

ÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة امحمد بوقرة- بومرداس-

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA - BOUMERDES -



Faculté des sciences

Département : Biologie

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme De MASTER II

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne.

Thème:

Essai de bioremédiation d'une matrice agricole polluée par les pesticides organophosphorés (OP) située dans la région d'El oued au moyen de microorganismes autochtone Tellurique

Présenté par :

MEDDEB A.ERRAZAQ

ZERZAR BACHIR

SEBBAK A.ELKADER NACER

Devant le jury composé de :

Mme. TIHAR-BENZINA F

MCA UMBB

Présidente

Mr. BOUZID M

MCA UMBB

Examineur

Mme. SAHIR-HALOUANE F

Pr UMBB

Promoteur

Mme. OUKALI Z

HDR UMBB

Co-promotrice

Année universitaire : 2021/2022

Dédicaces



*Au nom d'Allah et la paix au NABYAI Allah je dédie ce
modeste travail,*

Mes très chers parents.

*Qui ont sacrifié toute leur vie pour devenir ce que je suis
aujourd'hui, qui m'ont toujours soutenus et guidés dans les
moments difficiles et à qui je leur dois ma réussite ;*

À mes très chers sœurs,

*ZAYNEB, ASMA, NOUR EL HOUDA et ROUKAYA, Source de ma fierté, secret de ma
force, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de
persévérance, de courage et de générosité ;*

À mes binôme NACER ET BACHIR,

*Pour sa patience, sa sincérité et son intelligence, et à toute sa
famille ;*

À tous mes proches.

*Qui m'ont soutenue pour terminer ce travail et À tous mes
meilleurs amis et tout ma famille ;*

À tous les membres du club BIO-BEST

Je dédie ce travail.



ABDEREZAK

Dédicaces



*Au nom d'Allah et la paix au NABYAI Allah je dédie ce
modeste travail,*

Mes très chers parents.

*Qui ont sacrifié toute leur vie pour devenir ce que je suis
aujourd'hui, qui m'ont toujours soutenus et guidés dans les
moments difficiles et à qui je leur dois ma réussite ;*

A ma chère épouse

Mon soutien, qui a été la raison pour laquelle j'ai terminé mes études;

A tous mes fils,

Hanin, Muhammad, Saleh, Masoud

À mes binôme ABDEREZZAK et BACHIR,

*Pour sa patience, sa sincérité et son intelligence, et à toute sa
famille ;*

A tous mes proches.

Je dédie ce travail.



Nacer .

Dédicaces

Je remercie Dieu Tout-Puissant qui m'a permis d'accomplir cet humble travail :

A mes chers parents

Qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui ; après être devenu père, j'étais sûr que je ne vous rembourserais jamais vos sacrifices, mais je vous suis reconnaissant tant que j'ai vécu pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre présence près de moi et pour votre amour inconditionnel.

Je vous aime.

A mon amie, ma bien-aimée, ma chère épouse Amel qui m'a aidé à reprendre mon chemin d'études.

A mes chères sœurs et frères

*A mes petits anges Youcef, Nour et Hadil que dieu vous protèges
Je vous souhaite tout le bonheur la santé et la réussite du monde.*

Bachir

Remerciement

Nous remercions en premier, le grand dieu « ALLAH » tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience durant toutes nos années d'études.

Tout travail de recherche n'est jamais totalement l'œuvre d'une seule personne.

À cet effet, nous tenons à exprimer notre sincère reconnaissance et nos vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Tout d'abord à M^{eme} HALOUNE. F notre promotrice, et M^{eme} Oukali. Z notre co-promotrice, pour l'aide et le temps qu'elles ont bien voulu nous consacrer et que nous ne les remercierons jamais assez pour leur soutien et leur patience. Qu'elles trouvent en ces lignes l'expression de notre profonde gratitude.

Ensuite aux membres du jury qui ont eu l'aimabilité d'accepter d'évaluer ce travail. En l'occurrence : M^{eme} Benzina en qualité de présidente du jury et Mr Bouzid M. en qualité d'examineur. Qu'elles trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

Nous exprimons notre gratitude à Mr Benayad T, et le personnel cadre du département de sécurité alimentaire et environnement pour leur aide précieuse, leur patience et pour nous avoir aidé chacun à sa manière,

Nous n'oublions pas nos enseignants et professeurs qui ont su nous guider tout au long de notre cursus.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis et les membres de club scientifique BIO-BEST qui nous ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1	Volume de produits phytosanitaires, en tonnes d'ingrédients actifs.	8
Figure 2	Volumes de substances actives consommés mondialement depuis 1980 Source : Phillips McDougall. Evolution of the Crop Protection Industry since 1960, 2018.	9
Figure 3	Pesticides - Somme des utilisations par surface de terre cultivée.	10
Figure 4	schéma simplifié de dispersion des pesticides dans les milieux.	10
Figure 5	Structure chimique générale des OP (A) et structure chimique du chlorpyrifos (B).	12
Figure 6	Structure chimique du malathion .	15
Figure 7	Inhibition des cholinestérases par les organophosphorés.	17
Figure 8	Schéma de la métabolisation du CPF.	18
Figure 9	Schéma de principe du bioslurry ou bioréacteur.	28
Figure 10	Schéma de principe du landfarming.	29
Figure 11	Le devenir des polluants dans l'environnement.	31
Figure 12	Situations géographiques de la région de Bayadah. Par rapport à la situation géographique d'El Oued et de l'Algérie.	35
Figure 13	Vue panoramique par satellite du site d'échantillonnage.	36
Figure 14	Protocole d'échantillonnage avec la méthode de quartage.	37
Figure 15	Réaction d'hydrolyse de l'ONPG.	49

Figure 16	Représentation schématique du mode de fonctionnement de d'une CG/SM.	60
figure 17	Les critères morphologiques des 04 souches bactériennes isolées sur milieux (GN)	66
figure 18	résume l'aspect microscopique des 04 souches isolées.	67
Figure 19	Aspect macroscopique et microscopique de la souche M01, M02 et M04	70
Figure 20	Aspect macroscopique et microscopique de la souche M03 et M04	72
Figure 21	Test de croissance des souches bactériennes en présence du Chlorpyrifos	73
Figure 22	Chromatogrammes obtenus par GC/MS de la bioremediation du sol contaminé que les sols non inoculés, le taux de dégradation du chlorpyrifos (100 mg/kg) pouvant atteindre 99 % ou plus après 14 jours.	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Diversité chimique et fonctionnelle des pesticides, organiques, organo-métalliques ou inorganiques, d'usage actuel ou passé.	6
Tableau II	Paramètres physico-chimiques et granulométrique d'un sol agricole en provenance de la région de Soualeh de la wilaya d'Eloued	62
Tableau III	Dimensions de particules du sol de la région de Soualeh dans la wilaya d'Eloued obtenues par tamisage.	65
Tableau IV	Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes isolées	68
Tableau V	Résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes isolées	67
Tableau VI	Résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes isolées	68
Tableau VII	Résultats de croissance des souches testées en présence du Chlorpyrifos	73
Tableau VIII	Résultats de la croissance des moisissures en présence du Chlorpyrifos	75

Liste des abréviations

GABA : Acide gamma aminobutyrique

DL : Dose Letale

CL : Concentration létale

NOAEL: No Observable Adverse Effect

LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level

DJA : Dose Journaliere Acceptable

ONG: Organisation non gouvernementale

UE : Union Europeenne

OP : Organophosphore

AChE : Enzyme acetylcholinesterase

CPF : Chlorpyrifos

CPO : CPF oxon

PHO : Phosalone

DEP : diethylphosphate

TCP : Trichloro pyridinal

MS : Spectrometrie de masse

ECD : Electron capteur detector

DAD: Diode Array Detection

DAP: dialkylphosphate

GC : Chromatographie gazeuse

CL : chromatographie liquide

CE : conductivite

LNAPLs : Light Non_Aqueous Phase Liquids

GN: Gèlose nutritive

PDA: Potatoes dextrose agar

MSM: Mineral salt medium

CP : Chlorpyrifos

AS : Aèrobie stricte

ANS : Anaèrobie stricte

AF : Aèro_anaèrobie facultative

MA : Micro_aèrophile

NR : Nitrate rèductase

ONPG : Orthonitrophènyl_D_galactopyranoside

ONP : Orthonitrophènyl

RM : Rouge de méthyle

VP : Voges proskauer

LDC : lysine décarboxylase

ODC : Omithine décarboxylase

ADH : L'argeninedihydrolase

TDA : tryptophane désaminase

T: température

H : humidité

MO : matière organique

DBO₅ : demande biochimique en oxygène.

DCO : demande chimique en oxygène.

CE : conductivité électrique.

NO₃⁻ : Nitrate.

NO₂⁻ : Nitrite.

Cl⁻ : Chlorures.

SOMMAIRE

Liste Des Figures	
Liste Des Tableaux	
Liste Des Abréviations.....	
Sommaire	
Introduction	1
I.1. Les Pesticides	4
I.1.1. Généralité Sur Les Pesticides	4
I.1.1.1. Historique :	4
I.1.1.2. Définition :	4
I.1.1.3. Domaines De L'utilisation Des Pesticides :	5
I.1.1.4. Classification Des Pesticides	5
I.1.1.4.1. Organisme Cible :	5
I.1.1.4.2. Structure Chimique :	5
I.1.1.4.3. Leur Fonction et Leur Mode D'action (Tableau I).....	6
I.1.1.5. Effets Sanitaires Des Pesticides :	6
I.1.1.6. Commercialisation Et Utilisation Des Pesticides :	8
I.1.1.6.1. Dans Le Monde :	8
I.1.1.6.2. En Algérie:	10
I.1.1.7. Devenir Des Pesticides Dans L'environnement :	10
I.1.2. Les Organophosphorés (Op).....	11
I.1.2.1. Définition :	11
I.1.2.2. Mode D'action :	11
I.1.2.3. Structure Et Propriétés Physico-Chimiques :	11
I.1.2.4. Propriétés Physico-Chimiques Et Classification Des Organophosphorés :	12
I.1.2.4.1. Le Chlorpyrifos :	12
I.1.2.4.2. Le Malathion :	14
I.1.2.5. L'inhibition De L'acétylcholinestérase Par Les Organophosphorés :	16
Partie A) Mécanisme D'action Biologique De L'enzyme Acétylcholinestérase A L'état Actif ; ...	17
Partie B) L'effet De Ce Mécanisme Lorsque L'enzyme Est Inhibée.	17
Acétyltransférase, Cht : Transporteur De Choline.	17
I.1.2.6. Métabolisme Des Insecticides Organophosphorés Et Du Chlorpyrifos :	17
I.1.2.7. Utilisations Et Persistance Dans L'environnement :	18
I.1.2.8. Toxicité Pour L'homme :	19
I.1.2.9. Les Polluants Organiques Persistants Dans Le Sol :	20
I.1.3. Généralités Sur Les Méthodes D'analyses Des Pesticides	20
I.1.3.1 .Le Prétraitement Des Echantillons :	20

I.1.3.2. L'extractions Des Pesticides :	20
I.2. Bioremediation:	21
I.2.1. Generalite Sur Bioremediation	21
I.2.2. Facteurs Influençant La Biorémédiation :	22
I.2.3. Les Principales Méthodes De La Bioremediation :	23
I.2.3.1. La Bioremediation In-Situ :	23
I.2.3.1.1. Atténuation Naturelle :	23
I.2.3.1.2 Bioaugmentation :	24
I.2.3.1.3. Biostimulation :	24
I.2.3.1.4. Bioventing :	25
I.2.3.1.5. Bioslurping :	25
I.2.3.1.6. Biosparging :	25
I.2.3.2. La Bioremediation Ex-Situ :	26
I.2.3.2.1. Biopile :	26
I.2.3.2.2. Compostage :	27
I.2.3.2.3. Bioslurry/Bioreacteur :	27
I.2.3.2.4 Landfarming :	28
I.2.3.2.5. Phytoremediation :	29
I.2.4. Le Rôle Des Microorganismes Dans La Bioremediation :	29
I.2.5. La Biorémédiation Des Insecticides :	30
I.2.6. Les Avantages Et Les Désavantage De La Biorémédiation :	31
I.2.6.1. Les Avantages De La Biorémédiation :	31
I.2.6.2. Les Désavantages De La Biorémédiation :	33
ii. Matériels Et Méthodes :	36
iii.2. Résultats Des Analyses Microbiologiques	66
iii.2.1. Identification Des Bactéries.....	66
iii.2.1.1. Etude Morphologique :	66
iii.2.1.1.1 Examen Macroscopique Des Colonies :	66
iii.2.1.1.2 Examen Microscopique Des Colonies.....	67
Figure 19 : Résumé L'aspect Microscopique Des 04 Souches Isolées.	68
iii.2.1.1. 3. Test Biochimiques.....	68
iii.2.2. Identification Des Souches Fongiques Isolée :	70
iii.2.2.1. Aspect Macroscopique Et Microscopiques Des Souches Fongiques Isolées.....	70
iii.2.4. Résultats De La Croissance Des Souches Fongiques En Présence Du Chlorpyrifos.....	75
iii.2.5. Résultats De La Bioremediation Du Sol Pollué Par Le Chlorpyrifos :	78
Conclusion.....	82

Introduction

Les pesticides jouent un rôle important dans le succès des productions agricoles contemporaines. Au cours des deux dernières décennies, leur utilisation a augmenté de plus de 40 %, et actuellement, plus de 4,1 millions de tonnes sont utilisées chaque année dans le monde. En Algérie, les pratiques et itinéraires culturels ont sensiblement amélioré la production agricole, notamment par l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques. Toutefois, l'acquisition et l'utilisation de ces composés chimiques sont réglementés et approuvés par les pouvoirs publics (Saidi et *al.*, 2017). Dépendant entièrement de l'étranger, l'Algérie importe en moyenne 8827 tonnes de pesticides pour un coût estimé à près de 4 milliard et demi de dinars par an. Ce qui verra la généralisation dans la plupart des exploitations de ces produits rentrant à la fois dans l'amélioration quantitative des produits, mais aussi dans la lutte contre certains ravageurs des cultures.

Aussi, avec la demande alimentaire croissante, l'intensification de l'agriculture a engendré une augmentation de l'utilisation de ces intrants chimiques toxiques et difficilement biodégradables. L'utilisation intensive et généralisée des pesticides soulève des préoccupations environnementales et sanitaires en raison de la contamination des ressources naturelles.

En effet, lors de leur application, seule une fraction des pesticides appliqués atteint ses objectifs, le reste (30 à 50 %) finissent à la surface du sol et se disperse ensuite par le biais de plusieurs processus abiotiques, notamment la volatilisation, l'érosion éolienne, le lessivage ou le ruissellement. Ainsi, les pesticides et leurs produits de transformation sont connus pour polluer les milieux aquatiques et terrestres. Dans les systèmes terrestres, ils ont été directement et indirectement liés à la diminution des populations d'oiseaux, d'insectes et pollinisateurs. Ils constituent également une menace pour les micro-organismes du sol, qui sont à l'origine de processus pédologiques essentiels tels que le cycle du carbone et des nutriments. Comme la vie du sol fournit un large éventail de services écosystémiques, ces effets délétères des pesticides affectent la santé du sol.

La bioremédiation pourrait constituer un moyen efficace afin d'éliminer ces polluants et par voie de conséquence, la réhabilitation du sol. Cette alternative biologique se base sur les capacités dégradatives de certains microorganismes y compris ceux des communautés microbiennes indigènes aux sols pollués (Hassen,2020).

notre contribution s'inscrit dans cette approche prometteuse basée sur la capacité des microorganismes à dégrader certains pesticides. Elle permet notamment de traiter efficacement les sols contaminés par les intrants chimiques (pesticides chimiques).

Dans notre travail nous proposons de développer un inoculant à partir des microorganismes (bactéries et moisissures) présents dans une matrice agricole(sol cultivé) située dans la région d'El oued au sud de l'Algérie et de confirmer sur milieu de culture (in vitro) leur capacité à dégrader un pesticide organophosphoré le Chlorpyrifos très utilisé comme insecticide contre les insectes ravageurs des cultures maraichères .

Notre étude sera présentée en 3 chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur les pesticides, et la bioremédiation. Le deuxième chapitre détaille la démarche expérimentale entreprise pour accomplir le travail. Dans Le troisième chapitre nous exposons nos les résultats expermentaux avec leur interprétation. Nous tarminaux L'étude est achevée par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. les pesticides

I.1.1. Généralité sur les pesticides

I.1.1.1. Historique :

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture remonte à des milliers d'années. Toutefois, les pesticides ont commencé à être appliqués à plus grande échelle à partir des années 1940 en raison de l'essor des pesticides chimiques de synthèse et du développement rapide des biopesticides au cours de la dernière décennie. Aujourd'hui, il existe plus de mille (1000) pesticides disponibles sur le marché (y compris les pesticides chimiques, microbiens, semi-chimiques et botaniques).(**“FAO Publ. Cat. 2021,” 2021**)

Aujourd'hui ,les pesticides sont omniprésents dans l'environnement et dans l'alimentation. Ce sont plus de 1000 substances regroupées en 150 familles chimiques (**Joly Condette,2014 , 2016, Carenco, 2017**).

Les pesticides sont appliqués généralement d'une manière préventive afin de repousser ou d'atténuer les effets des organismes nuisibles de manière temporaire ou définitive, le nombre et l'efficacité de ces pesticides ont évolué si bien qu'à l'échelle de la planète, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans entre 1945 et 1985 (**Bonnefoy, 2013**).

L'utilisation en fors de ces pesticides a été interdite dans de nombreux pays à travers le monde en raison de leurs effets toxique, mutagènes et cancérigènes. Les métabolites polluent et persistent dans l'environnement, en particulier , les sols et les sédiments, **Tor et al ;(2006)**.

I.1.1.2. Définition :

Le mot « pesticides » désigne les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, (**Aubertot et al., 2005**).(**Serra A.A., Alberto D., Sulmon C., Gouesbet G., 2016**)

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (**FAO**) définit les pesticides comme étant : « toute substance ou mélange de substances d'ingrédients chimiques ou biologiques destinés à repousser, détruire ou contrôler tout parasite, ou à réguler la croissance des plantes.

Le terme pesticide s'applique aux insecticides, herbicides, fongicides, rodenticides, molluscicides, produits de préservation du bois et diverses autres substances utilisées pour lutter contre les parasites. Les pesticides comprennent également les régulateurs de croissance des plantes, les défoliants et les dessiccants ». (“FAO Publ. Cat. 2021,” 2021)

I.1.1.3. domaines de l'utilisation des pesticides :

I.1.1.4. Classification des Pesticides

Différentes classifications de pesticides existent selon leurs :

I.1.1.4.1. Organisme cible : les pesticides sont généralement classés selon cette fonction en trois grandes familles :

- **Les herbicides :** contre les mauvaises herbes ;
- **Les fongicides :** contre les champignons et les moisissures ;
- **Les insecticides :** contre les insectes ;

Les autres familles (moins fréquentes) sont : les **rodenticides**, contre les rongeurs, les **raticides** contre les rats, les **germicides** contre la germination des graines, les **corvicides** contre les corbeaux et tous les oiseaux ravageurs de cultures, les **molluscicides** contre les mollusques et les **nématocides** contre les nématodes (ou les vers ronds).

I.1.1.4.2. Structure chimique : les plus utiliser sont les organochlorés, les organophosphorés et carbamates. Il y a aussi les pyréthrinoïdes de synthèse, les organoazotés, les urées substituées, les sulfonlurées, les dicarboximides et les néonicotinoïdes (groupe chimique relativement nouveau).

I.1.1.4.3. fonction et mode d'action des pesticides (Tableau I)

Type	Organismes cibles	Familles chimiques	Exemples	Modes d'action
Herbicides	Plantes concurrençant les cultures	Acides chlorophénoxy-alcanoïques	2,4-D Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	Perturbation de la régulation de l'auxine
		Acides benzoïques	Dicamba	
		Carbamates	Carbétamide	Perturbation des centres organisateurs des microtubules et du fuseau achromatique
		Phosphonates (Organophosphorés)	Glyphosate	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés aromatiques
		Sulfonylurées	Metsulfuron-méthyle	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés ramifiés
		Triazines	Atrazine	Inhibition de la photosynthèse
		Urées substituées	Isoproturon, linuron	
Fongicides	Champignons parasites des cultures	Carbamates	Propamocarbe	Inhibition de la formation des microtubules
		Triazoles	Tébuconazole	Inhibition de la biosynthèse des stérols
		Organophosphorés	Fosétyl-Aluminium	Inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne
		Dérivés soufrés, sulfate de cuivre	Bouillie bordelaise	Inhibition de la germination des spores
Insecticides	Insectes ravageurs	Benzotriazines	Triazoxide	Perturbation de la biosynthèse des mélanines
		Carbamates	Aldicarbe	Inhibition des cholinestérases
		Pyréthrinoïdes	Cyperméthrine	Action sur le canal sodique et perturbation de l'influx nerveux
		Organophosphorés	Chlorpyrifos	Inhibition des cholinestérases
		Organochlorés	Aldrine	Inhibition de la neurotransmission
		Néonicotinoïdes	Thiaméthoxame	Action sur les récepteurs nicotiniques (Blocage)
		Phénylpyrazoles	Fipronil	Interaction avec le récepteur de l'acide gamma aminobutyrique (GABA)
		Amidinohydrazones	Hydraméthylnon	Perturbation du système respiratoire

Tableau I : Diversité chimique et fonctionnelle des pesticides, organiques, organo-métalliques et inorganiques . (Modifier) CALVET R., (2005)

I.1.1.5. Effets sanitaires des pesticides :

Les effets sanitaires se divisent en deux types d'exposition :

- **Les effets aigus** (accidentels ou volontaires) à **doses importantes** : sont estimés par la Dose Létale 50 (DL50), dose-seuil entraînant 50% de mortalité dans une

population donnée. Les individus les plus touchés sont les agriculteurs, leurs familles et proches (**Joly Condette et al , 2014**)

- **Les effets chroniques à faibles doses** : sur une durée importante, sont d'ordres digestif, comportemental, hormonal, cancérigène, mutagènes et métabolique.

effets sont déterminés par le NOAEL (No Observable Adverse Effect Level), le LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect Level) et la Dose Journalière Acceptable (DJA).

I.1.1.6. Commercialisation et utilisation des Pesticides :

I.1.1.6.1. Dans le monde :

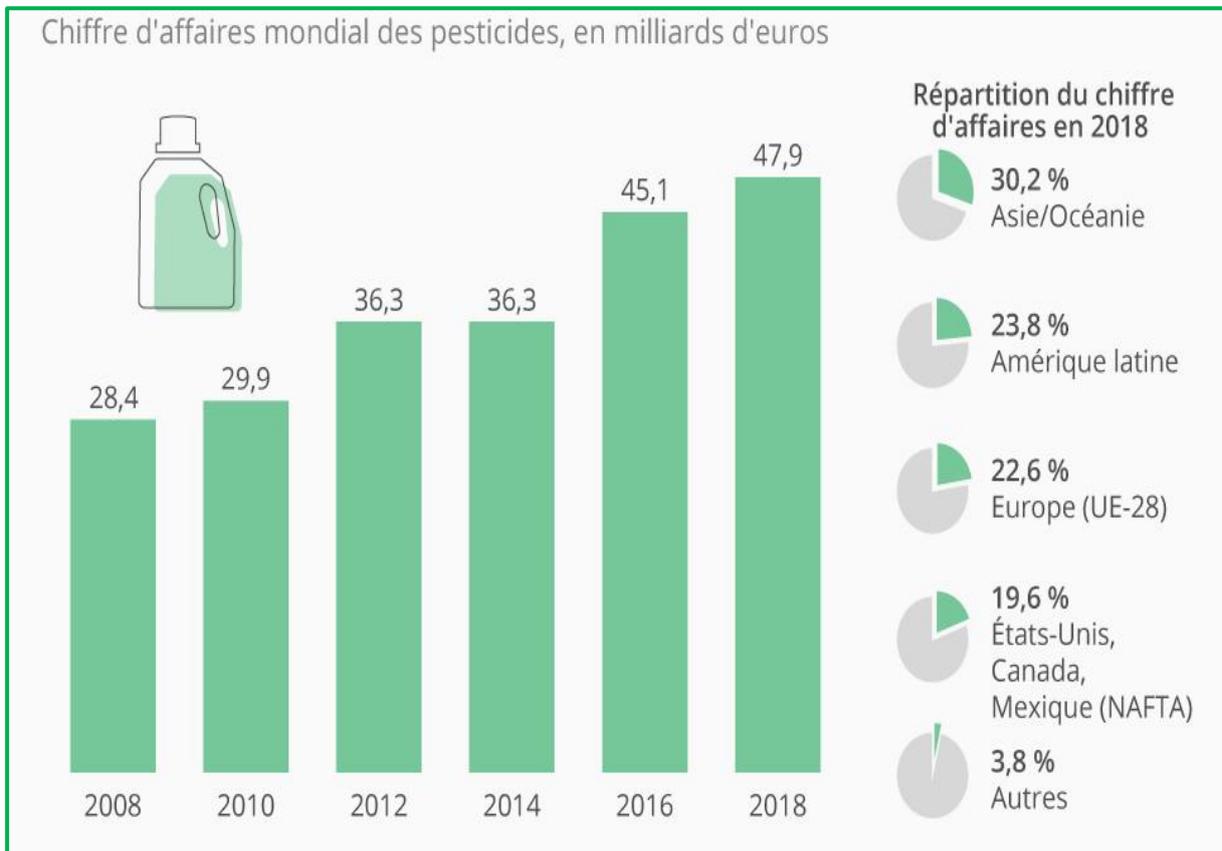


Figure 01 : Volume de produits phytosanitaires, en tonnes d'ingrédients actifs

. Le Brésil est le premier consommateur de pesticides au monde, il a augmenté sensiblement cette consommation ces dernières années.

L'Afrique est devenue une des principales zones d'exportations de pesticides interdits en Europe. Une vingtaine de pays africains figurent au rang des premières destinations. En matière de volume, le Maroc et l'Afrique du Sud sont les deux plus grands importateurs. On trouve également le Soudan, l'Égypte, le Sénégal parmi les principaux importateurs du continent africain.

On parle de 25 substances interdites qui sont exportées depuis l'Europe vers le continent africain en 2018, pour un total de 7500 tonnes.

La part de l'Afrique sur le marché des importations de pesticides interdits depuis l'Europe tourne autour de 10%. Un pourcentage important et surprenant quand on sait qu'en Afrique les législations sont encore très faibles et qu'il n'existe pas de système de contrôle pour tester les aliments et des dommages irréversibles causés aux écosystèmes.

Pareil en Asie, surtout en Inde, où c'est une catastrophe, car les conditions d'utilisation y sont désastreuses pour les agriculteurs qui utilisent bien souvent ces produits sans aucune protection et sont régulièrement victimes d'intoxications aiguës.

Source : Phillips McDougall, 2017

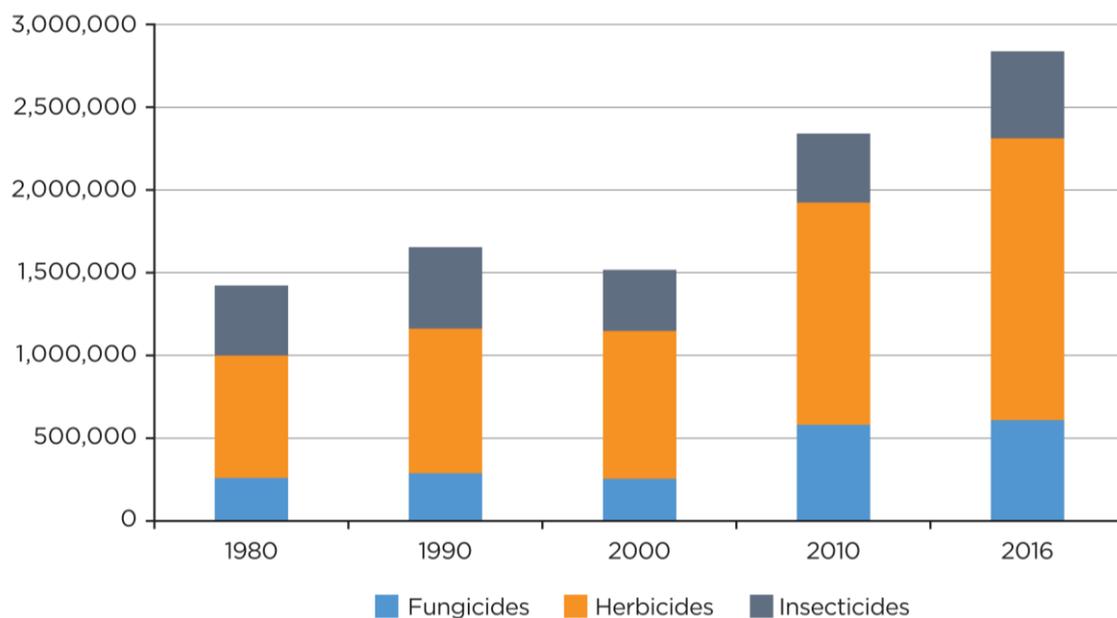


Figure 02. Volumes de substances actives consommés mondialement depuis 1980 Source : Phillips McDougall. Evolution of the Crop Protection Industry since 1960, 2018.

1.1.6.2. En Algérie:

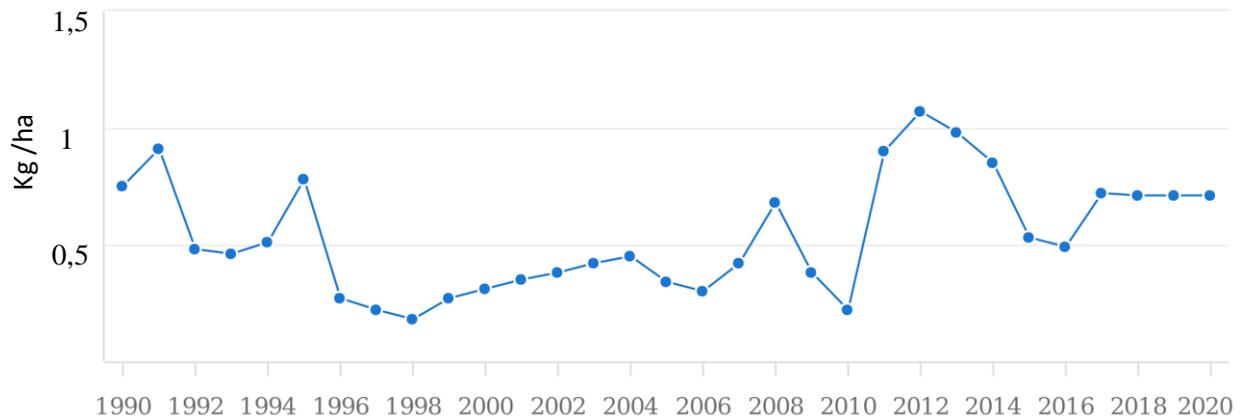


Figure 03. Pesticides - Somme des utilisations par surface de terre cultivée

Source : FAOSTAT (17 Juillet 2022)

I.1.1.7. Devenir des pesticides dans l'environnement :

Les recherches consacrées à la dispersion des pesticides dans l'environnement (**Figure 04**) ont prouvé la présence de ces produits dans plusieurs points de la biosphère qui n'ont subi aucun traitement (**Van Der Welf, 1996**). Ils peuvent alors être soumis à différents processus. La dégradation par le phénomène d'hydrolyse (**Wolfe et al., 1990**) ou de biodégradation grâce aux micro-organismes présents dans le sol (**Colin, 2000**). la rétention dans le sol jusqu'à la formation de résidus liés (adsorption) (par exemple l'accumulation des fongicides à base de cuivre dans les sols). Le transport vers d'autres compartiments environnementaux par des processus physique et physicochimiques (**Van Der Welf, 1996**).

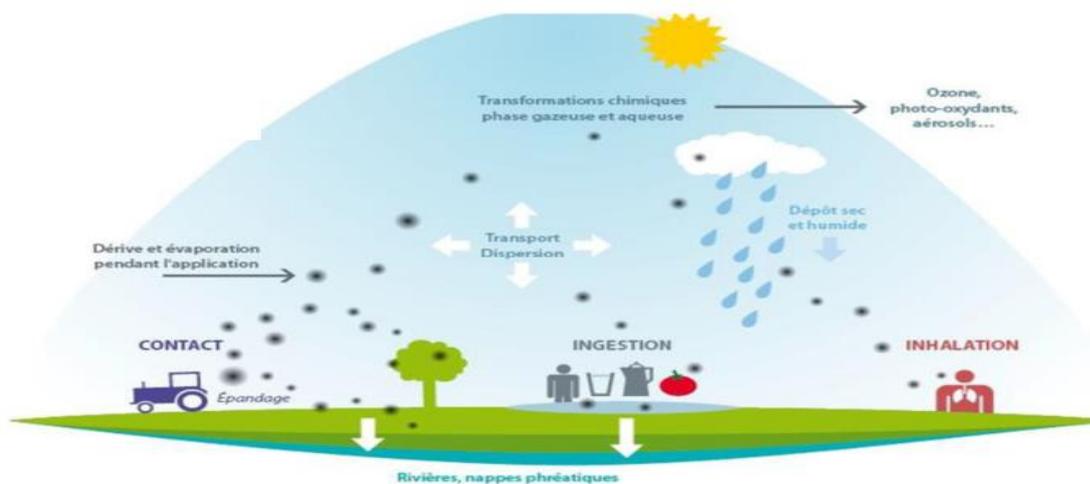


Figure 04: schéma simplifié de dispersion des pesticides dans les milieux (**Van Der Werf, 1996**)

I.1.2. Les Organophosphorés (OP)

I.1.2.1. Définition :

La majorité des organophosphorés (OP) sont des insecticides hautement toxiques pour le système nerveux central et/ou périphérique. Leur neurotoxicité explique à la fois leur efficacité sur les insectes et leurs effets toxiques sur l'homme **Testud, 2001**.

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique (amides ou esters des acides phosphorique, phosphonique et thiophosphorique), ils appartiennent à la famille chimique des anticholinestérasiques, dont les noms des matières actives sont le plus souvent identifiables par leur terminaison "phos" ou "the". Les OP sont neurotoxiques et sont les pesticides les plus toxiques pour les mammifères, mais contrairement aux organochlorés, ils ont une persistance modérée **Eddleston et al.,2005**.

I.1.2.2. Mode d'action :

Les OP agissent en perturbant la transmission de l'influx nerveux. Ils ont comme cible les synapses où ils inhibent la synthèse de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) par phosphorylation de son site actif, et empêchent ainsi la dégradation de l'acétylcholine, bloquée sous une forme inactive. Ce neurotransmetteur s'accumule donc dans les synapses et provoque une hyperexcitation empêchant la transmission de l'influx nerveux chez les insectes, entraînant ainsi leur mort. **(Regnault-Roger, 2005)**.

I.1.2.3. Structure et propriétés physico-chimiques :

Les composés OP sont des molécules qui sont toutes constituées d'un atome de phosphate sur lequel est attaché différents groupes chimiques (**Figure 05**), qui déterminent les propriétés exactes du composé. Il existe ainsi une grande variété d'insecticides organophosphorés **(Nauen, 2006; Testud et Grillet, 2007)**.

Les composés OP ont une structure chimique et un mode d'action commun **(Biljana et al.,2008)**

Leur formule générale a été définie par Schrader **Figure 05 (Biljana A et Milos PS.,2007)**

- Les pesticides OP se présentent généralement sous une forme liquide (huileux ou non) et rarement à l'état solide.
- La majorité des composés sont peu volatile.
- Ils ont une faible rémanence (peu stables).

- Certains ont une tension de vapeur élevée expliquant la toxicité par inhalation, exp : trichlorfon.
- Ils sont très peu hydrosolubles mais fortement liposolubles. Leur faible solubilité dans l'eau est suffisante pour rendre la solution toxique.
- Ils sont solubles dans les solvants organiques mais insolubles dans l'éther.
- Beaucoup ne sont actifs qu'après bioactivation dans l'organisme (exp : parathion).

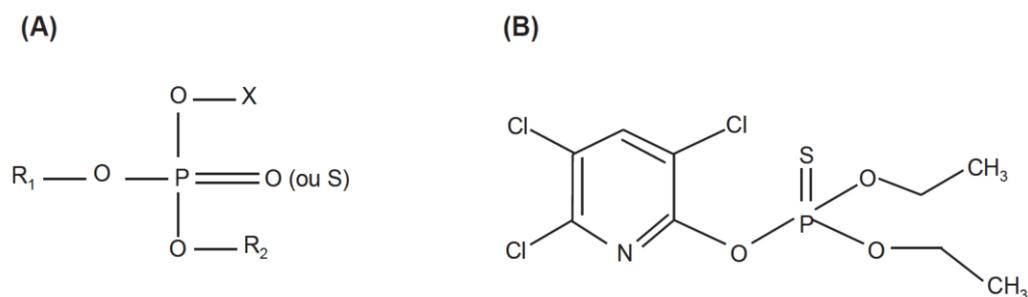


Figure 05. Structure chimique générale des OP (A) et structure chimique du chlorpyrifos (B).

R1 et R2 : groupement diméthoxy, diéthoxy, autre dialkoxy, diamino, chloré ou autre dialkoxy substitué, trithioalkyl, triphényl éventuellement substitué, constituant mixte.

X = substituant – très grand variété de structure – déterminant majeur des classes sur lequel va porter l'hydrolyse : halogène, carboxylate, phénoxy. (Nauen, 2006)

I.1.2.4. Propriétés physico-chimiques et classification des organophosphorés :

Nous avons choisi de décrire les propriétés physico-chimiques et quelques propriétés de toxicité aiguë en relation avec (02) deux OP : le chlorpyrifos (CPF) et la phosalone (PHO), d'autre comme le OP malathion et parathion ont citant certains également leurs classifications

I.1.2.4.1. Le chlorpyrifos :

- **Utilisation :** le CPF est un insecticide organophosphoré à large spectre. Il est utilisé aussi bien pour tuer des moustiques que des cancrelats, des larves de scarabées, des puces, des mouches, des termites, des fourmis et des poux. Il est utilisé comme insecticide sur les graines, le coton, les fruits, les noix, dans les champs et vergers, mais aussi sur des pelouses et plantes ornementales. Il est aussi répertorié comme antiparasitaire en utilisation directe sur le mouton et des dindes, mais aussi en utilisation indirecte, pour le traitement des écuries de chevaux, des niches de chien, des logements

- domestiques, des bâtiments agricoles, des poubelles de stockage et des établissements commerciaux.

Nom pour l'utilisation professionnelle : Dursban (mais aussi Empire, Eradex, Lorsban, Pageant, Piridane, Scout, et Stipend).

- **Structure chimique (Figure 05)**

Formule moléculaire brute : $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

Nom chimique IUPAC) O,O-diéthyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate

- **Propriétés physiques :**

- **Masse moléculaire :** 350,59 g/mol
- **Solubilité dans l'eau :** 0,002 g/l à 20° C.
- **Point de fusion :** 41,5 °C.
- **La pression de vapeur du CPF est de** $2,49 \times 10^{-3}$ Pa à 25°C.
- **Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau :** 4,82 à 5,11 (Élevé).
- **Persistance :** le CPF est fortement absorbé par le sol et sa persistance dans le sol va de deux semaines à un an en fonction du type de sol, de son pH et du condition climatique.
- La vitesse d'hydrolyse du CPF dans l'eau augmente en fonction du pH et de la température ainsi qu'en présence de cuivre. Le temps de demi-vie dans l'eau à 25°C est de 35 à 48 jours (**Howard et al., 1995**).
- **Limite de toxicité chez les animaux :** chez les mammifères, la toxicité aigüe est considérée comme modérée. En effet, chez les rongeurs, en fonction des sources, la LD50 (dose létale pour 50 % de la population) par voie orale chez le rat va de 82 à 270 mg /kg.

mg/kg et de 60 mg/kg chez la souris. Chez les mammifères plus grands, la toxicité est encore plus modérée : chez le lapin, LD50= 1000 mg/kg et chez le mouton 800 mg/kg.

Le CPF paraît aussi toxique chez les oiseaux de grande taille que chez les petits mammifères :

LD50 orale chez le canard 76 mg/kg, mais très toxique chez les oiseaux de petite taille :

LD50 oral chez le pigeon : 10 mg/kg.

Par contre, la toxicité chez les organismes aquatiques est très élevée, tant chez les poissons que chez les invertébrés. Par exemple, après 48 heures d'exposition, la toxicité (LD50 :

concentration létale pour 50% des individus) survient à des doses inférieures à 1dg/L (après 48 heures) pour les Daphnies (*Daphnie magna*) et la LC50 est de 0,009 mg/L (après 96 heures) pour la truite arc-en-ciel. Une accumulation du produit a été constatée dans les sédiments de rivières et dans les tissus des organismes aquatiques (**Retz et al., 1996**).

I.1.2.4.2. Le malathion :

Utilisation : Le malathion est un pesticide organophosphoré largement utilisé dans le monde, il est employé comme insecticide en agriculture et en usage vétérinaire (**Flessel et al., 1993**), et appliqué pour l'extermination des poux chez l'homme. En tant qu'insecticide, le malathion est utilisé pour contrôler les pucerons, les mouches, les sauterelles, les poux, les fourmis, les araignées et les moustiques. Il est appliqué sur la luzerne, le trèfle, les pâturages, les récoltes céréalières, le coton, le soja, les betteraves à sucre, le maïs, les haricots, les myrtilles et les grains stockés à l'intérieur des maisons (**Roberts, 2002**).

Nom pour utilisation professionnelle : Riddex Cythion (Kemsan), Malathion 500 (United Agri Products), Gardex (Gardex Chemicals), Fyfanon® ULV (Cheminova).

➤ **Structure chimique du malathion**

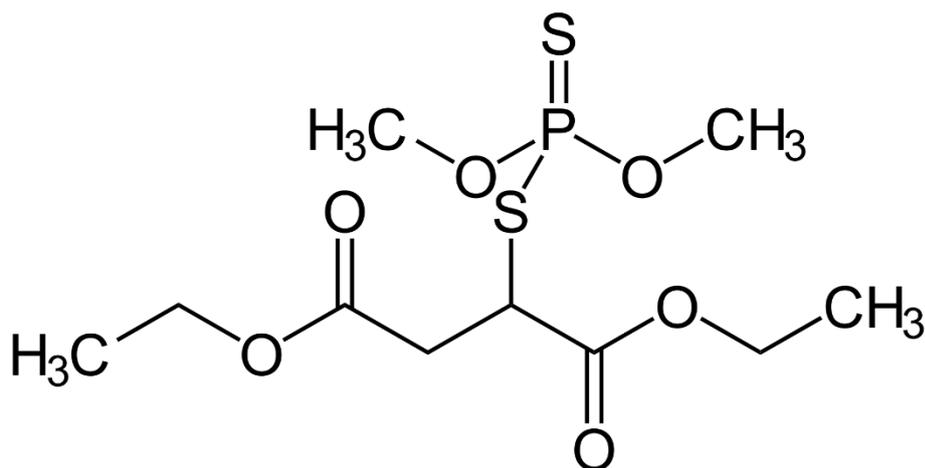


Figure 06: Structure chimique du malathion (Moore et al., 2010).

- **Formule moléculaire brute :** C₁₀H₁₉O₆PS₂
- **Nom chimique :** phosphorodithioate de S-[1,2-bis(éthoxycarbonyl) éthyle] et de O,O-diméthyle
- **Groupe chimique :** organophosphoré
- **Type de pesticide :** acaricide et insecticide
- **Propriétés physiques :**
 - **Masse moléculaire :** 330,36 g/mol
 - **Solubilité dans l'eau :** 146,16 mg/l
 - **Point de fusion :** 2,43 C°
 - **La pression de vapeur du malathion est de** 1,2×10⁻³Pa
 - **Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau :** 2,84
 - **Persistance :** Faible
 - La vitesse d'hydrolyse du malathion varie en fonction du pH, de la température et de la nature de l'eau (Zheng and Hwang, 2006 ; Druzina and Stegu, 2007) et de l'activité microbienne (Olvera-Hernandez et al, 2004). sa demi-vie varie de 0,2 semaine (pH = 8) à 21 semaines (pH = 6), la demi-vie est comprise entre 9 et 10 jours (Medina et al., 1999).
- **Toxicité humaine :**

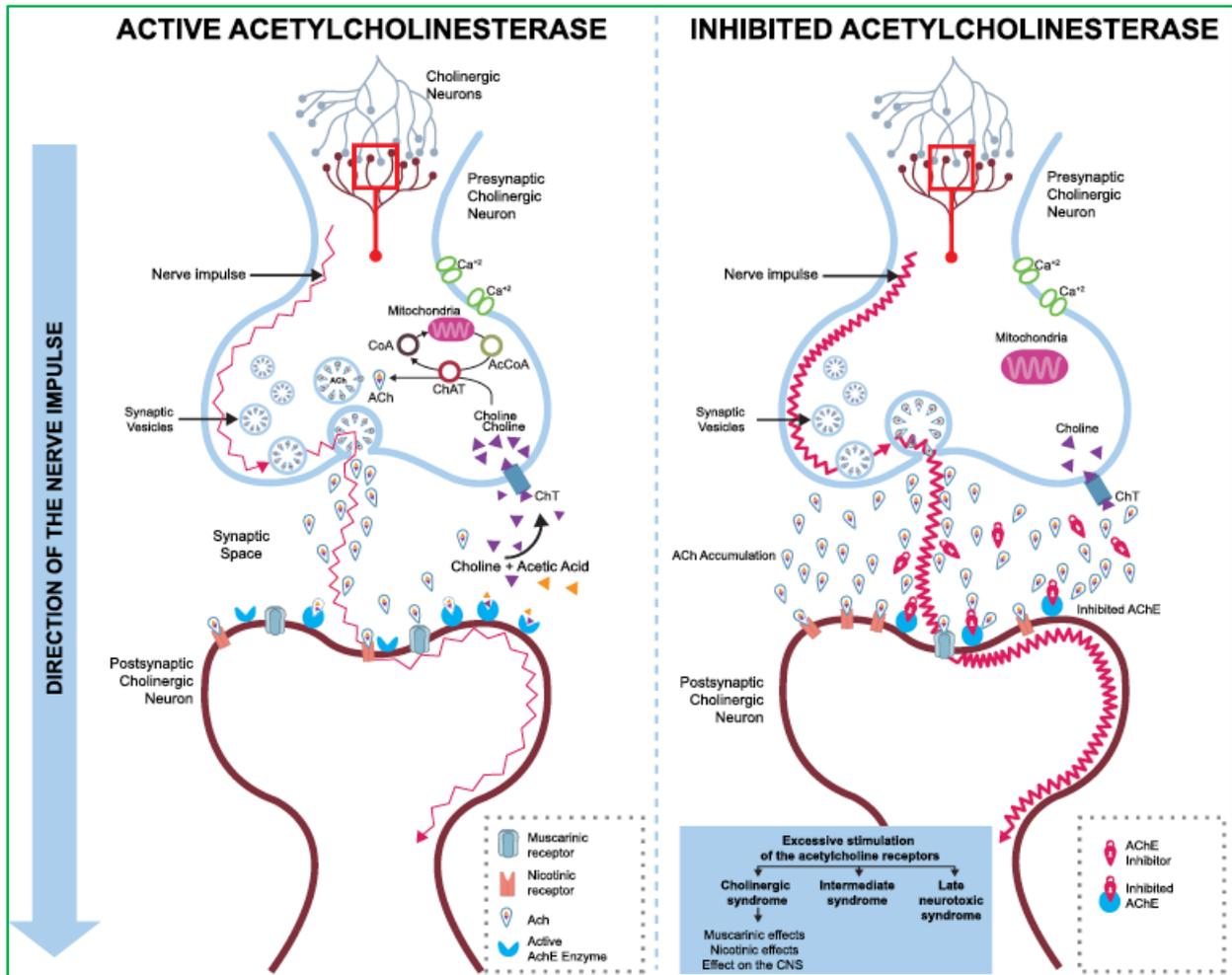
Le métabolite spécifique dicarboxylé du malathion a été mis en évidence dans près de ¾ d'urines de la population générale (concentration maximale : 107 µg/L). A la suite d'expositions professionnelles,

Les concentrations urinaires du métabolite également spécifique monocarboxylé étaient comprises entre 0,13 et 5,3 mg/L. A la suite d'une intoxication mortelle, ces deux métabolites (mon carboxyle et dicarboxylé) ont été décelés dans du sang à des concentrations comprises entre 3 et plus de 20 mg/L. Dans d'autres cas mortels, le malathion a été mis en évidence à des concentrations pouvant atteindre plus de 500 mg/L de sang et près de 200 mg/L d'urine.

I.1.2.5. L'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés :

La plupart des OP (dont le CPF et la PHO) sont synthétisés sous une forme assez peu toxique, dans laquelle le phosphore est lié à un soufre par une double liaison. La forme active des OP est leur métabolite dit « oxon », forme dans laquelle la double liaison P=S, est substituée par une liaison P=O. C'est donc cette forme qui est plus particulièrement capable d'inhiber fortement la famille des cholinestérases dont l'AChE. En ce qui concerne le CPF, il exerce cette action sur les cholinestérases, principalement via son métabolite actif, le CPF oxon (CPO). L'interaction entre les formes « oxon » et l'AChE se fait de manière covalente par phosphorylation de la sérine du centre catalytique. Cette liaison entre les OP et l'AChE est irréversible avec la plupart des OP à l'exception des OP diméthyles (**Lotti, 1995**).

L'inhibition de l'enzyme AChE provoque une accumulation d'acétylcholine dans les synapses et une sur stimulation des récepteurs muscariniques et nicotiniqes provoquant un certain nombre de troubles et symptômes décrits plus bas dans les effets toxiques des OP (**Figure 07**) (**Costa, 2006**).



A
Figure 07 : Inhibition des cholinestérases par les organophosphorés (Costa, 2006).

Partie A) mécanisme d'action biologique de l'enzyme acétylcholinestérase à l'état actif ;
 Partie B) l'effet de ce mécanisme lorsque l'enzyme est inhibée.

Abréviations : AChE : acétylcholinestérase, ACh : neurotransmetteur acétylcholine, Ca²⁺ : ion calcium, CoA : enzyme acétyltransférase, AcCoA : acétyle coenzyme A, ChAT : enzyme choline acétyltransférase, ChT : transporteur de choline.

I.1.2.6. Métabolisme des insecticides organophosphorés et du Chlorpyrifos :

Chez les mammifères, les OP sont rapidement métabolisés, principalement par le foie, même si une petite fraction reste stockée dans les tissus adipeux. Cette métabolisation se fait par deux voies différentes. L'une d'entre elles est la désulfuration oxydative de la double liaison avec le phosphore, par un cytochrome P450 du foie, qui donne lieu au métabolite oxon. On parle de bioactivation puisque l'on passe à une forme active, capable d'interagir avec les cholinestérases. Ce métabolite est hydrolysé par une A-estérase : par axonase 1 (PON-1) ou par une B-estérase en dialkylphosphate (DAP) et un métabolite organique inactif. Si

l'organophosphoré n'est pas converti en oxon, il peut par une seconde voie, être directement hydrolysé par un cytochrome P450 en son métabolite organique inactif et en dialkylthionate (Costa, 2006).

De cette manière, le Chlorpyrifos (CPF) est métabolisé par un CytochromeP450 en Chlorpyrifos-Oxon(CPO), le métabolite actif. C'est la bioactivation du CPF. Il peut ensuite être hydrolysé par une A-estérase (la PON-1) ou une B-estérase en diéthylphosphate(DEP) et 3, 5, 6- trichloro-2-pyridinal (TCP), ce dernier étant le métabolite inactif. C'est une des voies de détoxification du CPF. Il en existe une autre dans laquelle le CPF peut être directement hydrolysé en diéthylthiophosphate et TCP. Ce dernier métabolite est éliminé dans les urines sous forme de sulfates ou glucuronique des de TCP (Figure 08) (Timchalk et al., 2006).

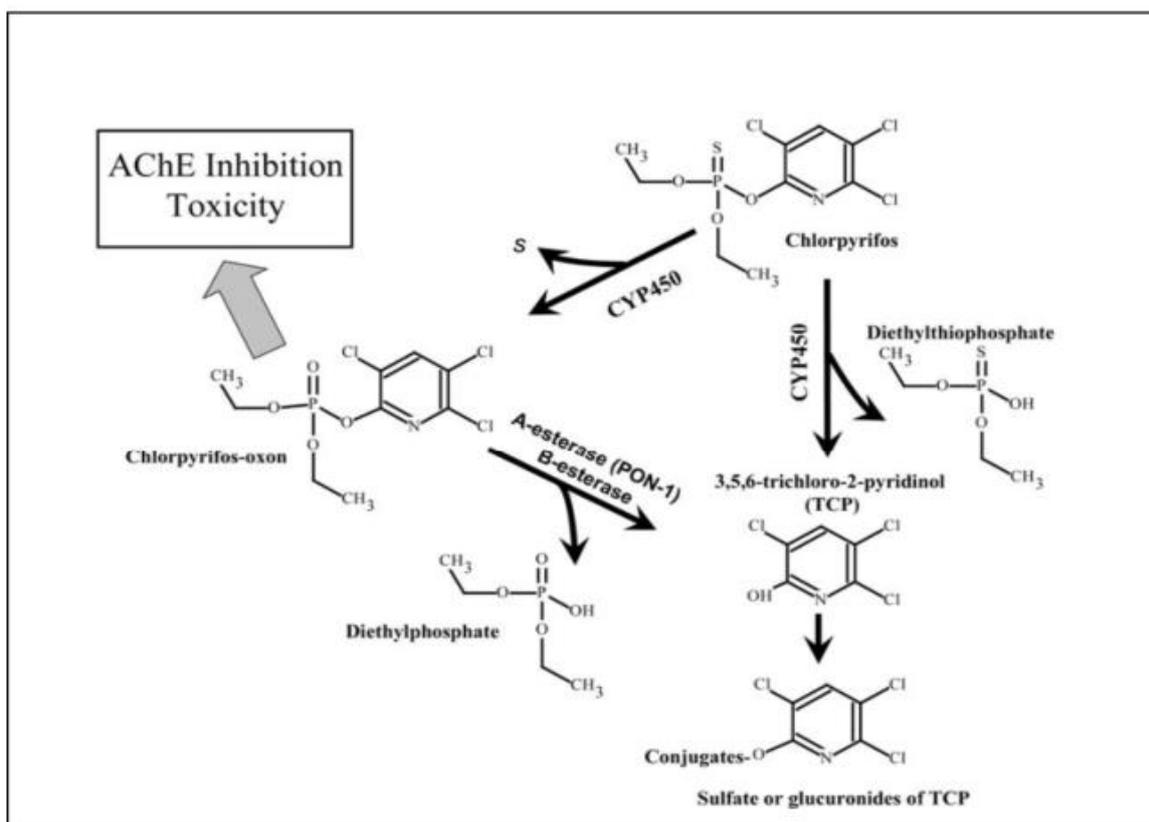


Figure 08 : Schéma de la métabolisation du CPF (Timchalk et al., 2006)

I.1.2.7. Utilisations et persistance dans l'environnement :

Le rôle majeur des pesticides OP est d'avoir des effets toxiques contre des organismes cibles. Toutefois, ils touchent aussi des organismes non cibles et l'environnement. La rétention

des métabolites toxiques entraîne la dégradation des constituants du sol (**Rangasamy et al,2018**).

Comme les OP sont souvent pulvérisés sur les cultures et les plantes, de petites particules peuvent être emportées hors du champ ou de la cour avant de tomber sur le sol après leur application, les OP peuvent être présentes dans le sol, les eaux de surface et à la surface des plantes. Ils peuvent se déplacer dans le sol et contaminer les eaux souterraines. Il est fort probable que les eaux de surface et les eaux souterraines sont contaminées dans les zones à forte activité agricole, ce qui est particulièrement important lorsque l'eau est destinée à l'irrigation ou à la consommation humaine (**Andrades et al , 2013**) . Les espèces terrestres qui s'alimentent

autour des plans d'eau et les humains qui résident ou se divertissent à proximité peuvent être contaminés (**Vermeire et al , 2018**).

I.1.2.8.Toxicité pour l'homme :

Tous les OP ont un mécanisme de toxicité commun et peuvent provoquer des symptômes similaires chez les humains qui sont trop exposés .

L'effets de nombreux OP se présente dans l'inhibiteurs de l'enzyme acétylcholinestérase qui conduit à un excès pathologique d'acétylcholinestérase dans l'organisme. (**Eddleston et al , 2008**)

de nombreux organophosphorées ont des effets neurotoxiques sur les organismes en développement, même à partir de faibles niveaux d'exposition (**Jokanoyic et Kosanović , 2010**).

Les capacités neurotoxiques de ces substances furent découvertes d'abord chez l'Homme par le Dr. Schrader, quelques années avant la guerre 40-45, lors de l'élaboration de gaz de combat neurotoxiques comme le sarin, le soman et le tabun. Ce n'est que quelques années plus tard que leur action insecticide fut mise en évidence. Des lors, de nombreux OP ont été synthétisés (**Kwong, 2002**). Leurs propriétés physico-chimiques ont été modifiées afin d'améliorer leur activité insecticide mais également de manière à réduire leur stabilité dans l'environnement (**Lotti, 2002**). Leur forte capacité insecticide associée à une toxicité aiguë considérée modérée chez les mammifères et une stabilité relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés) ont fait des OP la principale classe d'insecticides utilisés dans le monde, et encore actuellement (**Costa,2006**).

Leur principe actif repose sur la perturbation du fonctionnement du système nerveux par l'inhibition d'une enzyme essentielle à son bon fonctionnement : l'acétylcholinestérase (AChE).

I.1.2.9. Les polluants organiques persistants dans le sol :

- **Dispersion et comportement :**

Les pesticides organophosphorés se décomposent rapidement à la lumière du soleil et au contact de l'air et du sol, bien que l'on puisse en détecter de petites quantités dans les aliments et l'eau potable. **Source : GreenFacts**

- **Impact des OP sur le sol :**

- Empoisonnement des sols par accumulation. Le temps de dégradation des Op peut s'étendre sur plusieurs centaines d'années, variant en fonction du climat, du sol, et du groupe chimique.
- Appauvrissement des sols par la suppression des multiples acteurs de la richesse de sa biodiversité (organismes vivants) (**Lu et al., 2008**).

I.1.3. Généralités sur les méthodes d'analyses des pesticides

I.1.3.1. le prétraitement des échantillons :

En fonction des matrices à analyser, plusieurs techniques physicochimiques sont mises en oeuvre:

L'analyse des résidus de pesticides est faite par Multidétection en chromatographie en phase gazeuse (ECD, Spectrométrie de masse MS et MS/MS) et par Multidétection en Chromatographie en phase liquide (DAD, fluorescence, Spectrométrie de masse MS/MS).

En effet les techniques de préparation doivent être performantes, applicables aux matrices complexes tout en permettant l'analyse d'un grand nombre de molécules simultanément et ce de manière simple et rapide. (**Cruz , 2015**).

I.1.3.2. l'extraction des pesticides :

Les échantillons, après avoir été extraits par l'une des techniques précédemment décrites, doivent ensuite être analysés afin d'identifier les pesticides présents. Si les techniques ont énormément évolué au cours de ces dernières années, les enjeux liés à l'analyse sont restés sensiblement les mêmes. Dès les années 80, (**Stöber et Schulten . 1980**) décrivent que leur méthode d'analyse doit répondre à des critères de sélectivité (étant donné le nombre de

polluants pouvant être présent dans l'échantillon), de sensibilité (les concentrations attendues en pesticides étant faibles) et de rapidité, afin de pouvoir multiplier les analyses.

Les échantillons à analyser étant des mélanges complexes, les systèmes analytiques sont souvent constitués d'une partie de chromatographie, en phase gazeuse (GC) ou liquide (LC) et d'une partie de détection (détecteur ultraviolet, à capture d'électrons, spectromètre de masse...). L'une des premières méthodes de choix pour l'analyse des pesticides a été la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (**Benfenati et al. 1990**), les systèmes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) étant arrivés plus tard sur le marché.

De plus, même si les méthodes multi-résidus peuvent analyser près d'une centaine de molécules en même temps, il s'agit quand même d'une analyse ciblée, dont le choix des molécules doit être effectué en amont. Pour les pesticides, le choix s'opère souvent selon des critères de quantités utilisées autour de la zone étudiée, ce qui exclut des listes des molécules appliquées en faibles quantités mais qui peuvent potentiellement être toxiques mêmes à faible concentration comme par exemple certains insecticides (**Moschet et al. 2014**). A connaître aussi que de plus en plus de méthodes non ciblées basées sur la spectrométrie de masse haute résolution se développent de nos jours afin de déterminer des « composés inconnus » dans des échantillons (**Hernández et al. 2012**). **Guibal et al. 2015** ont par exemple combiné l'utilisation des échantillonneurs intégratifs de type POCIS avec une recherche d'inconnus opérée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie à temps de vol (UHPLC-(Q)-TOF). Ces techniques non ciblées, couplées à des tests biologiques, peuvent également permettre de mettre en évidence des composés responsables d'une activité biologique, grâce à l'approche dirigée par l'effet (EDA) (Dévier et al. 2011, **Gardia-pareje 2015**).

I.2. Bioremediation:

I.2.1. Generalite sur Bioremediation

Le sens littéraire de "bioremédiation" est "traitement biologique". Par définition, la bioremédiation signifie donc l'utilisation d'agents biologiques tels que des micro-organismes (principalement des bactéries et des champignons). et/ou des plantes (dans le cas de la phytoremédiation) pour le traitement des sols et des eaux contaminés, de manière à les rendre aptes à être réutilisés par toutes les entités biologiques. Certains des processus de remédiation utilisés pour le traitement de zone contaminée comprennent l'atténuation naturelle. Jusqu'à présent, le succès de la bioremédiation et de la biodégradation ont été assurés par les microbes

indigènes qui se développent dans ce même, et cela dépend fortement des caractéristiques de croissance et des exigences nutritionnelles des micro-organismes utilisés à cette fin (**Verma et Jaiswal 2016**). Plusieurs facteurs définissent le choix des techniques de bioremédiation, par exemple, la nature du polluant, le degré de pollution, l'emplacement géographique, le coût impliqué dans le processus, etc. (**Frutos et al. 2012 ; Smith et al. 2015**).

Plupart des procédures de bioremédiation fonctionnent en milieu aérobie complet, mais pour traiter certaines molécules récalcitrantes, le système peut fonctionner de manière anaérobie (**Abdelly, 2006 ; Fokou Mbogne, 2017**).

I.2.2. Facteurs influençant la bioremédiation :

Parmi les principales variables qui influent sur l'activité microbienne, on peut citer la capacité des microbes à réduire les matières organiques pour en faire des sources d'énergie. Un état d'oxydation moyen de C dans un contaminant sert de source d'énergie efficace pour un organisme hétérotrophe aérobie. Un état d'oxydation plus élevé, correspond donc à un rendement énergétique plus faible qui, fournit donc moins d'énergie pour la dégradation microbienne **Razmi, (2021)** . Le résultat de toute pratique de biodégradation repose sur microbienne (diversité de la population, activités enzymatiques, et concentration de la biomasse), du substrat (caractéristiques physiques et chimiques, concentration moléculaire et structure) et de l'environnement. chimiques, concentration moléculaire et structure) et d'un ensemble de facteurs environnementaux (pH, teneur en humidité, température, CE, disponibilité des accepteurs d'électrons), et du carbone, et sources d'énergie). Ces paramètres influencent la période d'adaptation des micro-organismes au substrat donné. Le site concentration et la structure moléculaire des contaminants sont connues pour influencer fortement la praticabilité de la biorémédiation et le type de transfiguration microbienne qui se produit. le type de transfiguration microbienne qui se produit, et si oui ou non Le composé servira de substrat primaire, secondaire ou cométabolique **Salilh FZ et Tarekegn MM (2020)** .

La biodisponibilité d'un contaminant est contrôlée par certains processus physiques et chimiques tels que la sorption et la désorption, la diffusion et la dissolution. Un taux lent de transfert de masse des contaminants vers les microbes de dégradation entraîne une biodisponibilité réduite des contaminants pour les microbes dans le sol. Lorsque le taux de transfert de masse est nul, les contaminants deviennent absolument indisponibles pour les microbes (sorption, diffusion et dissolution). Deviennent indisponibles pour les microbes **Boopathy R (2000)**.

I.2.3. Les principales méthodes de la bioremédiation :

I.2.3.1. La bioremédiation in-situ :

C'est les techniques de décontamination des sols et des eaux souterraines les plus souhaitables en raison de coûts réduits et moins de perturbation puisqu'elles sont effectuées sans aucun déplacement du matériel c'est-à-dire faire subir un traitement directement au niveau des sols ainsi qu'aux eaux souterraines contaminées Sans excavation ni pompage préalable (**Vidali, 2001**).

Comme les méthodes conventionnelles de bioremédiation in situ ne peuvent pas traiter une telle charge de contaminants dans le monde d'aujourd'hui, des techniques de bioremédiation améliorée sont en cours de développement afin que la biodégradation puisse être effectuée à un taux plus élevé. L'amélioration de la biodégradation in situ des contaminants organiques nécessite la stimulation des activités de biodégradation des populations microbiennes se développant dans cet environnement particulier par l'implication de certains nutriments ou accepteurs d'électrons externes. À cette fin, les micro-organismes reçoivent une certaine combinaison d'oxygène, de nutriments et d'humidité et contrôlent la température et le pH(**Jorgensen, K. S. 2007**) . Il existe plusieurs procédures permettant d'atteindre cet objectif :

I.2.3.1.1. Atténuation naturelle :

La bioatténuation ou atténuation naturelle est l'éradication des concentrations de polluants dans l'environnement. Elle s'effectue dans le cadre de processus biologiques qu'elle peut inclure (biodégradation aérobie et anaérobie, absorption par les plantes et les animaux), de phénomènes physiques (advection, dispersion, dilution, diffusion, volatilisation, sorption/désorption) et de réactions chimiques (échange d'ions, complexation, transformation abiotique) (**HANNA, K., 2004**).

Les contaminants sont convertis en formes moins nocives ou immobilisées pendant l'atténuation. Ces processus d'immobilisation et de transformation sont principalement attribués à la biodégradation microbienne et à la transformation biologique (**Smets et Pritchard, 2003**) et, dans une certaine mesure, aux réactions avec les produits chimiques naturels et à la sorption dans les milieux géologiques. Les processus d'atténuation naturelle spécifiques aux contaminants sont considérés comme des méthodes pour remédier aux composants des combustibles mais pas pour d'autres catégories de contaminants (par exemple, le sulfure et le fer ferreux (**Atteia et Guillot, 2007**)).

I.2.3.1.2 Bioaugmentation :

C'est l'un des mécanismes de la biodégradation. L'ajout de micro-organismes dégradant les polluants pour augmenter la capacité de biodégradation des populations microbiennes indigènes dans la zone contaminée, ce processus est connu sous le nom de bioaugmentation. Il s'agit d'augmenter rapidement la croissance de la population de micro-organismes naturels et de favoriser la dégradation en se nourrissant de préférence sur le site contaminé (**Hassan et Al., 2019**). Les microbes sont collectés sur le site d'assainissement, cultivés séparément, génétiquement modifiés et renvoyés sur le site. Pour convaincre, tous les micro-organismes essentiels se trouvent dans leurs sites où le sol et les eaux souterraines sont contaminés par des éthènes chlorés. (**Niu et Al., 2009**)

les micro-organismes génétiquement modifiés montrent et provoquent peuvent augmenter l'efficacité de dégradation d'une large gamme de polluants environnementaux. En raison de leur profil métabolique diversifié, ils peuvent se transformer en produits finaux moins complexes et inoffensifs (**S Malik ZA et Ahmed 2012 , Gomez et Sartaj M 2014**). Les espèces naturelles ne sont pas assez rapides pour dégrader certains composés et doivent donc être génétiquement modifiées par manipulation de l'ADN. Les microbes génétiquement modifiés dégradent les polluants beaucoup plus rapidement que les espèces naturelles et sont très compétitifs par rapport aux espèces indigènes, aux prédateurs et à divers facteurs abiotiques (**Sayler GS, Ripp S (2000), Bijay et Al (2012)**).

I.2.3.1.3. Biostimulation :

Cela inclut des modifications des paramètres environnementaux comme la restriction des suppléments de nutriments tels que les engrais à libération lente, des biosurfactants et des biopolymères (**Kumar, 2019**), ce qui permet de à éliminer les métaux lourds, les hydrocarbures et les contaminants pétroliers. (**Junior et al., 2019 ; Sun et al., 2019, 2021**). Il améliore

également la biodisponibilité de Cu, Cd, Pb et Zn, l'absorption des métaux lourds, métaux lourds, la translocation et le taux de biodégradation des hydrocarbures, des pesticides. Et des herbicides par les micro-organismes naturellement présents sur le site (**Lim et al., 2016**)

I.2.3.1.4. Bioventing :

Le bioventing consiste à ventiler de l'oxygène à travers le sol pour stimuler la croissance de bactéries et de champignons naturels ou introduits dans le sol en fournissant de l'oxygène aux microorganismes du sol existants ; en effet, il est fonctionnel dans les composés aérobies dégradables. Le bioventing utilise de faibles débits d'air pour fournir juste assez d'oxygène pour soutenir l'activité microbienne. L'oxygène est le plus souvent fourni par injection directe d'air dans la contamination résiduelle du sol à l'aide de puits. Les résidus de carburant adsorbés sont biodégradés, et les composés volatils le sont également, car les vapeurs se déplacent lentement dans un sol biologiquement actif. De nombreux chercheurs ont prouvé l'efficacité de la bioremédiation des sols contaminés par le pétrole en utilisant l'aération (**Lee et Al ,2006 et Samuel et Al ,2015**)

I.2.3.1.5. Bioslurping :

Dans cette technique, la bioremédiation est obtenue en combinant les stratégies suivantes stratégies de pompage sous vide et d'extraction des vapeurs du sol (**De Pourcq et Al.,2015**) . Cette technique est couramment utilisée pour récupérer des produits à partir de liquides capillaires, Light Non-Aqueous Phase Liquids (LNAPLs), dans des zones saturées et non saturées (**Sharma I ,2020**). Les composés organiques volatils et semi-volatils peuvent être éliminés par cette technique (**De Pourcq et Al.,2015**) . Par un mouvement ascendant, la machine de pompage transporte les LNAPL vers la surface. les LNAPL sont séparées de l'air et de l'eau, ce qui réduit les activités microbiennes (**Banitz T et Al.,2016**). Cette technique est moins adaptée à l'assainissement de dans les sols peu perméables, mais le coût de la procédure d'opération est moins élevé comparé à d'autres techniques in situ (**De Pourcq et Al.,2015**) .

I.2.3.1.6. Biosparging :

Dans la technique de biosparging, les activités microbiennes dans les sites pollués sont améliorées par l'injection d'air dans la subsurface du sol. sont améliorées par l'injection d'air dans la subsurface du sol . Ce site similaire au bioventing. Dans le cas du bioventing, un débit d'air élevé est nécessaire pour la volatilisation des polluants, alors que l'air injecté dans le biosparging stimule la biodégradation. biosparging stimule la biodégradation. La perméabilité

du sol et la biodégradabilité du polluant sont deux facteurs majeurs qui déterminent le succès de la technique de biosparging **Sharma I ,(2020)**.

I.2.3.2. La bioremédiation ex-situ :

La technologie de bioremédiation ex situ fait appel au traitement aérobie du sol pour le débarrasser des contaminants. La différence majeure entre les techniques de bioremédiation in situ et ex situ est que les remédiations in situ impliquent le traitement du sol contaminé sur place, alors que les méthodes ex situ impliquent l'extraction physique du milieu/sol d'un site contaminé et son déplacement vers un autre endroit pour un traitement efficace et contrôlé. L'un des principaux avantages de cette méthode par rapport à la méthode in situ est son efficacité et la certitude d'un traitement contrôlé grâce à la possibilité de tamiser et d'homogénéiser le mélange de sol **Atlas et al , (2005)** .

D'autre part, les méthodes de bioremédiation ex-situ requièrent l'excavation du sol et de l'eau pollués de leur emplacement original pour le d'origine pour le traitement. Elles sont ensuite classées en deux catégories système en phase solide et système en phase boueuse. Phase solide comprend les déchets contaminés tels que les déchets industriels, les déchets domestiques, les déchets solides municipaux et les boues d'épuration avec des déchets organiques tels que le fumier, les feuilles et les déchets agricoles. Le processus de traitement comprend le compostage, l'empilement des sols, l'hydroponie et l'agriculture sur terre, qui créent des conditions propices aux microorganismes anaérobies et aérobies indigènes pour anaérobies et aérobies indigènes pour stimuler le processus de valorisation (**Kumar et al., 2011 ; Rayu et al., 2012**). D'autre part, la bioremédiation en phase slurry est un processus rapide dans lequel les sols contaminés sont mélangés avec des additifs et de l'eau dans un bioréacteur afin de créer un environnement approprié pour que les micro-organismes éliminer les contaminants. homogénéiser uniformément le mélange de sols. Il existe plusieurs procédures permettant d'atteindre cet objectif :

I.2.3.2.1. biopile :

Les biopiles sont un moyen d'excaver les sols contaminer par des polluants rémédiabiles par voie aérobie, qui peuvent être traités en "piles". Les biopiles (également appelées bio cellules, tas, monticules et piles de compost) sont utilisées pour réduire les concentrations de polluants

dans les sols excavés pendant le temps de la biodégradation. Dans ce processus, l'air est fourni au système de pile par un système de tuyauterie et de pompes qui soit force l'air dans la pile sous une pression positive, soit aspire l'air à travers la pile sous une pression négative **Delille et Al, 2008**. L'activité microbienne est améliorée par la respiration microbienne et le résultat de la dégradation des polluants pétroliers adsorbés devient élevé **Emami et Al, 2012**.

I.2.3.2.2. Compostage :

Il s'agit de la technologie la plus primitive pour le traitement des déchets agricoles, des déchets solides municipaux et des boues d'épuration. Le principe de fonctionnement consiste à mélanger le sol contaminé avec des déchets organiques non toxiques, d'autres déchets agricoles, du fumier, etc. Ce mélange favorise la croissance de micro-organismes aérobies et donc la biodégradation des contaminants toxiques en produits finaux non toxiques. La biodégradation se produit par des voies métaboliques. Le processus est purement aérobie et utilise la chaleur générée par la réaction d'oxydation exothermique pour accélérer le processus. On peut donc considérer qu'il s'agit d'un processus autonome. La caractéristique positive du compostage est que le produit, c'est-à-dire le compost mature, peut être utilisé comme engrais dans les champs et peut également être utilisé à des fins de restauration des terres (**Antizar-Ladislao et al. 2006**).

Pour composter, il y a plusieurs approches, mais la plus économique consiste à utiliser des andains qui sont de longs monticules dans lesquels le mélange de compostage est conservé pour la bioremédiation. La taille optimale des andains est la suivante (3 l × 4 l × 1,5 h)m³. D'autres approches comprennent les récipients et les andains artificiels qui sont également utilisés pour l'empilage. Les vaisseaux artificiels peuvent également être appelés bioréacteurs en phase solide, dans lesquels tous les paramètres physiques et chimiques peuvent être contrôlés. Les sols contaminés par des métaux peuvent également être traités par des méthodes de compostage, par exemple, **van Herwizen et al. (2007)** ont assaini 80 % des sols pollués par des métaux avec des composts amendés de minéraux. Les facteurs limitants sont le besoin d'espace et le traitement post-excavation des sols contaminés. La gestion de l'ordre et le problème des lixiviats posent un problème majeur lors du compostage.

I.2.3.2.3. Bioslurry/bioreacteur :

La technique nommée « bioslurry » consiste à traiter le sol en réacteur avec de l'eau en quantité suffisante pour maintenir en suspension les particules du sol (**Figure 09**). L'excavation préalable du sol est obligatoire. Cette technique est déjà utilisée sur les grands chantiers et

permet de mieux contrôler les processus de traitement biologiques. Le bioslurry est la technique la plus coûteuse parmi les traitements biologiques et reste donc un peu marginale (Roudier, 2005).

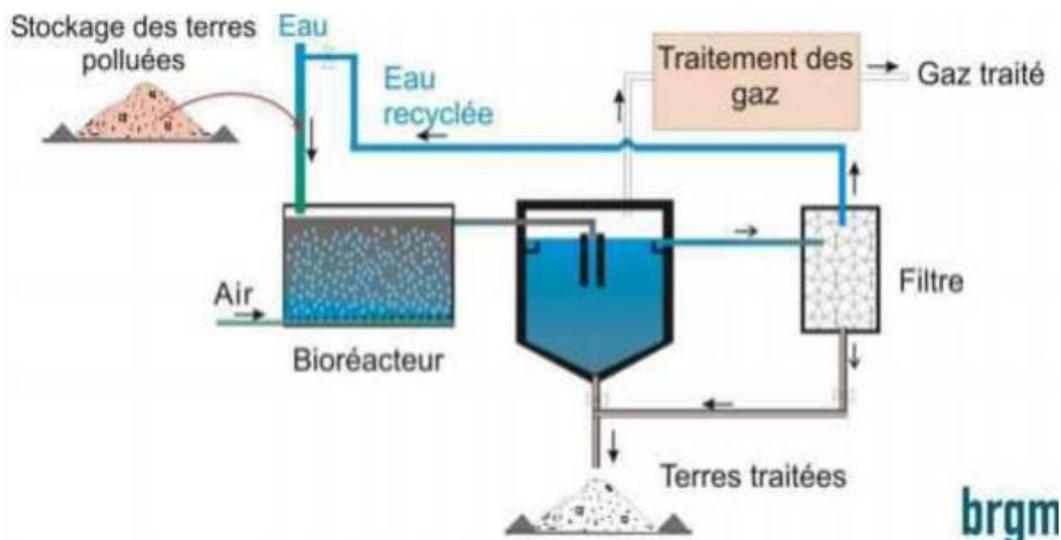


Figure 09 : Schéma de principe du bioslurry ou bioréacteur (Colombano et al, 2008)

Dans la plupart des systèmes, il y a plusieurs réacteurs en chaîne, la matière à traiter passant de l'un à l'autre. Les éléments nutritifs sont ajoutés dans le premier réacteur. Les micro-organismes sont également ajoutés à ce niveau si nécessaire. Un brassage mécanique est effectué dans chaque réacteur permettant un mélange vigoureux de tous les composants de la réaction. L'air est pulsé par le bas du réacteur et est récupéré en haut chargé d'une éventuelle phase gazeuse polluée qui est dirigée vers un système de purification (Ali Ahmed, 2011).

I.2.3.2.4 Landfarming :

le sol est étalée sur une surface imperméable. Des engrais sont ajoutés au sol, qui est travaillé, retourné et biné à intervalles réguliers pour permettre l'aération et favoriser le développement des micro-organismes. C'est une technique adaptée aux contaminants peu volatils et elle est souvent utilisée pour restaurer des sols contaminés par des produits pétroliers. Les surfaces décontaminées peuvent être utilisées ultérieurement comme terres agricoles. (Ali Ahmed, 2011).

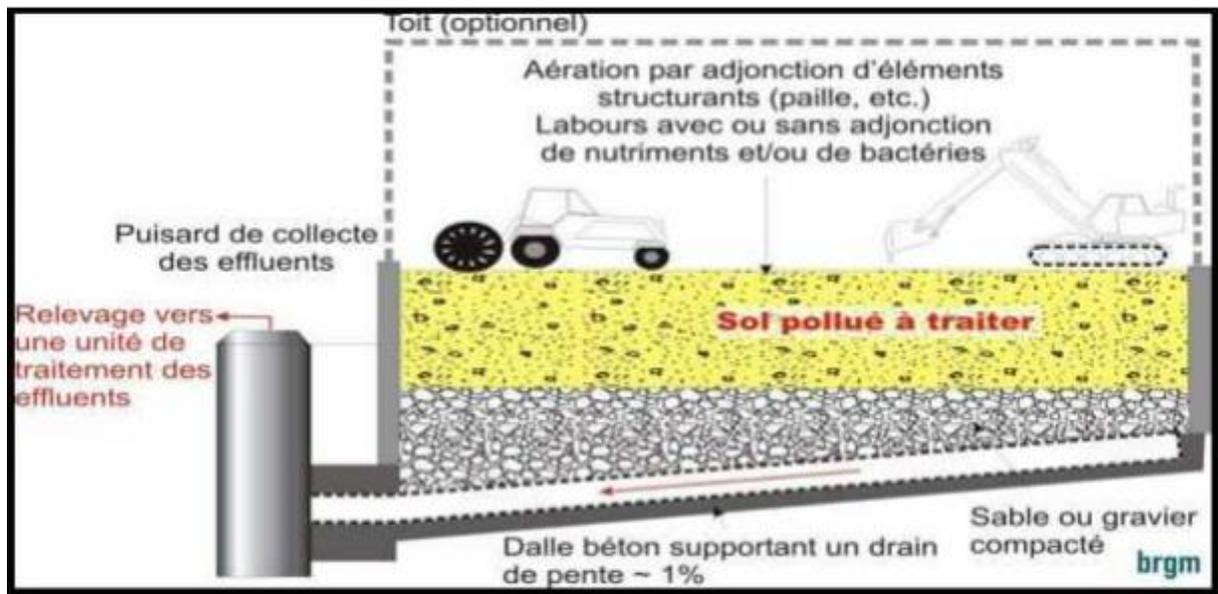


Figure 10: Schéma de principe du landfarming (Colombano et al, 2008).

I.2.3.2.5. Phytoremediation :

La phytoremédiation est un procédé technologique biologique qui utilise un processus végétal naturel pour améliorer la dégradation et l'élimination des contaminants dans le sol ou dans les eaux souterraines (Abid et al., 2017). Le succès de cette technique dépend de la quantité et de la nature du polluant. Les mécanismes de la phytoremédiation comprennent la phytoextraction, la dégradation, la filtration, l'accumulation, la stabilisation et la volatilisation. L'extraction, la transformation et la séquestration éliminent efficacement les polluants tels que les métaux lourds et les radionucléides. Avec l'utilisation de certaines plantes, comme le saule ou la luzerne, les polluants organiques, les hydrocarbures et les composés chlorés sont principalement éliminés par des mécanismes de minéralisation De-Bashan et Al., (2012), Declercq et Al., (2012).

I.2.4. Le rôle des microorganismes dans la bioremédiation :

La capacité des microorganismes à dégrader les contaminants dépend de leur système métabolique par lequel les polluants se transforment en forme inoffensive ou moins toxiques, via le processus d'oxydoréduction. Ils sécrètent plusieurs métabolites qui jouent un rôle important dans la bioremédiation des sites contaminés (Jan et al., 2014). L'ensemble de l'écosystème mondial est confronté au problème des différents types de pollution environnementale, les micro-organismes sont essentiels pour trouver une solution afin de surmonter ces défis (Abatenh et Al., 2017), les multiples fonctions des déchets chimiques et

des matières dangereuses physiques des microorganismes peuvent être dégradées, érodées, immobilisés, détoxifiées ou détruites. Certains microorganismes obtiennent de l'énergie en convertissant, modifiant et utilisant des polluants toxiques pour la production de biomasse (**Tiedje JM 1993**). la conversion d'une substance organique en ses composants inorganiques, rendant le composé d'origine inoffensif. Selon (**Chandrakant SK et Al.,2011**), La bioremédiation implique trois grandes interactions entre trois facteurs, à savoir le substrat (polluant), les organismes vivants et l'environnement.

Les interactions de ces facteurs affectent la biodégradabilité, la biodisponibilité, et les exigences physiologiques, qui déterminent le succès de la bioremédiation. Il a ajouté que la biodégradabilité d'un produit chimique est déterminée par la présence ou l'absence d'organismes qui sont capables de dégrader un produit chimique d'intérêt et par la ces organismes sont répandus sur le site. Le polluant peut interagir avec son environnement pour modifier sa disponibilité pour les organismes qui peuvent le dégrader. Par exemple, la biodisponibilité d'un polluant est faible s'il est étroitement lié à la matière organique du sol ou adsorbé par les agrégats du sol. Les facteurs physiologiques requis par les organismes pour effectuer une bioremédiation dans l'environnement comprennent la disponibilité des nutriments, un pH optimal et la disponibilité d'accepteurs d'électrons, tels que l'oxygène, le nitrate et le milieu propice, ainsi que l'environnement climatique (**Alori ET et Al 2017**).

I.2.5. La biorémédiation des insecticides :

De nombreux processus se produisent pendant la dissipation des insecticides dans l'environnement, par exemple (1) la volatilisation dans l'air, (2) la sorption sur les composants du sol, (3) le mouvement dans les sols par le ruissellement, (4) la lixiviation dans les sols, et (5) le mouvement ascendant dans les sols par les forces capillaires (**Figure 11**) (HCN 1996). Dégradation, la principale méthode de perte d'insecticides, est le principal processus affectant la dynamique des résidus d'insecticides dans l'environnement, y compris la persistance dans les sols. La dégradation des insecticides s'effectue à la fois par des méthodes physico-chimiques

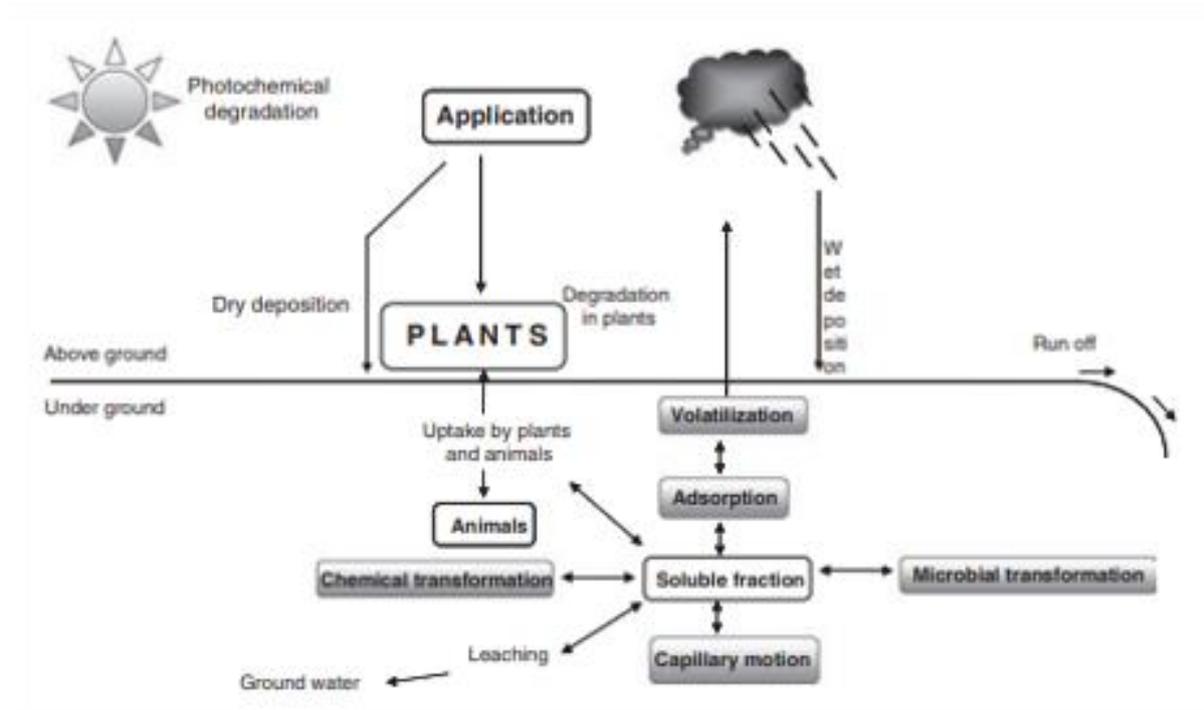


Figure 11: Le devenir des polluants dans l'environnement [modifié d'après HCN (1996)].

et par des organismes (microbes et plantes). La dégradation microbienne des insecticides est caractérisée par des enzymes qui médient la division des molécules par différentes voies métaboliques. Différentes voies métaboliques et dépend en fin de compte de la viabilité, de la densité, et de l'activité enzymatique des microorganismes du sol. En outre, les propriétés physico-chimiques des sols et les types et concentrations d'insecticides appliqués ou précédemment accumulés dans les sols, influencent grandement le taux de dégradation (Cáceres et al. 2010). Dans cette section, la dégradation microbienne des insecticides, en particulier le lindane, le chlorpyrifos et le monocrotophos, est abordée principalement en raison de leur toxicité et de leur utilisation intensive dans la production agricole. toxicité et de leur utilisation intensive dans les systèmes de production agricole.

I.2.6. les avantages et les désavantage de La bioremédiation :

I.2.6.1. les avantages de La bioremédiation :

- Il s'agit d'un processus naturel, qui prend un peu de temps, et qui constitue un procédé acceptable de traitement des déchets pour les matières contaminées comme le sol. Les microbes peuvent dégrader le contaminant et augmentent en nombre lorsque le contaminant est présent. Lorsque le contaminant est dégradé, la population biodégradant diminue. Les résidus du

traitement sont généralement des produits inoffensifs comprenant de l'eau, du dioxyde de carbone et de la biomasse cellulaire **Montagnoli et al ,(2015)**.

- Ce procédé demande très peu d'efforts et peut souvent être réalisé sur place, souvent sans causer de perturbation majeure des activités normales. Elle élimine également la nécessité de transporter des quantités de déchets hors du site et les menaces potentielles pour la santé humaine et l'environnement qui peuvent survenir pendant le transport. Elle est rentable, car elle est moins coûteuse que les autres méthodes (technologies) conventionnelles utilisées pour le nettoyage des déchets dangereux. C'est une méthode importante pour le traitement des sites contaminés par le pétrole **Montagnoli et al (2015)** .

- Il n'utilise pas de produits chimiques dangereux. Des nutriments, en particulier des engrais, sont ajoutés pour permettre une croissance microbienne active et rapide. Couramment, elle est utilisée sur les pelouses et les jardins. Parce que la biorémédiation transforme les produits chimiques dangereux en eau et en gaz inoffensifs, les produits chimiques dangereux sont détruits **Shilpi Sharma (2012)** .

- Ils sont simples, demandent moins de travail et sont bon marché en raison de leur rôle naturel dans l'environnement.

- Écologique et durable **Dell Anno et al(2012)** .

- Les contaminants sont détruits, et non simplement transférés dans différents milieux environnementaux.

- Non intrusif, permettant potentiellement une utilisation continue du site.

- Facilité relative de mise en œuvre **Kumar et al (2011)** .

- Moyen efficace d'assainir l'écosystème naturel d'un certain nombre de contaminants et options respectueuses de l'environnement **Abha et al (2013)** .

I.2.6.2. le désavantage de la bioremédiation :

- Elle est limitée aux composés qui sont biodégradables. Tous les composés ne sont pas susceptibles de se dégrader rapidement et complètement.

On craint que les produits de la biodégradation ne soient plus persistants ou toxiques que le composé d'origine.

- Les processus biologiques sont souvent très spécifiques. Les facteurs importants du site nécessaires au succès de la biodégradation comprennent la présence de populations microbiennes capables de métaboliser, des conditions environnementales de croissance appropriées et des niveaux adéquats de nutriments et de contaminants. **Adams et al., (2015).**

- Il est difficile d'extrapoler des études en laboratoire et à l'échelle pilote aux opérations sur le terrain à grande échelle.

- Des recherches sont nécessaires pour développer et mettre au point des technologies de biorestauration adaptées aux sites contenant des mélanges complexes de contaminants qui ne sont pas uniformément dispersés dans l'environnement. Les contaminants peuvent être présents sous forme de solides, de liquides et de gaz. **Kumar et al (2011) .**

- Elle prend souvent plus de temps que d'autres options de traitement, comme l'excavation et l'enlèvement du sol ou l'incinération.

- L'incertitude réglementaire demeure quant aux critères de performance acceptables pour la biorémediation. Il n'existe pas de définition acceptée du terme "propre", et l'évaluation de la performance de la biorestauration est difficile. **Montagnolli et al (2015) .**

*Chapitre II : Matériels et
méthodes*

II. Matériels et méthodes :

Pour la réalisation de notre étude, nous avons fait appel à des procédés et des techniques physicochimiques conduites principalement au niveau du laboratoire de la Police Scientifique d'Alger et des techniques microbiologiques réalisées au niveau du laboratoire de recherche de chimie pétrolière à l'université M'Hamed Bougera de Boumerdes.

II.1. Présentation du site du prélèvement :

La région d'El-Oued est située au Nord-est du Sahara Algérien (Bas-Sahara), aux confins septentrionaux du Grand Erg Oriental, (**Figure 12**) entre les parallèles : (32° et 35,4°) Nord, et (5,9° et 7,8°) Est. La zone est délimitée par : La frontière Algéro-Tunisienne (chotts El-Djerid : région de Tozeur) à l'Est Les chott Melghir et Merouane au Nord (région de Biskra) L'Oued-Righ (région de Touggourt) à l'Ouest.

Le climat de la région est de type saharien, caractérisé par des précipitations faibles et irrégulières, des températures élevées accusant des amplitudes thermiques importantes et par une faible humidité relative de l'air. Les vents sont fréquents et la luminosité est importante.

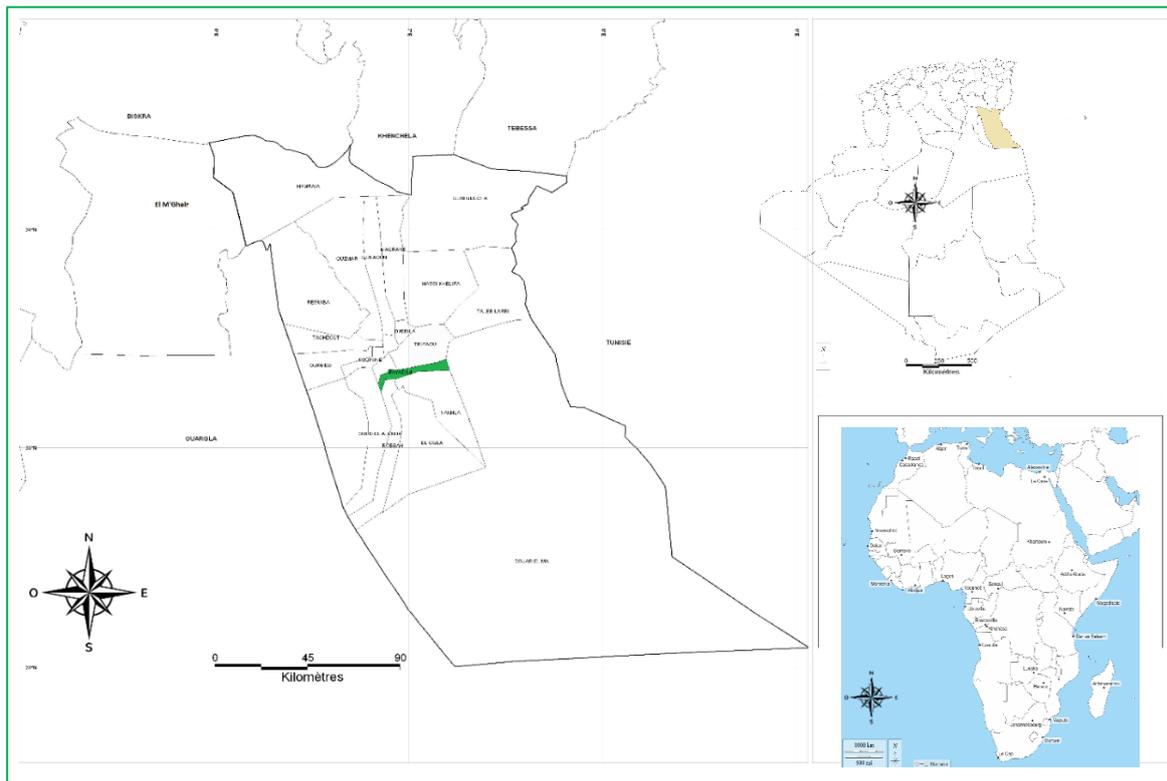


Figure 12 : Situations géographiques de la région de Bayadah. Par rapport à la situation géographique d'El Oued et de l'Algérie (Google Maps).

II.2. Échantillonnage

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons procédé à prélever des échantillons de sols pendant et après cultivation de pomme de terre. Les sols ont été prélevés au niveau d'un champs (pivots) dans la région de **Soualeh**, commune de **Bayadah** à l'aide d'une pelle en acier inoxydable à une profondeur de 20 à 50 cm. (**Figure 13.**), en 09 Avril 2022, dont les coordonnées géographiques sont les suivantes : - Latitude : **33,33742** ; -Longitude : **8,0797**



Figure 13 : Vue panoramique par satellite du site d'échantillonnage (google maps)

L'échantillonnage diffère selon le type d'analyses :

➤ **Pour les analyses physicochimiques :**

L'échantillonnage a été effectué selon la norme FN ISO 11464. (2006). Une fois le sol est prélevé à une profondeur donnée, à différents points de champs ; l'échantillon est mis dans des sachets stériles de prélèvement, à l'obscurité et à température ambiante, Il est ensuite transporté dans une glacière jusqu'au laboratoire.

➤ **Pour les analyses microbiologiques :**

L'échantillonnage pour l'analyse bactériologique s'effectue selon la norme ISO 18400-104 : 2018. L'échantillon est prélevé à différents points de champs (pivots), à une profondeur de 20 cm et en surface ; mis dans des sachets stériles de prélèvement, à l'obscurité et à température ambiante, Il est ensuite transporté dans une glacière de laboratoire jusqu'au laboratoire où il subit un prétraitement spécifique.

➤ **Prétraitement des échantillons :**

Le but du prétraitement des échantillons est d'obtenir un échantillon représentatif du sol d'origine, dont lequel la concentration en polluant est aussi proche que possible de celle présente dans le sol d'origine. Les étapes de base pour le prétraitement des échantillons sont les suivantes :

- * **Le séchage** : S'effectue à l'air libre pendant 24 à 48h.
- * **Le tamisage** : Afin d'éliminer les gros fragments solides, par un tamis à mailles de 2 mm.
- * **L'homogénéisation** : le broyage du sol est important pour réduire la taille des particules et homogénéiser la contamination.

. **Méthode de quartage** : L'homogénéisation et le sous-échantillonnage par quartage se déroule en plusieurs étapes (Fig.14):

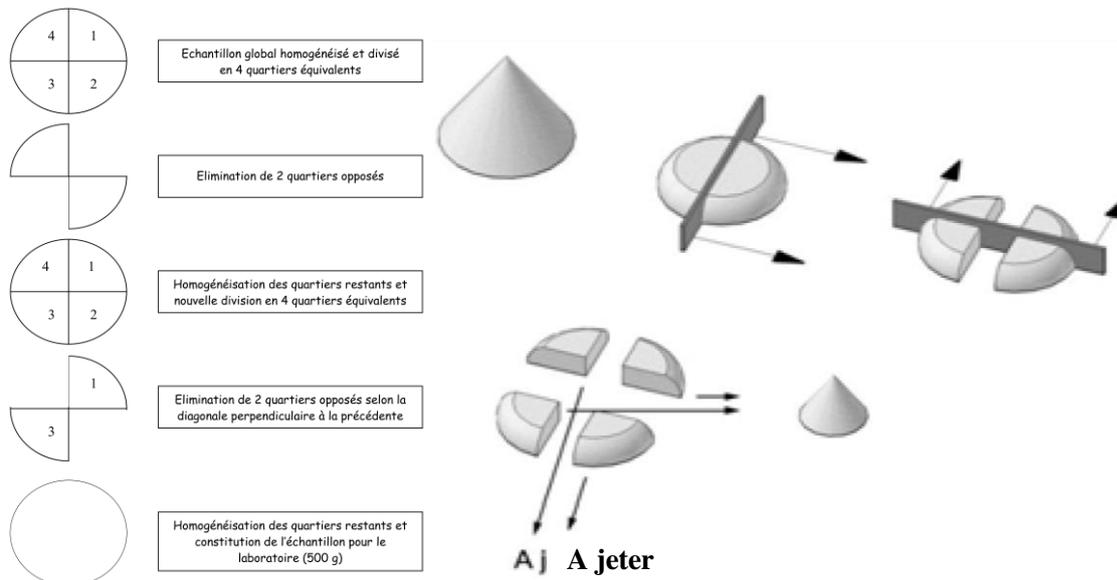


Figure 14 : Protocole d'échantillonnage avec la méthode de quartage (norme NF EN 14778.2011).

- 1) Etaler l'échantillon sur une toile ou une surface propre et former un tas aplati et circulaire avec la terre homogénéisée ;
- 2) Diviser en 4 quartiers équivalents en figurant deux axes perpendiculaires dans le tas à l'aide de la tranche de la pelle ;
- 3) Eliminer, à l'aide de la pelle, 2 quartiers opposés, mélanger soigneusement les 2 quartiers restants .

- 4) Procéder à nouveau à la division de la terre restante en 4 quartiers équivalents et éliminer cette fois les quartiers opposés selon la diagonale perpendiculaire à celle des quartiers précédemment éliminés.
- 5) Poursuivre ce procédé jusqu'à réduction de l'échantillon global et l'obtention d'un échantillon composé du volume souhaité.

II.3. Analyses physicochimiques du sol.

Les caractéristiques physico-chimiques influencent fortement les propriétés biologiques des sols. Pour estimer le degré de la pollution des sols, on procède aux analyses ci-après :

II.3.1. Analyses physiques :

II.3.1.1. Teneur en eau ou humidité :

La teneur pondérale en eau du sol est déterminée par la méthode gravimétrique selon la norme **NF ISO 1146**. Elle s'exprime en pourcentage (%) c'est-à-dire en gramme d'eau pour 100 g de sol déshydraté à 105° C. Le taux d'humidité s'exprime en % selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P_1 - P_0}{P_0} \times 100$$

P₀: poids de la prise d'essai du sol (g).

P₁ : poids de la prise d'essai de sol après séchage à 105°C (g).

II.2.1.2 Mesure de la température :

Pour évaluer la température de l'échantillon in situ, nous avons suivi la démarche suivante :

- Introduire le thermomètre dans le sol.
- Laisser le thermomètre introduit pendant 3 mn.
- Lire le niveau de mesure sur la graduation marquée au-dessus du thermomètre.

➤ Lecture :

La lecture représente le degré Celsius de température affiché sur le thermomètre.

II.3.1.3. Détermination de la Granulométrie Norme ISO 2395 :1990.

Afin de déterminer la granulométrie de notre échantillon du sol, nous avons fait appel à la méthode par Tamis

➤ **Principe :**

L'analyse granulométrique d'un sol consiste à déterminer la proportion des diverses classes de grosseur des particules. Il n'existe pas de méthode parfaite pour déterminer la granulométrie ; l'exactitude de la méthode dépend de la nature du sol et, plus précisément, de la forme géométrique des particules et du pourcentage des matières organiques qu'elles renferment.

➤ **Méthode :**

Une portion d'échantillon est séchée et séparée par vibration sur une série de tamis superposés. Par la suite, le contenu de chaque tamis est pesé.

➤ **Lecture :**

La fraction d'échantillon recueillie par tamis est pesée et rapportée sur la quantité d'échantillon totale.

II.3.2. Analyses chimiques :

II.3.2.1. Potentiel d'hydrogène (pH) :

Le pH est déterminé selon la norme **AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994)**, consiste en la mesure d'une différence de potentiel d'hydrogène, elle s'effectue à l'aide d'un dispositif potentiométrique.

▪ **Mode opératoire**

- Introduire dans un bécher 5g de sol, ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml ;
- Laisser agiter la solution pendant 30 min ;
- Rincer l'électrode abondamment avec de l'eau distillée ;
- Placer le bécher sous agitation magnétique ;

Introduire l'électrode dans la solution à analyse

- Mettre en marche le potentiomètre.

▪ **Lecture**

Lire la valeur affichée par le potentiomètre après stabilisation, ainsi que la température de l'échantillon.

II.3.2.2. Mesure de la conductivité électrique d'un sol

Pour la mesure de la conductivité électrique de notre échantillon du sol nous avons suivi la méthode préconisée par AFNOR, (1994).

- **Principe**

La conductivité d'un sol ou un sédiment est une mesure de la quantité d'ions présents et qui pourraient se dissoudre en présence d'eau.

- **Mode opératoire**

- Porter dans un bécher de 250 ml, 20 g de sol tamisé et y ajouter 100 ml d'eau distillée ;
- Agiter pendant 2 mn, avec un agitateur mécanique, ou magnétique ;
- Laisser reposer pendant 30 mn ;
- Filtrer, pour obtenir un filtrat clair ;
- Ajouter 2 gouttes d'hexamétophosphates de sodium à 0,1%, ce produit évitera la précipitation de CaCO_3 .

- **Mesure de la conductivité de l'échantillon :**

- Introduire l'électrode du conductivimètre au centre du récipient contenant l'extrait de sol ;
- Après stabilisation de l'aiguille, lire la conductivité ;
- Prendre la température de l'extrait de sol, en vue d'une correction de la conductivité ;
- La conductivité dépend de la température.

II.3.2.3. Dosage des paramètres indicateurs de la pollution :

Le dosage de ces paramètres a été effectué à l'aide d'un spectromètre. L'appareil dans le domaine du visible (325 à 900 nm) est programmé pour la quantification des divers éléments et composés contenus dans le lixiviat de l'échantillon du sol. L'analyse de ces éléments est réalisée suite à une complexation de ceux-ci avec les réactifs ajoutés, ce qui développe une couleur appropriée. Les paramètres dosés sont : Phosphore, Nitrate, Nitrite, Oxygène dissous, demande biochimique en Oxygène(DBO), demande chimique en Oxygène(DCO) où la lixiviation du sol doit être réalisée.

-Test Nitrates NO_3^- /Nitrites NO_2^- (Bandelette) :

▪ **Principe :**

Les ions nitrates sont réduits en ions nitrites par un réducteur qui en présence d'un tampon acide forment avec une amine aromatique un sel de diazonium. Celui-ci réagit avec la N-(naphthyl-1)-éthylène diamine pour donner un colorant rouge violet. La concentration en nitrates est déterminée semi-quantitativement par comparaison visuelle de la zone réactionnelle de la bandelette-test avec les zones d'une échelle colorimétrique.

▪ **Méthode :**

- Récupérer 100g du sol dans un Bécher et ajouter 100ml d'eau distillé déminéralisée (eau sans nitrates).
 - Mélanger pendant 2 minutes de façon à obtenir une boue homogène.
 - Filtrer à l'aide d'un papier filtre, on obtient le filtrat (liquide clair) au bout de quelques minutes.
 - Tremper une bandelette nitrate dans le filtrat pendant 1 seconde et au bout de 60 secondes exactement, réaliser la lecture par comparaison avec l'échelle colorimétrique placée sur le tube Nitratest.
- **Lecture :** Le résultat est donné en mg/L ou ppm. Pour convertir le résultat en unités/ha, il faut multiplier par un coefficient qui dépend de la texture du sol (coefficient compris entre 1 et 2).

-Mesure de l'Oxygène dissous :

▪ **Principe :**

Pour estimer la quantité d'oxygène dissout dans notre échantillon du sol, nous avons utilisé la sonde d'oxygène optique FDO925 IDS pour applications terrain et de laboratoire.

Méthode : La méthode consiste à mesurer la sensibilité de la sonde à l'oxygène. Elle consiste à introduire la sonde dans l'échantillon puis d'effectuer la lecture sur écran de l'appareil qui affiche rapidement la quantité d'oxygène dissoute.

▪ **Lecture :**

Le résultat s'affiche en mg/kg d'oxygène dissous.

- Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

La demande biochimique en oxygène est la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation des matières organiques présentes dans l'extrait aqueux du sol par la voie biologique.

▪ **Principe :**

Le principe de mesure de la DBO₅ repose sur la quantification de l'O₂ consommé après incubation de l'échantillon à 20°C.

Au cours de cette période, il se produit des réactions physico-chimiques et biologiques qui se traduisent par une consommation d'O₂ proportionnelle à la quantité des matières organiques biologiquement oxydables. Si la concentration en substance réductrices est importante, celle-ci absorbe rapidement l'O₂ de l'échantillon.

Deux réactions d'oxydations se produisent :

- ✿ Une oxydation lente par voie chimique des composés organiques et minéraux.
- ✿ Une métabolisation des matières organiques assimilables.

▪ **Méthode :**

Un extrait aqueux 50/500 solide/liquide a été agité pendant une heure puis filtré. Le filtrat est introduit dans un flacon brun, son col porte un support en caoutchouc qui contient deux pastilles de NaOH pour absorber le CO₂, puis la bouteille a été fermée par une tête OXITOPWTW.

▪ **Lecture :**

Le résultat correspond à la consommation d'O₂ en mg/kg obtenus après la multiplication de la valeur obtenue par le coefficient correspondant au volume utilisé.

-Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) :

La demande chimique en oxygène est la quantité d'oxygène consommé par les matières existantes dans l'échantillon et oxydables dans les conditions opératoires définies.

▪ **Principe :**

Ce test consiste la mesure de l'oxygène équivalent à la quantité de la matière organique oxydable par le dichromate de potassium K₂Cr₂O₇, dans une solution d'acide sulfurique à 50% dont un composé à base d'argent est ajouté comme catalyseur, ainsi qu'un composé mercurique pour réduire les interférences dues à l'oxydation des ions chlorures par le dichromates. L'oxydation s'effectue à une température de 150°C pendant deux heures.

▪ **Méthode :**

Un extrait aqueux 10/100 solide/liquide est mis dans un bécher et agité pendant une heure puis filtré. Une bonne homogénéisation du filtrat récupéré a été effectuée au moment où le réacteur DCO est préchauffé à 150°C.

Deux tubes DCO sont utilisés dans cette expérience : l'un contient 10 ml de l'extrait aqueux, il s'agit de l'échantillon étudié, et l'autre contient 10 ml d'eau distillée qui représente le blanc. La préparation de ces deux derniers se fait par l'ajout de 0,2 g de Sulfate de Mercure qui joue le rôle d'un catalyseur de réaction. 5 ml de dichromates de potassium à 0,2 N pour

l'oxydation et ainsi 15 ml d'acide sulfurique à 95% pour créer un environnement acide. La réaction se déroule pendant deux heures dans le réacteur de DCO à 150°C.

▪ **Lecture :**

Après refroidissement, la lecture a été faite par un spectrophotomètre à une longueur d'onde 420 nm, le résultat s'affiche en mg/kg.

II.3.3. Etude qualitative des pesticides dans le sol :

➤ **Principe :**

La caractérisation des pesticides dans le sol du pivot est réalisée par chromatographe en phase gazeuse (GC-MS). L'appareil utilisé est un chromatographe PerkinElmer de type Clarus 600 composé de plusieurs parties : un injecteur ; un détecteur SQ8 ; un four ; une colonne capillaire de silice fondue de 30m de longueur et de 0.25 mm de diamètre avec un film de 0,25µm.

La température de l'injection et de 270°C, et de la source est de 280°C.

Les pesticides sont d'abord extraits à l'aide de la technique d'extraction QuEChERS (voir plus loin pour le principe) utilisant l'eau et l'acétonitrile comme solvant d'extraction. Un volume de 1 µl de l'extrait sera utilisé pour l'injection.

➤ **Méthode :**

Une quantité de quelques microlitres de mélange à analyser est injecté à l'aide d'une seringue dans la chambre d'injection où elle va se vaporiser rapidement sous l'effet de la haute température du four. Il est ensuite emporté par le gaz vecteur qui est l'hélium, à travers la colonne d'analyse.

Une fois l'injection faite, les différents constituants du mélange passent dans la colonne, où ils seront plus ou moins retenus par l'adsorbant (phase stationnaire).

Les composants les moins retenus traversent rapidement la colonne alors que ceux plus fortement retenus y séjournent plus longtemps.

II.4. Analyses microbiologiques du sol

II.4.1. Pesticide utilisé :

Le Chlorpyrifos éthyle (**CP**) est un insecticide commercialisé sous forme liquide, fourni par l'**Institut National de la Protection des Végétaux (INPV)**. Ce dernier a été employé parmi d'autres pesticides dans les traitements de parcelles de pommes de terre dans le site d'échantillonnage et aussi il représente un composé actif auquel les micro-organismes sont susceptibles d'être exposés dans l'environnement du sol.

II.4.2. les étapes de l'isolement des bactéries et des moisissures

II.4.2.1. Préparation de la solution mère

A partir d'un échantillon de sol destiné à l'analyse microbiologique et dans des conditions aseptiques, 10 g de sol ont été pesés puis introduits dans un flacon contenant 100 ml d'eau physiologique stérile. Le flacon est ensuite agité énergétiquement dans un agitateur magnétique pendant 30 min. Le contenu du flacon représente la solution mère.

II.4.2.2. Préparation des dilutions

On prélève 1ml de la solution mère bien agitée puis on l'introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de 10^{-1} , et à partir de cette dernière on transfère 1 ml dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de 10^{-2} . On continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} .

II.4.2.3. Ensemencement

Les milieux gélosés retenus GN pour les bactéries et PDA pour les champignons (ce dernier est additionné d'un antibiotique chloramphénicol pour inhiber la croissance bactérienne), sont préalablement fondus et répartis dans des boîtes de Pétri à une hauteur d'environ 3 à 4 mm et sont laissées refroidir. Une quantité de 0,1 ml de la solution mère et de chaque dilution faisant guise d'échantillons, ont été prélevés puis uniformément étalées sur toute la surface des milieux à l'aide d'anes de platine stérilisées (deux boîtes de milieux pour chaque dilution).

Les bactéries sont incubées à 30°C pendant 24h à 48h et les levures et moisissures par contre sont incubées à 27°C pendant 5j.

II.4.2.4 L'isolement

L'étape d'isolement de la microflore bactérienne et fongique a été effectuée à partir des mêmes boîtes, sur lesquelles le dénombrement a été effectué.

II.4.3. Purification

La purification des souches isolées consiste à transférer aseptiquement une colonie bien individualisée, à l'aide d'une série de repiquages dans un milieu neuf et stérile pour obtenir une culture pure (**Branger et al., 2007**).

II.4.3.1. Purification des bactéries

Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées.

Un échantillon, de chaque type de colonies séparées les unes par rapport aux autres, est prélevé puis purifié par repiquages successifs selon la méthode de stries.

II.4.3.2. Purification des moisissures

Pour les moisissures, nous avons prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile, au bord de chaque colonie, un fragment du mycélium et le déposé au centre de la nouvelle boîte de Pétrie contenant le même milieu de culture sur lequel elle a été isolée ; alors que pour la purification des levures nous avons procédé de la même manière que celle adaptée pour les bactéries.

II.4.4. Identification

II.4.4.1. Identification des bactéries

L'identification des souches isolées est réalisée selon les travaux de Thomas et *al.*,(2002) en se basant sur les études morphologiques suivantes :

II.4.4.1.1. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats vers l'identification de la famille ou du genre. Les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- **La forme des colonies** : rondes, irrégulières, etc.
- **La taille des colonies par la mesure du diamètre** : punctiformes ou non punctiformes ;
- **La chronogénèse** : couleur de la colonie;
- **L'élévation** : convexe, concave, plate ;
- **L'opacité** : opaque, translucide ou transparente;
- **La surface** : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, ... etc.

II.4.4.1.2. Aspect microscopique

✿ Mobilité à l'état frais

Il s'agit de déterminer si la bactérie est mobile ou non. Ce test permet également de déterminer sa forme et leur arrangement. Cela consiste en une observation d'une goutte de suspension bactérienne préparée avec de l'eau physiologique entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique au grossissement x10, puis x40 et x100 à l'huile d'immersion.

✿ Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est

réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram⁺ ou Gram⁻.

- **Méthode**

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen .
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 min, éliminer l'excès par l'eau courante ;
- Ajouter du Lugol: deux bains de 45 secondes, éliminer l'excès par l'eau courante;
- Traiter à l'alcool 85° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau ;
- Recolorer à la Fuchsine pendant 1 à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage.

- **Lecture**

L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion. Les bactéries Gram positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatif sont colorées en rose.

- **Recherche de spores**

La coloration de Gram permet aussi l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence de spore.

II.4.4.2. Etude biochimique :

II.4.4.2.1 Métabolisme énergétique :

- Recherche de l'oxydase :

- **Principe :**

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

- **Technique:**

Sur une lame un disque oxydase est déposé contenant de l'oxalate N-dimethyl paranitro phénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée.

- **Lecture:**

A l'issue de quelques secondes, une coloration violette apparaît indiquant la présence de cytochrome oxydase (oxydase positive).

- Recherche de la catalase :

- **Principe :**

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



- **Technique:**

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes).

- **Lecture:**

Catalase+ : effervescence.

Catalase - : pas d'effervescence.

- **Étude du type respiratoire:**

- **Principe:**

Le type respiratoire est mis en évidence par l'ensemencement d'un milieu gélosé (viande fois) dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1cm.

- **Technique:**

- Régénération des milieux dans un bain-Marie à une température comprise entre 70 et 80°C (dans le but d'abaisser le potentiel redox des milieux);

- Refroidissement à 45°C;

- Ensemencement en utilisant une pipette Pasteur scellée et stérilisée: introduire jusqu'au fond du tube puis remonter et redescendre successivement plusieurs fois en décrivant des tours de spires très serrés. Sortir verticalement à 0.5cm de la surface.

- Le milieu est solidifié par refroidissement à l'eau courante du robinet.

- Incubation à 30°C pendant 24 heures.

- **Lecture:**

- Croissance en surface: bactéries **aérobies strictes (AS)**.
- Croissance en profondeur: bactéries **anaérobies strictes (ANS)**.
- Croissance le long du tube: bactéries **aéro-anaérobies facultatives (AF)**.
- Croissance dans la partie supérieure proche de la surface: bactéries **micro-aérophiles (MA)**.

- Recherche du nitrate réductase (NR):

• **Principe:**

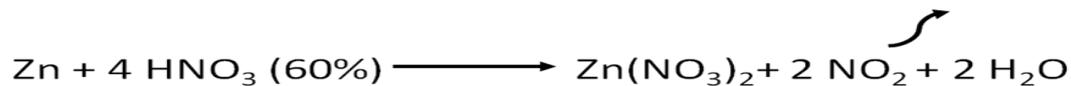
L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose.

L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réaction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N₂). Dans ce cas, on doit compléter par l'épreuve de Zoo Bell, épreuve qui consiste à ajouter de la poudre de zinc au milieu:

- si le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, la coloration rose apparaît et la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).

- si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant un nitrate réductase très active.

En effet, la mise en évidence d'une réaction chimique des nitrates par la poudre de Zinc permet de distinguer ces deux cas et la réaction est comme suit :



• **Technique:**

A une culture en bouillon nitraté de 24 à 48h d'incubation à 30°C, on ajoute cinq gouttes de réactif de Griess. Après agitation, la lecture est immédiate.

• **Lecture:**

- Coloration rose ou rouge: nitrates réduits en nitrites (nitrate réductase positive NR⁺).

- Milieu restant incolore: ajouter un peu de poudre de zinc (réducteurs des nitrates) ; agitation, inclinaison du tube de culture en position presque à l'horizontale et attendre cinq minutes avant la lecture:

- Si le milieu devient alors rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie: nitrate réductase négative NR⁻.

- Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites: nitrate réductase positive NR⁺.

II.4.4.2.2 Métabolisme glucidique :

- Utilisation des sucres :

- **Principe:**

Cette méthode permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate (H₂S). C'est un milieu incliné dont le glucose présent dans le culot, est attaqué par voie fermentative entraînant une acidification du milieu avec production ou non de gaz. Sur la pente, le lactose et le saccharose seront alors oxydés et fermentés. La production du H₂S se manifeste par un noircissement du culot.

- **Technique:**

Une colonie est ensemencée en réalisant une piqûre centrale dans le culot et des stries serrés sur la pente. Remettre le bouchon du tube sans le revisser.

Incubation à 30°C pendant 24 heures.

- **Lecture:**

Lactose-saccharose positif : pente virant au jaune;

Glucose positif: culot jaune;

H₂S positive: noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot.

Production de gaz : présence de bulles de gaz dans le culot.

- **Recherche de la β-galactosidase :**

- **Principe:**

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la -galactosidase.

L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl-D- galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de deux molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu, Ce processus se fait selon la réaction illustrée dans la figure 15 :

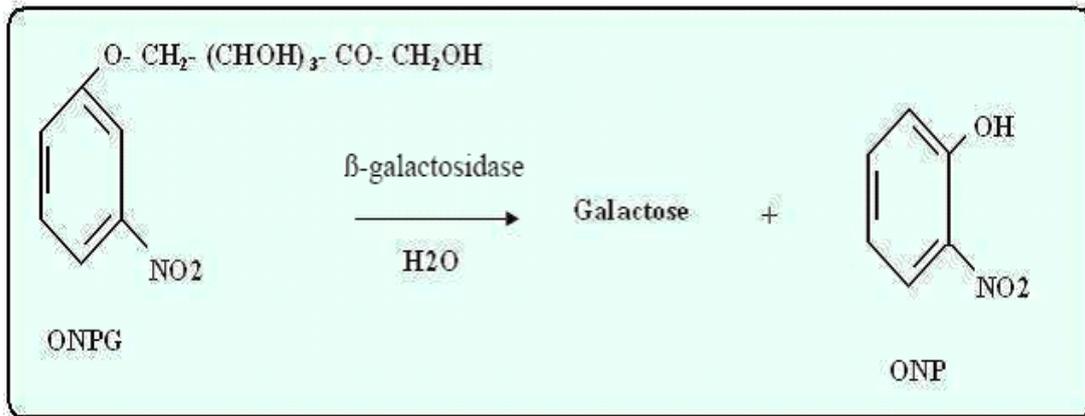


Figure 15: Réaction d'hydrolyse de l'ONPG.

- **Technique:**

- Préparer une suspension dense d'une culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5ml d'eau physiologique, puis y ajouter un disque ONPG.
- incubé à 30°C pendant 24 heures.

- **Lecture:**

Le test ONPG est positif lorsque la suspension bactérienne se colore en jaune.

- Recherche du citrate perméase :

- **Principe:**

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons, qui ne contient que le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu.

- **Technique:**

La pente du milieu estensemencée d'une suspension bactérienne, par stries longitudinales au moyen d'une anse. Les tubes sont légèrement fermés.

L'incubation se fait à 30°C pendant 3 à 5 jours.

- **Lecture:**

- Bactéries « citrate positive » : culture avec alcalinisation du milieu ; virage de l'indicateur au bleu
- Bactéries « citrate négative » : pas de culture ; coloration verte du milieu (inchangé).

- Utilisation du mannitol et l'étude de la mobilité :

- **Principe:**

Le Mannitol est un produit de réduction D-Mannose. Sa dégradation conduit à la formation du fructose dont l'attaque aboutit à la formation des acides à chaînes très courtes (acide acétique, Acide formique). Le milieu Mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du Mannitol et la mobilité.

- **Technique:**

Ensemencer le milieu Mannitol par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur, chargée de culture à étudier.

Incuber à 30°C, pendant 24 heures à 48 heures.

- **Lecture:**

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.

- les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement tandis que les souches immobiles croissent uniquement le long de la piqûre.

- Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires :

- **Principe**

Cette étude permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction Voges Proskauer, VP). Ces deux réactions ont un intérêt différent, mais elles peuvent être effectuées sur le même milieu et le plus souvent, se vérifiant mutuellement, une souche à RM+ est habituellement VP- et vice versa.

Réaction au rouge de méthyle : elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale d'un milieu glucosé par la fermentation du glucose, cette acidification provoque le virage du rouge de méthyle (rouge à un $\text{pH} \leq 5$; jaune $\text{pH} \geq 5.8$).

Réaction de l'acétoine (réaction de Voges- Proskauer) : certaines bactéries sont capables de produire de l'acétyl-méthyl carbinol, soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit, le plus souvent au cours de la fermentation de 2-3 butyléneglycolique. En présence d'une base forte l'acétoine donne une coloration rouge au milieu oxygéné (oxydation en diacétyle).

Le diacétyle formé réagit avec le groupement guanidine de α - naphthol pour donner un composé rouge.

- **Technique :**

Une colonie de la souche à étudier estensemencée sur le milieu Clark et Lubs puis incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Après l'incubation, diviser le milieu dans deux tubes stériles, verser quelques gouttes de VP I et quelques gouttes de VP II dans l'un des tubes, et dans l'autre, ajouter quelques gouttes de réactif RM (rouge de méthyle).

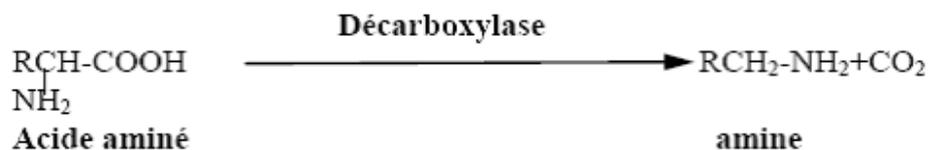
- **Lecture:**
 - Test VP: Coloration rouge: VP⁺.
Coloration jaunâtre: VP⁻.
 - Test RM: Coloration rouge: RM⁺.
Coloration jaunâtre : RM⁻.

II.4.4.2.3 Métabolisme protéique :

- Recherche des décarboxylases:

- **Principe:**

Les décarboxylases ou carboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO₂ suivant la réaction :



Les décarboxylases sont:

*La lysine décarboxylase (LDC): LysineCadavérine + CO

*L'ornithine décarboxylase ou ODC: OrnithinePutricine + CO

*L'argeninedihydrolase ou ADH : ArgénineAgmatine + CO.

- **Technique:**

Le test est réalisé avec le milieu Moeller réparti dans 4 tubes à hémolyse différents:
1- le premier tube constitue le témoin. Il contient essentiellement du glucose en petite quantité et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH.

2- Tubes contiennent en plus du milieu témoin, un des trois acides aminés suivants : Arginine, Lysine ou Ornithine.

3- après ensemencement, 1ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube et le tout sera incubé à 30°C pendant 24 à 48h.

- **La lecture:**

- la réaction est positive lorsque le témoin vire au violet (acidification du milieu due à l'utilisation du glucose). Les tubes contenant l'acide aminé restent violet (phénomène due à l'alcalinisation).

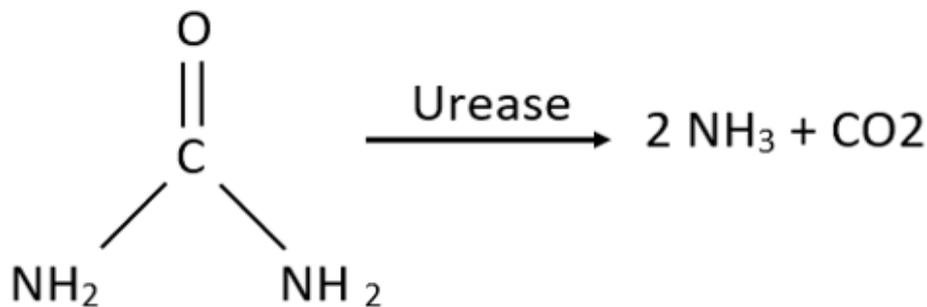
- la réaction est négative lorsque les tubes contenant l'acide aminé et le témoin virent au jaune (acidification).

- **Recherche de l'uréase, le tryptophane désaminase (TDA) et de la production d'indole :**

- **Recherche de l'uréase :**

- **Principe:**

Toutes les bactéries hydrolysent l'urée



Le carbonate d'ammonium alcalinise le milieu.

- **Technique:**

La recherche de l'uréase se fait selon le procédé :

Dans les tubes d'urée –Indole, et à l'aide d'une anse stérile, on ensemence des colonies de la souche test âgée de 24h, on incube à 30°C pendant 24 heures.

- **Lecture:**

- L'uréase est positive s'il y a virage de couleur du jaune vers le rouge violacé ou vers le rose rouge.

- L'uréase est dite négative s'il n'y a pas de changement de couleur.

-Recherche du tryptophane (TDA) :

• **Principe:**

La désaminase agit sur le L- tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (Marchal et Bourdon, 1982).

• **Technique :**

Ensemencer le milieu urée-indole (0.5ml) d'une suspension bactérienne dense.

Incuber à 30°C pendant 24 heures.

• **Lecture:**

Après l'ajout de quelques gouttes du réactif TDA, si :

- Apparition d'une coloration brun foncé: TDA positive.

- Apparition d'une coloration brun clair (du réactif): TDA négative.

-Production d'indole:

• **Principe:**

Ce test s'effectue en utilisant un milieu riche en tryptophane exempt d'indole (ou milieu urée-indole). L'indole produit par la bactérie est mis en évidence par le réactif de Kovacs (Marchal et Bourdon, 1982).

• **Technique:**

Après 24 heures d'incubation, ajouter quelques gouttes du réactif de Kovacs au milieu urée indole inoculé par la souche à étudier.

• **Lecture:**

Après agitation:

- Anneau rouge vermillon en surface : indole positif.

- Anneau brunâtre (couleur du réactif): indole négatif.

II.4.4.3. Identification des moisissures

L'identification des souches fongiques isolées de notre échantillon du sol est déterminée empiriquement, en se basant sur des schémas dichotomique classiques à partir des caractères macroscopiques ou culturaux, et des caractères microscopiques, selon les clés de détermination du genre décrites par la littérature (**Botton et al., 1990 et Chabasse et al., 2002**).

- Aspects macroscopiques

En examinant des boîtes de Pétri à l'œil nu. On observe attentivement, dans un endroit bien éclairé, l'aspect du champignon, en vérifiant que toutes les colonies soient identiques, il faut noter :

- **La consistance de la colonie** : duveteuse, laineuse, cotonneuse, floconneuse, poudreuse,...etc.
- **La couleur** : du recto et du verso de la boîte de Pétri ;
- **La taille** : en mesurant le diamètre de la colonie ;
- **La pigmentation** : présence ou absence d'un pigment diffusible dans le milieu ;
- **La forme du contour** : régulier, irrégulier, lobé, dentelé, filamenteux,etc.
- **La surface** : plane, plissée, cérébriforme ;
- **L'exsudat** : présence ou absence de gouttelettes ;

-Aspects microscopiques

L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques, on note : Les organes de fructification, types de spores, aspect du thalle, taille, couleur et disposition des spores.

Dans des conditions d'hygiène et d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais est réalisée comme suit :

- Déposer une goutte de bleu de méthylène sur une lame stérile ;
- Appliquer du ruban adhésif (scotch) par sa face collante sur le mycélium, puis on prélève doucement et on le dépose sur la lame précédente, pour faire une observation directe au microscope au $G \times 10$ et voir plus de précision.

II.4.5. Conservation

Après isolement, purification et identification, chaque souche est affectée d'un code de référence puis conservée pour des utilisations ultérieures, la conservation se fait comme suit:

II.4.5.1. Conservation des bactéries

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive (GN) inclinée. Les souches sontensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les 3 à 6 mois.

II.4.5.2. Conservation des moisissures

La conservation des moisissures, un disque mycélien de chaque isolat est déposé dans des tubes à essai sur un milieu PDA incliné. Les cultures sont incubées à 25 °C pendant 5 à 8 jours puis conservées à 4 °C. Ils sont régulièrement repiqués (chaque trois mois).

II.4.6. Mise en évidence de la croissance des souches en présence du Chlorpyrifos a différentes concentrations en milieu solide :

II.4.6.1. Cas des bactéries :

Le Chlorpyrifos sous forme liquide est ajouté aux milieux GN et MSM Agar à des concentrations de 0,1% , 0,5% , 1% et ceux après filtration à l'aide d'un filtre seringue (de porosité de 0,22 µm). Les boîtes ainsi préparées sontensemencées par des stries, puis incubées à 37 °C pendant 3 jours. La croissance des bactéries est estimée nulle (-), faible (+), modérée (++) ou abondante (+++). (Reddi et Deepika ,2018)

II.4.6.2. Cas des moisissures :

Les moisissures isolées à l'étape précédente ont ensuite été testés sur un insecticide commercial contenant le principe actif chlorpyrifos. Des tests qualitatifs ont été réalisés sur des milieux solides

1. Milieux MSM contenant le pesticide comme seule source de carbone et d'énergie à trois concentrations différentes : 0,1%, 0,5% et 1%.
 2. Milieux MSM contenant le pesticide a une concentration à 1% additionné d'une source de carbone (glucose) à 1%.
 3. Milieux MSM contenant le pesticide à une concentration 1% est additionné d'une source de d'azote (extrait de levure) à 1%.
 4. Milieux MSM contenant des pesticides à une concentration 1% additionné d'une source de carbone (glucose) 1% et source de d'azote (extrait de levure) à 1%.
- Les isolats fongiques sontensemencés sur les différents milieux de culture dans des boîtes de Pétri en plaçant un disque de 6 mm de diamètre prélevé par l'extrémité inférieure d'une pipette Pasteur stérile à partir d'une culture jeune âgée de 7 jours, puis les cultures sont incubées à 27 °C pendant 15 j.

▪ Lecture des résultats

La tolérance des isolats fongiques vis-à-vis des différentes concentrations du chlorpyrifos et l'effet de l'addition de la source de carbone et de la source s'azote est évaluée

par la détermination de la croissance mycélienne linéaire à l'aide d'une règle graduée tout en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires des colonies. La différence entre la valeur de ce diamètre et celui du disque mycélien initial (explant), donne la croissance des isolats, selon la formule suivante (Leach, 1962):

$$L = \frac{D - d}{2}$$

L: croissance mycélienne;

D: diamètre de la colonie;

d: diamètre du disque mycélien.

II.5. Bioremédiation d'un sol contaminé par le Chlorpyrifos :

II.5.1. Préparation de la suspension sporale :

Les spores des champignons sont obtenues en inondant une culture de 14 jours sur milieu PDA (incubée à 28°C) avec 10 ml d'eau distillée stérile, les conidies sont délogées en grattant la surface du milieu avec le bout d'une pipette Pasteur stérile. Le liquide résultant est filtré à travers 4 couches de mousseline autoclavée (toile de coton) pour éliminer les débris du mycélium et du milieu. Le filtrat obtenu contenant les spores est lavé 2 fois avec de l'eau distillée stérile et la suspension sporale est centrifugée à 1000 g pendant 5 minutes. La concentration des conidies est estimée à l'aide d'une cellule de Malassez et ajustée à la concentration voulue (10⁷ spores/ml)

$$N = n \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{d}$$

N : nombre moyen de colonies en UFC/ml ;

n : nombre de colonies dénombrées ;

v : volume prélevé 0,1 ml ;

d : facteur de dilution dilution.

II.5.2. Préparation de l'inoculum bactérien :

Des boîtes de Pétri contenant le milieu nutritif gélosé sontensemencées en stries et incubées pendant 24 h à 37°C. Avec une pipette Pasteur stérile prélever plusieurs colonies et les mettre en suspension dans 10ml d'eau distillée ou l'eau physiologique stérile.

Les suspensions sont homogénéisées par agitation à l'aide d'un vortex

II.5.3. Études de la dégradation du Chlorpyrifos en microcosme :

Pour les études sur le microcosme du sol, on a utilisé le même sol agricole d'un champs (pivots) dans la région de **Soualeh**, commune de **Bayadah**, wilaya de El eoud qui n'avait auparavant fait l'objet d'aucune application de pesticides. Le sol collecté a été tamisé par des mailles de 2 mm pour éliminer les débris. Ensuite, 100 g d'échantillons de sol ont été placés dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml.

Plus tard, les échantillons de sol ont été dopés avec 100 mg kg⁻¹ d'insecticide et inoculés avec des culots cellulaires contenant 10⁶ cellules gm⁻¹ des souches bactériennes et 10⁷ des moisissures pour la biodégradation du Chlorpyrifos. Les flacons ont été maintenus pour incubation à 27°C pour les moisissures et 37°C pour les bactéries. De même, les flacons témoins ont été conservés sans ajout de culture cellulaire. Les flacons ont été conservés pour incubation pendant 10 jours. Les flacons ont été humidifiés régulièrement en ajoutant 10 ml d'eau stérile.

II.5.4. Extraction de Chlorpyrifos par la méthode QuEChERS

II.5.4.1. Définition et principe de la méthode

Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) qui signifie Rapide, Facile, Bon marché, Efficace, Robuste et Sûr est une technique d'extraction et de nettoyage développée à l'origine en 2003 par **Anastassiades et al.**, et ensuite validé par **Lehotay et al. (2005)** et **Anastassiades et al. (2007)** pour la valorisation de plus de 200 résidus de pesticides à partir de fruits et légumes.

II.5.4.2.Méthode d'extraction

- Un échantillon de sol représentatif de 5 g a été prélevé dans un tube à centrifuger de 50 ml et 10 ml d'eau distillée 15 ml de l'acétonitrile a été ajouté à l'échantillon de sol.
- Ce mélange a été secoué vigoureusement pendant une minute avec un vortex
- 6 g de sulfate de magnésium et 1,5 g de chlorure de sodium ont été ajoutés aux échantillons.

- Pour améliorer la récupération des valeurs, un milieu tamponné au citrate (1 g de citrate trisodique et 0,5 g d'hydrogène citrate disodique sesquihydraté) a été ajouté ;
- Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 minutes ;
- 10 ml du surnageant ont été ajoutés dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 2 g de sulfate de magnésium et 250 mg de PSA ;
- Tous les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 4400 rpm ;
- Du tube à centrifuger ci-dessus, 4 ml d'aliquote ont été prélevés et filtré à l'aide d'un filtre seringue de porosité 0,22 ;
- Dosage par CG/SM .

II.5.5. Techniques utilisées chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse

II.5.5.1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) est l'une des techniques analytiques dites à trait d'union. Il s'agit en fait de deux techniques qui sont combinées pour former une seule méthode d'analyse des mélanges de produits chimiques organiques. La chromatographie en phase gazeuse sépare les composants d'un mélange et la spectrométrie de masse caractérise chacun des composants individuellement. (**Medeiros, 2018**).

La combinaison des deux techniques permet des évaluations qualitatives et quantitatives d'un échantillon contenant un certain nombre de composés organiques. (**Sparkman et al. 2011**).

II.5.5.2. Principe de fonctionnement

Selon **Wu et al., (2012)** le principe de fonctionnement de la CG/MS peut se résumer comme suit : (**figure 16**)

-Séparation

La GC peut séparer les composants volatils des mélanges par migration différentielle à travers une colonne contenant une phase stationnaire liquide ou solide. Les solutés sont transportés à travers la colonne par une phase mobile gazeuse et sont détectés lors de leur élution. Les solutés sont généralement élués par ordre croissant de point d'ébullition, sauf lorsqu'il existe des interactions spécifiques avec la phase stationnaire. Une température élevée, généralement dans la plage de 50 à 350°C, est normalement employée pour s'assurer que les solutés ont une volatilité adéquate et sont donc élués raisonnablement rapidement.

-Identification

Un spectromètre de masse est utilisé pour compter les ions individuellement, étant ainsi un système de détection très sensible. Cette technique est basée sur le principe que la trajectoire des ions ou des molécules chargés électriquement, se déplaçant dans un champ électrique et/ou un champ magnétique imposé, est relative à leurs masses atomiques ou plus exactement, au quotient de la masse sur la charge (m/z). Cela peut être utilisé pour séparer des particules chargées mais de masses différentes. Mais pour cela, un vide poussé est nécessaire pour éviter que les ions soient absorbés ou déviés par leur passage à travers l'air.

Un spectromètre de masse est constitué d'une source de particules chargées, d'un champ magnétique et/ou d'un système de déflexion électrostatique pour la séparation des ions et d'un collecteur d'ions afin de compter les ions.

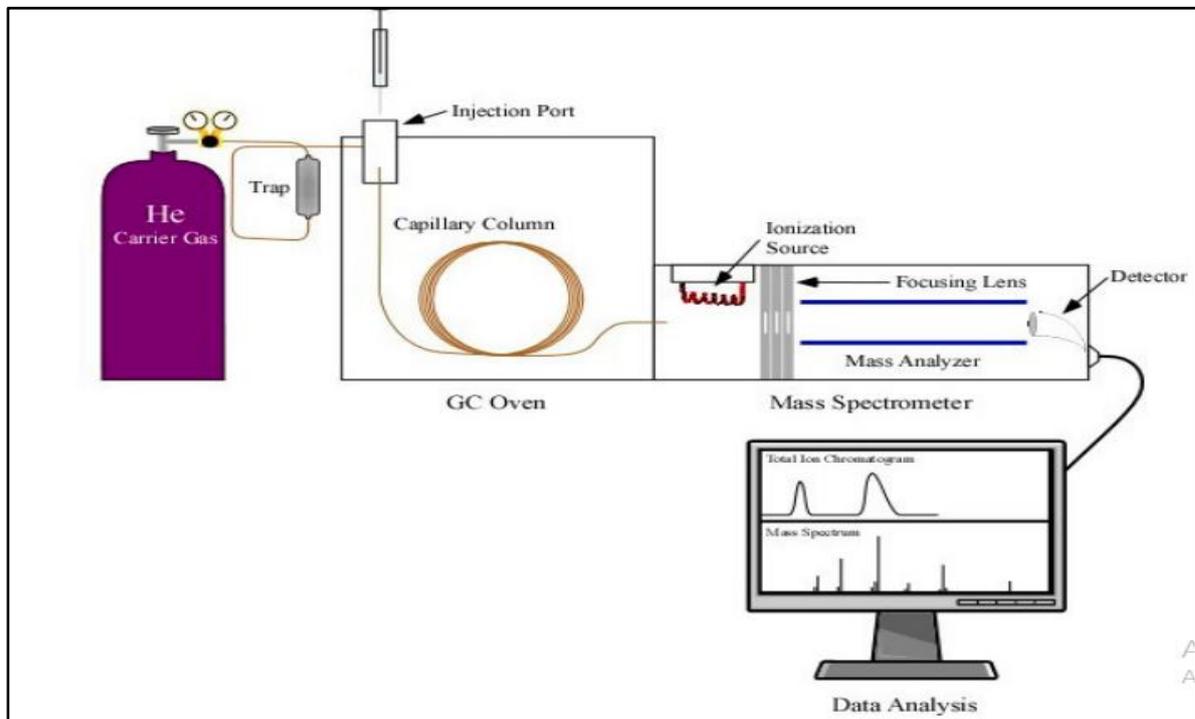


Figure 16 : Représentation schématique du mode de fonctionnement de d'une CG/SM (Wu et al., 2012) .

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats des analyses physico-chimiques

Les résultats de l'analyse physicochimique et granulométrique réalisés sur notre échantillon du sol agricole en provenance de la région de Soualeh de la wilaya d'El oued sont réunies sur le tableau

Tableau II: Paramètres physico-chimiques et granulométrique d'un sol agricole en provenance de la région de Soualeh de la wilaya d'El oued

Paramètres	Echantillon de sol
T	25,08° C
H	4%
pH	7,37
MO	10%
CE	1256,5 μ s/cm
DCO	547,2 mg/l
DBO ₅	260,24 mg/l
DCO/DBO ₅	2,10
Nitrate	Inférieur à 25 mg/l
Nitrite	0 mg/l
Chlorures	0 mg/l
Granulométrie	Majoritairement > 100 μ m

t: température en °C ; H : humidité en % ;MO : matière organique en % du poids de l'échantillon ;DBO₅ : demande biochimique en oxygène en 5 jours en mg/l ;DCO : demande chimique en oxygène en mg/l ;CE : conductivité électrique en μ s/cm ;NO₃⁻ : Nitrate ;NO₂⁻ : Nitrite ;Cl : Chlorures.

L'analyse du tableau relatif aux résultats trouvés pour les analyses physicochimiques de notre échantillon du sol, nous laisse faire les constatations suivantes :

-Le taux d'humidité enregistré pour notre échantillon du sol est très faible 4% l'échantillon de sol étudié est caractérisé par un faible taux d'humidité variant de 04%. Cette faible teneur en eau peut être expliquée par les faibles humidités relatives des sols sahariens tributaire au climat sec caractéristique de la région. **Dio et Nautiyal (1979)**

Le pH de notre échantillon est proche de la neutralité 7.37, ce dernier se situe dans l'optimum de la croissance des microorganismes chimiohétérotrophes organotrophes surtout les bactéries qui prolifèrent électivement dans un pH neutre (**Dibble et Bartha, 1979**)

La conductivité électrique du sol est une mesure de la teneur en sel soluble dans le sol elle est utilisée comme indicateur global du niveau de macro et de micronutriments dans le sol.

Notre échantillon du sol présente une conductivité électrique d'environ 1034 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (légèrement salé) à 20 cm de profondeur et de 1470 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (salé) à 50 cm. Le taux de salinité à une grande influence sur l'évolution de la microflore du sol, de nombreuses études ont montré que la salinité réduit l'activité microbienne, la biomasse microbienne et modifie la structure de la communauté microbienne (**Andronov et al. (2012), Rousk, Elyaagubi, Jones, & Godbold (2011)**). Selon **Sublette (2001)**, des concentrations élevées de sel peuvent être inhibantes ou létales pour de nombreuses classes de microorganismes, car elle peut perturber l'équilibre osmotique de ces derniers dans le sol et interférer avec leur activité enzymatique. En conséquence, les sols à haute conductivité électrique (EC) pourraient retarder les taux de biodégradation. Néanmoins, certaines bactéries halophiles et halotolérants peuvent y proliférer.

La teneur en carbone organique total du sol est de 10 % ce qui peut être expliqué par la présence d'engrais organiques (environ 25 tonnes/ha de fumier de volailles sont apportés par les agriculteurs durant la campagne agricole dans l'année 2013 (**DSA, El Oued, 2014**)).

La demande biochimique en oxygène (**DBO**) est la quantité d'oxygène dissoute utilisée dans des conditions spécifiques (20° C, 5 jours) par l'oxydation biologique de matière organique ou inorganique présente dans l'échantillon qui s'évalue à 260,24 mg/l. Alors que la demande chimique en oxygène (**DCO**) qui est la quantité d'oxygène utilisée dans des conditions spécifiques par l'oxydation chimique, par le bichromate de matière organique ou inorganique présente dans l'échantillon est beaucoup plus élevée et s'évalue à 547,2 mg/l. Le rapport

DCO/DBO nous renseigne sur la biodégradabilité de la matrice. Pour ce qui de notre échantillon du sol, le rapport DCO/DBO indique un résultat de 2.10 permettant de classer notre matrice comme moyennement biodégradable en comparaison avec l'échelle de biodégradabilité de Trac,(2007) qui préconise le classement suivant :

- * $DCO/DBO < 2$: effluent facilement biodégradable ;
- * $2 < DCO/DBO < 4$: effluent moyennement biodégradable ;
- * $DCO/DBO > 4$: effluent difficilement biodégradable.

Les nitrates sont indispensables aux écosystèmes, en étant un nutriment de première importance pour la croissance des végétaux et autres organismes autotrophes, car l'azote (N) est assimilé par ces organismes principalement par sa forme d'ion nitrate, loin devant l'ion ammonium dans la nature. Cet azote minéral leur permet de construire une partie de la matière organique constitutive des tissus vivants (acides aminés des protéines, bases azotées des nucléotides, chlorophylle, etc.). Dans notre échantillon, on a enregistré une fraction de nitrates inférieure à 25 mg/cette faible quantité de nitrates est due au faible apport d'engrais azotés utilisés par les agriculteurs. D'une autre part elle indique le caractère non pollué de notre sol, car il s'avère que la présence de nitrates en trop grande quantité dans l'eau et le sol est considérée comme une pollution. Celle-ci peut être d'origine agricole (engrais), urbaine (insuffisance des réseaux d'assainissement) ou industrielle. Les nutriments en excès, en premier lieu les nitrates et les phosphates, sont notamment la cause d'importants déséquilibres écologiques appelés eutrophisation (**Brussel et al.,2002**). Par ailleurs, nos résultats indiquent l'absence des chlorures dans notre échantillon du sol. Les chlorures, forme inorganique, ont longtemps été considérés comme inertes dans les sols et faiblement réactifs vis à vis des phases minérales des sols. Cependant, de récentes études démontrent que des quantités non négligeables de chlore sont retenues dans les sols, sous une forme organique (**Johanssen et al. 2003**). La dynamique du chlore dans les écosystèmes terrestres et sa rétention dans les sols paraissent en fait régulées par la formation et la dégradation de molécules organochlorées via des processus naturels essentiellement issus de l'activité microbienne du sol (**Bastviken et al. 2009**).

La granulométrie a pour but d'étudier la taille des particules du sol mais aussi leur répartition. Les résultats granulométriques détaillés obtenus par tamisage de notre échantillon sont indiqués dans le tableau en ci-dessous.

Tableau III: Dimensions de particules du sol de la région de Soualeh dans la wilaya d'Eloued obtenues par tamisage.

Dimensions des particules Supérieure à	Poids /g	pourcentage % /1000g (1kg)
>900 µm	11,56 g	1,157 %
>500 µm	11,15 g	1,116 %
>350 µm	30,567 g	3,059 %
> 200 µm	288,14 g	28,84 %
> 100 µm	577,14 g	57,771 %
> 50 µm	80,179 g	8,025 %

Le **Tableau III** illustre la variation du rendement pondéral en fonction des classes granulométriques obtenues par tamisage de l'échantillon de sol.

La classe granulométrique de l'échantillon-là plus pondérale est inférieure à 100 µm. Elle représente 57.77% en poids de l'échantillon globale. Toutefois, les proportions pondérales des tranches granulométriques (200-350 µm) et (50-100 µm) non utilisées ne sont pas négligeables. Elles représentent respectivement 28,84 % et 8,025 % en poids du tout-venant de l'échantillon.

A la lumière de ces résultats, on peut dire que notre échantillon de sols est majoritairement composé de la fraction de taille inférieure à 200 µm. Donc, leurs textures d'après les données de la littérature indiquées précédemment correspondent à une texture sableuse fine.

III.2. Résultats des analyses microbiologiques

III.2.1. Identification des bactéries

L'ensemencement sur le milieu gélose nutritif nous a donné une culture mixte de colonies morphologiquement distinctes désignées par ordre croissant en souches **S1, S2, S3, S4**. Chaque colonie fait l'objet d'une purification et une identification basée sur des critères macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

III.2.1.1. Etude morphologique :

III.2.1.1.1 Examen macroscopique des colonies :

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, la couleur, l'opacité, le contour, le relief, ainsi que la surface des colonies.

Les critères morphologiques des 04 souches bactériennes isolées sur milieux gélose nutritive (GN) sont représentées dans le **tableau IV** et **figure 17**.

TableauIV: Résultats de l'examen macroscopique des souches bactériennes isolées

Bactéries	Forme	Contour	Relief	Taille	Surface	Couleur	Opacité
Souche 01	Ronde	Régulier	Irrégulier	> 2mm	Lisse	Beige	Opaque
Souche 02	Ronde	Régulier	Régulier	< 2mm	Lisse	Jaune	Opaque
Souche 03	Ronde	Irrégulier	Irrégulier	> 2mm	+ ou rugueuse	Beige	Opaque
Souche 04	Ronde	Irrégulier	Irrégulier	> 2mm	+ ou rugueuse	Beige	Opaque

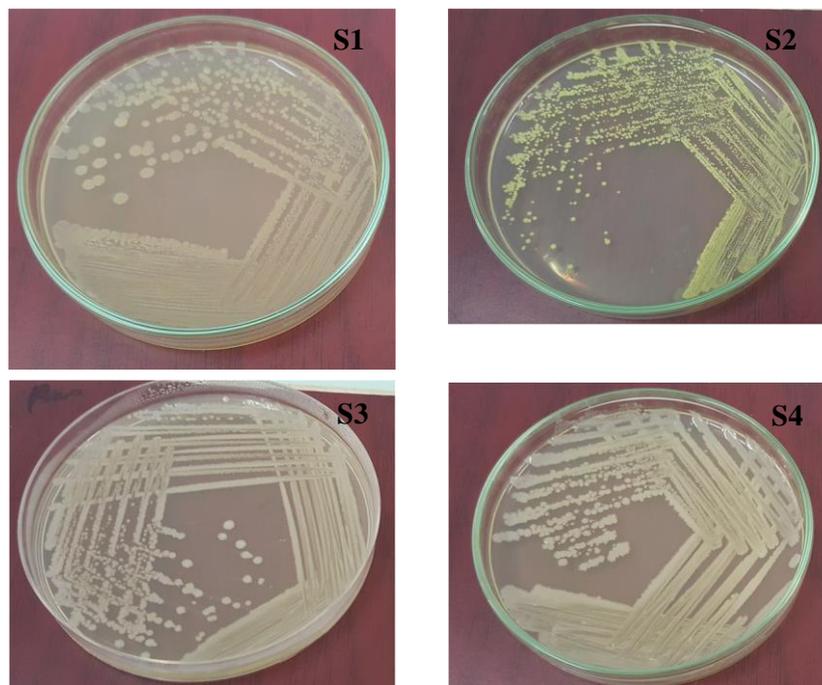


figure 17 : Les critères morphologiques des 04 souches bactériennes isolées sur milieux (GN)

III.2.1.1.2 Examen microscopique des colonies

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram, Cette technique nous a révélé des bactéries Gram négatifs et des bactéries Gram positif apparaissent sous différentes formes avec différents modes d'associations. Cette observation a montré que les souches **S3** et **S4** étudiées sont des gros bacilles sporulés, tandis que **S1** apparaît comme des bâtonnets et **S2** de forme coccoïde.

le **tableau V** et **figure 18** résume l'aspect microscopique des 04 souches isolées.

Tableau V : Résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes isolées

Bactéries	Forme	Gram	Regroupement	Mobilité	Endospore
Souche 01	Bâtonnet	-		Mobile	Absence
Souche 02	Cocci	+	Chaînette	Immobile	Absence
Souche 03	Gros bacilles	+		Mobile	Présence
Souche 04	Gros bacilles	+		Mobile	Présence

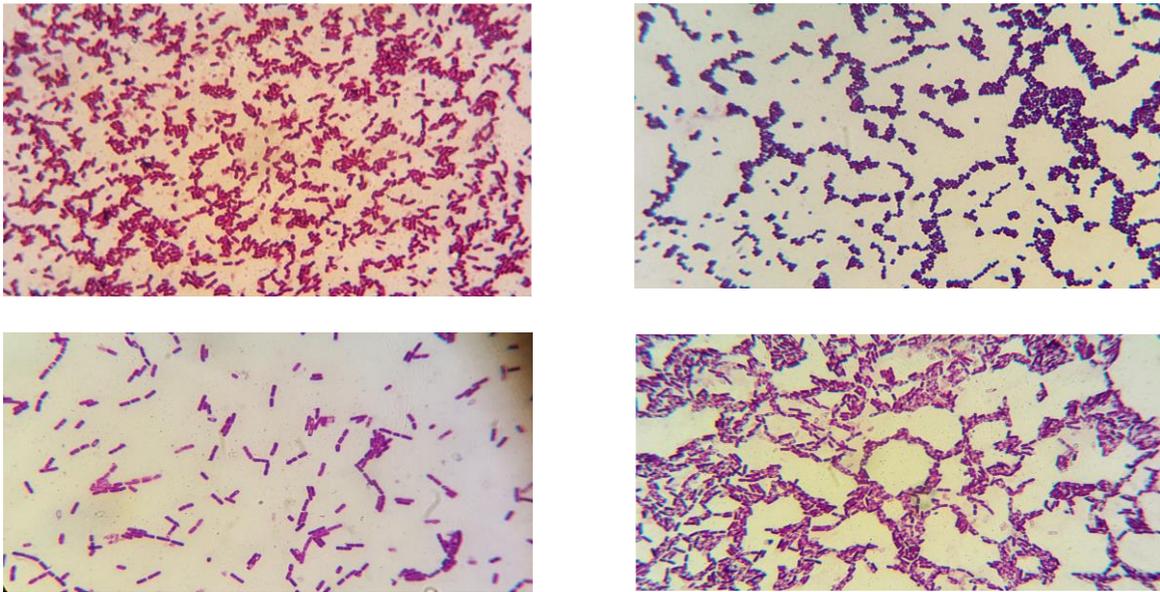


figure 18 : résume l'aspect microscopique des 04 souches isolées.

III.2.1.1. 3. Test biochimiques

Les tests biochimiques définissant une galerie classique ont été réalisés (utilisation des sucres sur milieu TSI, utilisation des citrates, la dégradation des différents acides aminés, la mise en évidence des enzymes respiratoires et autres, et la détermination du type respiratoire) et ont apporté les résultats mentionnés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Résultats de l'examen microscopique des souches bactériennes isolées

Souche		S1	S2	S3	S4
Test					
Métabolisme	Type respiratoire	AAF	AS	AS	AS

énergétique	Catalase		+	+	+	+
	oxydase		-	+	+	+
	Nitrate réductase		+	-	+	-
Métabolisme glucidique	Milieu TSI	Lactose/ saccharose	+	-	+	+
		Glucose	+	-	+	+
		H₂S	-	-	-	-
		Gaz	-	-	-	-
	β. Galactosidase (ONPG)		+	-	+	+
	Citrate perméase		+	+	+	+
	Milieu mannitol/ mobile	Mannitol	+	-	+	+
		Gaz	-	-	-	-
		Mobilité	+	-	+	-
Test RM/VP		- / +	- / +	- / +	- / -	
Métabolisme protéique	Milieu moeller	LDC	-	+	-	-
		ODC	+	+	-	-
		ADH	+	-	+	-
	Milieu Urée / indole	UREASE	-	-	-	-
		TDA	-	-	-	-
		Indole	-	-	-	-

(+) : réaction positive ; (-) : réaction négative; **AS** : aérobie stricte ; **AAF** : aéro-anaérobie facultatif.

Les différents résultats des tests biochimiques **Tableau VI** ont montré que toutes les souches analysées sont aérobies strictes ,oxydase et catalase positives à l'exception de la souche **S1** aéro-anaérobies facultatives.

On remarque que la plupart des souches peuvent assimiler le citrate comme seule source du carbone et d'énergie, et certaines d'autres sont capables de fermenter le glucose, le lactose et/ou saccharose sans production de gaz.

On a observé l'absence de l'uréase ainsi que l'enzyme responsable de l'hydrolyse de Tryptophane en indole chez toutes les souches.

L'identification probable des souches

- La souche (1) peut être rattachée au genre *Enterobacter sp*, caractérisé par une paroi gram négative et mobile.
- La souche (2) peut être rattachée au genre *Micrococcus sp*, aussi pour ces caractères cocci Gram + en chaînette, immobile, catalase positive.
- Les souches (3) et (4) ont été rattachées au genre *Bacillus sp*. pour leurs morphologies microscopiques (présence de la spore).

III.2.2. Identification des souches fongiques isolée :

III.2.2.1. Aspect macroscopique et microscopiques des souches fongiques isolées

Les caractères macroscopiques des différents isolats sélectionnés ont été étudiés sur milieu PDA, tels que la surface et la consistance des colonies, la couleur du revers des boîtes ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche (**Botton et al., 1990**).

La **figure 19**. montre les différents caractères des souches **M01**, **M02** et **M04** isolées à partir du sol agricole de Oued souf

Ensemencée dans le milieu PDA, la souche fongique **M01** présente une couleur grise au centre avec contour blanc, une texture cotonneuse, production d'exudat jaune avec absence de pigmentation du milieu. Au revers de la boîte, la souche fongique a un centre jaune avec un contour vert foncé. La croissance est légèrement lente de 4 jours à 6 jours.

Du point de vue microscopique, on observe des hyphes séptés qui portent des conidiophores cylindriques et cloisonnés, les filides sont disposés en pinceau insérés par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores, donc on peut dire que c'est un champignon biverticillé. Les conidies sont petites, rondes et lisses.

La culture sur boîte PDA de la souche fongique **M02** présente un centre vert gris avec relief vert foncé, une texture poudreuse, présence d'exudat jaune sur la surface de la colonie et une production de pigmentation jaune qui se diffuse dans la gélose. Au revers de la boîte, la souche fongique a un centre jaune avec un contour vert foncé. La croissance est légèrement lente de 7 jours à 15 jours.

Sur le plan microscopique, on observe des hyphes séptés qui portent des conidiophores cylindriques et cloisonnés, les filides sont disposés en pinceau insérés par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores, donc on peut dire que c'est un champignon biverticillé. Les conidies sont ovoïdes et lisses.

La souche **M04** présente un aspect cotonneux de couleur blanchâtre avec absence de production d'exudat et de pigments, ainsi une couleur grise au centre de la colonie avec un contour beige au revers de la boîte. Elle est caractérisée par une croissance lente de 5 jours à 9 jours.

Microscopiquement, elle présente des hyphes cloisonnés avec production de conidies terminales ou latérales.

Les observations macro et microscopies des souches **M01**, **M02** et **M04** nous orientent directement aux caractéristiques du genre *Alternaria*.

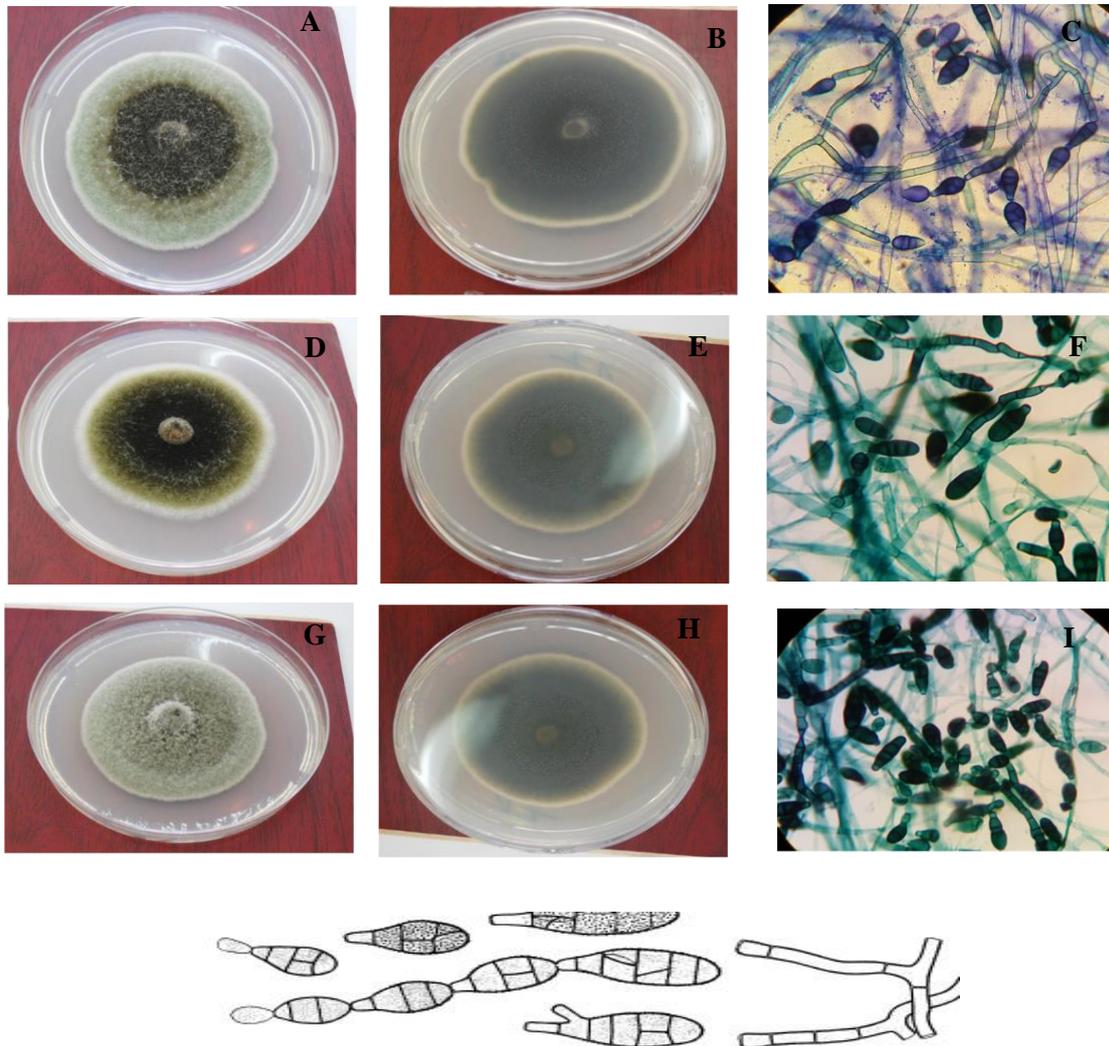


Figure 19 : Aspect macroscopique et microscopique de la souche **M01**, **M02** et **M04**
(**A**) Culture sur milieu PDAM**01**, (**B**) Revers de la boîte **M01**, (**C**) Grossissement (X100) **M01**,
(**D**) Culture sur milieu PDAM**02**, (**E**) Revers de la boîte **M02**, (**F**) Grossissement (X100) **M02**,
(**G**) Culture sur milieu PDAM**04**, (**H**) Revers de la boîte **M04**, (**I**) Grossissement (X100) **M04**,
(**J**) Schéma de référence du genre *Alternaria* (**Botton et al.**, 1991).

La figure montre les caractéristiques macroscopiques et microscopiques de deux souches fongiques **M03** et **M05** isolées à partir du sol agricole de el Oued

Sur le milieu PDA, la colonie fongique **M03** apparaît de couleur grise au centre avec un contour blanc, de texture laineuse avec absence de pigmentation du milieu. Au revers de la boîte,

la souche présente des strates sous forme d'anneaux de couleur jaunâtre. La croissance est rapide de 72h à 96h.

Sur le plan macroscopique, **M03** présente un conidiophore long et lisse, une vésicule hémisphérique, les phialides sont portées par des métules insérées directement sur la vésicule, une tête aspergillaire bisériée et des conidies globuleuses et lisses.

Les caractères culturels de la colonie fongique **M05** Colonies poussant modérément sur PDA 3,5-4,5 cm en 10 jours, avec un mycélium submergé abondant, des têtes de conidies noir de carbone ou parfois noir brunâtre foncé ; revers incolore à jaune pâle; exsudat limité ou absent avec de minuscules gouttelettes.

Les observations sur le plan macroscopique montrent que la souche **M05**; têtes de conidies grosses et noires, d'abord globuleuses puis rayonnantes ou se fendant en colonnes bien définies avec l'âge, conidiophores provenant directement du substratum, lisses, non septées, à parois épaisses, vésicules globuleuses, à parois épaisses, parfois plus longues, portant deux séries de phialides emballées, brunâtres; rarement cloisonnées, conidies globuleuses, spinuleuses avec substance colorante, noires, sclérotées globuleux à subglobuleux produits chez certaines souches d'abord crème à chamois, puis chamois vineux à l'âge

D'après l'analyse des résultats microscopiques et macroscopiques, on peut dire que les souches **M03** et **M05** appartiennent au genre *Aspergillus*, ce dernier est caractérisé par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés.

Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non-cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes uni-séries) nommées mérules ou stigmates (**Figure 20**). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir. L'ensemble vésicule ± métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus* (**Chabasse et al., 2002**)

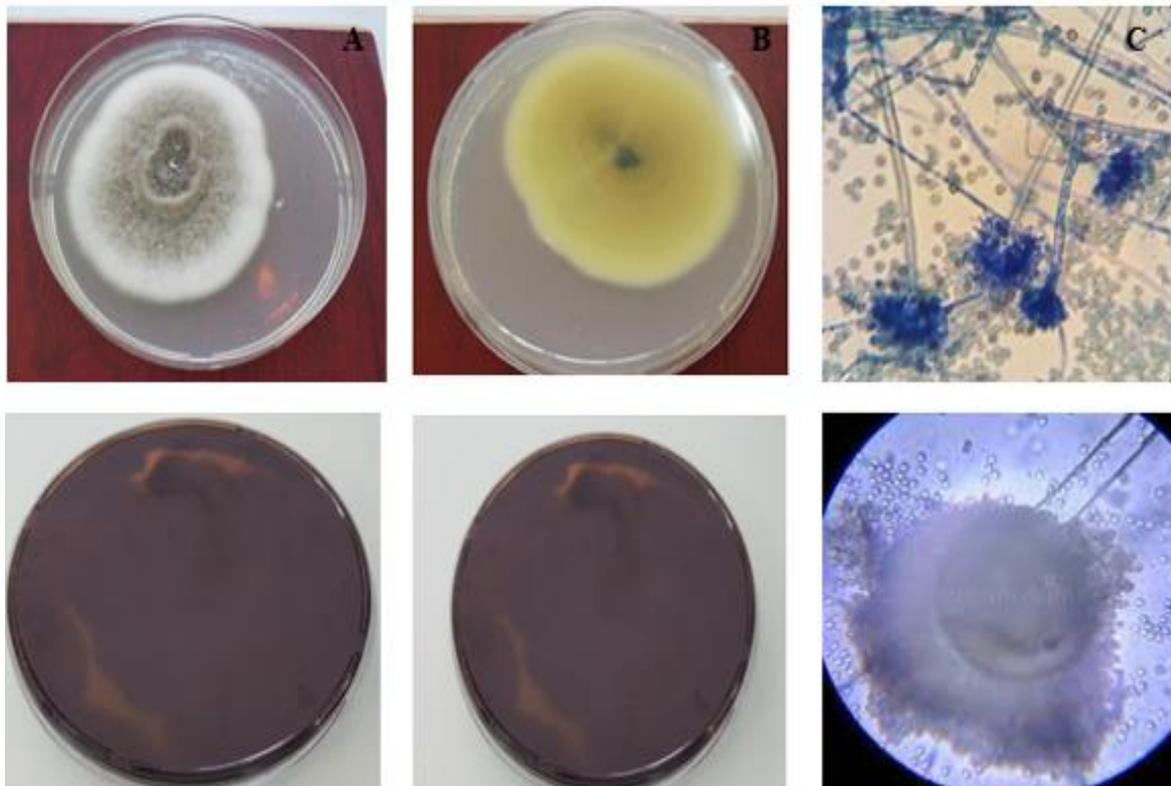


Figure 20: Aspect macroscopique et microscopique de la souche **M03** et **M05**
(**A**) Culture sur milieu PDAM**03**, (**B**) Revers de la boîte **M03**, (**C**) Grossissement (X100)**M03**,
(**D**) Culture sur milieu PDAM**05**, (**E**) Revers de la boîte **M05**, (**F**) Grossissement (X100)**M05**,
(**G**) Schéma de référence du genre *Alternaria* (**Botton et al., 1991**).

III.2.3. Croissance des bactéries en présence de Chlorpyrifos :

Afin de mettre en évidence la tolérance des souches isolées à différentes concentrations (0,1 %, 0,5 %, 1 %) du chlorpyrifos, nous avons réalisé le test de croissance sur deux milieux de culture solide à savoir : la gélose nutritive (**GN**) qui est milieu riche en nutriments et un milieu

minimal MSM ou le Chlorpyrifos est considéré comme la seule source de carbone et d'énergie. Le tableau V et la figure 21 résument les résultats obtenus.

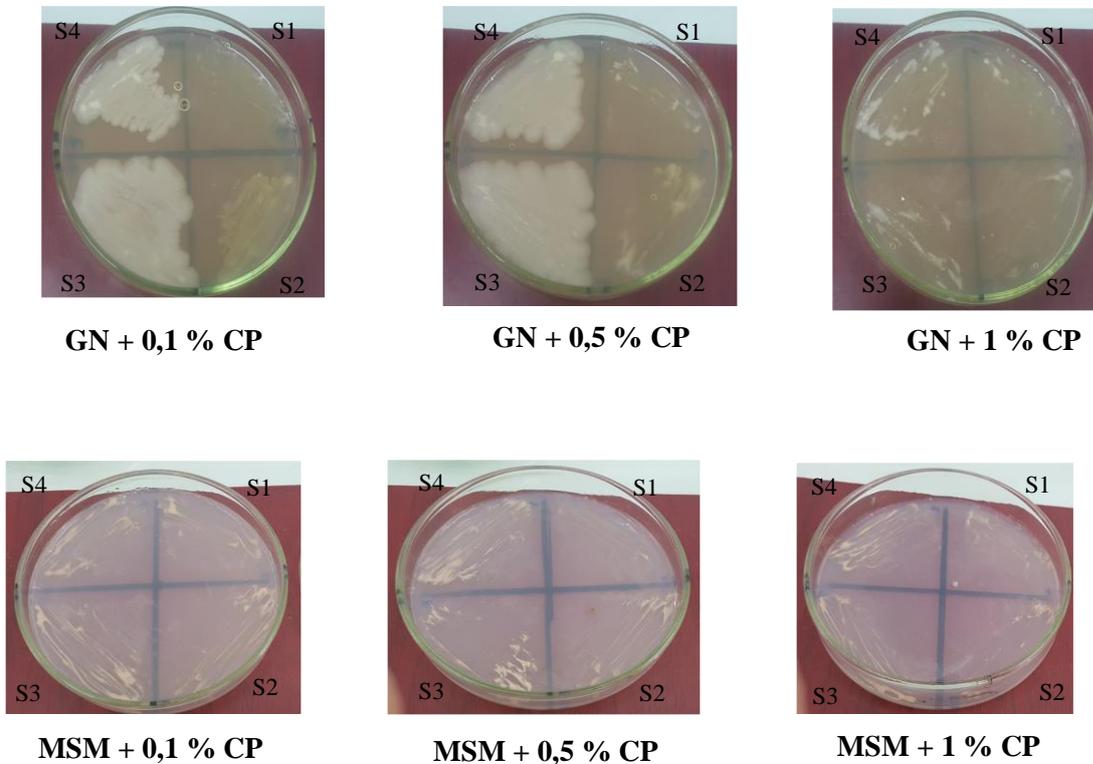


Tableau VII : Résultats de croissance des souches testées en présence du Chlorpyrifos

Bactéries	Souche 01	Souche 02	Souche 03	Souche 04
GN + 0,1 % CP	-	+	+++	+++
GN + 0,5 % CP	+	+	+++	+++
GN + 01 % CP	+	+	+	+
MSM + 0,1 % CP	+	+	+	+
MSM + 0,5 % CP	-	+	+	+
MSM + 01 % CP	-	-	+	+

Figure 21: Test de croissance des souches bactériennes en présence du Chlorpyrifos

Après trois jours d'incubation sur le milieu GN, les deux souches (S3, S4) appartenant au genre *Bacillus* ont montré une croissance plus importante que les autres, sous forme d'un tapis bactérien bien dense et ceux pour les concentrations 0,1 % et 0,5 %, alors que la croissance régresse significativement par l'augmentation de la concentration du pesticides à 1 %.

Les 2 souches (S1, S2) qui appartiennent successivement au genre *Enterobacter* et *Micrococcus* ont présentées une croissance faible pour les trois concentrations (0,1%, 0,5%, 1%) voire une

croissance nulle de la souche (S1) à la faible concentration (0,1%) du Chlorpyrifos additionné au milieu GN.

Sur le milieu MSM on peut remarquer presque le même effet de la concentration du Chlorpyrifos sur les deux souches (S3, S4) ou on a enregistré une croissance faible, même constat observé pour la souche (S1) à (0,1%) et (S2) aux deux premières concentrations ; tandis que une absence de croissance est enregistrée à 1% pour la souche (S2) et (0,1%, 0,5%) pour la bactérie (S1).

L'analyse des résultats de la croissance des 4 souches isolées du sol agricole de oued souf nous mène à conclure que les souches S3 et S4 qui appartiennent au genre *Bacillus* ont une meilleure capacité à se développer sur le Chlorpyrifos que les souches S1 et S2.

D'après la littérature, plusieurs bactéries isolées de champ agricole qui peuvent tolérer diverses gammes de chlorpyrifos.

En effet, Savita et Raman (2012) ont montré que *Bacillus stearothermophilus*, *B. circulans*, *B. macerans* 50 mg/l, 55 mg/l et 60 mg/l du chlorpyrifos après son addition au milieu gélose nutritive.

Briceño et al., (2012) ont pu sélectionner quatre souches du genre *Strptomyces* pouvant croître sur milieu MSM agar contenant 50 mg/l de chlorpyrifos comme seule source de carbone et d'énergie ; Aswathi et al., (2019) ont identifié trois souches bactériennes *Bacillus tequilensis*, *Bacillus megaterium* et *Pseudomonas nitroreducens* qui ont pu passer sur 100 mg/l.

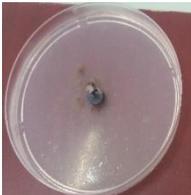
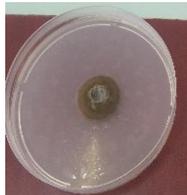
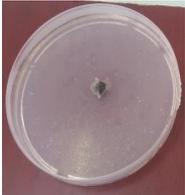
Les travaux de Prabu et al., (2021) ont démontré que *Bacillus cereus* OP3 tolérance une concentrations de chlorpyrifos allant jusqu'à 300 ppm, alors que *Mesorhizobium* sp. pu dégradé efficacement le CP jusqu'à une concentration initiale de 400 mg/L dans une large gamme de températures (30 à 40 °C) et de pH (6,0 à 8,0). Jabeen et al., (2015).

III.2.4. Résultats de la croissance des souches fongiques en présence du Chlorpyrifos

Les résultats relatifs à la croissance fongique en présence du Chlorpyrifos sont reportés sur le tableau VIII en ci-après.

Tableau VIII: Résultats de la croissance des moisissures en présence du Chlorpyrifos

Souches	MSM + CP 0,1%	MSM + CP 1%	MSM + CP 1% + Glucose	MSM + CP 1%	MSM + CP 1%
---------	------------------	-------------	--------------------------	----------------	----------------

				+ Extrait de levure	+ Glucose + Extrait de levure
M01	 08 cm	 0,1	 03 cm	 02 cm	 06 cm
M02	 06 cm	 01 cm	 2,5 cm	 2,5 cm	 2,5 cm
M03	 1,8 cm	 0,0 cm	 0,6 cm	 2,2 cm	 03 cm
M04	 3,5 cm	 0,1 cm	 05 cm	 0,5cm	 4,5cm
M05	 1,5 cm	 0,5 cm	 05 cm	 0.6 cm	 07 cm

Les résultats présentés dans le **tableau VIII** indiquent que les deux souches **M01** et **M02** qui appartiennent au genre *Alternaria* ont pu se développer tout en atteignant un diamètre **08 cm** et **06 cm** de diamètre pour les deux souches respectives la souche **M04**, et ceux après incubation sur un milieu minimum qui contient 0,1 % du Chlorpyrifos comme seule source de carbone et d'énergie avec une diminution de la condensation du mycélium; contrairement aux souches précédentes, **M03** et **M05** alors identifiées comme étant des *Aspergillus* n'ont pas donner une forte croissance mycélienne.

A 1 % du Chlorpyrifos, on a enregistré une très faible croissance pour toutes les moisissures excepté la **M03** qui n'a présenté aucune croissance, ceci peut être expliqué que les souches fongiques isolées ne tolèrent pas une forte concentration du Chlorpyrifos d'où la nécessité d'une acclimatation pour stimuler leur complexe enzymatique pour une meilleure dégradation.

L'amendement du glucose à 1% comme source de carbone dans milieu MSM qui contient 1 % du Chlorpyrifos, on a pu détecter une nette amélioration de la croissance plus précisément chez les souches **M04** et **M05** dont le diamètre a pu atteindre **05 cm**.

L'addition de l'extrait de levure à 1% (source d'azote) dans milieu MSM qui contient 1 % du Chlorpyrifos, n'a pas donner un très grand effet puisque la croissance la plus élevée été enregistré chez **M02** qui est de l'ordre de **2,5 cm** de diamètre.

A l'opposée, l'addition des de sources de carbone et d'azote au milieu à bien stimuler la croissance de la plupart des souches surtout la **M01** avec une croissance de **06 cm**, alors que **M05** a enregistré une croissance radiale atteignant **06 cm** mais avec une réduction considérable dans la condensation de son mycélium.

Chen et al. (2012) ont indiqué que *Cladosporium cladosporioides* Hu01 utilisait 50mg L⁻¹ de chlorpyrifos comme seule source de carbone et tolérait une concentration élevée de chlorpyrifos jusqu'à 500 50mg L⁻¹

Kumar et al. (2021) ont démontré que les deux souches C1 et C3, identifiés respectivement comme *Byssochlamys spectabilis* et *Aspergillus fumigates* étaient capables de tolérer 600 mg L⁻¹ de chlorpyrifos sur le milieu CDM qui contient 3% de saccharose comme source de carbone.

Dans les études de **Fauriah et al. (2021)**, trois isolats fongiques notés comme *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.* et *Fusarium sp.* ont été testés sur le milieu PDA contenant du Chlorpyrifos et tolérant des concentrations comprises entre 300 à 600 ppm.

III.2.5. Résultats de la bioremédiation du sol pollué par le Chlorpyrifos :

Après dix jours d'incubation des sols contaminés et bioaugmentés (37°C pour les souches bactériennes et à 27° C pour les souches fongiques), le pourcentage de la biodégradation a été déterminé par l'exploitation des aires de pics des chromatogrammes (**figures 22**) obtenues après analyses par CG/SM en appliquant la formule suivante **Usmani et al. (2021)** :

$$\% \text{ Biodégradation} = \frac{\text{aire de pic du traitement a T0} - \text{aire de pic de l'échantillon a T}}{\text{aire de pic du traitement a T0}} \times 100$$

Tableau IX : Résultats du pourcentage de biodégradation de chlorpyrifos

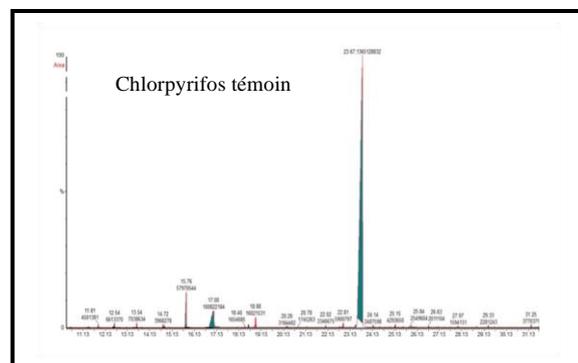
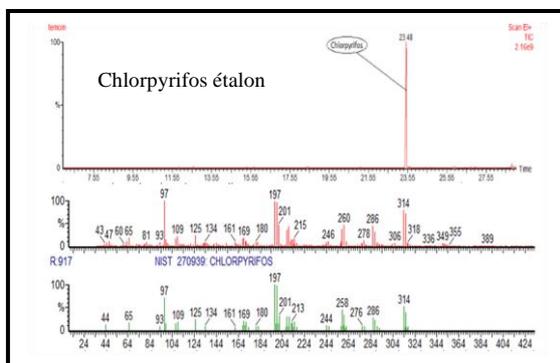
	Aire de pic	% Biodégradation
Témoin T₀	136,5128832	0
Souche S1	42,6453024	68,76
Souche S2	27,8539072	79,59
Souche S3	28,1237952	79,39
Souche S4	63,8722176	53,21
Consortium S1+ S2+ S3+ S4	19,3969568	85,79
Souche M01	57,1695360	58,12

D'après les résultats illustrés dans le **tableau IX** on peut dire que le processus de bioremédiation utilisées est efficace puisqu'on a pu atteindre un taux de biodégradation dépassant les clinquantes pour cent enregistrés dans les différents traitements effectués.

En effet, pour les bactéries inoculées individuellement, les deux souches **S2** et **S3** présentent un taux de biodégradation rapprochés d'environ **79%** par rapport à la souche **S1** (**68,79%**) et la souche **S4** (**53,21%**) alors que l'utilisation d'une mixture des quatres souches à fait augmenter considérablement le pourcentage de biodégradations dépassant ainsi **85%**.

L'essai de la bioremédiation du sol contaminé par la souche fongique a donné aussi un taux de biodégradation satisfaisant d'environ **58 %**.

Zhu et al., (2010) ont étudié une souche ZHU-1 identifié comme *Bacillus licheniformis* capable d'utiliser le chlorpyrifos comme seule source de carbone et l'énergie L'ajout de ZHU-1 au sol traité au chlorpyrifos a entraîné un taux de dégradation plus élevé



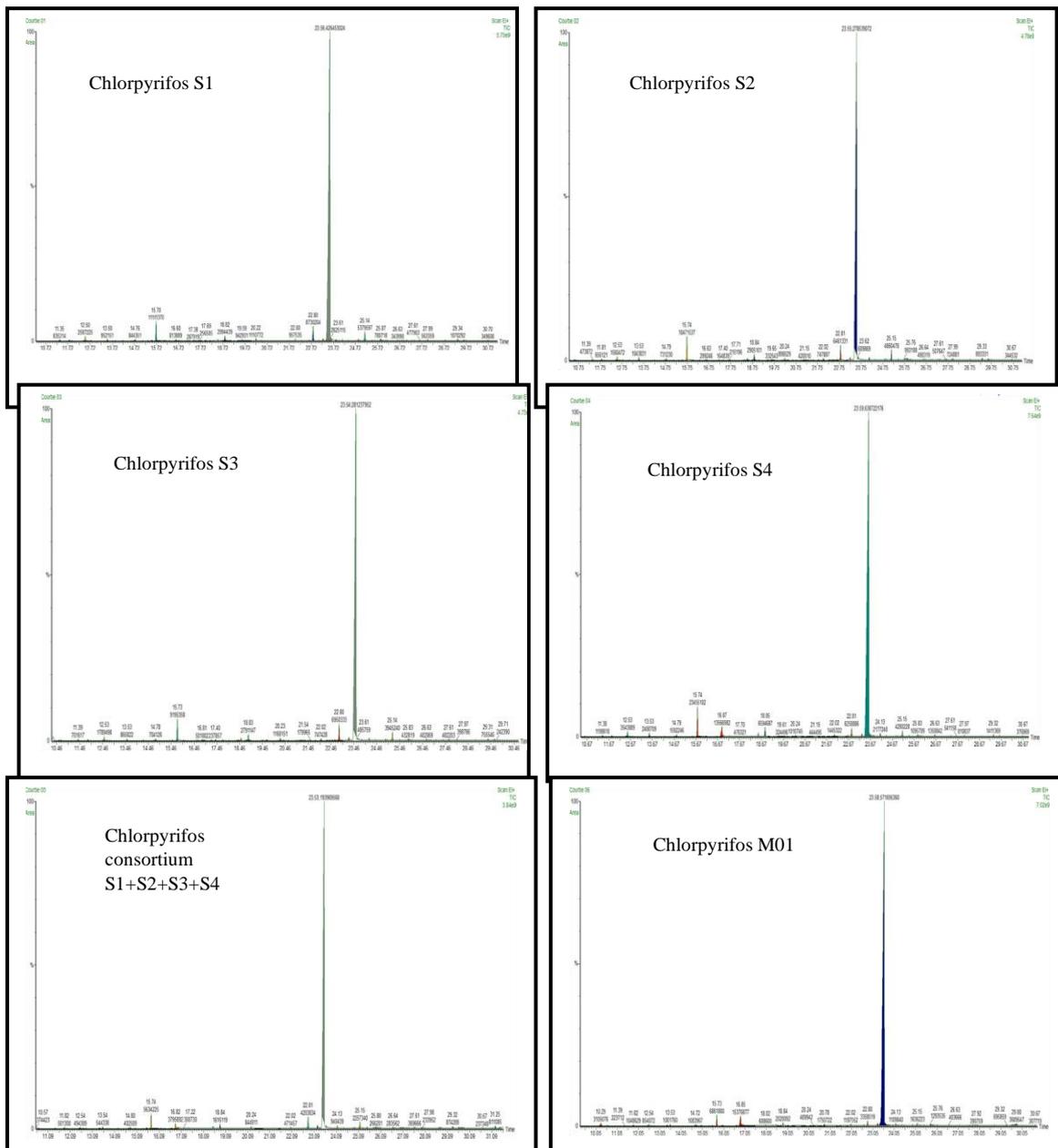


Figure 22 : Chromatogrammes obtenus par GC/MS de la bioremédiation du sol contaminé que les sols non inoculés, le taux de dégradation du chlorpyrifos (100 mg/kg) pouvant atteindre 99 % ou plus après 14 jours.

Kumar et al., (2011) ont étudié la capacité de dégradation du chlorpyrifos de quatre monocultures bactériennes (RCC-2, GCC-1, GCC-3 et JCC-3) et deux cultures mixtes Bactériennes (GCE345 et GCC134) ont été étudiées en termes de traitement. Parmi les monocultures bactériennes, RCC-2 a été trouvé être le plus efficace avec 21, 37, 54 et 77 % de dégradation du chlorpyrifos en 5, 10, 15 et 30 jours de durée de traitement, respectivement. Sur

deux cultures mixtes bactériennes, GCC134 était plus efficace et a entraîné une dégradation de 24, 38, 56 et 85 % du chlorpyrifos en 5, 10, 15 et 30 jours de traitement, respectivement. Augmenter le volume de culture des cultures bactériennes respectives, de 10% à 25% (v/v), pendant 10 jours de traitement à température ambiante.

Lakshmi et al. (2009) avaient rapporté 64 % de CP (50 mg kg⁻¹) éliminés après 30 jours. **Sasikala et al. (2012)** avaient également signalé une dégradation du CP dans les sols. Les consortiums développés ont montré une élimination de 65 % de CP (500 mg kg⁻¹) après 21 jours de procédure de dégradation. **Akbar et al. (2014)** avaient également signalé une dégradation accrue de la CP, lorsqu'ils étaient développés en un consortium avec la capacité d'éliminer une concentration de CP aussi élevée que 200 mg kg⁻¹. Le consortium a pu dégrader 100 % du CP ajouté en 42 jours, contre 76 à 90 % de dégradation par des souches individuelles.

A. xylosoxidans et *Ochrobactrum sp.* ont montré une capacité de dégrader le chlorpyrifos dans des sols stérilisés et non stérilisés, et ont pu dégrader 93 à 100 % du contaminant ajouté (200 mg kg⁻¹) en 42 jours (**Akbar et Sultan, 2016**).

Uniyal et al. (2021) ont réalisé une expérience de bioremédiation d'un sol contaminé réel de l'Himalaya central indien en inoculant le sol natif avec le consortium bactérien ECO-M. Les échantillons de sol prélevés sur sept sites différents H1, H2, S1, S2, J1, J2 et témoin ont montré la présence de résidus de CP avec des concentrations de 205,6, 386,8, 215,7, 287,3, 354,9, 372,4 et 398,6 µg kg⁻¹ respectivement. Après la bioaugmentation, la plus grande dégradation de CP dans le microcosme du sol H1, H2, S1, S2, J1, J2 et le contrôle non stérilisé et stérilisé perçu était d'environ 85,7 %, 92,6 %, 86,6 %, 90,8 %, 94,3 %, 92,1 %, 46,4 % et 21,6 %, respectivement après 30 jours.

Conclusion

La pollution du sol par les pesticides présente un impact écologique et des conséquences négatives sur le système écologique et la biodiversité des êtres vivants. Pour lutter contre cette pollution plusieurs techniques ont été mises en évidence, l'une de ces techniques de décontamination économique et avantageuse des sols

Les voies d'élimination chimiques et physiques de la pollution par les pesticides ont leurs limites du fait de leurs coûts ou de leurs impacts secondaire sur l'environnement. La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux de part le monde entier. En effet, la bioremédiation consiste en l'élimination de polluants par l'utilisation de microorganismes qui utilisent ces derniers comme source de carbone et d'énergie en les transformant en composés moins toxique soit en les minéralisant complètement.

Dans ce travail, nous avons fait en premier lieu une analyse physicochimique d'un sol agricole cultivé en pomme de terre situé dans la région de Soualeh dans la wilaya d'Eloued, les résultats ont montré que ce dernier présente un pH neutre et une faible humidité avec un taux de biodégradabilité moyen et un taux de nitrate faible indiquant le caractère non pollué de notre échantillon ceci est confirmé par l'absence des chlorures et des nitrites.

En second lieu, nous avons réalisé des isolements de la microflore résiduelle de notre échantillon du sol. Les résultats ont permis de recenser 40 souches bactériennes et 10 souches fongiques. Selon l'abondance, 4 souches bactériennes et 5 souches fongiques ont été retenus pour les essais de dégradation de l'insecticide organophosphoré choisi « le chlorpyriphos ».

L'identification phénotypique (morphologiques et biochimiques) des souches retenues a permis d'affilier nos isolats bactériens au genres *Bacillus* *Enterobacter* et *Micrococcus*.

Alors que pour les champignons filamenteux, l'identification à l'échelle du genre a permis d'attribuer les souches au genres *Alternaria* et *Aspergillus*.

Les souches testées pour le test de la croissance sur milieux de culture additionnés de l'insecticide ont montré une bonne croissance qui varie selon la souche testée et la concentration de l'insecticide employé.

Le test de bioremédiation réalisé par les souches bactériennes retenues a montré une bonne dégradation de l'organochloré surtout lorsque ces bactéries sont appliquées en consortium. Cette efficacité de décontamination a été confirmée par les résultats de l'analyse LC-MS de notre échantillon du sol inoculé de l'insecticide.

L'ensemble de nos travaux nous ont permis de sélectionner une collection de souches candidates pour des applications dans la réhabilitation des sols pollués de pesticides dans une perspective d'agriculture et d'environnement plus durable. L'approche développée pourra s'inscrire comme mesure d'atténuation dans un programme de protection des surfaces et servir de base au développement d'une méthode de traitement des sols agricoles en cultures.

A l'issu de nos résultats et en perspectives, il serait souhaitable de compléter cette étude par :

- le suivi de la bioremédiation pour une période plus longue (des mois)
- L'identification moléculaire des souches testées performantes.
- L'augmentation de la concentration du polluant afin de déterminer l'aptitude maximale des souches à biodégrader les pesticides.
- L'essai d'autres molécules stimulant la microflore tellurique.
- L'application à plus grande échelle du procédé de réhabilitation dans les conditions de terrain.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- Abid A.a., Sarvajeet S. G., Ritu G., Guy R. L., Lee N., (2017).** Phytoremediation: Management of environmental contaminants. Ed: Springer ,406pp
- Aswathi A., Pandey A., Sukumaran R. K. (2019).** Rapid degradation of the organophosphate pesticide – Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3. Bioresource Technology. 292, 122025.
- Abatenh E, Gizaw B, Tsegaye Z, Misgan W.** The role of microorganisms in ioremediation- a review. Open J Environ Biol (2017) 2(1):038–46.
- Alori ET, Fawole OB.** Microbial inoculants-assisted phytoremediation for sustainable soil management. In: AA Ansari, R Gill, SS Gill, GR Lanza and L Newman, editors. Phytoremediation: Management of environmental contaminants, vol. 5 . Switzerland: Springer International Publishing (2017). p. 3–17 .
- Anne-Antonella Serra, Diana Alberto, Cécile Sulmon, Gwenola Gouesbet, Ivan Couée.** Implications des communautés végétales péri-agricoles dans la dynamique environnementale des pollutions par les pesticides. Revue d'Ecologie, Terre et Vie, Société nationale de protection de la nature, 2016, 71 (3), pp.203-221.
- Akbar S., Sultan S., Kertesz M. (2014).** Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(10), 2755–2766.
- Akbar S., Sultan S. (2016).** Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. Brazilian Journal of Microbiology, 47(3), 563–570.
- ALI AHMED, S. (2011).** Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique .Thèse de Magistère en science de sol. Université Algérienne, p 36.
- Anastassiades M, Scherbaum E, Tsdelen B, Stajnbaher D (2007)** Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa HM, Hisashi; Lee, Philip W (eds) Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: KGaA, pp 439– 458

Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12.

ABDELY, C. (2007). Bioremédiation/phytoremédiation. Thèse Département des sciences naturelles. Institute supérieur de l'éducation et de la formation continue. Université de Tunisie.

Atteia, O., and Guillot, C. (2007). Factors controlling BTEX and chlorinated solvents plume length under natural attenuation conditions. *J. Contam. Hydrol.* 90, 81–104.

Anastassiades M, Scherbaum E, Tasdelen B, Stajnbaher D (2007) Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa HM, Hisashi; Lee, Philip W (eds) *Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: KGaA, pp 439– 458.

Anonyme (2006). Profil national pour l'évaluation des capacités de gestion rationnelle des produits chimiques, 60p:13.

Antizar-Ladislao B, Lopez-Real J, Beck AJ (2006) Investigation of organic matter dynamics during in-vessel composting of an aged coal-tar emission spectroscopy. *Chemosphere* 64(5):839– 847.

A.TOR; M.EMIN AYDIN; S.OZCAN, J. *Analytica Chimica Acta* 559 (2006) 173–180.

AUBERTOT, J.N., BARBIER, J.M., CARPENTIER, A., GRIL, J.J., GUICHARD, L., LUCAS, P., SAVARY, S., SAVINI, I. & VOLTZ, M.(2005). Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. INRA, Cemagref, Paris-Antony.

Atlas R.M., Philp J., (2005). Bioremediation: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. Ed: ASM press.139-293pp.

Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86(2):412–431.

B

B.Niranjana Reddi and D.Sandya Deepika. (2018); potential chlorpyrifos and malathion degrading bacterial isolation, biochemical characterization and growth kinetics studies. *int. j. of adv. res.* **6** (dec). 580-586] (issn 2320-5407).

Banitz T, Frank K, Wick LY, Harms H, Johst K (2016). Spatial metrics as indicators of biodegradation benefits from bacterial dispersal networks. *Ecol Ind* (2016) 60:54–63.

Bijay Thapa, Ajay Kumar KC, Anish Ghimire (2012) a review on Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu University. *Journal of science, engineering and technology* 8: 164-170.

Biljana A, Safifiyya MA, Sin Eng C. Interethnic variability of plasma paraxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among Asian populations: A short review. *Ind Health* 2008;46:309—17.

Biljana A, Milos PS. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin Med Res* 2007;5:71—82.

Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technol* (2000) 74:63–7.

Benfenati, E., Tremolada, P., Chiappetta, L., Frassanito, R., Bassi, G., Di Toro, N., Fanelli, R. and Stella, G., (1990) Simultaneous analysis of 50 pesticides in water samples by solid phase extraction and GC-MS. *Chemosphere* 21, 1411–1421.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P. H., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y. et Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2^{ème} édition, Masson, Collection Biotechnologies, Paris, 34-381p.

C

Centers for disease control and prevention organophosphates. <https://www.cdc.gov/nceh/clusters/Fallon/organophosfaq.htm>. Accessed 23 Jan 2019.

Carenco P. Antibiorésistance et biocides. CH Hyères (83): Cclin-Arlin;2017 . (Informations du réseau national de prévention des infections associées aux soins). Report No.: 7.

Chen S., Liu C., Peng C., Liu H., Hu M., Zhong, G. (2012). Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol by a New Fungal Strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. PLoS ONE, 7(10), e47205.

Chandrakant SK, Shwetha SR. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. Enzyme Res (2011) 2011:1–11

Cáceres, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., and Naidu, R. 2010. Fenamiphos and related organophosphorus pesticides: environmental fate and toxicology. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 205:117–162.

COLOMBANO, S., SAADA, A., GUERIN, V., BATAILLARD, P., BELLENFANT, G., BERANGER, S., HUBE, D., BLANC, C., ZORING, C., GIRARDEAU . (2008) .Quelles techniques pour quels traitements ? Analyse coûts- bénéfices .BRGM /RP-58609-FR. p 276.

Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. Clin Chim Acta 366, 1-13.

CALVET R., 2005 : Les Pesticides dans le Sol, Conséquences Agronomiques et Environnementales. Référence Scientifique. Editions France Agricole, 641 p.

Chabasse D., Bouchara J.P., de Gentile L., Brun S., Cimon B et Penn P. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bi
Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes.

Colin F., 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). Unité mixte Cemagref-ENGREF. Structure des systèmes spatiaux. 233 p.

D

De Pourcq K, Ayora C, Garcia-Gutierrez M, Missana T, Carrera JA. Clay permeable (2015). reactive barrier to remove Cs-137 from groundwater: column experiments. J Environ Radioact (2015) 149:36–42.

De-Bashan LE, Hernandez J-P, Bashan Y (2012) . The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—a comprehensive evaluation. Appl Soil Ecol . 61:171–89.

Declercq I, Cappuyns V, Duclos Y (2012). Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: state of the art in Europe—a critical evaluation. *Sci Total Environ* (2012) .426:393–405.

Dell Anno A, Beolchini F Rocchetti L, Luna G M, Danovaro R (2012). High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environ Pollut* 167: 85–92.

Decontamination of organophosphorus compounds: Towards new alternatives L. Poirier a,1, P. Jacquet a,1, M. Elias b, D. Daudéc, E. Chabrièrea,c,

Delille D, Duval A, Pelletier E (2008) Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil. *Cold reg sci technol* 54: 7-18.

Druzina B. & Stegu M., 2007. Degradation study of selected organophosphorus insecticides in natural waters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 87, 1079–1093.

Dibble J. T., Bartha R., (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 37 (4) :729-739.

Dio p., Nautiyal C.S., (2008). *Microbiology of extreme soils*. Ed : Springer. 287pp.

E

Emami S, Pourbabae AA, Alikhani HA (2012) Bioremediation Principles and Techniques on Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 2: 320-323.

Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH (2008) Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 371:597–607.

Eddleston M, Singh S, Buckley N. Organophosphorus poisoning (acute). *Clin Evid* 2005;13:1744-55 .

Eddleston M, Singh S, Buckley N. Organophosphorus poisoning (acute). *Clin Evid* 2005;13:1744-55.

Testud F. Insecticides organophosphorés, carbamates anti-cholinestérasiques et pyréthrinoïdes de synthèse. In: Testud F, Garnier R, Delemotte B, editors. *Toxicologie humaine des produits phytosanitaires*. Paris: ESKA; 2001. p. 67-116.

F

Fauriah R., Amin N., Daud I ; D ., Harsanti E.S. (2021). The potential of endophytic fungi as biodegradation of chlorpyrifos in shallots. *Earth and Environmental Science*. 807 :032058

FOKOU MBOGNE, P. (2017). Bioremédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques. Mémoire de licence. Université du Québec, P 18.

Frutos FJG, Pe'rez R, Escolano O, et al (2012) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: evaluation of bioremediation technologies. *J Hazard Mater* 199:262–271.

Floesser-Mueller and W.Schwack, 2001. Photochemistry of organophosphorus insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 172 : pp 129-228 .

Flessel P., Quintana P.J. & Hooper K., 1993. Genetic toxicity of malathion : a review. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22, 7–17.

G

Guibal, R., Lissalde, S., Charriau, A., Poulier, G., Mazzella, N. and Guibaud, G., (2015) Coupling passive sampling and time of flight mass spectrometry for a better estimation of polar pesticide freshwater contamination : Simultaneous target quantification and screening analysis. *Journal of Chromatography A* 1387, 75–85.

Gardia-parege, C., (2015) Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques.

Gomez, Sartaj M (2014) Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *Int Biodeterior Biodegradation* 89: 103–109.

H

HASSEN W. 2020. La Biodégradation des pesticides utilisés dans les sols agricoles. Ed.UE.ISBN: 978-613-9-53921-5

Hassan, A., Pariatamby, A., Ahmed, A., Auta, H. S., and Hamid, F. S. (2019). Enhanced bioremediation of heavy metal contaminated landfill soil using filamentous fungi consortia: a demonstration of bioaugmentation potential. *Water Air Soil Pollut.* 230, 1–20.

Herrero-Hernández E, Andrades MS, Álvarez-Martín A et al (2013) Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *J Hydrol* 486:234–245.

HANNA, K., (2004). Étude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse doctorat. Université Lyon. France, P 59.

HCN (Health Council of the Netherlands). 1996. Committee on the evaluation of the carcinogenicity of chemical substances Evaluation of the carcinogenicity of chemical substances. Health Council of the Netherlands, Rijswijk (The Netherlands), publication no. 1996/26.

Howard, A. S., Bucelli, R., Jett, D. A., Bruun, D., Yang, D., and Lein, P. J. (1995).

J

Junior, R. B. R., Meira, H. M., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., et al. (2019). Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. *Biodegradation* 30, 215–233.

Joly Condet C, Elion Dzon B, Hamdad F, Biendo M, Bach V, Khorsi-Cauet H. Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract of chlorpyrifos-exposed rats. *Gut Pathog.* 2016;8.

Joly Condet C, Elion Dzon B, Hamdad F, Biendo M, Bach V, Khorsi-Cauet H. Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract of chlorpyrifos-exposed rats. *Gut Pathog.* 5 nov 2016;8.

Justine Marie Cruz. Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0221 ; tel-01359188.

Jabeen H., Iqbal S., & Anwar S. (2014). Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water and Environment Journal*, 29(1), 151–160.

Joly Condette C. Impact d'une exposition chronique au chlorpyrifos sur le développement, la maturation de l'intestin et le microbiote : approches in vivo (rat) et in vitro (SHIME®) [Thèse]. [Amiens]: UPJV; 2014.

Jan, A. T., Azam, M., Ali, A., and Haq, Q. M. R. (2014). Prospects for exploiting bacteria for bioremediation of metal pollution. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 519–560.

Jokanović M, Kosanović M (2010) Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 29:195–201.

Jorgensen, K. S. (2007). In situ bioremediation. *Advances in Applied Microbiology*, 61, 285-305.

K

Kumar A., Sharma A., Chaudhary P., Gangola S. (2021). Chlorpyrifos degradation using binary fungal strains isolated from industrial waste soil. *Biologia.* 76(10), 3071–3080.

Kumar, (2019). Il existe divers engrais disponibles comme nutriments pour stimuler les microbes, par exemple, NaNO₃, KNO₃, NH₃NO₃ hydrosolubles, à libération lente personnalisable, max-bac, IBDU, et oléophiles Inipol EAP22, MM80, F1, S200.

kumar, N. (2019). “Natural and artificial soil amendements for the efficient phytoremediation of contaminated soil,” in *Phyto and Rhizo Remediation* (Singapore : Springer), 1–32.

Kumar, R., Acharya, C., and Joshi, S. R. (2011). Isolation and analyses of uranium tolerant *Serratia marcescens* strains and their utilization for aerobic uranium U(VI) bioadsorption. *J. Microbiol.* 49, 568–574.

Kumar A, Bisht B S, Joshi V D, Dhewa T (2011) Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *international journal of environmental sciences* 1: 1079-1093.

Kwong, T. C. (2002). Organophosphate pesticides : biochemistry and clinical toxicology. Therapeutic drug monitoring.

L

Leidy Johanna Caro-Gamboa, Maribel Forero-Castro, Al ix Eugenia Dallos-Báez Cholinesterase inhibition as a biomarker for the surveillance of the occupationally exposed population to organophosphate pesticides. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria* vol.21 no.3 Mosquera Sep./Dec. 2020 Epub Aug 31, 2020

Lakshmi V. C., Kumar M., Khanna S. (2009). Biodegradation of Chlorpyrifos in Soil by Enriched Cultures. *Current Microbiology*, 58(1), 35–38.

Lu, C., Barr, D. B., Pearson, M. A., and Waller, L. A., 2008. Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ Health Perspect.* 116(4); 537-542.

Lee TH, Byun IG, Kim YO, Hwang IS, Park TJ (2006) Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using in situ respiration rate. *Water Science and Technology* 53: 263-272.

Lotti, M. (2002). Low-level exposures to organophosphorus esters and peripheral nerve .

Lehotay SJ, De KA, Hiemstra M, Van Bodegraven P (2005) Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J AOAC Int* 88(2):595–614

Lotti M, Moretto A. Inhibition of lymphocytic neuropathy target esterase predicts the development of organophosphate polyneuropathy in man. *Hum Toxicol* 1986;5:1

M

Medeiros, P. M. (2018). Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). *Encyclopedia of Geochemistry*, 530–535.

Montagnolli RN, Matos Lopes PR, Bidoia E D (2015) Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environ. Monit. Assess* 187: 1-17.

Munoz, G., Giraudel, J.-L., Botta, F., Lestremau, F., Dévier, M.-H., Budzinski, H. and Labadie, P., (2015) Spatial distribution and partitioning behavior of selected poly- and perfluoroalkyl substances in freshwater ecosystems: A French nationwide survey. *Science of The Total Environment* 517, 48–56.

Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., Singer, H., Stamm, C., Leu, C. and Hollender, J., (2014) How a Complete Pesticide Screening Changes the Assessment of Surface Water Quality. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5423–5432.

Moore pd, yedjou cg, tchounwou pb. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ Toxicol* 2010, 25 : 221-226 .

Milan Jokanovi'c, Milo's P, Stojiljkovi'c. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in the treatment of organophosphate poisoning. *Eur J Pharmacol* 2006;553:10—7

Medina D., Prieto A., Ettiene G., Buscema I. & Abreu de V A., 1999. Persistence of organophosphorus pesticide residues in Limon river waters.

Moretto A, Lotti M. Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:463—8.

N

Niu GL, Zhang JJ, Zhao S, Liu H, Boon N, et al. (2009) Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environmental Pollution* 57: 763-771.

Nauen R. (2006). Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Man Sci*, 62: 690-692.

O

Olvera-Hernandez E., Martinez-Tabche L. & Martinez-Jeronimo F., 2004.

B organophosphate pesticides in workers and residents. *journal of medical sciences*, 28(8-9): 584-598.

P

Prabu M. R., Kumar S. D., Murugan A. (2021) ; impact of chlorpyrifos on *Bacillus cereus* op3 soil bacteria isolated from rhizosphere ; *Journal of Advanced Scientific Research* 12 (4): 143-153.

Phillips McDougall (2017), An Analysis of Historical Application Rate and Volume Trends in the Crop Protection Industry; A Consultancy Study for CropLife International; December 2017

Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M.J., Andrades, M.S., Rodríguez-Cruz, M.S. and Herrero-Hernández, E., (2015) .Pesticide residues in vineyard soils from Spain: Spatial and temporal distributions. *Science of The Total Environment* 514, 351–358.

Pimentel D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 8: 17- 29.

R

Rangasamy K, Athiappan M, Devarajan N, Samykannu G, Parray JA, Aruljothi KN, et al. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. *Microb Pathog.* 2018; 114:304-10.

Rayu, S., Karpouzas, D. G., and Singh, B. K. (2012). Emerging technologies in bioremediation: constraints and opportunities. *Biodegradation* 23, 917–926.

Roudier P., (2005). Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués- Fiches de synthèse. *Techniques de l'ingénieur*.C5:1-40.

Regnault-Roger, C. 2005. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. *Londre-Paris-New-York: TEC & DOC*, 1013 p.

Roberts R.J., 2002. Head lice. *New Engl. J. Med.*, 346, 1645–1650.

Retz, W., Kornhuber, J., and Riederer, P. (1996). Neurotransmission and the ontogeny of human brain.

S

Salilh FZ, Tarekegn MM. Cleaning polluted environments by bioremediation: Review. *IJESC* (2020) 10(8):27112–21.

Sharma I (2020). Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects. In: MA Murillo-Tovar, HA Saldarriaga-Norena and A Saeid, editors. *Trace metals in the environment: New approaches and recent advances*. London, SW7 2QJ UNITED KINGDOM: IntechOpen, (2020).

Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., et al. (2019). A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 281, 421–428.

Saidi I, Mouhouche F, Abri H (2017). Determination of pesticide residues on tomatoes from greenhouses in Boudouaou and Douaouda, Algeria .Quality Assurance and Safety of Crops & Foods. 9 (2): 207-212.

Smith E, Thavamani P, Ramadass K, et al (2015) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: evaluation of bioslurry and piling techniques. Int Biodeterior Biodegrad 101:56–55.

Samuel Agarry, Ganiyu K. Latinwo (2015) Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of Bioventing and amendment with brewery waste effluents as Biostimulation-Bioaugmentation agents. Journal of Ecological Engineering 16: 82–91.

S Malik ZA, Ahmed (2012) Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. African J Biotechnol 11: 650–658.

Savitha K., Raman D. N. S. (2012). Isolation, identification, resistance profile and growth kinetics of chlorpyrifos resistant bacteria from agricultural soil of

Bangalore. Research in Biotechnology, 3(2): 08-13

Sasikala C., Jiwal S., Rout. P., Ramya M. (2012). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology .28, 1301–1308.

Shilpi Sharma (2012) Bioremediation: Features, Strategies and applications. Asian Journal of Pharmacy and Life Science 2: 202-213.

Sparkman, O. D., Penton, Z. E., & Kitson, F. G. (2011). Introduction and History. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide, 2–13.

Smets, B. F., and Pritchard, P. H. (2003). Elucidating the microbial component of natural attenuation. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 283–288. doi: 10.1016/S0958-1669(03)00062-4.

Sublette, K.L. (2001). Fundamentals of Bioremediation of Hydrocarbon contaminated soils.the university of Tulsa,continuing Engineering and science Education .Houston,TX.Swannell.

Sayler GS, Ripp S (2000) Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. Current Opinion in Biotechnology 11: 286-289.

Stöber, I. and Schulten, H.-R., (1980) Combined application of high-pressure liquid chromatography and field desorption mass spectrometry for the determination of biocides of

the phenylurea- and carbamate-type in surface water. *Science of The Total Environment* 16, 249–262.

T

Timchalk, C., Poet, T. S., and Kousba, A. A. (2006). Age-dependent pharmacokinetic and to pesticides : what do we really know and what can be done about it. *Acta Paediatr.*

Tiedje JM. Bioremediation from an ecological perspective. In: *In situ bioremediation: When does it work.* Washington, D. C (USA): National Academy of Sciences (1993). p. 110–20.

Thomas, M.G., Burkart, M.D and Walsh C.T, (2002). Conversion of L-proline to pyrrolyl-2- carboxyl-S-PCP during undecyl prodigiosin and pyolouteorin biosynthesis. *Chemistry and biology.* Vol 9 : 171-184.

Truc A., (2007). Traitements tertiaires des effluents industriels. *Techniques dell'ingénieur.* Technologie de l'eau.3:1-4

U

Uniyal S., Sharma R. K. Kondakal V. (2021). New insights into the biodegradation of chlorpyrifos by a novel bacterial consortium: Process optimization using general factorial experimental design. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111799.

Usmani Z., Kulp M., Lukk T. (2021). Bioremediation of lindane contaminated soil: Exploring the potential of actinobacterial strains. *Chemosphere*, 278, 130468.

V

Vermeire T, McPhail R, Waters M 2018 . Organophosphorous pesticides in the environment. Toxicology advisory centre national institute of public health and the environment, the Netherlands and national health and environmental effects research laboratory office of research and development environmental protection agency, USA .

Verma JP, Jaiswal DK (2016) Book review: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. *Front Microbiol* 6:1–2.

Van Herwizen R, Hutchings TR, Al-Tabbaa A et al (2007) Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. *Environ Pollut* 150:347–354

Vidali M., (2001). Bioremediation :An overview. Pure applied chemistry. 73 (7) : 1163-1172.

Van Der Werf H., 1996. Assessing the impact on the environment. Agriculture, Ecosystems and Environment. 60: 81-96.

W

Wu S., Lv G., Lou R ., (2012). Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis IN Applications of Gas Chromatography. Edited by Reza davarnejad ; ISBN978-953-51-0260-1

Z

Zheng Y. & Hwang H.M., 2006. effects of temperature and microorganisms on malathion transformation in river water.

Zhu, J., Zhao, Y. and Qiu, J. (2010). Isolation and application of a chlorpyrifos degrading *Bacillus licheniformis* ZHU-1. African Journal of Microbiology. 4: 2410-2413

Site web consultes :

<http://toxnet.nlm.nih.gov>

<https://www.cdc.gov/nceh/>

Résumé

L'intensification de l'agriculture s'est accompagnée d'une utilisation importante de pesticides qui a généré une pollution généralisée à impacts soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes donc la qualité des sols peut également en être altérée. Pour lutter contre cette pollution plusieurs techniques ont été mises en évidence, l'une de ces techniques de décontamination économique et avantageuse des sols est la bioremédiation. Cette alternative biologique se base sur les capacités dégradatives de certains microorganismes y compris ceux des communautés microbiennes indigènes aux sols pollués. Notre étude est orientée vers cette approche dont le but est d'accéder à la diversité des communautés bactériennes compétentes du sol pouvant dégrader efficacement les résidus des pesticides toxiques. Le présent travail a pour objectif de décontaminer un sol artificiellement contaminé par un insecticide organophosphoré le chloropyriphos au moyen de l'inoculation de souches bactériennes indigènes isolées à partir du même sol à l'état naturel. Préalablement, nous avons réalisé des analyses physicochimiques et granulométrique de notre matrice (sol) situé dans la région de Soualeh de la wilaya d'Eloued dont les résultats soutiennent le caractère non pollué de ce dernier. Les isolations effectuées sur le sol ont permis de recenser 40 souches bactériennes et 10 souches fongiques. La dégradation de l'insecticide inoculé dans le milieu de culture comme source de nutriment n'a pas empêché les souches fortement présentes dans l'échantillon du sol de proliférer ; il s'agit notamment d'une communauté bactérienne représentée par les genres *Bacillus* (2 souches), *Enterobacter* (une souche) et *Micrococcus* (une souche). Pour les champignons filamenteux, il s'agit de 5 souches appartenant aux genres *Alternaria* et *Aspergillus*. Le test de bioremédiation a fait ressortir une digestion intéressante de pesticide testé par le consortium bactérien utilisé, ceci a été confirmé par les résultats de LC-MS.

Mots clés : Sol, agricole, pesticides, organochlorés, pollution, bioremédiation, microorganismes. Dégradations.

The intensification of agriculture has been accompanied by an important use of pesticides which has generated a generalized pollution with direct or indirect impacts on human health and the balance of the ecosystems. To fight against this pollution several techniques have been highlighted, one of these techniques of economic and advantageous decontamination of soils is the bioremediation. This biological alternative is based on the degradative capacities of certain microorganisms including those of the microbial communities indigenous to the polluted soils. Our study is oriented towards this approach whose goal is to access the diversity of competent bacterial communities in the soil that can effectively degrade the residues of toxic pesticides. The objective of the present work is to decontaminate a soil artificially contaminated by an organochlorine insecticide chloropyriphos by means of inoculation of indigenous bacterial strains isolated from the same soil in its natural state. Previously, we conducted physicochemical and granulometric analysis of our matrix (soil) located in the region of Souleah of the wilaya of Eloued whose results support the unpolluted character of the latter. Isolations carried out on the soil have identified 40 bacterial strains and 10 fungal strains. The degradation of the insecticide inoculated in the culture medium as a source of nutrient did not prevent the strains strongly present in the soil sample from proliferating; these include a bacterial community represented by the genera *Bacillus* (2 strains), *Enterobacter* (one strain) and *Micrococcus* (one strain). For filamentous fungi, it is about 5 strains belonging to the genera *Alternaria* and *Aspergillus*. The bioremediation test showed an interesting digestion of the tested pesticide by the bacterial consortium used, this was confirmed by the LC-MS results.

Key words : Soil, agricultural, pesticides, organophosphorus, pollution, bioremediation, microorganisms. Degradations.

ملخص: تتراقف الزراعة المكثفة مع استخدام كبير للمبيدات التي تسببت في تلوث واسع النطاق مع تأثيرات، مباشرة أو غير مباشرة، على صحة الإنسان وتوازن النظم البيئية، وبالتالي يمكن أن تتأثر جودة التربة أيضاً. لمحاربة هذا التلوث، تم تسليط الضوء على العديد من التقنيات، ومن بين هذه التقنيات الاقتصادية والمفيدة لإزالة تلوث التربة المعالجة البيولوجية. يعتمد هذا البديل البيولوجي على القدرات التدميرية لبعض الكائنات الحية الدقيقة، بما في ذلك المجتمعات الميكروبية الأصلية في التربة الملوثة. دراستنا موجهة نحو هذا النهج، والهدف منه هو الوصول إلى تنوع المجتمعات البكتيرية المختصة في التربة التي يمكن أن تؤدي بشكل فعال إلى تدهور بقايا المبيدات السامة.

يهدف العمل الحالي إلى تطهير التربة الملوثة صناعياً بمبيد حشري كلوروبيريغوس عضوي عن طريق تلقيح سلالات بكتيرية محلية معزولة من نفس التربة في حالتها الطبيعية. في السابق، أجرينا التحليلات الفيزيائية والكيميائية والحيوية لمصفوفتنا (التربة) الموجودة في منطقة الصوالمح ببلدية البياضة / ولاية الوادي، والتي تدعم نتائجها الطبيعية غير الملوثة للأخيرة. سمحت العزلات التي أجريت على الأرض بتحديد 40 سلالة بكتيرية و 10 سلالات فطرية. لم يمنع تحلل المبيد الملقح في وسط الاستزراع كمصدر مغذي السلالات الموجودة بقوة في عينة التربة من التكاثر؛ وتشمل هذه المجتمعات البكتيرية التي يمثلها جنس (*Enterobacter* (سلالة واحدة) و *Micrococcus* (سلالة واحدة)). بالنسبة للفطريات الخيطية، هناك 5 سلالات تنتمي إلى أجناس *Aspergillus* و *Alternerai* كشف اختبار المعالجة الحيوية عن هضم مبيد حشري مثير للاهتمام تم اختياره من قبل المجموعة البكتيرية المستخدمة، وقد تم تأكيد ذلك من خلال نتائج

الكلمات المفتاحية: التربة، الزراعة، مبيدات الآفات، الكلورين العضوي، التلوث، المعالجة الحيوية، الكائنات الحية الدقيقة. الانحط