylogénétique. Des analyses de Bootstrap avec 1000 itérations ont été effectuées pour vérifier la robustesse de l'arbre (Tamura *et al.* 2011).

7. Pesticides utilisés et leurs propriétés physicochimiques

D'après les données fournies par l'ITCMI, les stations d'échantillonnage ont été traitées avec plusieurs familles de produits phytosanitaires à usage agricole, afin de lutter contre certains ravageurs notamment les insectes.

Quatre substances actives ont été utilisées dans notre étude dont trois insecticides : le Chlorpyrifos-méthyl (CM), la Deltaméthrine et l'Abamectine (ABA) et un seul fongicide : le Thiophanate-méthyl (TM). Les pesticides, sous forme de solution, ont été stérilisés par filtration stérilisante (porosité 0.45 μ m), récupérés dans des tubes à vis stériles et conservés à l'abri du soleil dans un endroit sec, et à la température ambiante.

Tableau 11 : Propriétés physicochimiques chlorpyrifos-méthyl (PubChem US NCBI, 2019)

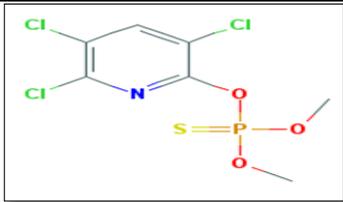
Nom commun ISO	Chlorpyrifos-méthyl
Nom chimique	(O, O-diméthyl O- 3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate)
Famille chimique	Organophosphorés
Type de pesticide	Insecticide
Structure chimique	 La structure chimique du chlorpyrifos-méthyl est représentée dans une boîte. Elle montre un noyau pyridine avec trois atomes de chlore (Cl) substitués aux positions 3, 5 et 6. Le carbone 2 du noyau est lié à un atome d'oxygène (O), qui est à son tour lié à un atome de phosphore (P). Le phosphore est doublement lié à un atome de soufre (S) et est également lié à deux autres atomes d'oxygène (O), chacun lié à un groupe méthyle (CH3).
Nom commercial	Reldan 40
Formule brute	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₄ PS
Masse molaire	322.51 g/mol
Apparence	La substance active apparaît sous forme de cristaux blancs
Température de fusion	45.5 – 46.5°C
Solubilité	Dans l'eau : 4 mg/l à 25°C Fortement soluble dans les solvants organiques (acétone, méthanol, hexane)
Décomposition	Une fois chauffé jusqu'à décomposition, il émet des fumeurs extrêmement toxiques (oxydes d'azote, oxydes phosphorique ...)
Stabilité	Relativement stable à pH neutre Hydrolysé à pH acide (4 à 6) et surtout à pH basique (8 à 10)

Tableau 12 : Propriétés physicochimiques du deltaméthrine (PubChem US NCBI, 2019).

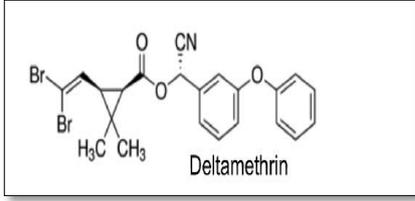
Nom commun ISO	Deltaméthrine
Nom chimique	[(S)- α -cyano-(3-phenoxyphenyl) methyl 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate]
Famille chimique	Pyréthrinoïdes
Type de pesticide	Insecticide
Structure chimique	 <p>The image shows the chemical structure of Deltamethrin. It consists of a cyclopropane ring with two methyl groups (CH₃) and a 2,2-dichlorovinyl group (CH=CHCl₂) attached to one carbon. The other carbon of the ring is attached to a carboxylate group (-COO-), which is further substituted with a cyano group (-CN) and a 3-phenoxyphenyl group (-O-C₆H₄-C₆H₅). The label 'Deltamethrin' is placed below the structure.</p>
Nom commercial	Decis 25
Formule brute	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Masse molaire	505.2 g/mol
Apparence	liquide, limpide à légèrement turbide de Couleur jaune pâle à brunâtre
Odeur	Aromatique
Température de fusion	100-102°C Décompose à partir de 270°C
Solubilité	Eau : 0.25 µg/l Solvant organique : 500 g/l
Durée de demi-vie	30 jours
Dégradation dans le sol (jours)	21-25 en aérobie 31-36 en anaérobie

Tableau 13 : Propriétés physicochimiques de l'abamectine (PubChem US NCBI, 2019).

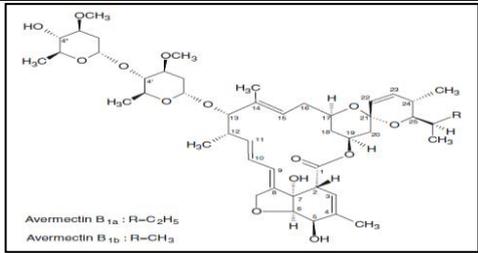
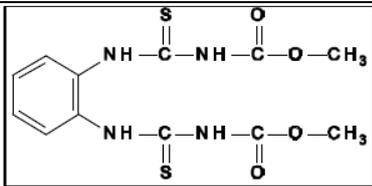
Nom chimique	Abamectine
Famille chimique	Avermectines
Type de pesticide	Insecticide
Structure chimique	 <p>Avermectin B_{1a}: R=C₂H₅ Avermectin B_{1b}: R=CH₃</p>
Nom commercial	Agromec 18
Formule brute	C ₉₅ H ₁₄₂ O ₂₈
Masse molaire	1732.153 g/mol
Apparence (état pur)	Cristaux blancs
Odeur	Sans aucune odeur
Température de fusion	150-155°C
Solubilité	<p>Dans l'eau : 1.21 mg/l à 25°C</p> <p>Faiblement soluble dans les solvants organiques (mg/l) à 21°C :</p> <p>Toluène 0.35 ;</p> <p>Acétone 0.1 ;</p> <p>n-butanol 0.01 ;</p> <p>Ethanol 0.02 ;</p> <p>Isopropanol : 0.07</p>
Stabilité	Stable en milieu aqueux à pH 5, 7 et 9 à 25°C

Tableau 14 : Propriétés physicochimiques du thiophanate-méthyl (PubChem US NCBI, 2019).

Nom commun ISO	Thiophanate-méthyl
Nom chimique	dimethyl 4,4'-(<i>o</i> -phenylene)bis(3-thioallophanate) (IUPAC) dimethyl [1,2 phenylenebis(iminocarbonothioyl)]bis[carbamate] (CAS)
Famille chimique	Benzimidazoles
Type de pesticide	Fongicide
Structure chimique	
Nom commercial	Pelt 70
Formule brute	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂
Masse molaire	342.4 g/mol
Apparence	Poudre blanchâtre
Odeur	Inodore
Température de fusion	Décompose à 165.0°C
Solubilité	Eau : 24.6 à 40 mg/l Solvant organique (g/100ml de solvant à 25°C): Acétone 2.9 Méthanol 0.6 Acétonitrile 1.3 Toluène 0.04 n-Hexane 0.6 x 10 ⁻⁴
Hydrolyse	Demi-vie à 25°C : 867 jours (pH 5) 36 jours (pH7) 0.7 jours (pH 9)
Stabilité	Stable pour 14 jours à 54°C ; pour trois ans à la température ambiante

8. Essais biodégradation des pesticides

8.1. Sélection des souches sur milieu gélosé

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des souches à utiliser les pesticides comme unique source de carbone et d'énergie à différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 mg/l), et sélectionner les souches exerçant une meilleure croissance. Un milieu minimum (minéral) '*Mineral Salt Medium*' (MSM) a été utilisé pour les tests sur milieu solide et liquide.

Tableau 15 : Composition du milieu minéral (Rousseaux *et al.*, 2001; modifié)

Composants	Concentration (g/litre d'eau distillée)
K₂HPO₄	1.6
KH₂PO₄	1.6
MgSO₄.7H₂O	0.2
NaCl	1
CaCl₂	0.002
(NH₄)₂SO₄	3.5
FeSO₄.6H₂O-EDTA	1 ml
Agar (milieu solide)	15
pH	7.5

- Autoclaver le milieu et la solution du fer séparément à 120°C pendant 20 min.
- Préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile, à partir d'une culture pure et récente de 18h à 24h.
- Ensemencer, par inondation sur la surface de la gélose MSM en présence de différentes doses de :
 - ✓ Chlorpyrifos méthyl,
 - ✓ Deltaméthrine,
 - ✓ Abamectine,
 - ✓ Thiophanate méthyl,
- Ensemencer également des géloses seules (sans aucune source de carbone et d'énergie : boîtes témoin)
- Laisser la suspension en contact pendant environ 20 min en surface, puis éliminer l'excès.
- Incuber les boîtes à 30°C et à l'obscurité pour éviter la photodégradation des pesticides.
- Les boîtes ont été examinées toutes les 24h pour vérifier la croissance des microorganismes pendant un intervalle de temps de 15 jours.

- L'aptitude des souches à croître en présence des pesticides comme unique source de carbone et d'énergie a été évaluée comme positive ou négative selon la présence, l'absence ainsi que le nombre de colonies qui s'y développent sur le milieu de culture (Bhatt *et al.*, 2016).
- Les souches ayant présenté un meilleur pouvoir de croissance et développement ont fait l'objet d'essais de biodégradation sur MSM liquide.

8.2. Etude des phases de croissance des souches sur MSM liquide

L'objectif de cette technique est de déterminer si l'souches sélectionné assimile les substances actives testées comme seule source de carbone et d'énergie à travers des cinétiques de croissance réalisées par des mesures quotidiennes de la densité optique (DO) par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm.

Les bactéries sélectionnées ont fait l'objectif d'étude de cinétique et développement en présence des quatre produits phytosanitaires (Chlorpyrifos méthyl, Deltaméthrine, Abamectine et Thiophanate méthyl).

- Dans un erlenmeyer stérile de capacité 500 ml, mettre 99 ml de MSM liquide.
- Introduire le pesticide, en solution, dans le milieu de telle sorte on va obtenir une concentration finale de 50mg/l pour l'abamectine, le CM et TM, et 25mg/l pour la deltaméthrine.
- Inoculer avec une suspension bactérienne 'dense' préparée à partir d'une culture pure et jeune de la souche sélectionnée.
- Ajuster la DO du milieu (approximativement DO = 0.1).
- Incuber dans un *shaker* à 30°C±2°C, à une vitesse de 150 rpm et à l'obscurité tout en créant une chambre noire ne permettant pas l'entrée de la lumière à l'intérieur de l'agitateur.
- Prélever aseptiquement des échantillons du milieu liquide toutes les 24 h pour suivre les variations de la concentration bactérienne par mesure de densité optique à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Secomam Uviline 9000).
- Des erlenmeyers non inoculés ont été utilisés comme témoins (Cycon *et al.*, 2011).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Les analyses physicochimiques

Les résultats des analyses physicochimiques (PC) des échantillons de sols prélevés au niveau des 3 stations obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16 : Résultats des analyses physicochimiques des échantillons de sols.

Stations	Station 1	Station 2	Station 3
Paramètres			
Température	12	18	17
Humidité (%)	28.10	23.59	28.28
Fh%	1.28	1.23	1.28
Texture du sol	Limono-sableuse	Sablo-limoneuse	Limono-sableuse
pH eau	7.77	7.39	7.81
pH KCl	6.1	6.2	6.15
Conductivité (μSimens/cm)	221	454	223
Carbone Organique (%)	1.42	1.26	1.42
Matière Organique (%)	2.44	2.17	2.44
Granulométrie			
Argile (<2 μm) (%)	21.44	31.63	20.34
Argile+Limon (<2 – 50 μm) (%)	71.42	53.97	69.52
Sable (50 – 2000 μm) (%)	7.17	14.40	10.14

D'après les données ci-dessus, les stations 1 et 3 présentent des propriétés PC très proches malgré la différence de localisation.

La station 2 présente une structure sablo-limoneuse avec un taux non négligeable en sable, les stations 1 et 3 ont une texture limono-sableuse, une faible proportion en sable en particulier la première station, et un pourcentage assez élevé en limon et argile (Gauchers, 1961).

Les sols présentent un pH basique selon la classification proposée de Denis (2000), relativement pauvres en matière organique (Anne, 1945), et considérés comme des sols non salés selon l'échelle de salinité (Delaunoy, 1976).

2. Analyses microbiologiques

2.1. Les bactéries telluriques

Les souches obtenues au nombre de 48 sont réparties entre Gram positif et Gram négatif. Dans la première étape, ils ont fait l'objet de tests de croissance sur MSM gélosé (Rousseaux *et al.*, 2001; Bhatt *et al.*, 2016) où les quatre molécules étaient l'unique source d'énergie durant une période d'incubation de 24h à 15 jours à une température de 30°C et à l'obscurité.

Différentes souches ont montrées un bon développement sur gélose MSM additionnée de doses croissantes de substances actives (Tab. 18-21). Selon Calvet (2005), les pesticides peuvent être des sources d'éléments et d'énergie pour les microorganismes par la mise en œuvre de diverses réactions chimiques cataboliques catalysées par des enzymes.

Les douze souches choisies et sélectionnées sont celles qui ont présentées une meilleure croissance en présence de doses importantes des pesticides sur MSM solide ;

Les souches sélectionnées pour le chlorpyrifos méthyl codées : S17, SDP1, MC09, ANT14

Les souches sélectionnées pour l'abamectine codées : S04, C10, KP15, KP24

Les souches sélectionnées pour la deltaméthrine codées : B02, MC01

Les souches sélectionnées pour le thiophanate méthyl codées : B05, ANT02

Ces souches ont plus tard fait l'objet d'un test de croissance sur MSM liquide en présence de concentrations considérées comme élevées de pesticides ; 50 mg pour le chlorpyrifos méthyl, abamectine et thiophanate méthyl et 25 mg pour la deltaméthrine.

Tableau 17 : Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses de chlorpyrifos méthyl comme seule source de carbone et d'énergie.

Code des souches testées	Croissance en présence de 25mg/l	Croissance en présence de 50 mg/l	Croissance en présence de 100 mg/l	Croissance en présence de 200 mg/l
S04	-	-	-	-
C05	-	-	-	-
B02	-	-	-	-
KP15	-	-	-	-
C03	-	-	-	-
B11	-	-	-	-
C10	-	-	-	-
KP66	-	-	-	-
JC92	-	-	-	-
B01	-	-	-	-
KP24	-	-	-	-
B05	-	-	-	-
SDP22	-	-	-	-
B08	-	-	-	-
B04	-	-	-	-
MC46	-	-	-	-
MC04	-	-	-	-
MC18	-	-	-	-
KC20	-	-	-	-
JC415	++	+	+	-
JC17	-	-	-	-
SDP1	+++	++	+	+
SDP5	-	-	-	-
SDP6	-	-	-	-
SDP8	++	+	-	-
S17	+++	+++	++	+
JM22	-	-	-	-
JM56	+	-	-	-
JM188	-	-	-	-
S20	-	-	-	-
ANT02	+	+/-	-	-
ANT14	+++	++	+	+
KL12	-	-	-	-
MC01	-	-	-	-
MA26	+	-	-	-
MC09	+++	++	-	-
KP26	-	-	-	-
KC96	-	-	-	-
JC41	++	+/-	-	-
B09	-	-	-	-
LC8	-	-	-	-
C04	-	-	-	-
S13	-	-	-	-
MC29a	-	-	-	-
KL18	-	-	-	-
S05	-	-	-	-
S06	-	-	-	-
KL19	-	-	-	-

Tableau 18 : Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses de deltaméthrine comme seule source de carbone et d'énergie.

Code des souches testées	Croissance en présence de 12.5 mg/l	Croissance en présence de 25 mg/l	Croissance en présence de 50 mg/l	Croissance en présence de 100 mg/l
S04	-	-	-	-
C05	-	-	-	-
B02	+	+	-	-
KP15	-	-	-	-
C03	-	-	-	-
B11	-	-	-	-
C10	-	-	-	-
KP66	-	-	-	-
JC92	-	-	-	-
B01	-	-	-	-
KP24	-	-	-	-
B05	-	-	-	-
SDP22	-	-	-	-
B08	-	-	-	-
B04	-	-	-	-
MC46	-	-	-	-
MC04	-	-	-	-
MC18	-	-	-	-
KC20	-	-	-	-
JC415	-	-	-	-
JC17	-	-	-	-
SDP1	-	-	-	-
SDP5	-	-	-	-
SDP6	-	-	-	-
SDP8	-	-	-	-
S17	-	-	-	-
JM22	-	-	-	-
JM56	-	-	-	-
JM188	-	-	-	-
S20	-	-	-	-
ANT02	-	-	-	-
ANT14	-	-	-	-
KL12	-	-	-	-
MC01	++	+	+	-
MA26	-	-	-	-
MC09	-	-	-	-
KP26	-	-	-	-
KC96	-	-	-	-
LC8	-	-	-	-
C04	-	-	-	-
S13	-	-	-	-
JC41	-	-	-	-
B09	-	-	-	-
KL18	-	-	-	-
MC29a	-	-	-	-
S05	-	-	-	-
S06	-	-	-	-
KL19	-	-	-	-

Tableau 19 : Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses de thiophanate méthyl comme seule source de carbone et d'énergie.

Code des souches testées	Croissance en présence de 12.5 mg/l	Croissance en présence de 25 mg/l	Croissance en présence de 50 mg/l	Croissance en présence de 100 mg/l
S04	-	-	-	-
C05	-	-	-	-
B02	-	-	-	-
KP15	-	-	-	-
C03	-	-	-	-
B11	-	-	-	-
C10	-	-	-	-
KP66	-	-	-	-
JC92	-	-	-	-
B01	-	-	-	-
KP24	-	-	-	-
B05	+	+/-	+/-	
SDP22	+	-	-	-
B08	-	-	-	-
B04	+	+	+/-	-
MC46	-	-	-	-
MC04	+	-	-	-
MC18	-	-	-	-
KC20	+	-	-	-
JC415	+	+	-	-
JC17	-	-	-	-
SDP1	-	-	-	-
SDP5	-	-	-	-
SDP6	+	-	-	-
SDP8	+	+/-	-	-
S17	++	+	+	-
JM22	+	-		
JM56	+	-	-	-
JM188	-	-	-	-
S20	+	-	-	-
ANT02	+	+	-	
ANT14	+/-	-	-	-
KL12	+	-	-	-
MC01	-	-	-	-
MA26	-	-	-	-
MC09	-	-	-	-
KP26	-	-	-	-
KC96	-	-	-	-
LC8	-	-	-	-
C04	-	-	-	-
S13	-	-	-	-
JC41	-	-	-	-
B09	-	-	-	-
KL18	-	-	-	-
MC29a	-	-	-	-
KL19	-	-	-	-
S05	-	-	-	-
S06	-	-	-	-
KL19	-	-	-	-

Tableau 20 : Résultats du test de croissance des souches en fonction de leur capacité de développement sur MSM solide en présence de différentes doses d'abamectine comme seule source de carbone et d'énergie.

Code des souches testées	Croissance en présence de 12.5mg/l	Croissance en présence de 25 mg/l	Croissance en présence de 50 mg/l	Croissance en présence de 100 mg/l	Croissance en présence de 200 mg/l
S04	+++	+++	+++	++	++
C05	-	-	-	-	-
B02	-	-	-	-	-
KP15	+++	+++	++	++	+
C03	-	-	-	-	-
B11	-	-	-	-	-
C10	+++	+++	+++	++	+
KP66	-	-	-	-	-
JC92	-	-	-	-	-
B01	-	-	-	-	-
KP24	+++	+++	+++	++	+
B05	-	-	-	-	-
SDP22	+	+	+	-	-
B08	-	-	-	-	-
B04	-	-	-	-	-
MC46	-	-	-	-	-
MC04	++	+	-	-	-
MC18	-	-	-	-	-
KC20	-	-	-	-	-
JC415	++	+	+/-	-	-
JC17	-	-	-	-	-
SDP1	-	-	-	-	-
SDP5	-	-	-	-	-
SDP6	-	-	-	-	-
SDP8	+++	+++	+++	++	++
S17	-	-	-	-	-
JM22	-	-	-	-	-
JM56	-	-	-	-	-
JM188	-	-	-	-	-
S20	-	-	-	-	-
ANT02	-	-	-	-	-
ANT14	-	-	-	-	-
KL12	-	-	-	-	-
MC01	-	-	-	-	-
MA26	-	-	-	-	-
MC09	-	-	-	-	-
KP26	-	-	-	-	-
KC96	-	-	-	-	-
LC8	-	-	-	-	-
C04	-	-	-	-	-
S13	-	-	-	-	-
JC41	-	-	-	-	-
B09	-	-	-	-	-
KL18	-	-	-	-	-
MC29a	-	-	-	-	-
S05	-	-	-	-	-
S06	-	-	-	-	-
KL19	-	-	-	-	-

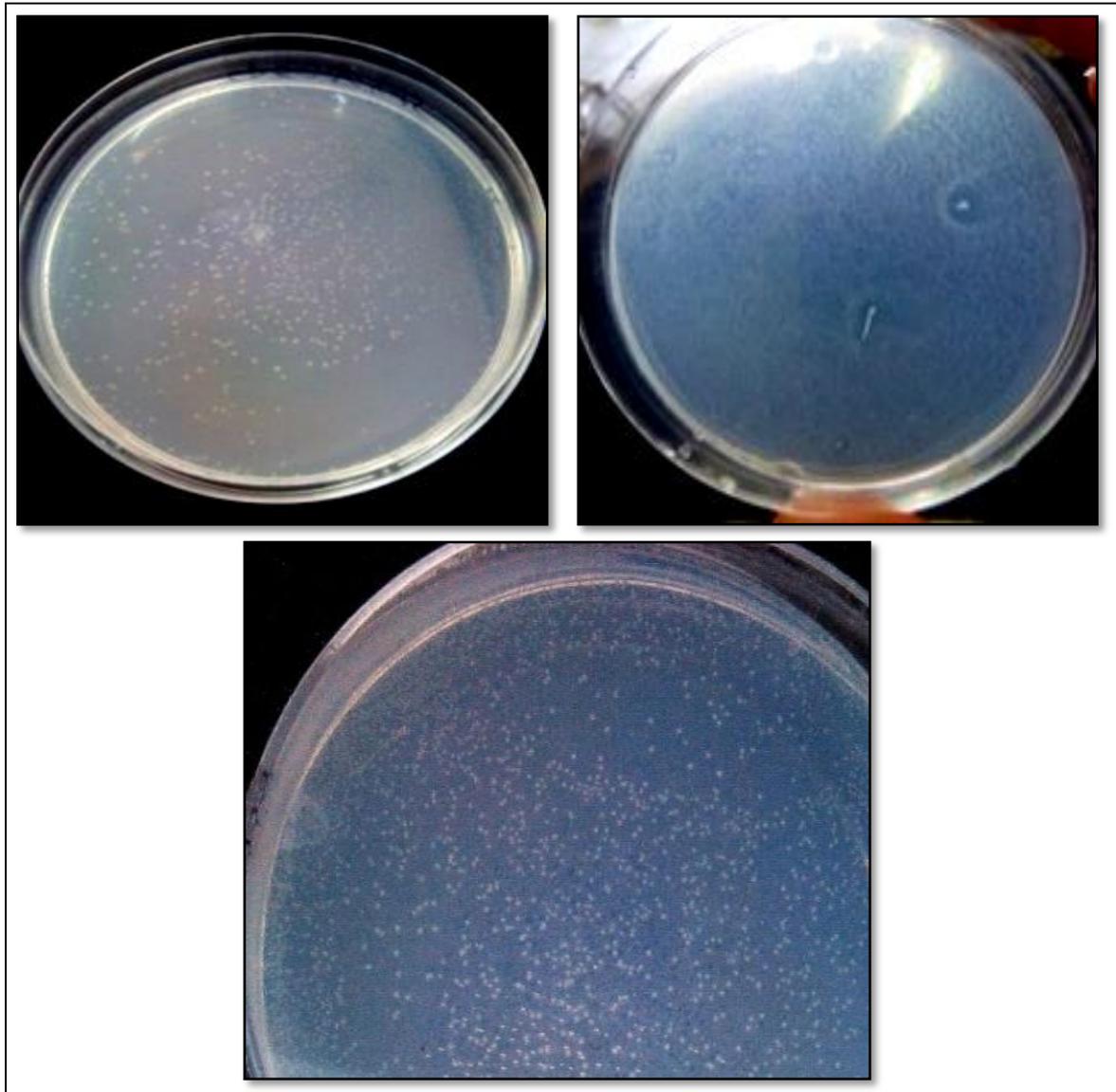


Figure 10 : Aspect des cultures sur MSM en présence des pesticides comme unique source de carbone et d'énergie.

La figure 10 ci-dessus représente l'aspect des colonies bactériennes obtenues sur gélose MSM additionnée de pesticides. Le même aspect a été obtenu avec nos pesticides (petites colonies blanchâtres visqueuses dont la croissance était timide).

2.2. Identification macro et microscopique

L'ensemble des caractères macroscopiques, microscopiques des souches intéressantes (Fig. 11 – Fig. 18), ainsi que les résultats des tests complémentaires oxydase et catalase sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 21).

Tableau 21: Description macroscopiques et microscopiques des souches intéressantes.

Code de la souche	Station d'isolement	Milieu d'isolement	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram	Mobilité	Oxydase	Catalase
S04	LB	Station 1	Petites colonies, sèches sur milieu COS, rondes à bords réguliers, jaunâtres et brillantes	Courts bacilles	-	+	+	+
C10	LB	Station 3	Colonies de tailles moyennes, très visqueuses, rondes à bords réguliers, jaunâtres et brillantes	Courts bacilles de petite taille isolés	-	+	+	+
KP15	GN	Station 2	Colonies de tailles moyennes, très visqueuses, rondes à bords réguliers, jaunâtres et brillantes	Courts bacilles de petite taille isolés	-	+	+	+
KP24	GN	Station 2	Colonies de tailles moyennes, très visqueuses, rondes à bords réguliers, jaunâtres et brillantes	Courts bacilles de petite taille isolés	-	+	+	+
B02	LB	Station 3	Colonies ayant une très petite taille, rondes, plates, transparentes et brillantes	Très courts bacilles	-	+	+	+
B05	LB	Station 3	Petites colonies rondes, visqueuses, et de couleur jaune	Cocci	+	-	+	-
MC01	GN	Station 1	Colonies	Longs bacilles	+	+	+	-

			formant des ramifications dans le sens des aiguilles d'une montre, blanches, très collantes à la gélose	de petite taille, formant de très longues chaînes				
SDP1	LB	Station 1	Grandes colonies rondes à bords réguliers, visqueuses, blanches de couleurs et opaques	Longs bacilles en forme de chaînettes	+	+	+	+
S17	GN	Station 1	Colonies rondes de tailles moyennes, sèches, blanches, à bords irréguliers et opaques	Gros bacilles isolés	+	+	+	+
MC09	LB	Station 1	Grandes colonies rondes au centre pointu, marron, solides et opaques	Bacilles de longueur moyenne, isolés ou en longues chaînes	+	+	+	+
ANT14	LB	Station 2	Grandes colonies rondes, blanches, sèches, à bords irréguliers et opaques	Courts bacilles de petites tailles isolés	+	+	+	-
ANT02	GN	Station 1	Grandes colonies rondes, sèches, blanches, à bords irréguliers et opaques	Courts bacilles de petites tailles isolés	+	+	+	-

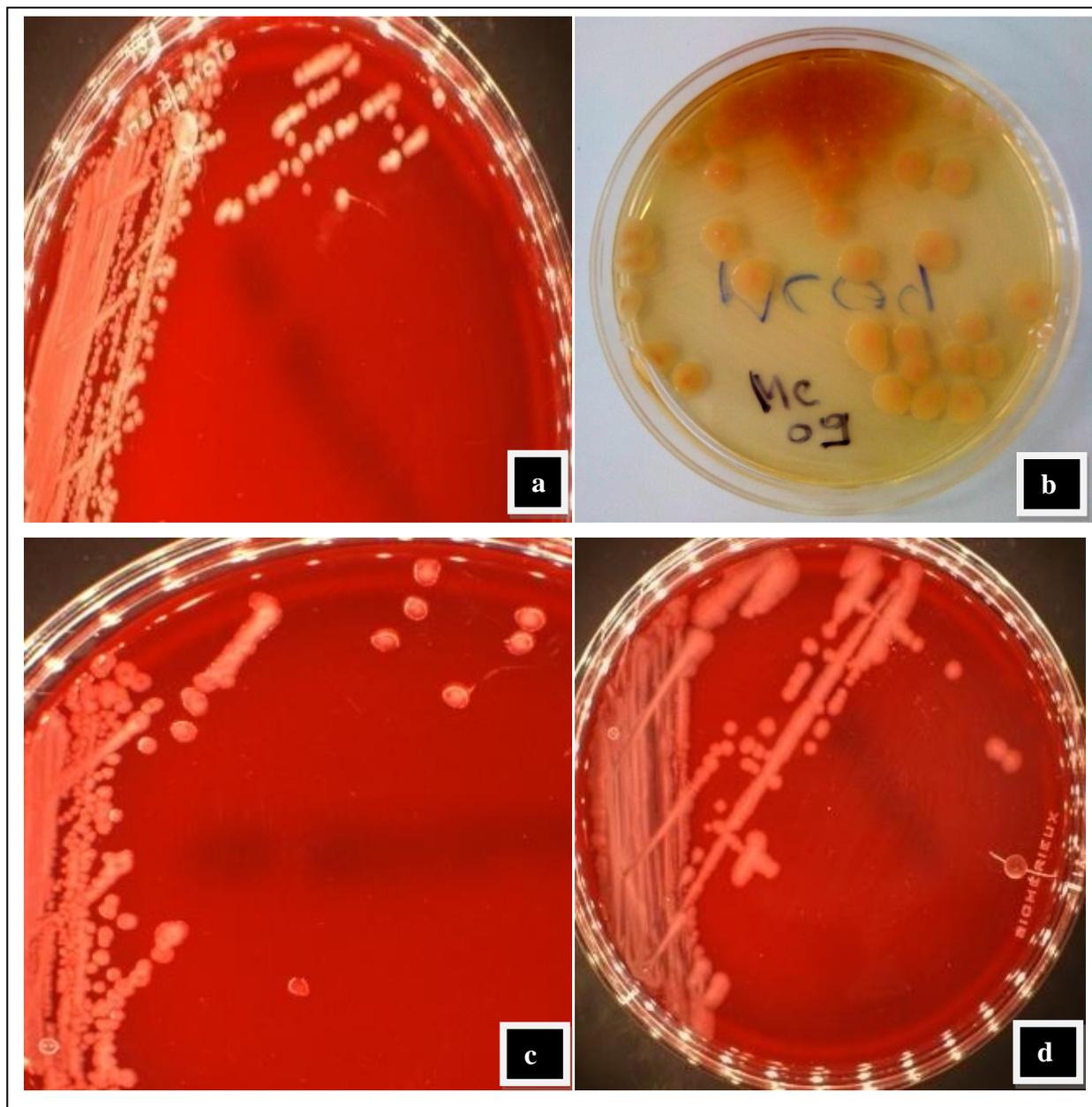


Figure 11 : Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour le CM :

(a) : souche S17, (b) : souche MC09, (c) : souche SDP1, (d) : ANT14.

**Le milieu en rouge représente la gélose COS (gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton),

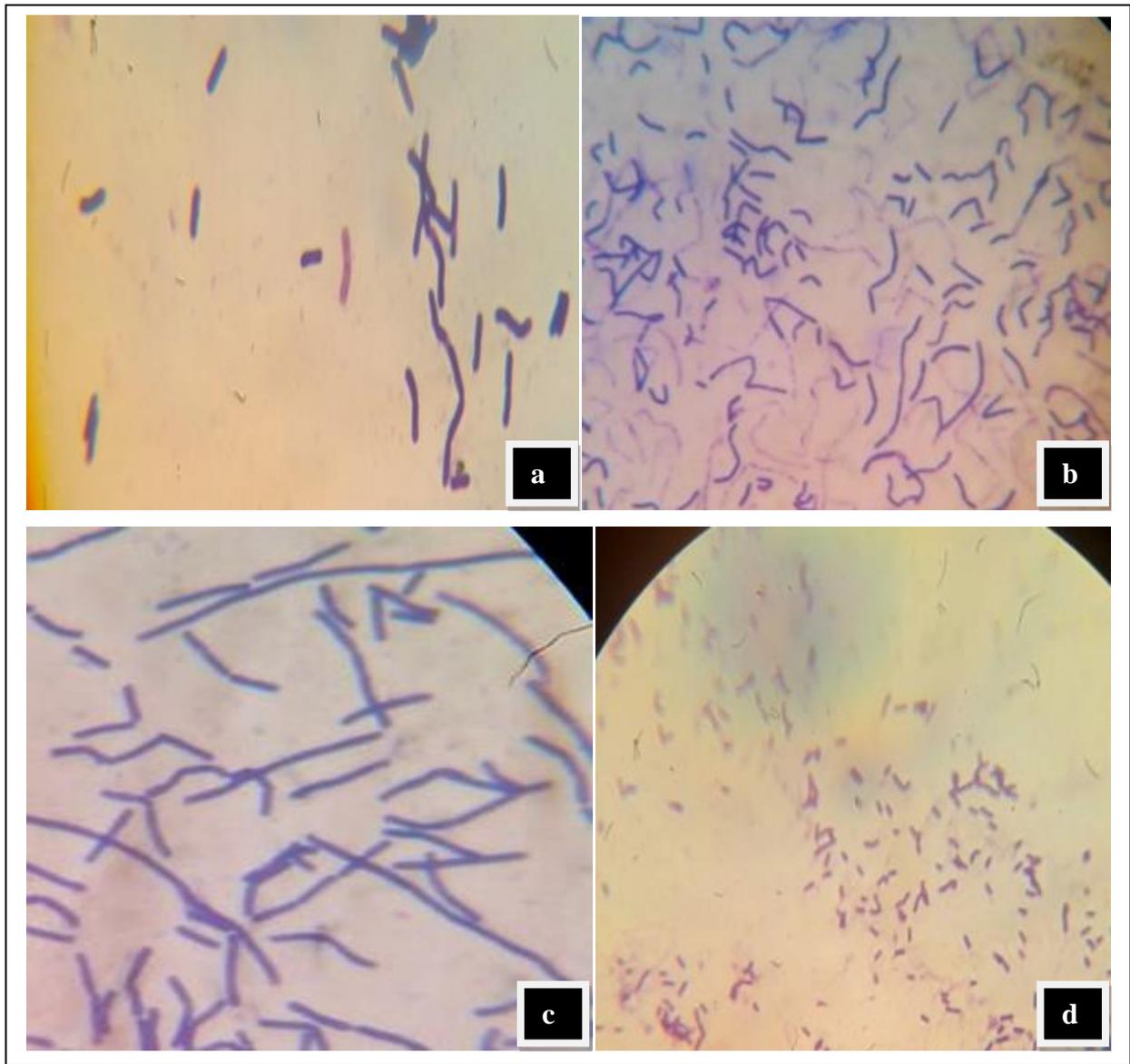


Figure 12 : Aspect microscopique des souches sélectionnées pour le CM, après coloration de Gram, (a) : souche S17, (b) : souche MC09, (c) : souche SDP1, (d) : ANT14.

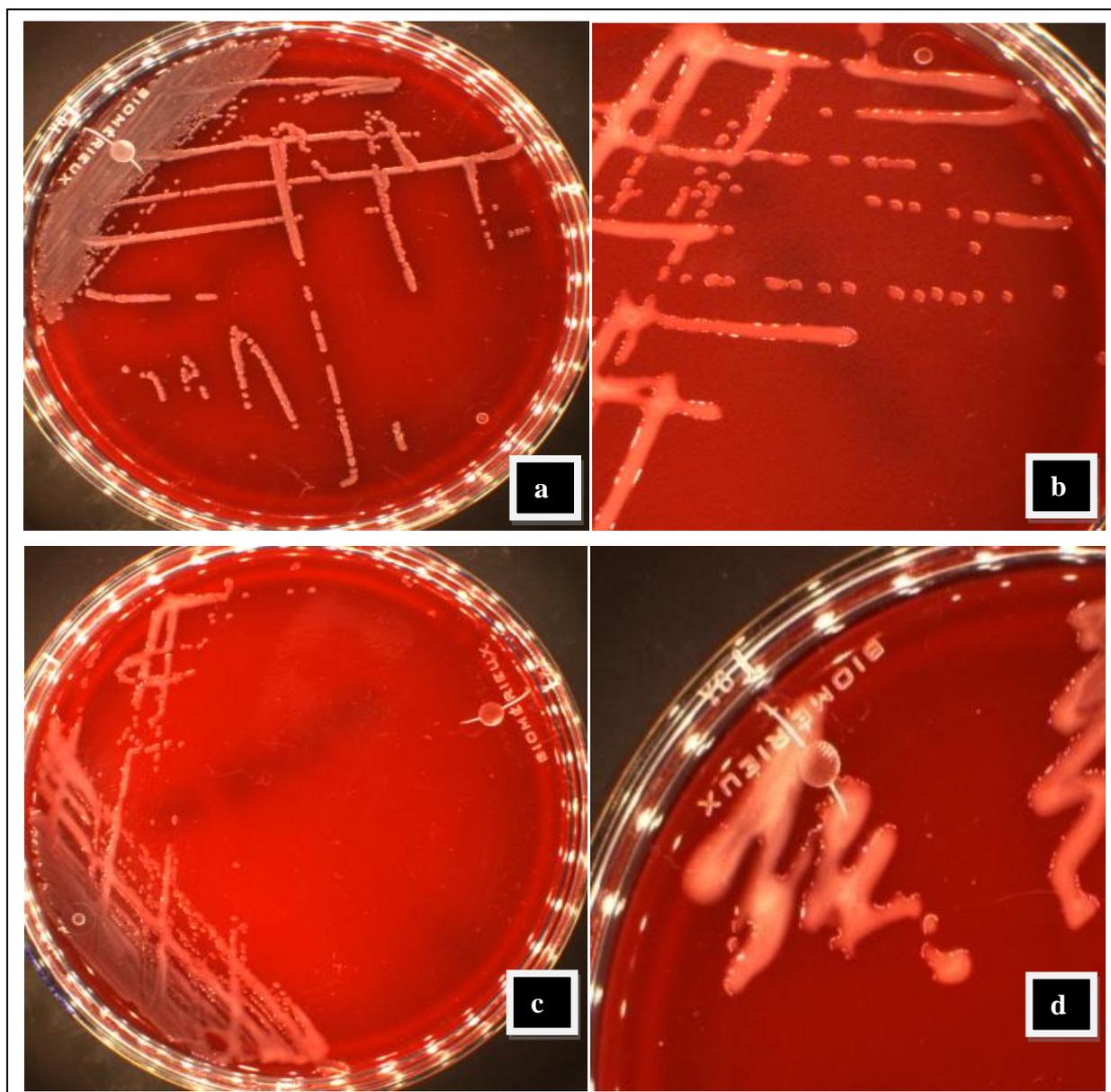


Figure 13 : Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour l'ABA sur la gélose COS, (a) : souche S04, (b) : souche C10, (c) : souche KP15, (d) : souche KP24.

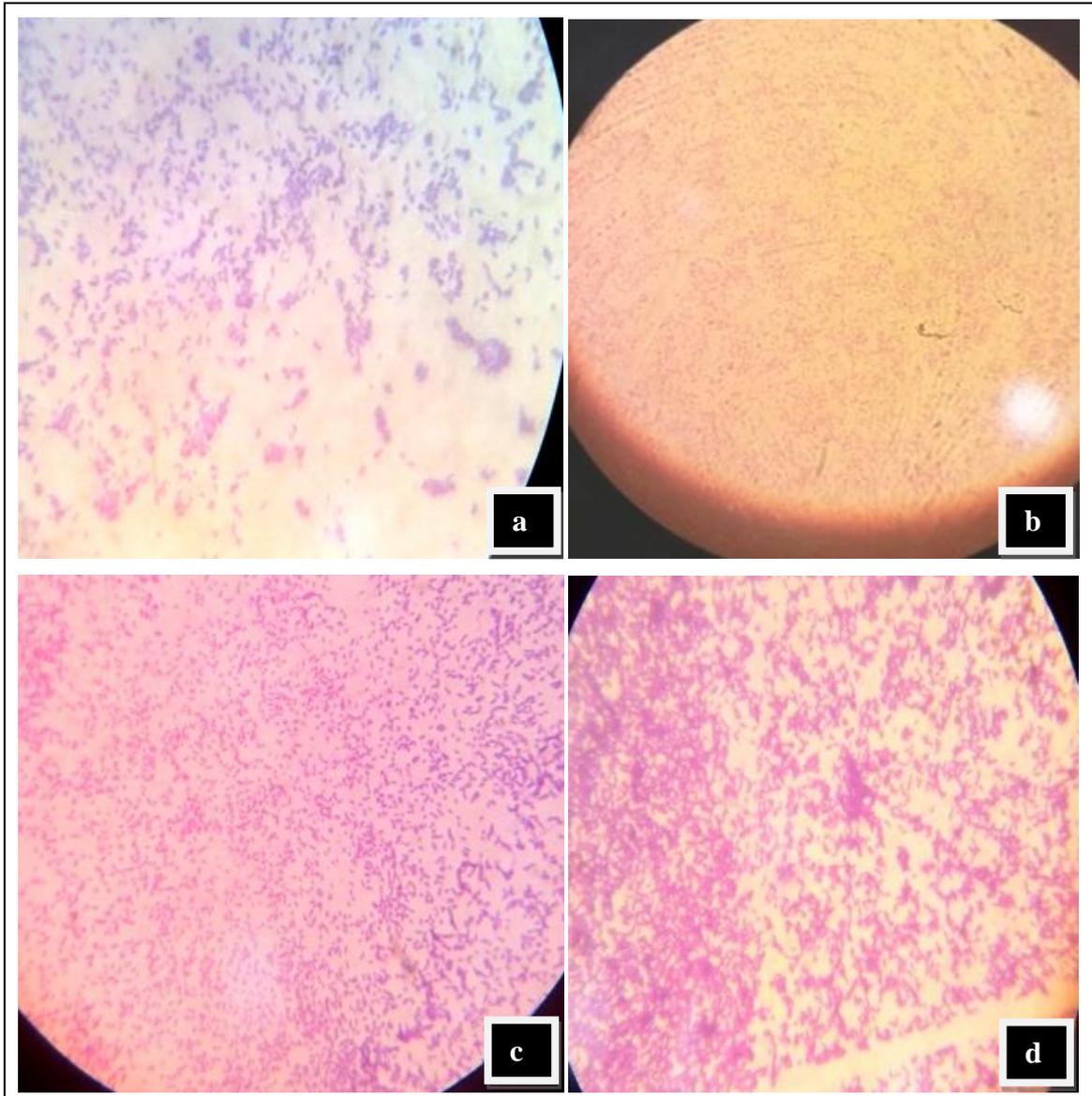


Figure 14 : Aspect microscopique des souches sélectionnées pour l'ABA, après coloration de Gram, (a) : souche S04, (b) : souche C10, (c) : souche KP15, (d) : souche KP24.

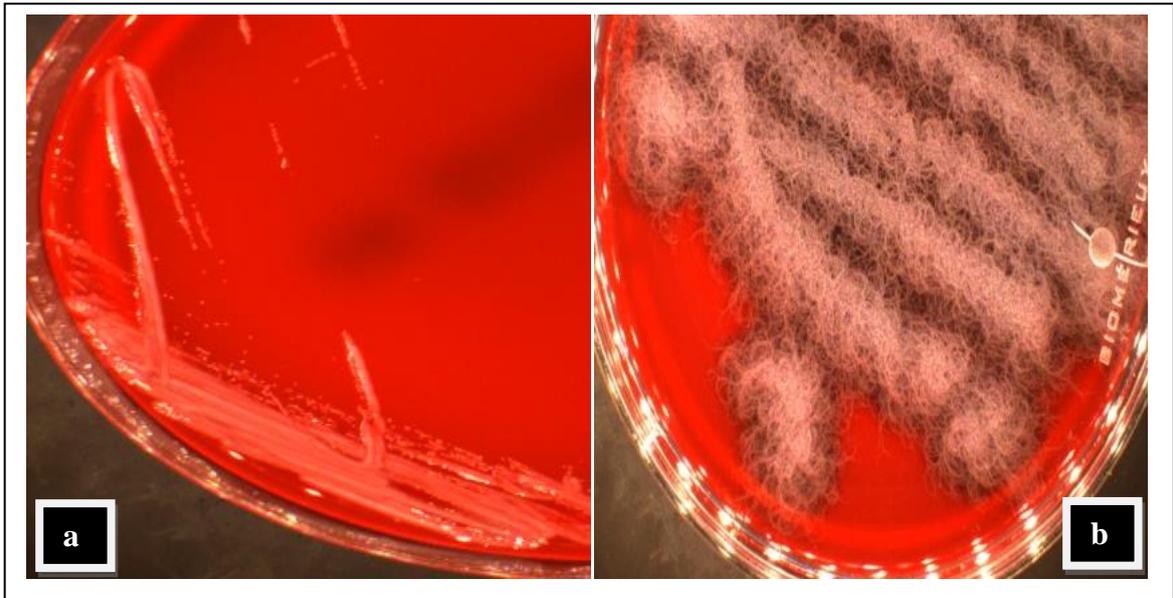


Figure 15 : Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour la deltaméthrine sur la gélose COS, **(a)** : souche B02, **(b)** : souche MC01.

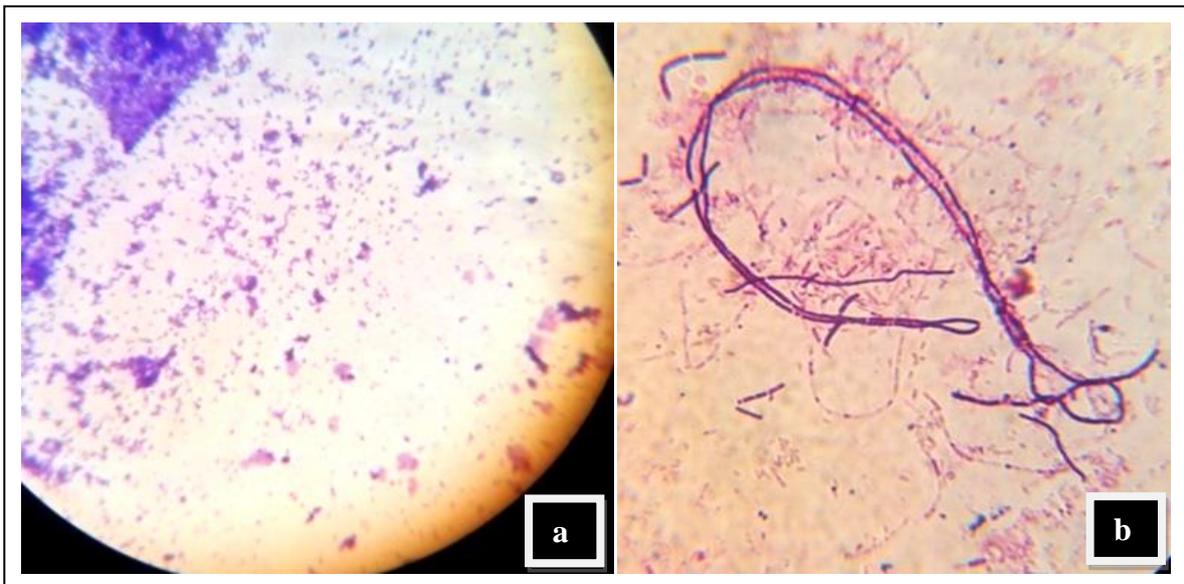


Figure 16 : Aspect microscopique des souches sélectionnées pour la deltaméthrine, après coloration de Gram, **(a)** : souche B02, **(b)** : souche MC01.

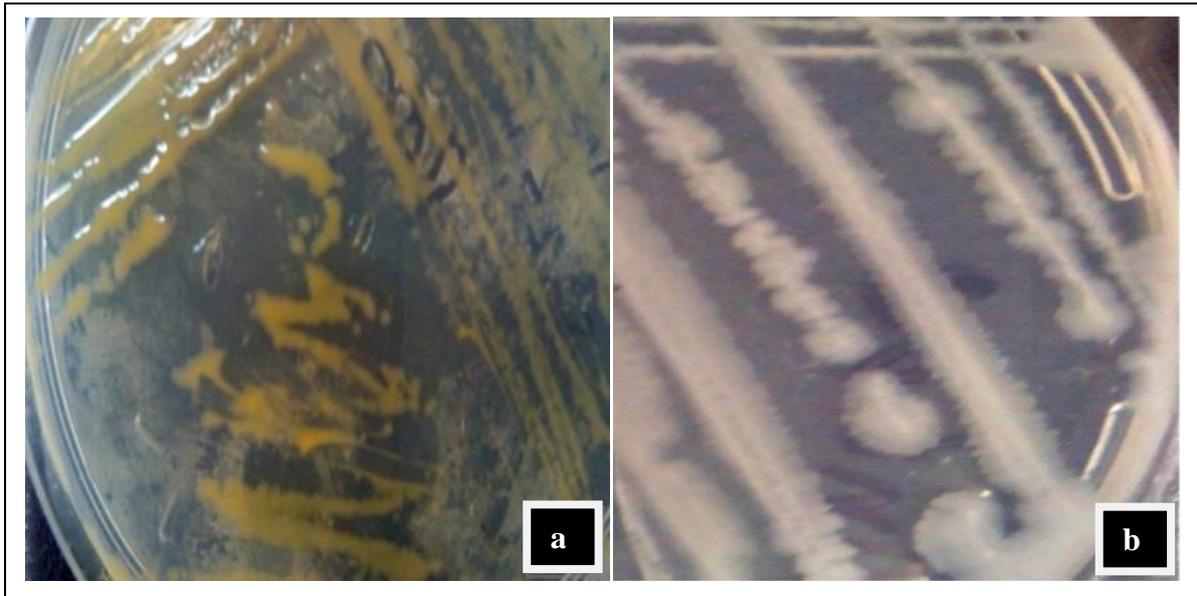


Figure 17 : Aspect des colonies bactériennes sélectionnées pour le TM sur le milieu LB, (a) : souche B05, (b) : souche ANT02.

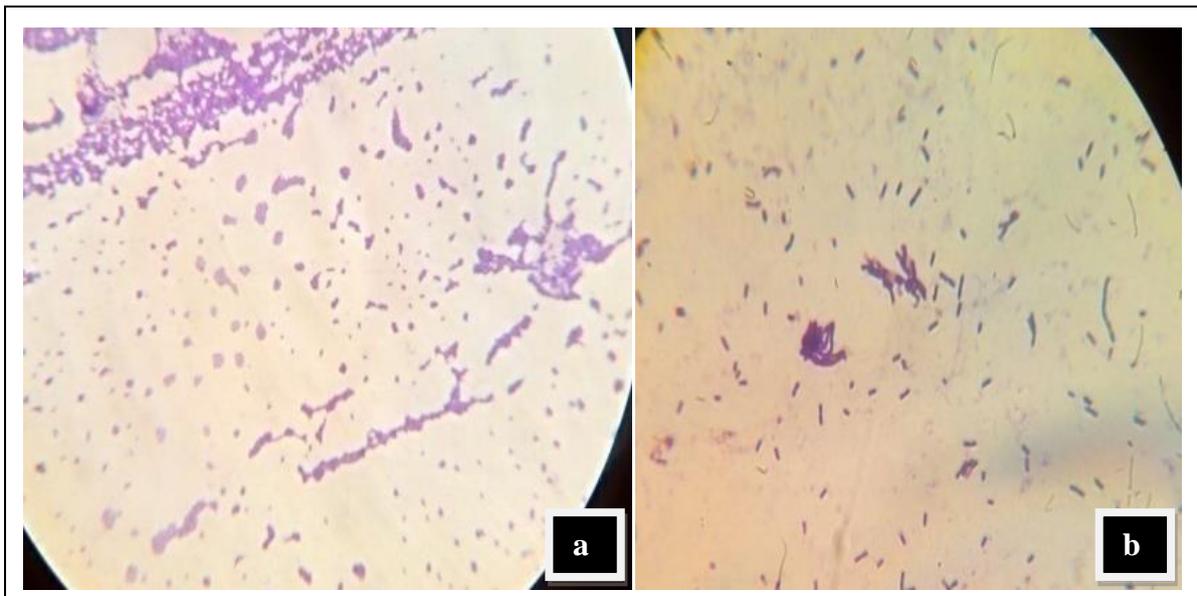


Figure 18 : Aspect microscopique des souches sélectionnées pour le TM, après coloration de Gram, (a) : souche B05, (b) : souche ANT02.

2.3. Identification des souches sélectionnées : Biochimique et MALDI-TOF-MS

L'identification des souches réalisée au premier temps par les API système (Api 20 E, Api 20 NE et Api Staph. bioMérieux, Meylan, France), a permis d'obtenir les profils biochimiques représentés dans les figures ci-dessous.

✓ Api 20 E (utilisée pour identification des *Bacillus*): *Bacillus thuringiensis*, *B. lentus*, *B. cereus* ... ;

- ✓ Api 20 NE (Non-Fermentant) : *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Achromobacter denitrificans* ... ;
- ✓ Api Staph (*Staphylococcus* sp.) : *S. auricularis*, *S. warneri*, *Kocuria rosea*



Figure 19 : Résultats obtenus par les galeries biochimiques, (a) : API 20 E ; (b) : API 20 NE ; (c) : API Staph.

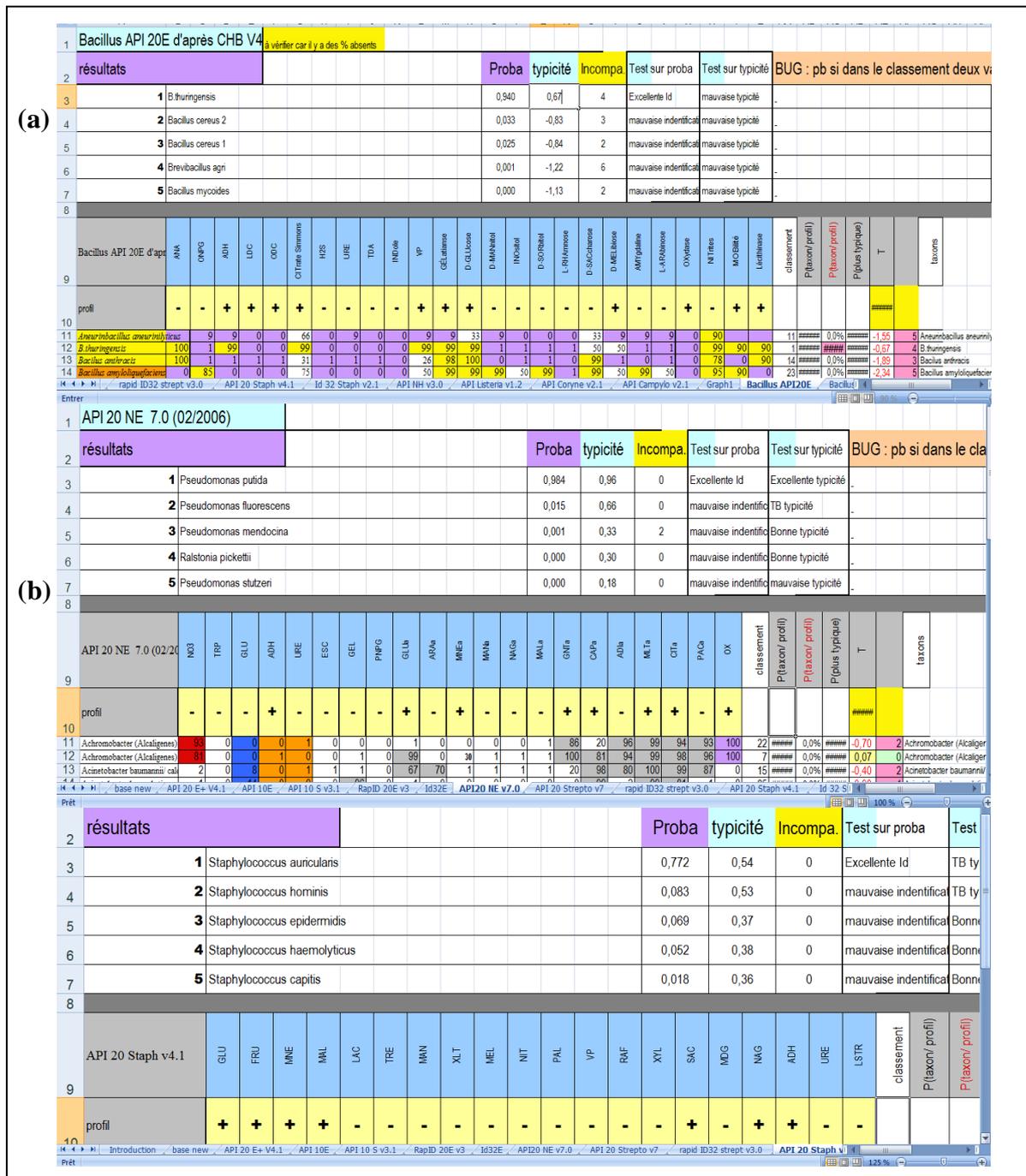


Figure 20 : Résultats de l'identification bactérienne obtenus avec le logiciel API Web (version 2011), **(a)** : API 20 E ; **(b)** : API 20 NE ; **(c)** : API Staph

La spectrométrie de masse MALDI TOF-MS, a confirmé l'identification de quelques souches en donnant les même résultats que les galeries API, et on a obtenu aussi des identifications différentes de celles obtenues des avec les galeries : le genre *Arthrobacter* au lieu de *Staphylococcus* et *Pseudomonas* à la place d'*Achromobacter*. Les résultats d'identification des bactéries ont présenté de bons scores allant de 1.89 à 2.489 comme le montre les tableaux 22 et 23.

Tableau 22 : Exemple des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF (les cases en rouge représentent le témoin négatif).

Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
A1 (-) (C)	A1 (standard)	Aucune identification possible	1,38	Aucune identification possible	1,32
A2 (-) (C)	A2 (standard)	Aucune identification possible	1,60	Aucune identification possible	1,38
A3 (++) (B)	A3 (standard)	Pseudomonas monteilii	2,19	Pseudomonas putida	2,12
A4 (++) (B)	A4 (standard)	Pseudomonas monteilii	2,25	Pseudomonas putida	2,23
A5 (++) (B)	A5 (standard)	Pseudomonas putida	2,12	Pseudomonas monteilii	2,07
A6 (++) (A)	A6 (standard)	Pseudomonas putida	2,26	Pseudomonas putida	2,18
Aperçu des résultats -- suite page suivante					

Afin de mieux comprendre la différence entre les deux méthodes utilisées dans l'identification des souches, on a regroupé leurs résultats dans un seul tableau comparatif (Tableau 23). Les galeries biochimiques et le MALDI-TOF-MS donnent des résultats très contradictoires : on distingue pour chaque souche deux espèces complètement différentes voir même des genres différents.

Tableau 23 : Résultat des identifications biochimiques et MALDITOF-MS.

Code des souches	Identification biochimique	Identification MALDI-TOF-MS
S04	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas monteilii</i> 014_W29 NFI Score : 2.16 Identifiant: 76759
C10	<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DSM 13022T HAM Score : 1.93 Identifiant: 104087
KP15	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> DSM 13227T HAM Score : 1.89 Identifiant: 86265
KP24	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T HAM Score : 2.01 Identifiant: 86265
B02	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Achromobacter piechaudii</i> DSM 11386 DSM Score : 2.23 Identifiant: 72556

B05	<i>Staphylococcus auricularis</i>	<i>Arthrobacter luteolus</i> DSM 13067T DSM Score : 2.03 Identifiant: 98672
MC01	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>B. mycoides</i> DSM 2048T DSM Score : 2.42 Identifiant: 1405
SDP1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. megaterium</i> DSM 2894 DSM Score : 2.30 Identifiant: 1404
S17	<i>B. lentus</i>	<i>B. megaterium</i> DSM 1668 DSM Score : 2.40 Identifiant: 1404
MC09	<i>B. brevis</i>	<i>B. simplex</i> CSURP558 Score: 2.33 Identifiant: 130148166
ANT14	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. subtilis</i> strain CD7.3 Score : 2.34 Identifiant: 133993714
ANT02	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i> strain CD7.3 Score : 2.489 Identifiant: 120110351

Depuis 2009, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est entrée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Elle connaît une large utilisation à cause de sa fiabilité, le délai de réponse rapide, ainsi que le coût très bas de l'analyse. Actuellement, les laboratoires ont incité à utiliser cette nouvelle technologie. Beaucoup d'études ont comparé les résultats d'identification obtenus par MALDI-TOF avec les techniques biochimiques, en faveur de la technique MALDI-TOF (Seng *et al.*, 2009 ; Bizzini *et al.*, 2010; Dupont *et al.*, 2010 ; Van Veen *et al.*, 2010 ; Bessede *et al.*, 2011; Bille *et al.*, 2012; Patel, 2013).

2.4. Identification moléculaire ADN_r16S

L'identification moléculaire des souches bactériennes sélectionnées après amplification et séquençage de leurs ADN_r16S a donné les espèces suivantes :

- S04** *Pseudomonas* sp. OX1
- C10** *Pseudomonas mediterranea* isolate strain PSB47
- KP15** *Pseudomonas migulae* strain OKB3
- KP24** *Pseudomonas* sp. clone 6A4
- B02** *Achromobacter marplatensis* strain EY-T10
- B05** *Arthrobacter* sp. dv7
- MC01** *Bacillus weihenstephanensis* strain 261ZG8
- SDP1** *Bacillus* sp. H1-80

- S17** *Bacillus* sp. strain GL5
MC09 *Brevibacterium frigoritolerans* strain WJB99
ANT14 *Bacillus* sp. strain GL5
ANT02 *Bacillus* sp. strain JDMASP42

2.4.1. Analyses phylogénétiques

L'histoire de l'évolution a été déduite en utilisant la méthode *Neighbors-Joining* (Saitou *et al.*, 1987). L'arbre optimal avec la somme de la longueur de la branche = 0,28656512 est représenté par la figure ci-dessous. L'arbre est dessiné avec des longueurs de branche dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode de vraisemblance composite maximum (Tamura *et al.*, 2004) et sont dans les unités du nombre de substitutions de base par site (Fig. 21). Les positions des codons étaient incluses du 1^{er} + 2^e + 3^e + non codant. Toutes les positions contenant les lacunes et les données manquantes ont été éliminés (en option complète de suppression). Il y avait un total de 426 positions dans l'ensemble de données final. Les analyses phylogénétiques ont été menées dans MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

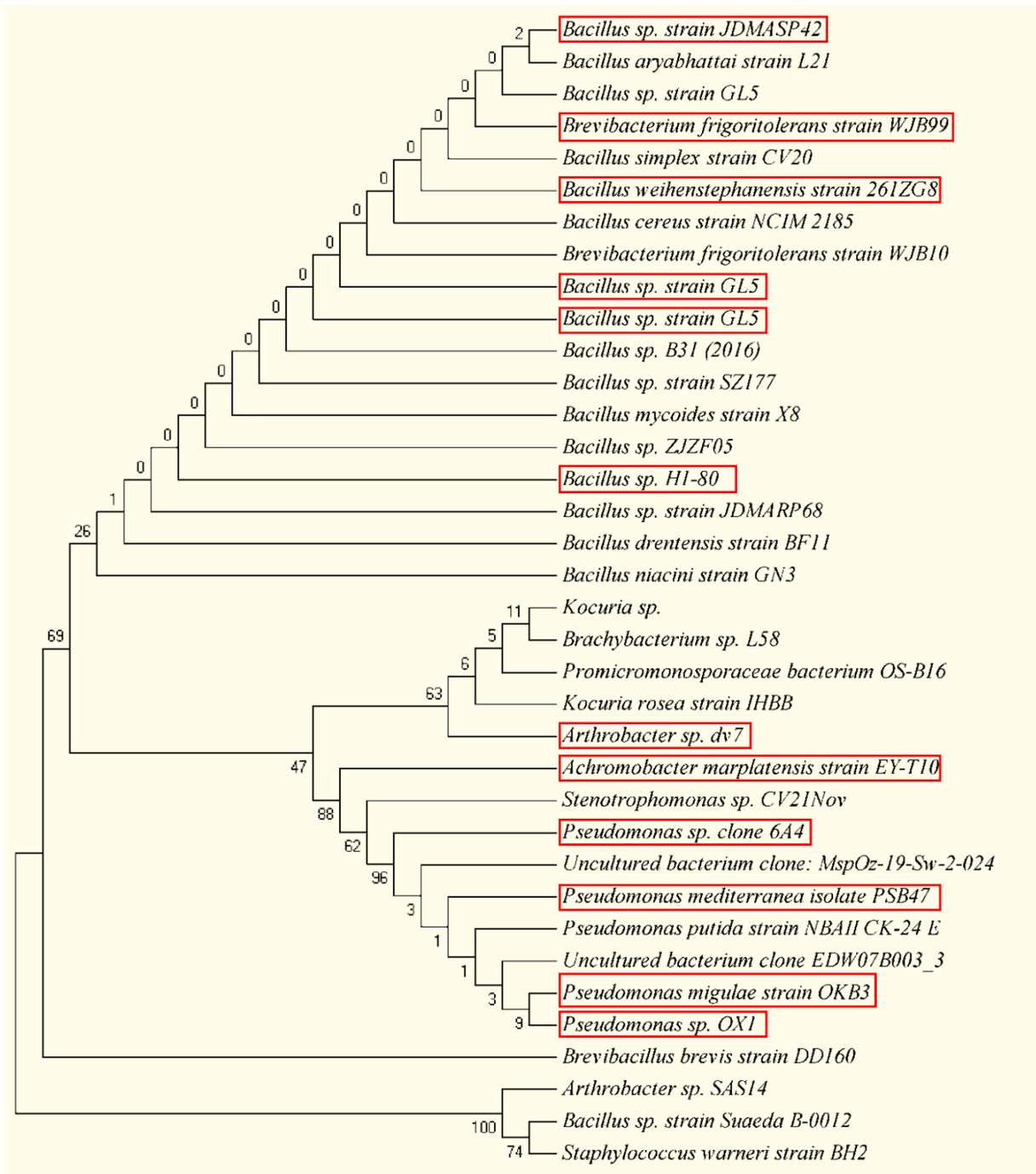


Figure 21 : Relations évolutives entre les espèces intéressantes et l'ensemble des taxons identifiés.

3. Croissance des bactéries sélectionnées en présence des pesticides

Certains travaux montrent l'aptitude des microorganismes à dégrader divers produits phytosanitaires, tout en les utilisant comme source de carbone et d'azote (Yang *et al.*, 2005 ; Fang *et al.*, 2008 ; Cycoń *et al.*, 2011 ; Wang et Xie, 2012).

Les souches intéressantes, préalablement identifiées par différentes méthodes, ont été testées en présence de concentrations croissantes des quatre xénobiotiques. En absence de source de carbone et d'énergie alternatives, les pesticides 'ajoutés en conditions stériles aux cultures bactériennes' au milieu MSM solide, puis liquide semblent être dégradés et assimilés par nos souches dans leur développement.

L'évolution de la croissance des souches a été suivie par mesure d'absorbance à 600nm par spectrophotomètre, sur des périodes relativement longues allant de 10 à 20 jours. Des prélèvements stériles (1000 µL) étaient réalisés régulièrement dans différents intervalles de temps pour déterminer s'il y a augmentation ou baisse de la biomasse cellulaire dans les conditions expérimentales éprouvées.

On a obtenu différentes allures de croissance des bactéries examinées avec les produits phytosanitaires. En fonction de celles-ci, les résultats ont essentiellement été répartis sur trois groupes.

3.1. Premier groupe bactérien

En présence de la même concentration d'Abamectine comme seule substrat carboné et d'énergie, les souches de *Pseudomonas* ont présentés des formes de courbe de progression cellulaire similaires.

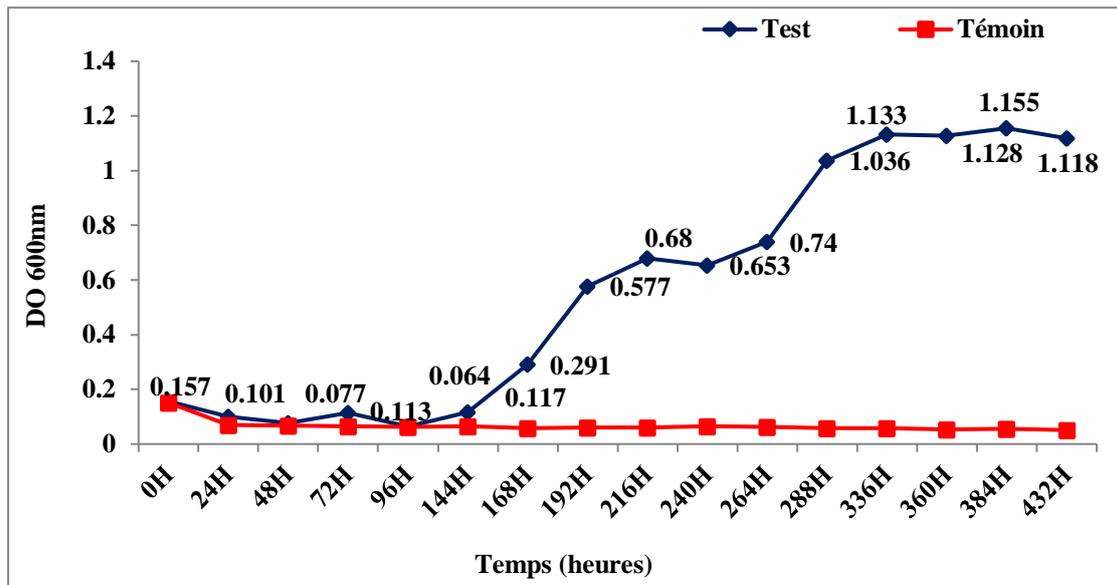


Figure 22 : Croissance de *P. mediterranea* isolate strain PSB47 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie.

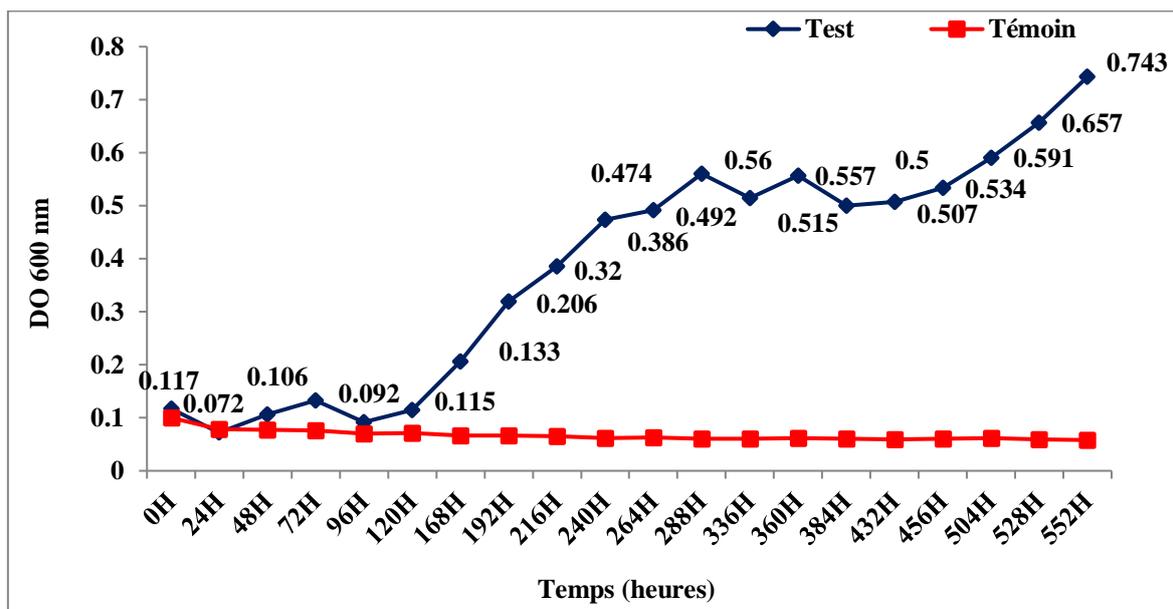


Figure 23 : Croissance de *P. migulae* strain OKB3 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie.

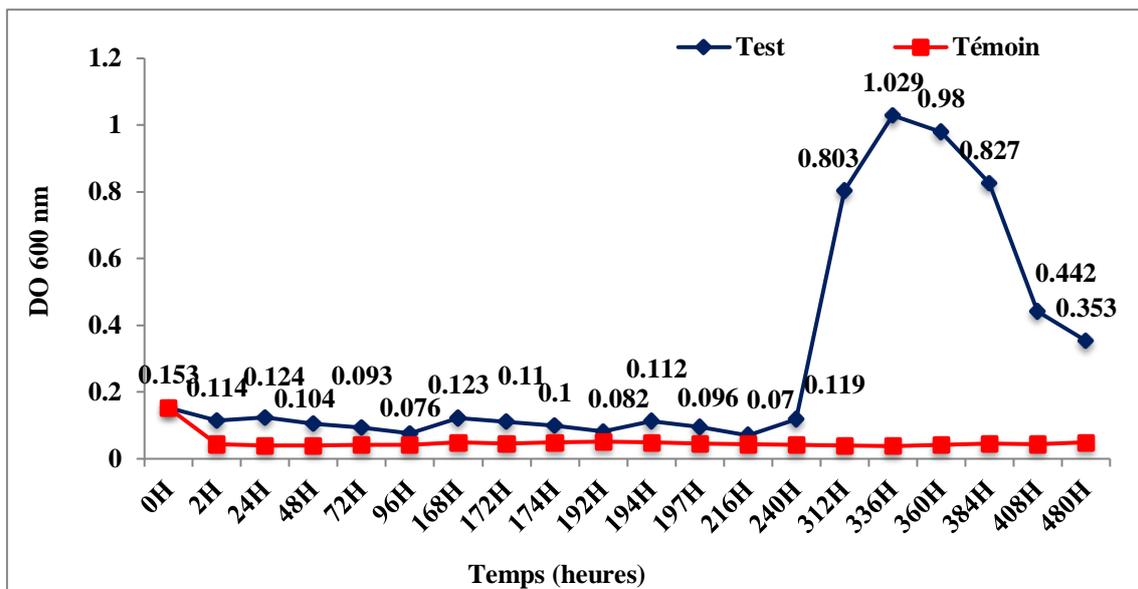


Figure 24 : Croissance de *Pseudomonas* sp. OX1 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie.

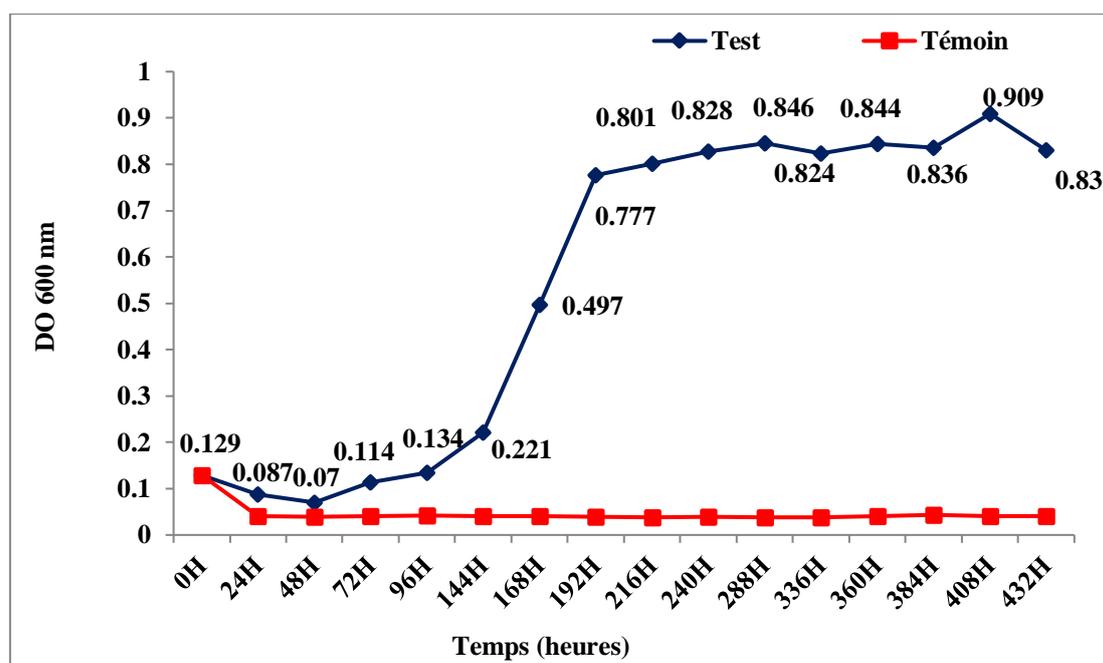


Figure 25 : Croissance de *Pseudomonas* sp. clone 6A4 en présence de 50 mg/l d'ABA comme seule source de carbone et d'énergie.

Dans la cinétique de développement de nos *Pseudomonas*, plusieurs phases peuvent être distinguées ;

La première phase révèle 'sur la base de mesure de DO 600nm' une phase de latence qui varie de quelques heures jusqu'à dix jours en fonction de l'espèce. Au cours de cette période les souches semblent avoir des difficultés dans l'adaptation avec le substrat.

Les souches de *P. mediterranea* isolate strain PSB47 et *P. migulae* strain OKB3 ont suivies un cheminement de développement similaire. Une période d'adaptation relativement longues 144h et 120h respectivement dont l'absorbance diminue remarquablement surtout pour la souche *P. mediterranea* isolate strain PSB47, et se réduit de 0.157 jusqu'à 0.064 unités de DO (Fig. 22). Le rythme de croissance s'accélère montrant ainsi l'adaptation des bactéries avec la molécule, il s'agit d'une phase exponentielle et les quantités cellulaires mesurées par absorbance 600nm augmentent de 0.064 à 1.118 au bout de 384h d'incubation pour *P. mediterranea* isolate strain PSB47 (Fig. 22) et de 0.092 à 0.743 après 552h pour *P. migulae* strain OKB3 (Fig. 23).

D'après la figure 24, la phase de latence de *Pseudomonas* sp. OX1 avec l'ABA comme unique source d'énergie et de carbone était très longue (216h). Durant cet intervalle de temps, on assiste à une importante diminution de la turbidité de 0.153 à 0.07 unités de DO. Cette période a été suivie de deux phases : une phase exponentielle accélérée exprimée par une augmentation significative de l'absorbance dans les 72h qui suivent, synonyme d'adaptation des bactéries, atteignant ainsi une valeur de 1.029 dans 336h. Cette phase qui est une preuve du phénomène d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de croissance, correspond en réalité à la phase exponentielle de croissance proprement dite durant laquelle il y a diminution de la quantité de substrat disponible pour les microorganismes dans le milieu de culture.

Une phase de déclin ou la DO diminue lentement pour arriver à 0.353 unités de DO 480h après l'inoculation.

Avec la souche *Pseudomonas* sp. clone 6A4, on distingue dans sa croissance une phase de latence très réduite 48h seulement (Fig. 25), suivie d'une phase de division accélérée dont la bactérie assimile la substance active et la biomasse augmente atteignant une DO de 0.777 après 192h. La croissance stagne entre les mesures 216h et 348h mais il ne s'agit pas de phase stationnaire proprement dite vu que la DO atteigne sa valeur maximale de 0.909 après 408h de l'inoculation.

Rappelons que les molécules utilisées dans notre travail sont des molécules 'formulées' c'est-à-dire elles ne sont pas pures et y contiennent des adjuvants permettant ainsi la dissolution des substances actives, en raison de leur caractère hydrophobe (très faiblement soluble dans de l'eau) (Tab. 11-14). On peut clairement observer l'important effet inhibiteur de l'abamectine en formulation sur la croissance des cellules d'où les longues phases d'adaptation particulièrement avec la bactérie *Pseudomonas* sp. OX1. La toxicité de l'abamectine est donc convenablement mise en évidence.

Dans le même contexte, une étude menée par Youness (2013) explique l'effet toxique du fongicide mésotrione en formulation sur les cultures de *Bacillus* sp. 3B6 et *Bacillus* sp. 1B11 à des doses de l'ordre du mMol. Néanmoins, le mésotrione pur n'exerce pas d'inhibition sur le développement bactérien.

L'aptitude des souches à métaboliser l'ABA et l'utiliser comme source d'énergie a été bien mise en évidence par comparaison avec les courbes témoins.

Nos résultats ont été confirmés par les données de la littérature au sujet de la capacité du Genre *Pseudomonas* particulièrement l'espèce *Pseudomonas* sp. à dégrader un nombre important de xénobiotiques y compris des produits phytosanitaires issus de différentes familles, présents dans de variables compartiments environnementaux, et notamment dans les sols (Bhatt *et al.*, 2016 ; Hamzah *et al.*, 2017 ; Aswathi *et al.*, 2019 ; Mali *et al.*, 2022).

Ainsi, Mandelbaum *et al.* (1995) ont reporté dans leur travail, la capacité de la souche *Pseudomonas* sp. ADP, isolée à partir d'un site de stockage d'herbicides, à métaboliser l'atrazine (fongicide appartient de la famille des triazines) à des concentrations très élevées. Pareil, Kamanavalli et Ninnekar (2000) décrivaient l'isolement à partir du sol, par enrichissements successifs, d'un *Pseudomonas* sp. dégradant le propoxur (2-isopropoxyphényl-N-méthylcarbamate). Cette souche était capable de se développer sur milieu minéral en utilisant de hautes concentrations de ce produit (2 g/l) comme seule source de carbone et d'azote, tout en accumulant, le 2-isopropoxyphénol comme métabolite principal dans le milieu de culture. Bajaj *et al.* (2010) ont également pu caractériser un *Pseudomonas* sp. IITR01 capable de métaboliser l' α -endosulfan et l'endosulfan-sulfate. Fan *et al.* (2010) ont isolé et identifié par séquençage de l'ADNr 16S, un *Pseudomonas* sp. capable de dégrader le fongicide carbendazime, avec un taux de dégradation voisin de 90 % après 3 jours seulement. Les auteurs ont proposé une voie de biodégradation où le carbendazime était minéralisé par cette souche en dioxyde de carbone. Daugherty et Karel (1994), eux ont aussi isolé une souche de *Pseudomonas cepacia* DBO1 utilisant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique comme source de carbone et/ou d'énergie.

Nos résultats concordent aussi avec les travaux réalisés par Calvayrac (2011) sur la biodégradation du sulcotrione. Parmi les souches qu'il a isolées et caractérisées, *Pseudomonas* sp. 1OP semblait avoir le meilleur pouvoir de biodégradation du sulcotrione en MSM liquide avec de 30 mg de l'herbicide. La souche a montré un développement important visualisé par mesure de l'absorbance. Sa cinétique a dévoilé deux phases : une phase de latence d'environ six jours avec une turbidité stable à 0.3, et une phase continue de croissance atteignant à une absorbance de 0.7 unités de DO, 30 jours après l'inoculation.

Selon la bibliographie, il n’existait pas de données relatives à la dégradation microbienne de l’abamectine catalysée par des souches de *Pseudomonas*. Uniquement trois bactéries ont été identifiées comme étant des souches dégradantes d’ABA. Li *et al.* (2008) ont pu isoler pour la première fois, à partir de boue activée, une souche bactérienne affiliée au genre *Bacteroidetes* espèce *Bacteroidetes endosymbiont* isolate LYH, capable de dégrader l’ABA (250 mg/l). Ces auteurs ont étudiés la biodégradation de l’ABA sous différents paramètres environnementaux et on pu mettre en évidence que les taux de biodégradation les plus élevés ont été obtenu à un pH 7.0–8.0, et à une vitesse d’agitation de 150 rpm. Ali *et al.* (2010) ont isolé à partir du sol une seconde souche, *Burkholderia sp.* GB-01 (identifiée comme une souche de *Burkholderia diffusa*), utilisant 50 et 100 mg/l d’ABA comme source de carbone d’énergie et dégradant plus de 90% de la substance active pendant 30 et 36 heures respectivement.

Enfin, l’espèce *Stenotrophomonas maltophilia* ZJB-14120 caractérisée par Wang et ces collaborateurs (2015) à partir du sol. Cette bactérie était capable de dégrader 84.82 % de l’ABA à une concentration initiale de 200 mg/l pendant 48h d’incubation. La souche a également montré une tolérance très importante à l’ABA (1000 mg) ainsi que d’autres macrolides dont l’érythromycine et la spiramycine.

NB. Parmi les souches testées, les souches bactériennes à Gram négatif sont les seules qui ont poussées en présence d’abamectine notamment en milieu liquide.

3.2. Deuxième groupe bactérien

Les figures ci-dessous (Fig. 27-31) montrent une grande similarité des courbes de développement malgré que les souches soient différentes.

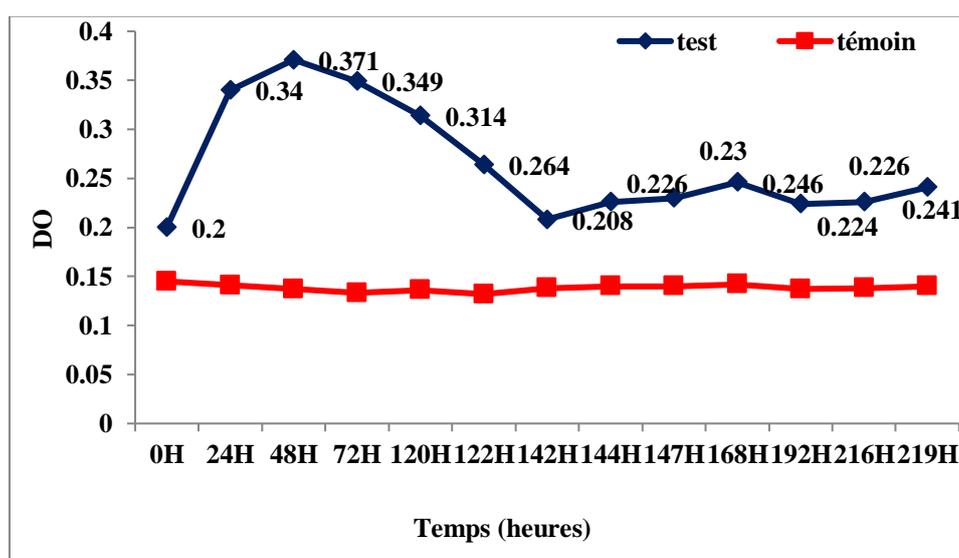


Figure 26 : Croissance de *B. weihenstephanensis* strain 261ZG8 en présence de 25 mg/l de deltaméthrine comme seule source de carbone et d’énergie.

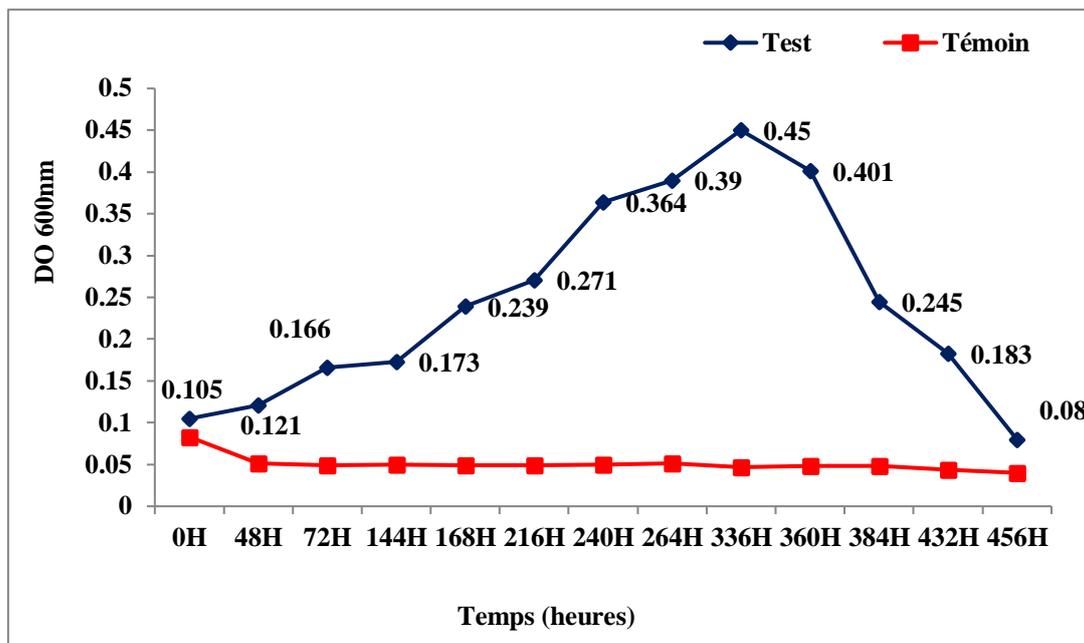


Figure 27 : Croissance de *Bacillus* sp. strain GL5 (1) en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie.

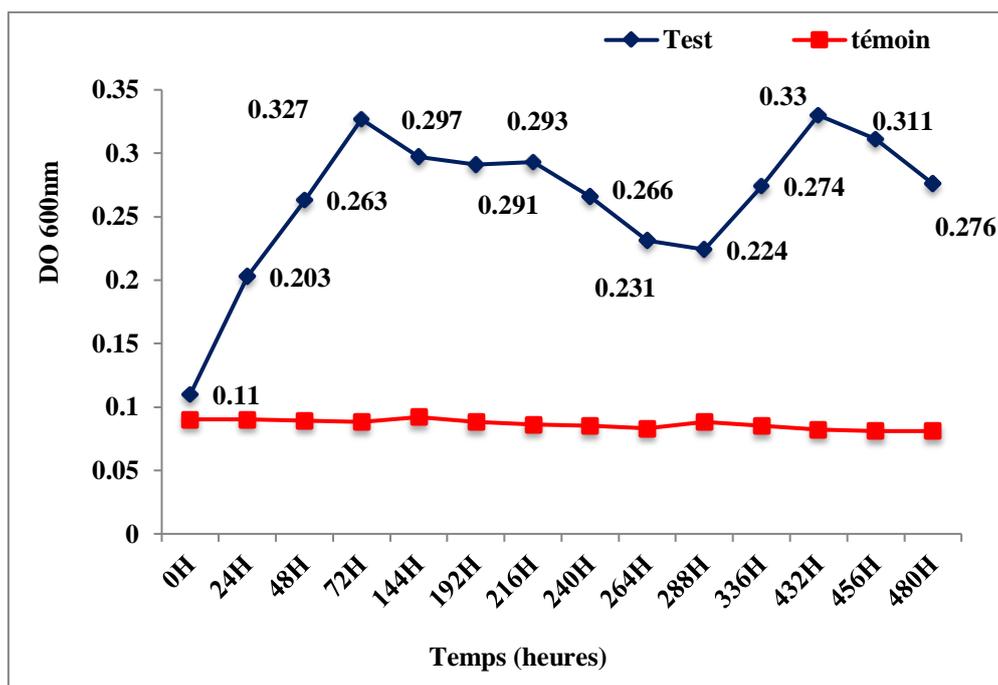


Figure 28 : Croissance de *Brevibacterium frigoritolerans* strain WJB99 en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie.

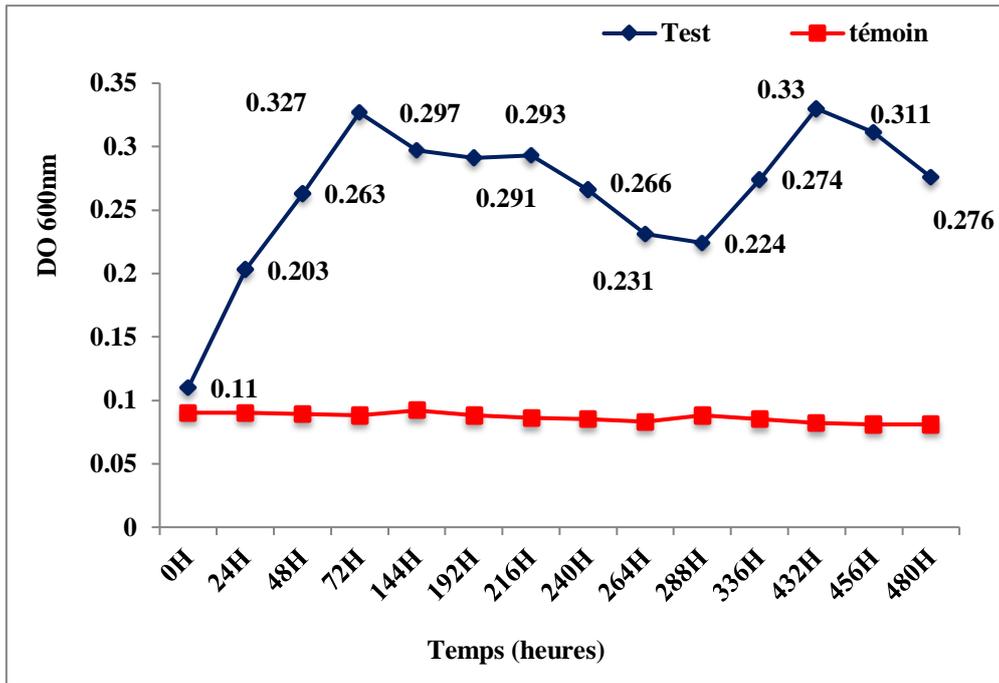


Figure 29 : Croissance de *Bacillus* sp. strain GL5 (2) en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie.

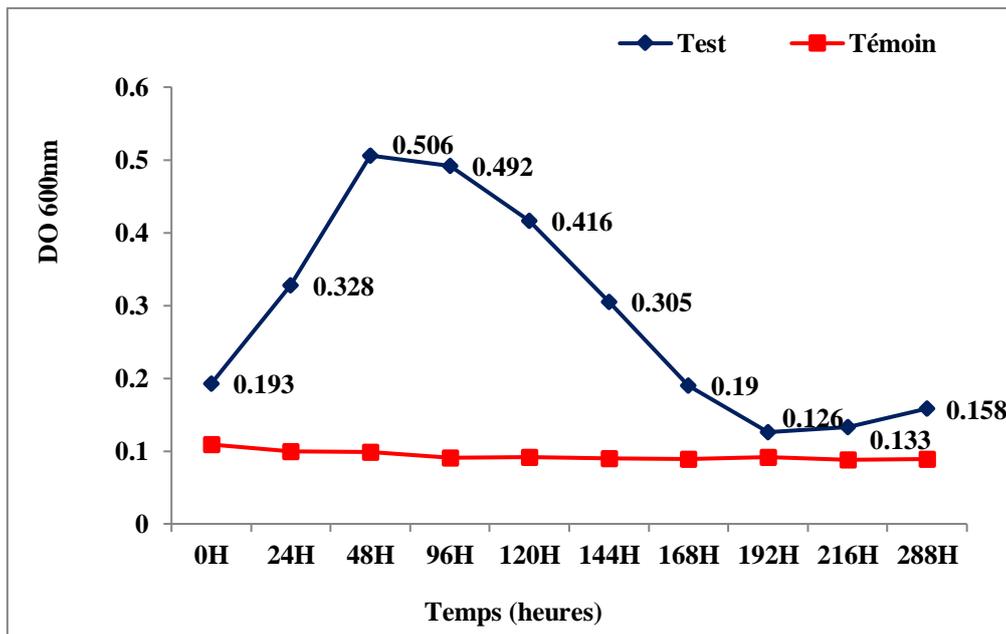


Figure 30 : Croissance de *Bacillus* sp. H1-80 en présence de 50 mg/l de CM comme seule source de carbone et d'énergie.

L'allure ne montre qu'aucun effet toxique sur la croissance des cellules bactériennes n'a été observé. On peut remarquer que l'allure des courbes est très spéciale (absence de phase stationnaire conduisant à une forme de cloche). Ces souches présentent une croissance très

particulière et caractéristique. Remarquent également que le maximum de croissance des cellules bactériennes diffère d'une souche à l'autre.

L'absence, remarquée, d'une phase de latence au niveau des courbes de croissance semble justifier le comportement assez intéressant des souches de *Bacillus* avec le CM. L'allure des courbes dévoilent une accélération assez nette et un dédoublement des quantités cellulaires jusqu'à atteindre un maximum d'absorbance au bout de 48h d'incubation seulement pour de *B. weihenstephanensis* strain 261ZG8 (Fig. 26) et *Bacillus* sp. H1-80 (Fig. 30), 72h pour *Brevibacterium frigoritolerans* strain WJB99 (Fig. 28). Les deux souches de *Bacillus* sp. strain GL5 (1 et 2) ont atteints une DO maximale après 360 et 336h respectivement (Fig. 27 et 29). Cette phase signifie l'adaptation trop rapides des bactéries avec leurs nouvelles conditions de développement au laboratoire, autrement dit il y a avait une véritable consommation (diminution) de la substance active présente dans le milieu par nos microorganismes.

Enfin, une chute commune de la densité optique chez toutes les espèces est constatée. Cette phase de croissance correspond à la phase de déclin cellulaire. Elle correspond à une décroissance cellulaire due à d'éventuelle lyse cellulaire et un manque de substrat dans le milieu de culture.

Contrairement à la conclusion constatée précédemment : pas d'effet toxique signalé avec les deux concentrations utilisées : deltaméthrine et chlorpyrifos méthyl (Fig. 26-30). La légère chute de la DO observée avec les espèces de *Brevibacterium frigoritolerans* strain WJB99 et *Bacillus* sp. strain GL5 (2) au bout des 288^{ème} et 264^{ème} heures d'incubation respectivement, pourrait être expliquée par la production de métabolites secondaires plus toxiques que la molécule de départ affectant ainsi la croissance bactérienne.

Auparavant, certaines publications décrivaient la résistance du CM à la dégradation (Racke *et al.*, 1990; Mallick *et al.*, 1999). Plus tard, des études ont identifiées des bactéries appartenant aux genres *Enterobacter* (Singh *et al.*, 2004), *Pseudomonas* (Lakshmi *et al.*, 2009; Farhan *et al.*, 2012; Chawla *et al.*, 2013), *Bacillus* (Liu *et al.*, 2012; El-Helow *et al.*, 2013) et *Klebsiella* (Ghanem *et al.*, 2007) exhibant avec efficacité leur capacité à dégrader le CM. D'autres études récentes énoncent la diversité des bactéries dégradant le CM dont *Bacillus* (Anwar *et al.*, 2009 ;), *Alcaligenes* (Yang *et al.*, 2005), *Paracoccus* (Xu *et al.*, 2008), *Sphingobacterium* (Abraham and Silambarasan, 2013) et *Mesorhizobium* (Jabeen *et al.*, 2015). Ces dernières pouvaient user le CM comme source de carbone et d'énergie et dégrader le TCP (3, 5, 6-trichloropyridinol), métabolite plus toxique que le CM lui même et modérément mobile dans le sol.

La littérature est riche en revues et travaux mettant en évidence l'importance du genre *Bacillus* dans la biodégradation et la bioremédiation des pesticides notamment le chlorpyrifos (Ahmad *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2017; Farhan *et al.*, 2021 ; Bose *et al.*, 2021; Elshikh *et al.*, 2022 ; Zhang *et al.*, 2022). Maya *et al.* (2011) ont étudiés la vitesse de la biodégradation du CM par trois microorganismes dont *Bacillus* sp. étaient capables d'éliminer 52% des doses testées durant dix jours. Une autre étude réalisée par Liu *et al.* (2012) dévoile la capacité de *Bacillus cereus* à dégrader jusqu'à 74% du CM avec une concentration initiale 100mg/l. Une souche de *Bacillus pumilis* C2A1 strain isolée par Anwar *et al.* (2009) à partir d'une culture de coton en Pakistan, a montré son importante capacité de métaboliser de fortes doses de CM dans différentes conditions (ainsi que le TCP) : 100, 200 et 300 mg/l à raison de 73%, 83% et 87% respectivement en milieu liquide pendant dix jours.

3.3. Troisième groupe bactérien

L'aspect des courbes ci-dessous, obtenues avec le fongicide Thiophanate méthyl, était altéré par cette substance.

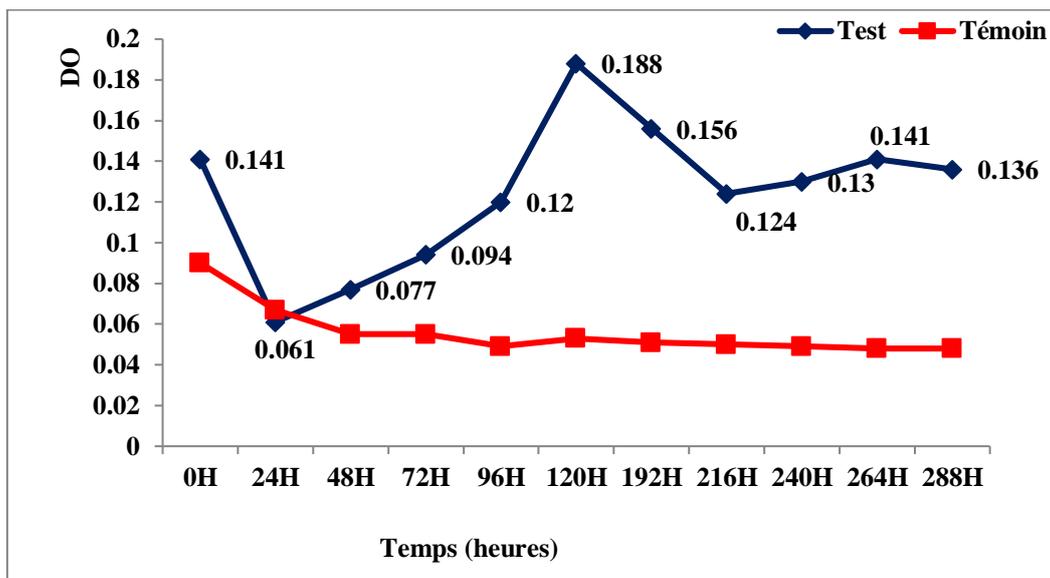


Figure 31 : Croissance de *Bacillus* sp. strain JDMASP42 en présence de 50 mg/l de TM comme seule source de carbone et d'énergie.

Dans la figure 31 ci-dessus on constate une forte inhibition la croissance cellulaire après 24h d'incubation exercée par le TM, conduisant à l'abaissement de la biomasse microbienne de départ, visualisée toujours par mesure d'absorbance à 600nm. Un dédoublement progressif des cellules est noté par une phase exponentielle dans laquelle la turbidité atteint 0.188 unités de DO, 120h plus tard.

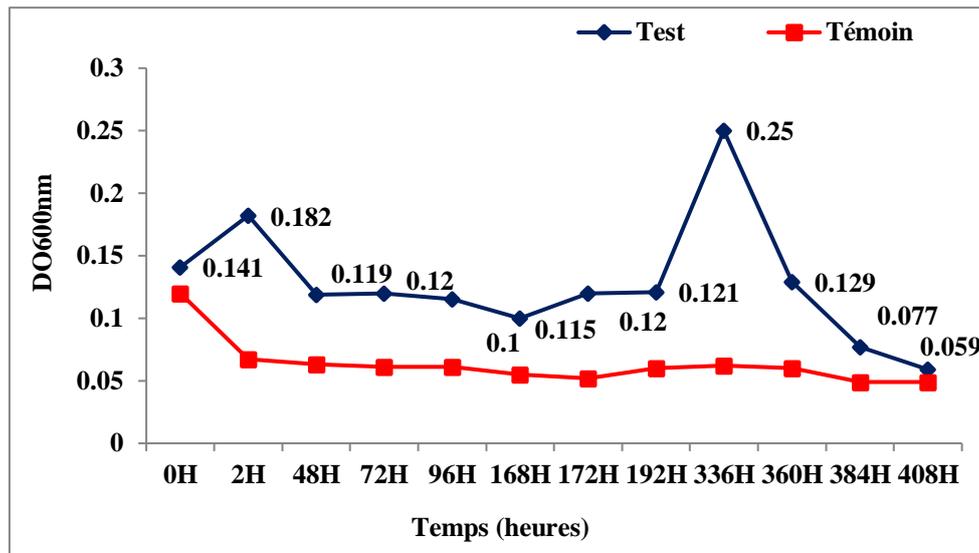


Figure 32 : Croissance d'*Arthrobacter* sp. dv7 en présence de 50 mg/l de TM comme seule source de carbone et d'énergie

Avec 50 mg/l de Thiophanate Méthyl comme seule source de carbone et d'énergie, *Arthrobacter* sp. dv7 montre un rythme de développement très caractéristique. Une faible augmentation de la DO après 2h de l'inoculation (Fig. 32) a été remarquée. Il est fort possible que cette élévation serait due à la consommation des résidus du substrat carboné précédemment présent dans le milieu gélosé (culture fraîche sur LB utilisé pour ensemencement). Cette élévation a été suivie d'une diminution de turbidité de 0.182 jusqu'à 0.1 unité de DO après 168h, le même phénomène a été constaté avec la souche de *Bacillus* sp. strain JDMASP42. Une valeur voisine de 0.250 unités de DO a été observée tardivement après 336h d'inoculation signifiant alors la difficulté d'adaptation avec le milieu, la faible assimilation du TM par la souche ainsi que son effet inhibiteur sur sa croissance. D'après la bibliographie (Roberts *et al.*, 1998), la dégradation du TM se fait principalement par oxydation et hydrolyse, générant ainsi le méthyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) métabolite à effet fongicide aussi et très rémanent dans l'environnement. Un nombre limité de microorganismes sont capables de convertir le TM en MBC puis en CO₂ dont on trouve seulement *Enterobacter* sp. et *Bacillus* sp. (Cycon *et al.*, 2011).

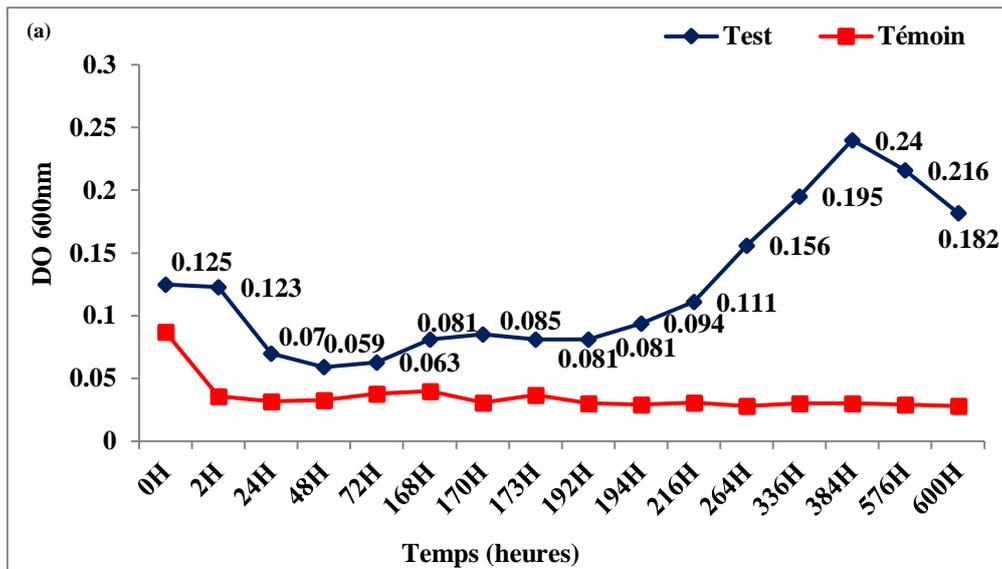


Figure 33 : Croissance d'*Achromobacter marplatensis* strain EY-T10 en présence de 25 mg/l de deltaméthrine comme seule source de carbone et d'énergie.

Achromobacter marplatensis strain EY-T10 a eu les cycles de croissance les plus lents avec un déclin cellulaire très attardé avec 600h (25 jours) de mesure. Pareil, une baisse très importante de la biomasse a été également marquée de 0.125 à 0.059 unités de DO après 72h seulement (Fig. 33). Le microorganisme continue son développement avec un rythme stable et lent, l'optimum de la croissance est obtenu au bout 384h. Contrairement à la souche de *Bacillus weihenstephanensis* strain 261ZG8 (Fig. 26), cette bactérie apparaît peu acclimatée avec la deltaméthrine et ses cycles de développement étaient fortement affectés par sa toxicité. La bactérie n'arrive pas à cataboliser la substance active aisément.

Ce résultat s'accorde fortement avec une étude publiée par Zhang *et al.* en 2009 à propos de l'impact du cyperméthrine -insecticide appartenant à la famille des pyréthriinoïdes- sur la diversité de la microflore tellurique. Le travail dévoile le rabais de l'effectif des bactéries à Gram négatif, et une augmentation des firmicutes.

La conclusion retirée ici serait comme suit : parmi les pesticides testés, il s'agit du fongicide thiophanate méthyl qui exhiberait le plus d'effet inhibiteur et toxique sur la croissance, malgré son emploi à grande échelle au niveau des stations d'échantillonnage (souches faiblement adaptées). Cela est vraisemblablement dû à la quantité importante d'adjuvants rentrant dans la composition du TM formulé (Pelt 70): 30 g d'adjuvants dans les 100 g de produit commercialisé.

Pour résumer et mieux expliquer la diversité des résultats observés avec les bactéries testées, un schéma général du phénomène d'adaptation et la biodégradation de façon générale a été

proposé: la première application d'un produit phytosanitaire dans une parcelle agricole se traduit par une dégradation de la substance active après une période plus ou moins longue selon la nature du produit, appelée période de latence. Cette première phase correspond à l'induction enzymatique pouvant s'expliquer par une adaptation physiologique et/ou génétique des populations microbiennes concernées. Au cours d'une deuxième phase, la dégradation de la substance active se traduit très souvent par une décroissance exponentielle de la concentration résiduelle. Cette phase n'est réellement mesurable qu'à la seule condition d'avoir une densité cellulaire suffisante. Si l'application du même produit est successivement répétée un grand nombre de fois, la présence d'une très forte densité de souches microbiennes adaptées entraîne une diminution, voire une suppression de la phase de latence. Dans ce cas, au sein de ces sols dits « adaptés », 80 % du produit phytosanitaire appliqué peut ainsi être rapidement biodégradé en moins de 15 jours (Devers, 2008). Ce potentiel dégradant d'un sol adapté à la substance active peut se maintenir sur des périodes allant de quelques semaines à plusieurs années après l'arrêt total des traitements. La disparition de cette capacité catabolique peut résulter de la perte du caractère génétique en l'absence de pression de sélection suffisante au sein des communautés microbiennes telluriques (Roeth, 1986 ; Walker et Welch, 1991 ; Parekh *et al.*, 1992 ; Anderson et Lafuerza, 1992 ; Suett *et al.*, 1993 ; Smelt *et al.*, 1996 ; Morel-Chevillet, 1998).

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture tout en réduisant les dommages causés par les agents phytopathogènes, contribue à la dégradation des différents compartiments de l'environnement. En effet, un sol, longuement et périodiquement en contact avec le même xénobiotique, a plus de chance, de renfermer dans sa communauté microbienne, une multitude de microorganismes qui se sont adaptés et acclimatés aux pesticides utilisés dans la présente recherche. Le but de notre étude consiste à isoler et caractériser des souches microbiennes autochtones du sol, suivre leurs rythmes de croissance et déterminer leurs différentes phases de développement en présence de quatre molécules de produits phytosanitaires comme unique- source de carbone et énergie.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des échantillons de sol ont été prélevés à partir de trois stations situées dans la région d'El Kous - El Tarf, dirigées par l'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (ITCMI). Les stations ont été traitées périodiquement par différentes familles de produits phytopharmaceutiques d'où le choix des molécules testées. La station 2 présente une structure sablo-limoneuse avec un pourcentage élevé en sable, les stations 1 et 3 ont une texture limono-sableuse, une faible proportion en sable en particulier la première station, et un pourcentage assez élevé en limon et argile. Les sols présentent un pH basique, pauvres en matière organique, et considérés comme des sols non salés.

Quarante-huit souches obtenues, réparties entre Gram positif et Gram négatif, ont été isolées à partir des échantillons de sols. Afin de sélectionner des souches dégradant les pesticides, les souches ont été mis en culture sur gélose minérale MSM dont le Chlorpyrifos-méthyl, la Deltaméthrine, l'Abamectine et le Thiophanate-méthyl constituaient l'unique source de carbone et d'énergie. En fonction de l'aspect des cultures obtenues sur gélose minérale et la rapidité de croissance des souchesensemencées, douze espèces bactériennes ont été sélectionnées pour les tests de biodégradation sur MSM liquide. Les souches choisies ont été identifiées par les méthodes microbiologiques classiques, par MALDI-TOF-MS, et par biologie moléculaire. Enfin, une analyse phylogénétique des souches a été également réalisée.

Différentes allures de croissance des bactéries examinées avec les produits phytosanitaires ont été obtenues. En fonction de celles-ci, les résultats ont essentiellement été répartis sur trois groupes. Avec l'abamectine les souches de *Pseudomonas* dévoilaient de longues phases de développement, en particulier la phase de latence, signifiant ainsi l'effet inhibiteur de l'abamectine en formulation. L'aptitude des souches à métaboliser l'ABA et l'utiliser comme source d'énergie a été bien mise en évidence.

Par contre, aucun effet toxique sur la croissance des cellules bactériennes n'a été observé avec le deuxième groupe bactérien (les différentes espèces appartenant au genre *Bacillus*), testés avec la deltaméthrine et le Chlorpyrifos méthyl. L'aspect des courbes obtenues était très spéciale (absence de phase stationnaire conduisant à une forme de cloche). Ces souches présentent une croissance très particulière et caractéristique, indiquant l'adaptation trop rapide des bactéries avec la molécule et les conditions de culture. Finalement, une cinétique de développement altérée a été obtenue avec les microorganismes de ce groupe. Parmi les pesticides testés, il apparaît clairement que le thiophanate méthyl exhiberait le plus d'effet inhibiteur et toxique sur la croissance, malgré son usage à grande échelle au niveau des

stations d'échantillonnage, probablement du à l'importante quantité d'adjuvants rentrant dans la composition du TM commercialisé. Plusieurs facteurs rentrent en jeu dans la biodégradation d'un xénobiotique dont la nature du produit lui-même, la fréquence de son application dans une parcelle donnée, ainsi que la physiologie et le matériel génétique et enzymatique portés par la communauté microbienne du sol. Ces facteurs expliquaient la diversité des résultats observés avec nos bactéries.

En perspective, il serait intéressant de :

- ✓ Faire des dosages par chromatographie liquide (quantitative et qualitative) afin de déterminer la quantité de pesticides consommée par les souches, identifier les métabolites produits au cours de leurs croissances et éventuellement identifier la voie de leur biodégradation.
- ✓ Tester les souches avec d'autres molécules appartenant aux mêmes familles des pesticides étudiés.
- ✓ Tester d'autres pesticides avec les souches isolées.
- ✓ Tester d'autres souches avec les molécules étudiées.
- ✓ Améliorer les conditions de culture pour accélérer le phénomène de biodégradation et réduire les longues phases de latence.
- ✓ Identifier les gènes responsables de la biodégradation des organophosphorés.
- ✓ Identifier les gènes responsables de la biodégradation des pyréthriinoïdes.
- ✓ Identifier les gènes responsables de la biodégradation des avermectines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbassy M.A., Salim Y.M.M., Shawir M.S. and Nassar A.M.K. (2017).** Disappearance and hazard quotient of chlorpyrifos-methyl, fipronil, and imidacloprid insecticides from dates. *J. Consum. Prot. Food. S.* 12: 223-230.
2. **Abraham J. and Silambarasan S. (2013).** Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Sphingobacterium* sp. JAS3. *Process Biochem.* 48: 1559–1564.
3. **Acero J.L., Stemmler K. and Von Gunten U. (2000).** Degradation kinetics of atrazine and its degradation products with ozone and OH radicals: a predictive tool for drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 34: 591-59.
4. **ACTA, 2005. Index Phytosanitaire ACTA 2005.** 41ème éd. Paris. Association de Coordination Technique Agricole. France. pp. 820.
5. **Ahmad F., Iqbal S., Anwar S., Afzal M., Mustafa T. and Khan Q.M. (2012).** Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumilus* C2A1. *J. Hazard. Mater.* 237: 110–115.
6. **Aktar, W., Sengupta D. and Chowdhury A. (2009).** Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2: 1–2.
7. **Alavanja, M.C.R. (2009).** Pesticides use and exposure extensive worldwide. *Rev Environ Health.* 24 (4): 303–309.
8. **Albers-Schonberg G., Arison B.H., Chabala, J.C., Douglas A.W., Eskola P., Fisher M.H., Lusi A., Mrozik H., Smith J.L. and Tolman R.L. (1981).** Avermectins: structure determination. *J Am Chem Soc,* 103 (14): 4216–4221.
9. **Ali S.W., Li R., Zhou W.Y., Sun J.Q., Guo P., Ma J.P. and Li S.P. (2010).** Souchesion and characterization of an abamectin-degrading *Burkholderia cepacia*-like GB-01 strain. *Biodegradation.* 21: 441-452.

- 10. Ali S.W., Yu F.B., Haider M.S., Yan X. and Li S.P. (2013).** Phenotypic and phylogenetic characterization of an abamectin-degrading bacterial strain soucheded from a citrus orchard. *J Gen Appl Microbiol.*, 59: 215-225.
- 11. Ali S.W., Yu F.B., Li L.T., Li X.H., Gu L.F., Jiang J.D. and Li S.P. (2012).** Studies revealing bioremediation potential of the strain *Burkholderia* sp. GB-01 for abamectin contaminated soils. *World J Microbial Biotechnol.*, 28: 39-45.
- 12. Alletto L., Coquet Y., Benoit P., Heddadj D. and E. Barriuso (2010).** Tillage management effects on pesticide fate in soils. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, 30(2): 367-400.
- 13. Diop Amadou. (2013).** Diagnostic des pratiques d'utilisation et quantification des pesticides dans la zone des Niayes de Dakar (Sénégal). Thèse de Doctorat Université du Littoral Côte d'Opale, discipline : Chimie analytique.
- 14. Añasco N., Uno S., Koyama J., Matsuoka T. and Kuwahara N. (2010).** Assessment of pesticide residues in freshwater areas affected by rice paddy effluents in Southern Japan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(11): 371-383.
- 15. Anderson J.P.E. and Lafuerza A. (1992).** Microbiological aspects of accelerated pesticide degradation. In: Anderson, J.P.E., Arnold, D.J., Lewis, F., Torstensson, L. (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*. Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 184-192.
- 16. Anne P. (1945).** Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Ann. agron.*, 15 année, N° 2.
- 17. Anonyme 5. (2005).** 166-World Health. Organization. The W.H.O. Recommended classification. Ed-WHO. Library cataloguing. In. *Publication Data*: 2-9.

- 18. Anwar S., Liaquat F., Khan Q. M., Khalid Z. M. and Iqbal S. (2009).** Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6 trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. J. Hazard. Mater. 168: 400–405.
- 19. APE USA (Données 2007).** Agence de protection environnementale USA.
- 20. Arutchelvan V., Kanakasabai V., Nagarajan S. & Muralikrishnan V. (2005).** Souchesion and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. J Hazard Mater, 127: 238–243.
- 21. Aswathi A., Ashok P. and Rajeev K. (2019).** Rapid degradation of the organophosphate pesticide – Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3. Bioresour. Technol. 292: 122025.
- 22. Ayad Mokhtari N. (2012).** Identification et dosage des Pesticides dans l’Agriculture et les problèmes d’environnement liés. Mémoire de Magister de l’université d’Oran, discipline : Chimie organique (environnement).
- 23. Cohn B. A. (2011).** Developmental and environmental origins of breast cancer: DDT as a case study. *Reprod. Toxicol.*, 31: 302-311.
- 24. Batisson I., Crouzet O., Hogga, PB., Sancelme M., Mango, J.F., Mallet C. and Bohatier J. (2009).** Souchesion and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environmental Pollution*, 157: 1195-1201.
- 25. Bedos C., M.-F. Rousseaux, Djabri D., Flura S., Masson E., Barriuso and Cellier P. (2002).** Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin. *Atmospheric Environment*. 36, 5917-5925.

- 26. Ben Hassine S. and Ben Ameer W. (2012).** Determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominateddiphenyl ethers in human milk from Bizerte (Tunisia) in 2010. *Chemosphere* 89: 369–377.
- 27. Bessede E., Angla-Gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Menard A. and Megraud F. (2011).** Matrix-assisted laser desorption/ionization biotyper experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect.* 17(4): 533–8.
- 28. Bhatt P., Sharma A., Gangola S., Khati P., Kumar G. and Srivastava A. (2016).** Novel pathway of cypermethrin biodegradation in a *Bacillus* sp. strain SG2 souched from cypermethrin-contaminated agriculture field. *Biotechnology.* 6(45): 1-11.
- 29. Bille E., Dauphin B., Leto J., Bougnoux M.E., Beretti J.L., Lotz A. (2012).** MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect,* 18(11):1117–25.
- 30. Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G. and Prod'hom G. (2010).** Performance of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely souched in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 48(5):1549–54.
- 31. Bloomquist J.R. (1996).** Insecticides : chemistries and characteristics. In: E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison [eds.], *Radcliffe's IPM World Textbook.*
- 32. Bocquené G. and Franco A. (2005).** Pesticide contamination of the coastline of Martinique. *Marine Pollution Bulletin.* 51(5-7) : 612-619.
- 33. Borch T., Kretzschmar R., Kappler A., van Cappellen P., Ginder-Vogel M., Voegelin A. and Campbell K. (2010).** Biogeochemical redox processes and their

- impact on contaminant dynamics. *Environmental Science & Technology*, 44(1): 15-23.
- 34. Bose S., Kumar P.S., Vo D.V.N. (2021).** A review on the microbial degradation of chlorpyrifos and its metabolite TCP. *Chemosphere*. 283: 131447.
- 35. Bosma H., vanBoxtel M. P., Ponds R.W., Houx P.J. and Jolles J. (2000).** Pesticide exposure and risk of mild cognitive dysfunction. *Lancet*, 356(9233): 912-913.
- 36. Bouseba B., Zertal A., Beguet J., Rouard N., Devers M., Martin C. and Martin-Laurent F. (2009).** Evidence for 2,4-D mineralisation in Mediterranean soils: impact of moisture content and temperature,. *Pest Manage. Sci.*, 65(9): 1021-1029.
- 37. Bouziani M. (2007).** L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. *Le guide de la médecine et de la santé. Santé Maghreb*.
<https://santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>
- 38. Brittain C. A., Vighi M., Bommarco R., Settele J. and Potts S. G. (2010).** Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology* , 11(2): 106-115.
- 39. Burg R.W., Miller B.M., Baker E.E., Birnbaum J., Currie S.A., Hartman R., Kong Y.L., Monaghan R.L., Olson G., Putter I., Tunac J.B., Wallick H., Stapley E.O., Oiwa, R. and Omura S. (1979).** Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Ch.*, 15(3): 361-367.
- 40. Burker J.G. and Schnoor J.L (1998).** Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environ Sci Technol.*, 32: 3379–3385.

- 41. Burker J.G., Schnoor J.L. (1998).** Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environ Sci Technol.* 32: 3379–3385.
- 42. Cabidoche Y. M., Achard R., Cattan P., Clermont-Dauphin C., Massat F. and Sansoulet J. (2009).** Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue, *Environmental Pollution.* 5(157): 1697-1705.
- 43. Calvayrac C. (2011).** Dégradation biologique de la sulcotrione dans un sol agricole: recherche d'une éventuelle biodégradation accélérée et caractérisation de souches bactériennes potentiellement dégradantes. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan Via Domitia, discipline : biologie.
- 44. Calvet R. (2005).** France Agricole, Les pesticides dans le sol conséquences agronomiques et environnementales, France : 1- 307.
- 45. Calvet R., Barriuso E., Benoit P., Bedos C., Charnay M. and Coquet Y. (2005).** Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales, Paris: Editions France Agricoles. 637 p.
- 46. Calvet R., Terce M. and Arvieu J.C. (1980).** Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants. I- Description du phénomène d'adsorption. *Annales Agronomiques*, 31 : 33-62.
- 47. Carbone P., Giordano F., Nori F., Mantovani A., Taruscio D., Lauria L. and Figà-Talamanca I. (2006).** Cryptorchidism and hypospadias in the Sicilian district of Ragusa and the use of pesticides. *Reprod. Toxicol.* 22: 8-12.
- 48. Chawla N., Suneja S., and Kukreja K. (2013).** Souches et caractérisation de chlorpyrifos dégradant bactéries. *Indian J. Agric. Res.* 47 : 381–391.
- 49. Ciani A., Goss K. U. and Schwarzenbach R. P. (2005).** Light penetration in soil and particulate minerals. *European Journal of Soil Science.* 56(5): 561-574.

- 50. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A. and Wolk D.M. (2013).** Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 26(3):547–603.
- 51. Colón D., Weber E.J., Anderson J.L., Winget P. and Suárez L.A. (2006).** Reduction of nitrosobenzenes and N-hydroxylanilines by Fe (II) species: elucidation of the reaction mechanism. *Environmental Science & Technology.* 40(14): 4449-4454.
- 52. Cycon´ M., Wojcik M. and Piotrowska-Seget Z. (2009).** Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere.* 76: 495-501.
- 53. Cycon´ M., Wo´jcik M. and Piotrowska-Seget Z. (2011).** Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria souchedes from loamy sand soil. *Biodegradation.* 22:573–583.
- 54. Dabéne L. and Marié H. (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.
- 55. Daughton C. G. and Hsieh D. P. H. (1977).** Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. *Applied Environmental Microbiology.* 34: 175-184.
- 56. Delaunois A. (1976).** Travaux pratiques de pédologie générale. Montpellier. INRA (Ed.).
- 57. Denis B. (2000).** Guide des analyses en pédologie 2^{ème} édition revue et augmentée. INRA (Ed.).
- 58. Devers-Lamrani M. (2008).** Etude des mécanismes à l'origine de la dispersion des gènes codant les enzymes responsables de la minéralisation de l'atrazine au

sein de la microflore des sols. Présentation des activités de recherche, Prix Phytopharma.

59. **Devillers H. (2005).** Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides. Ed TEC et DOC. Lavoisier. P278.
60. **Dugain F., Arial G., Audry P., and Jouga J. (1961).** Les méthodes d'analyses utilisées au laboratoire de physicochimie des sols. Dakar. Office de la recherche scientifique et technique outre-mer, centre de pédologie de Hann.
61. **Dupont C., Sivadon-Tardy V., Bille E., Dauphin B., Beretti J.L., Alvarez A.S. (2010).** Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, souchedes in micro-biology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and two automated systems. Clin Microbiol Infect. 16(7):998–1004.
62. **Egerton J.E. (1979).** Avermectins: a new family of poten anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. Antimicrob Agents Chemother, 15 (3), 372–378.
63. **El Sebai T., Lagacherie B., Soulas Guy, and Martin-Laurent F. (2004).** Souchesion and characterisation of an isoproturon-mineralising *Methylopila* sp. TES from French agricultural soil. FEMS Microbiology Letters, 239: 103-110.
64. **El-Helow E. R., Badawy M. E., Mabrouk M. E., Mohamed E. A., and El-Beshlawy Y. M. (2013).** Biodegradation of chlorpyrifos by a newly souchedes *Bacillus subtilis* strain, Y242. Bioremediat. J. 17: 113–123.
65. **Elshikh M.S., Alarjani K.M., Huessien D.S., Elnahas H.A.M., Esther A.R. (2022).** Enhanced biodegradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus* CP6 and *Klebsiella pneumoniae* CP19 from municipal waste water. Environ. Res. 205:112438.

- 66. Escalada J.P., Gianotti J., Pajares A., Massad W.A., Amat-Guerri F. and Garcia N.A. (2008).** Photodegradation of the acaricide abamectin: a kinetic study. *J Agric Food Chem.* 56(16): 7355–7359.
- 67. Fang H., Xiang Y.Q., Hao Y.J., Chu X.Q., Pan X.D., Yu J.Q. and Yu Y.L. (2008).** Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 614: 294-303.
- 68. Farahat T.M., Abdelrasoul G.M., Amr M.M., Shebl M.M., Farahat F.M. and Anger W.K., (2003).** Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. *Occupational and Environmental Medicine.* 60: 279- 86.
- 69. Farhan M., Ahmad M., Kanwal A., Butt Z.A., Khan Q.A., Raza S.A., Qayyum H., Wahid A. (2021).** Biodegradation of chlorpyrifos using soucheses from contaminated agricultural soil, its kinetic studies. *Sci. Rep.* 11:1–14.
- 70. Farhan M., Khan A., Wahid A., Ahmad M., and Ahmad F. (2012).** Biodegradation of chlorpyrifos using indigenous *Pseudomonas* sp. souchesed from industrial drain. *Pak. J. Nutr.* 11: 1183–1189.
- 71. Feng F., Ge J., Li Y., He S., Zhong J., Liu X. and Yu X. (2017).** Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability. *Chemosphere.* 184:505–51.
- 72. Fisher M.H. and Mrozik H. (1992).** The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 32 : 537–543.
- 73. Foong S.Y., Ma N.L., Lam S.S., Peng W., Low F., Lee B.H.K., Alstrup A.K.O. and Sonne C. (2020).** A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide

- in fruit and vegetables: prevalence, remediation and actions needed. *J. Hazard. Mater.* 400: 123006.
- 74. Gamble D. and Khan S. (1985).** Atrazine hydrolysis in soils: Catalysis by the acidic functional groups of fulvic acid. *Can. J. Soil Sci.* 65: 435-443.
- 75. Gauchers G. (1968).** *Traité de Pédologie Agricole. Le sol et ses caractéristiques agronomiques.* Paris, Dunod (Ed.).
- 76. George J., Shukla Y. (2011).** Pesticides and cancer: Insights into toxic proteomic-based findings. *Journal of proteomics.* 2713-2722.
- 77. Ghanem I., Orfi M., and Shamma M. (2007).** Biodegradation of chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. souched from an activated sludge sample of waste water treatment plant in damascus. *Folia Microbiol.* 52 : 423–427.
- 78. Gigliotti and Allievi L. (2001).** Differential effects of the herbicides Bensulphuron and Cinosulphuron on soil microorganisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.* 36(6): 7757.
- 79. Gilliom R.J. (2007).** Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environmental Science & Technology.* 41(10): 3408-3414.
- 80. Glotfelty K. (1987).** Pesticides in fog. *Nature.* 325: 602-605.
- 81. Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L. and Richardson R.J., (1998).** The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology.* 50(5): 1346-50.
- 82. Halley B.A., VandenHeuvel W.J. and Wislocki P.G. (1993).** Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Vet Parasitol.* 48 (1-4): 109–125.

- 83. Hamzah A. K., Shubo H., Sherrice A. and Shirley L. C. (2017).** Metabolism of chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* increases toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Int. Biodeter. Biodegrad.* 121, 114–121.
- 84. Hebert V.R. and Miller G.C. (1990).** Depth dependence of direct and indirect photolysis on soil surfaces. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* 38(3): 913-918.
- 85. Hildebrandt A., Lacorte S. et Barceló D. (2009).** Occurrence and Fate of Organochlorinated Pesticides and PAH in Agricultural Soils from the Ebro River Basin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 57(2): 247-255.
- 86. Horvath R. S. (1972).** Cometabolism of the herbicide, 2,3,6-trichlorobenzoate by natural microbial populations. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology.* 7: 273-276.
- 87. Houot Sabine, Barriuso Enrique, and Bergheaud V. (1998).** Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry.* 30: 2147-2157.
- 88. Huang Y., Zhang W., Pang S., Pang S., Chen J., Bhatt P., Mishra S. and Chen S. (2021).** Insights into the microbial degradation and catalytic mechanisms of chlorpyrifos. *Environ. Res.* 194: 110660.
- 89. Hussain S., Arshad M., Saleem M. and Khalid A. (2007).** Biodegradation of α - and β -endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation.* 18(6): 731-740.
- 90. IFEN, Les pesticides dans les eaux (Données 2007).** Institut Français de l'Environnement (2007).
- 91. Jabeen H., Iqbal S., and Anwar S. (2015).** Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water Environ. J.* 29 : 151–160.

- 92. Janke D. and Fritsche W. (1985).** Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Microbiology*, 25: 603-619.
- 93. Jiang Y. F., Wang X. T., Jia Y., Wang F., Wu M.H., Sheng G.Y. and Fu J.M. (2009).** Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticides in agricultural soil of Shanghai, China. *Journal of Hazardous Materials*. 170(2-3): 989-99.
- 94. Jury R. (1984).** Behaviour assessment model for trace organics in soil: III. Application of screening modes. *J. Environ qual.* 13: 573-579.
- 95. Kappler A. and Haderlein S.B. (2003).** Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants. *Environmental Science & Technology*. 37(12): 2714-2719.
- 96. Kolar L., Kozuh-Erzen N., Hogerwerf L. and Van-Gestel C. A. (2008).** Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environ. Pollut.* 151 (1): 182-189.
- 97. Koranteng-Addo E.J., Owusu-Ansah E., Boamponsem L.K., Bentum J.K. and Arthur S. (2011).** Levels of zinc, copper, iron and manganese in soils of abandoned mine pits around the Tarkwa gold mining area of Ghana. *Advanc. Appl. Scien. Resear.* 2 (1): 280-288.
- 98. Koterba M. T., Dieter C. A. and Miller C. V. (2010).** Pesticides in groundwater in the Anacostia River and Rock Creek watersheds in Washington, D.C., 2005 and 2008 U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey · District of Columbia.
- 99. Cooper B. (1996).** Central and North West Regions Water Quality Program 1995/1996. Report on Pesticide Monitoring. Department of Land & Water Conservation, Sydney, Australia.

- 100. Kozuh Erzen N., Kolar L., Flajs V.C., Kuzner J., Marc I. and Pogacnik M. (2005).** Degradation of abamectin and doramectin on sheep grazed pasture. *Ecotoxicology*. 14(6): 627–635.
- 101. Dubois L. and Feuillet C. (2010).** Les pesticides dans le milieu aquatique, données de 2007. *Environnement*. 26 : 1-43.
- 102. Lakshmi C.V., Kumar M. and Khann S. (2008).** Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62: 204–209.
- 103. Levy W., Radl V., Ruth B., Schmid M., J.C. Munch and Schroll R. (2007).** Harsh summer conditions caused structural and specific functional changes of microbial communities in an arable soil. *European Journal of Soil Science*. 58 (3): 736-745.
- 104. Li H., Lee L., Jafvert C. and Graveel J. (2000).** Effect of substitution on irreversible binding and transformation of aromatic amines with soils in aqueous systems. *Environmental Science & Technology*. 34(17): 3674-3680.
- 105. Li H., Lee L., Schulze D. and Guest C. (2003).** Role of soil manganese in the oxidation of aromatic amines. *Environmental Science & Technology*. 37(12): 2686-2693.
- 106. Li X.H., Wang W., Wang J., Cao X.L., Wang X.F.L.J.C., Liu X.F., Xu X.B. and Jiang X. (2008).** Contamination of soils with organochlorine pesticides in urban parks in Beijing, China. *Chemosphere*. 70(9): 1660-1668.
- 107. Li Z., Song C., Yang J., Guo J. and Xing, L. (2008).** Biodegradation of avermectin by *Bacteroidetes endosymbiont* strain LYH. *World J Microbiol Biotechnol*. 24(3): 361-366.

- 108. Liu Z. Y., Chen X., Shi Y., and Su Z. C. (2012).** Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Adv. Mat. Res.* 356: 676–680.
- 109. Mali H., Shah C., Prajapati A.S., Mesara S., Dhameliya H.A., Patel D.H., Trivedi U., Subramaniam R.B. (2022).** Improved live-cell PCR method for detection of organophosphates degrading opd genes and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106(4) : 1705-1714.
- 110. Mallick K., Bharati K., Banerji A., Shakil N., and Sethunathan N. (1999).** Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 48–54.
- 111. Mapa R. B., Green R. E. and L. Santo (1986).** Temporal variability in soil hydraulic properties with wetting and drying subsequent to tillage. *Soil Science Society of America Journal*, 50: 1133–1138.
- 112. Mariusz C., Marcin W. and Zofia P-S. (2009).** Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere.* 76:494–501.
- 113. Mietinen Martikainen P., Vartiainen T. and Lötjönen S. (1993).** Biochemical and chemical degradation of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in surface and drinking water. *Chemosphere.* 27: 1707-1718.
- 114. Martin-Gullon I. and Font R. (2001).** Dynamic pesticide removal with activated carbon fibres. *Wat. Res.* 35: 516-520.
- 115. Maya K., Singh R.S., Upadhyay S.N. and Dubey S.K. (2011).** Kinetic analysis reveals bacterial efficacy for biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP. *Process Biochem.* 46 (11) : 2130–2136.
- 116. Mc Lean E.O. (1982).** Soil pH and lime requirement.

- 117. McCormack L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A.B., Thiffault C., Langston J. W., Cory-Slechta D.A. and Di Monte D.A. (2002).** Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol. Dis.* 10(2): 119-27.
- 118. Meikle R.W. and 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.* 7: 13-22.
- 119. Merrah N. (2010).** Biodégradation des fongicides : cas du fluazifop-p-butyl. Thèse de Magister, Université Badji Mokhtar Annaba Algérie; discipline: Microbiologie.
- 120. Miller A.L.R.H. and Keeney D. R. (eds. 1982).** Methods of soils analysis. Part 2. Chemical and microbiological methods. 2nd ed. ASA. SSSA Publ. Madison USA, 199-209.
- 121. Mirsal I. A. (2004).** Soil pollution. Origin, monitoring and remediation, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 122. Mishra K., Sharma R.C. and Kumar S. (2013).** Contamination profile of DDT and HCH in surface sediments and their spatial distribution from North-East India. *Ecotoxicol Environ Saf.* 95: 113-122.
- 123. Gevao C., Semple K. T., Pearce T.G. and Jones K.C. (2000).** Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environmental Science & Technology*, 35 (3): 501-507.
- 124. Morel R. (1986).** Les Sols Cultivés. Lavoisier. 1^{ère} édition. Paris. 64 p.
- 125. Morel-Chevillet C. (1998).** La biodégradation accélérée croisée des méthylcarbammates insecticides et nématicides. Possibilités d'interactions entre ces

produits et avec certains organophosphorés. Thèse de doctorat. Université de Lyon.

- 126. Mortland M. M. (1970).** Clay-organic complexes and interactions. *Advan. Agron.*, 22 : 75-117.
- 127. Mountacer H., Tajeddine L. and Sarakha M. (2011).** Adsorption and photochemical behavior of the herbicide monuron on clay surfaces. In *Herbicides and environment*, K. A., Éd. Intechweb.org, 273-294.
- 128. Muir D. (1991).** Dissipation and transformation of pesticides in water and sediment. In *Environmental Chemistry of Herbicides*, CRCP, Inc., 1-87.
- 129. Mulbry W. and Kearney P.C. (1991).** Degradation of pesticides by micro-organisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Prot*, 10(5):334–346.
- 130. Nam K., Chung N. and Alexander M. (1998).** Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science & Technology*, 32(23): 3785-3788.
- 131. Odukkathil G. and Vasudevan N. (2013).** Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil *Rev Environ Sci Biotechnol*. 12:421–444.
- 132. Pal R., Chakrabarti K., Chakraborty A. and Chowdhury A. (2005).** Pencycuron application to soils: Degradation and effect on microbiological parameters. *Chemosphere*. 60(11): 1513-1522,.
- 133. Parekh N. R., McKeown T., Roberts S. J., Walker A., and Suett D. L. (1992).** Bacterial systems involved in the enhanced degradation of soil-applied pesticides. In Anderson, J.P.E., Arnold, D.J., Lewis, F., Torstensson, L. (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology*. Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 153-158.

- 134. Patel R (2013).** Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spec-trometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* 57(4):564–72.
- 135. Pedigo L.P. (2002).** Entomology and pest management. Fourth edition. Prentice Hall, 742 p.
- 136. Plaza-Bolaños P., Padilla-Sánchez J.A., Garrido-Frenich A., Romero-González R. and Martínez-Vidal J L. (2012).** Evaluation of soil contamination in intensive agricultural areas by pesticides and organic pollutants: south-eastern Spain as a case study. *J Environ Monit.* 14(4) : 1182-9.
- 137. Prescott L.M., Harley J.P. and Klein D.A. (2013).** Microbiologie, 4^{ème} édition. Éd. De Boeck, Bruxelles, pp. 1070.
- 138. PubChem US NCBI 2019 (base de données des produits chimiques United States National Centre Biotechnology for Information).**
- 139. Racke K. D., Laskowski D. A., and Schultz M. R. (1990).** Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1430–1436.
- 140. Radosevich M., Traina S. J., Hao Y. L., and Tuovinen O. H. (1995).** Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial souchese. *Appl. Environ. Microbiol*, 61: 297-302.
- 141. Reinecke S. A. and Reinecke A. J. (2007) .**The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 66(2): 244-251.
- 142. Relyea R. A. (2003).** Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications.* 13(6): 1515-1521.
- 143. Roberts T.R., Hutson D.H. and Jewess P.J. (1998).** Metabolic pathways of agrochemicals: insecticides and fungicides. Royal Society of Chemistry, Great Britain, pp 1134–1137.

- 144. Roeleveld N. and Bretveld R. (2008).** The impact of pesticides on male fertility, *Curr. Opin. 175 Obstet. Gynecol.*, 20: 229-233.
- 145. Roeth F.W. (1986).** Enhanced herbicide degradation in soil with repeat application. *Review of Weed Science*, 2: 45-65.
- 146. Rousseaux S., Hartmann A. and Soulas G. (2001).** Souchesion and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 211-222.
- 147. Russell C. and Schultz C. B. (2009).** Effects of grass-specific herbicides on butterflies: an experimental investigation to advance conservation efforts. *Journal of Insect Conservation*. 14(1): 53-63.
- 148. Russell J.D., Cruz M.I. and White J.L. (1968).** The adsorption of 3-aminotriazole by montmorillonites,. *J. Agric. Food Chem.*, 16(1): 21-24.
- 149. Saitou N. and Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- 150. Sánchez-Camazano M. and Sánchez-Martín M. (1991).** Hydrolysis of azinphos methyl induced by the surface of smectites. *Clays & Clay Minerals*, 39(6): 609-613.
- 151. Schroll R., Becher H.H., Dorfler U., Gayler S., Grundmann S., Hartmann H.P. and Ruoss J. (2006).** Quantifying the effect of soil moisture on the aerobic microbial mineralization of selected pesticides in different soils. *Environmental Science & Technology*, 40(10): 3305-3312.
- 152. Senesi N. (1993).** Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter: molecular and mechanistic aspects. *NATO ASI Series*, 32: 47-74.

- 153. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., and Rolain J.M. (2009).** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization Time of flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4):543–51.
- 154. Shahla Y. and D'Souza D. (2010).** Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: A Review. *Applied and Environmental Soil Science*, 9.
- 155. Shaw L.J., Beaton Y., Sousa S., Glover L.A., Killham K. and 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*, 34(4): 531-539.
- 156. Singh B. K., Walker A., Morgan J. A. W., and Wright D. J. (2004).** Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 : 4855–4863.
- 157. Skopp J., Jawson M.D. and Doran J.W. (1990).** Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*, 54(6): 1619-1625.
- 158. Smelt J.H., Van de Peppel-Groen A.E., Van der Plas L.J.T. and Dijksterhuis A. (1996).** Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1757-1765.
- 159. Smolen J. and 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.*, 62: 636-643.
- 160. Somasundaram L., and Coats J. R. (1990).** Pesticide transformation products in the environment. *ACS symposium, series 459*: 2-9.

- 161. Soulas G. (1990).** Dégradation biologique d'un herbicide, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) dans le sol. Aspects cinétiques. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. ENSAIA.
- 162. Spencer H. and Cliath L. (1990).** Movement of pesticides from soil to atmosphere. In D. A. Kurtz: long range transport of pesticides. Levis publishers, Chelsea, Michigan, USA. 1-16.
- 163. Suett D.L., Jukes A.A. and Phelps K. (1993).** Stability of accelerated degradation of soil applied insecticides: laboratory behaviour of aldicarb and carbofuran in relation to their efficacy against cabbage root fly (*Delia radicum*) in previously-treated field soils. *Crop Protection*, 12: 431-442.
- 164. Sugiyama S., Shimada N., Miyoshi H. and Yamauchi K. (2005).** Detection of thyroid system disrupting chemicals using in vitro and in vivo screening assays in *Xenopus laevis*. *Toxicol. Sci.*, 88: 367-374.
- 165. Tabb M. M. and Blumberg B. (2006).** New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol. Endocrinol.*, 20: 475-482.
- 166. Tajeddine L., Nemmaoui M., Mountacer H., Dahchour A. and Sarakha M. (2010).** Photodegradation of fenamiphos on the surface of clays and soils. *Environmental Chemistry Letters*, 8(2): 123-128.
- 167. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004).** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101: 11030-11035.
- 168. Tamura K., Peterson D., Peterson N. Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011).** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28: 2731-2739.

- 169. Taylor F. and Spencer M. (1990).** Volatilization and vapour transport process. In pesticides in the soil environment. Soil. Science Society of America Book series, Madoson, Weed Scien, USA. N°2. 53: 213-269.
- 170. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F. Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 25 (24): 4876-4882.
- 171. Tisler T. and Kozuh-Erzen N. (2006).** Abamectin in the aquatic environment. Ecotoxicology, 15 (6): 495–502.
- 172. Van Veen S.Q., Claas E.C. and Kuijper E.J. (2010).** High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Micro-biol, 48(3):900–7.
- 173. Vieubl e-Gonod L., Chenu C. and Soulas G. (2003).** Spatial variability of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) mineralisation potential at a millimetre scale in soil, Soil Biology & Biochemistry, 35(13): 373-382.
- 174. Walker A. and Welch S. J. (1991).** Enhanced degradation of some soil-applied herbicides. Weed Research, 31: 49-57.
- 175. Wang Q. and Xie S. (2012).** Souchesion and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. Int. Biodeterior. Biodegr., 71: 61-66.
- 176. Wang Y.S., Zheng X.C., Hu Q.W. and Zheng Y.G. (2015).** Degradation of abamectin by newly souchesed *Stenotrophomonas maltophilia* ZJB-14120 and characterization of its abamectin-tolerance mechanism. Research in Microbiology, 166 (5).

- 177. Watts M. (2007).** Pesticides and breast cancer. ISBN 9789679381320.
- 178. WHO (1992).** Our Planet, Our Health; Report of the WHO Commission on Health and Environment,. WHO, Geneva, Switzerland.
- 179. Xu G., Zheng W., Li Y., Wang S., Zhang J., and Yan Y. (2008).** Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a newly souchesed *Paracoccus* sp. strain TRP. Int. Biodeterior. Biodegradation, 62 : 51–56.
- 180. Yang L., Zhao Y. H., Zhang B. X., Yang C. H., and Zhang X. (2005).** Souchesion and characterization of a chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. FEMS Microbiol. Lett., 251: 67–73.
- 181. Yaron, B., R. Calvet and R. Prost (1996).** Soil pollution, Processes and dynamics, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 182. Youness M. (2013).** Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. Thèse de doctorat de l’université de Blaise Pascal, discipline : Chimie organique biologique.
- 183. Zhang B., Bai Z., Hoefel D., Tang L., Wang X., Li B., Li Z., and Zhuang G. (2009).** The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. Sci Total Environ, 407:1915-1922.
- 184. Zhang H. and Weber E. (2009).** Elucidating the role of electron shuttles in reductive transformations in anaerobic sediments. Environmental Science & Technology, 43(4): 1042–1048.

- 185. Zhang H., Chen W. and Huang C. (2008).** Kinetic modeling of oxidation of antibacterial agents by manganese oxide. *Environmental Science & Technology*, 42(15): 5548–5554.
- 186. Zhang M., Li Y., Mu Q., Feng F., Yu X., Ge J., Zhang Y. and Nie J. (2022).** Effects of chlorpyrifos on the metabolic profiling of *Bacillus megaterium* strain RRB. *Chemosphere*. 297:134189.