



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par
BELLATRECHE Fouad
&
BOUKHARI Hyam

Thème :

ÉTUDE DE LA CROISSANCE MICROBIENNE DE BACTERIES ISOLEES DE SOLS AGRICOLES POLLUEES PAR DES PESTICIDES

Soutenu le 19/06/2023 devant le jury composé de :

Président	SIDHOUM W	MCA	Université de Mostaganem
Encadreur	BEKENNICHE N	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	BOUZNAD A	MCB	Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Dédicace

Merci Allah pour m'avoir donné la santé, la force nécessaire et le courage pour mener à réalisé ce travail.

Aujourd'hui et après toutes ces années j'ai l'honneur et surtout le plaisir de Dédier ce travail de master à :

Ma mère, le symbole de tendresse, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

Mon père *Zinedine*, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager à me donner l'aide et me protéger.

Ma chère sœur et cher frère *Mohamad Islam*

Tous mes amis et collègues, en particulier *Muhammad* et *Oussama*

Mon binôme *hyam*, qui a partagée avec moi les bons et les mauvais moments de ce Travail.

Toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail et m'accompagnés tout au long de ce chemin.

Bellatreche Fouad

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A tous les membres de la famille Boukhari et *Missoum*, pour leurs soutiens multiformes et leurs encouragements tout au long de ce travail. Je pense tout particulièrement à ma très chère maman ainsi mon père, Grâce à vous, j'ai pu me sentir soutenue et entourée pendant cette période cruciale de ma vie. Votre amour et votre confiance en moi ont été un véritable moteur qui m'a poussée à donner le meilleur de moi-même

A Mes chères sœurs : *Khawla* et *Meriem*

A Mes chers frères : *Izzou* et *Seddik*

Pour leurs présences constantes et leurs encouragements

A Mes merveilleuses copines : *Aya* et *Rabia*, pour leurs amitiés sans faille, et leurs amour inconditionnel.

A mon binôme *Fouad* pour son soutien et ses compétence exceptionnelles, je suis reconnaissante d'avoir eu la chance de travailler ensemble

Sans oublier toute la promo de microbiologie appliquée

Boukhari hyam

Remerciement

Remerciant tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir donné la force de réaliser ce travail.

Nous voudrions exprimer notre profond remerciement à notre encadreur *Mme Bekenniche* qui a bien voulu diriger ce travail, et pour ses orientations, ses aides et ses précieux conseils qui nous avons permis de bien mener ce travail.

Nos sincères remerciements vont également à *Mr. Ait Saada* d'avoir accepté de nous accueillir dans son laboratoire.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie *Djillali, Hafida* et particulièrement *Mohamed* pour sa patience, son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Nous remercions également nôtres collègues *Melissa* et *Loudjeina* qui nous ont beaucoup aidé dans ce travail

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à *Mme. Sidhom* qui nous a fait l'honneur de présider le jury d'évaluation de notre travail

Nos vifs et sincères remerciements vont aussi à *Mr. Bouznad* d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'être membre de jury de ce travail.

Sans oublier de remercier tous les enseignants du département biologie et surtout de spécialité microbiologie qui nous ont transmis le goût de l'étude.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail

ملخص:

يمكن أن يؤدي استخدام المبيدات لحماية المحاصيل الزراعية إلى عواقب غير مرغوب فيها للإنسان والبيئة. في هذا البحث التمهيدي استهدفنا تطوير وسط مناسب وانتقائي للبكتيريا القادرة على تحلل المبيدات المستخدمة في معالجة محصول البطاطا. ثلاث باكتيريا تم غربلتها، عزلها وتنقيتها. تم إجراء اختبارات تنفسية، كيميائية وإنزيمية لمعرفة خصائص العزلات. تم إجراء دراسة التحلل الحيوي لمبيدات على وسط MSM سائل عن طريق قياس الكثافة البصرية للعزلات في تركيزين مختلفين لخمسة المبيدات مختلفة تستعمل في معالجة محصول البطاطا. أظهرت نتائج تحللاً للمبيدات مصحوباً بنمو وتكاثر العزلات، و ذلك أظهره زيادة الكثافة البصرية في الوسط السائل،

الكلمات المفتاحية: بكتيريا، تربة زراعية، مبيدات، تحلل حيوي، تحمل.

Résumé :

L'utilisation des pesticides en agriculture pour protéger les cultures peut entraîner des conséquences indésirables pour l'homme et l'environnement. Dans cette recherche préliminaire nous avons visé à élaborer un milieu approprié et sélectif pour des bactéries autochtones ayant le potentiel de dégrader les pesticides utilisés dans le traitement de la culture de pomme de terre. Trois bactéries ont été criblées, isolées et purifiées. Des tests respiratoires, biochimiques et enzymatiques ont été effectués afin d'évaluer les caractéristiques des isolats. L'étude de la biodégradation des pesticides sur milieu MSM liquide a été réalisée en mesurant la densité optique des trois isolats testés durant cinq jours dans deux différentes concentrations pour cinq différents pesticides utilisés dans le traitement de la pomme de terre. Les résultats montrent une dégradation des pesticides s'accompagne par une croissance microbienne des trois isolats révélés par l'augmentation de l'absorbance du milieu liquide.

Mots clés : Bactéries, Sol agricole, Pesticide, Biodégradation, Tolérance.

Abstract:

The use of pesticides in agriculture to protect crops can have undesirable consequences for humans and the environment. In this preliminary research we aimed to develop a suitable and selective medium for autochthonous bacteria with the potential to degrade pesticides used in the treatment of potato crops. Three bacteria were screened, isolated and purified. Respiratory, biochemical and enzymatic tests were carried out to evaluate the characteristics of the isolates. The study of pesticide biodegradation on liquid MSM medium was carried out by measuring the optical density of the three isolates tested over five days in two different concentrations for five different pesticides used in potato treatment. The results show that pesticide degradation is accompanied by microbial growth of the three isolates, revealed by the increase in absorbance of the liquid medium.

Key words: Bacteria, Agricultural soil, Pesticide, Biodegradation, Tolerance.

Liste des abréviations

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

ACTA : Association de coordination technique agricole

BBT : bleu de bromothymol

BN : Bouillon nutritif.

CaCl₂ : chlorure de calcium

GC : Chromatographie en phase gazeuse

DDD : Dichloro diphényldichloroéthane

DDT : dichloro diphenyl trichloroéthane

DO : Densité Optique

DSA : Direction des Services Agricoles

etc.: Et cetera.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

GN : Gélose nutritive.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène,

H₂S : Sulfure d'hydrogène

Ha : Hectare

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

MSM: Mineral Salt Medium

N₂ : Diazote

NaCl : Chlorure de sodium

NO₂: Nitrite

NO₃: Nitrate

O₂: Dioxygène

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

pH: Potentiel d'hydrogène.

RM : Rouge de méthyle

TCP : 3,5,6-trichloro-2-pyridinol
rpm : rotation par minute.

TSI : Triple Sugar Iron

TTC : sel de tetrazolium

UHT : Upérisation à Haute Température

UIPP : Union des industries et de la protection des plantes

UV : ultraviolets

VF : viande foie

VP : Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du biote du sol en fonction de la taille du corps.....	5
Tableau 2 : Fiche technique de quelques types de pesticides.....	16
Tableau 3 : les colonies obtenues à partir de criblage sur milieu MSM solide additionné par des pesticides	41
Tableau 4 : Aspect macroscopique des colonies.....	41
Tableau 5 : photos des colonies.....	42
Tableau 6 : résultats de la coloration de gram	44
Tableau 7 : Résultats de test catalase.....	46
Tableau 8 : Résultats de test viande foie.....	47
Tableau 9 : Résultats de test TSI.....	48
Tableau 10 : Résultats de test de mannitol mobilité	50
Tableau 11 : Résultat de test citrate de Simmons.....	51
Tableau 12 : Résultats de test MEVAG.....	52
Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques et enzymatiques.....	57

Liste des figures

Figure 1 Composition approximative du sol (Daniels et Haering, 2006).	3
Figure 2 la diversité biologique du sol (Galet, 2003).....	5
Figure 3 le marché mondial des pesticides (Anonyme 4, 2011).	13
Figure 4 Quantité de produits phytopharmaceutiques importés en Algérie en tonnes depuis 1975 jusqu'à 2007 (Anonyme 5, 2010).....	13
Figure 5 Voies de dispersion des produits phytosanitaires dans l'environnement (Guignon-Moreau, 2006).....	14
Figure 6 la structure chimique de Bactimec - ABAMECTINE – (Mahmoud et al., 2021) 17	17
Figure 7 La structure chimique de Focus Ultra -Cycloxydime- (Monadjemi et al., 2014). 17	17
Figure 8 La structure chimique de Dekafate (Leroux 1994).....	17
Figure 9 la structure chimique de Mustang 360 SE (Bi et al., 2020).....	18
Figure 10 la structure chimique de Lamdoc 50 EC -Lambda-Cyhalothrine- (Aïna et al., 2015).18	18
Figure 11 carte de localisation de la wilaya de Mostaganem.....	24
Figure 12 Localisation d'El Touahria sur Google Maps.....	25
Figure 13 Terrain de l'échantillonnage.....	26
Figure 14 Schéma montre les étapes de préparation de milieu de criblage	28
Figure 15 schéma montre les étapes de criblage sur milieu solide	29
Figure 16 schéma montre la technique de test TTC (sel de tetrazolium).....	33
Figure 17 schéma montre la technique du lavage des cellules.....	39
Figure 18 Résultat de test TTC	45
Figure 19 Résultat de test nitrate réductase.....	46
Figure 20 Résultats de test viande foie.....	47
Figure 21 Résultats de test TSI	49
Figure 22 Résultats de test de mannitol mobilité	50
Figure 23 Résultat de test citrate de Simmons	51
Figure 24 Résultats de test MEVAG.....	52
Figure 25 Résultats des tubes King A sous les rayons UV	53
Figure 26 Résultats de test King B.....	53
Figure 27 Résultats de test de production de l'indole	54
Figure 28 Résultats de test VP et RM.	55
Figure 29 Résultat de test d'Amylase	55
Figure 30 Résultats de test d'Estérase.....	56
Figure 31 Résultats de test de protéolyse	56
Figure 32 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du lamdoc (200 mg/L)	58
Figure 33 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du Focus Ultra (200 mg/L).....	58
Figure 34 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du bactimec (200 mg/L).....	59
Figure 35 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du mustang (200 mg/L)	59
Figure 36 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du dekafeate (200 mg/L)	60

Figure 37 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du lamdoc (500 mg/L)	60
Figure 38 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du bactimec (500 mg/L)	61
Figure 39 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du Focus Ultra (500 mg/L)	61
Figure 40 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du dekafeate (500 mg/L)	62
Figure 41 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du mustang (500 mg/L)	62

Table des matières

Dédicace

Remerciement

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale : 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I. Généralité sur le sol agricole et ses microorganismes 3

1. Généralités sur le sol agricole 3

1.1 Définition 3

1.2 Composition de base du sol 3

1.3 Les facteurs influençant la formation du sol 4

2. Le sol agricole 4

2.1 Définition 4

2.2 Le sol agricole des pommes de terre 4

3. Les organismes vivants dans le sol 4

3.1 Classification du biote du sol 6

4. Diversité des micro-organismes du sol 6

4.1 Microorganismes procaryotes 6

4.2. Microorganismes eucaryotes 7

5. Action des organismes de sol 8

Chapitre II. Généralité sur les pesticides 9

1. Introduction 9

2. Définition et classification des pesticides 9

2.1. Définition 9

2.2. Classification 9

3. Composition et formulation 11

4. Domaines d'utilisation des pesticides 11

4.1. Dans l'agriculture 11

4.2. Dans l'industrie 12

4.3. Dans les constructions 12

4.4. En médecine.....	12
5. Marché des Pesticides.....	12
5.1. Dans le monde	12
5.2. En Algérie	13
6. Devenir des pesticides dans l'environnement	14
7. L'impact des pesticides sur l'environnement.....	15
8. L'impact des pesticides sur la santé humaine	15
9. Alternative aux pesticides chimiques.....	15
10. Fiche technique des pesticides	15
11. Structure chimique des pesticides	17
Chapitre III. Biodégradation des pesticides par les microorganismes de sol.....	19
1. La biodégradation des pesticides.....	19
1.1. Définition	19
1.2. Facteurs affectant la biodégradation	19
1.3. Différents types de biodégradation.....	20
1.5. La biodégradation et la génique microbienne.....	21
2. Les bactéries impliquent dans la biodégradation des pesticides.....	21
2.1 <i>Bacillus</i>	21
2.2 <i>Pseudomonas</i>	23
2.3. <i>Streptomyces</i>	24
<u>Partie II : Synthèse expérimentale</u>	
Chapitre I : Matériel et Méthodes	24
1. Situation Géographique	24
1.1 Localisation.....	24
1.2. Cadre pédologique	24
2. Objectifs du travail.....	25
3. Matériel.....	25
3.1 Les pesticides	25
3.2 L'échantillon du sol.....	25
4. Méthode	26
4.1. Échantillonnage du sol.....	26
4.2 Préparation de milieu de criblage.....	27
4.3. Criblage sur milieu MSM solide	29
4.4. Purification	30
4.5. Conservation.....	30

4.6. Caractéristiques macroscopique et microscopique	30
4.7. Les tests biochimiques	32
4.8 Tests enzymatiques	37
4.9 Tolérance des bactéries à différentes concentrations de pesticides sur milieu liquide (MSM liquide + pesticide)	38
Chapitre II : Résultats et Discussion	41
1. Résultat de criblage sur milieu MSM solide	41
2. Aspect macroscopique des colonies isolées	41
3. Observation microscopique	43
4. Les tests biochimiques	45
4.1 Tests respiratoires	45
4.2 Métabolisme glucidique	48
4.3 Isolement sur milieu King A et King B	52
4.4 Test de production de l'indole	53
4.5 Test de Clark & Lubs (VP-RM)	54
5. Tests enzymatiques	55
5.1 Test d'Amylase	55
5.2 Test d'Estérase	56
5.3 Test de protéolyse :	56
6. Résultats de tolérance des bactéries à différentes concentrations de pesticides sur milieu liquide (MSM liquide + pesticide)	58
7. Discussion :	63
Conclusion	65
Référence Bibliographique	66
Annexes	



Introduction

Générale :

Introduction générale :

Les avancées réalisées dans la protection des plantes ont grandement favorisé l'amélioration des rendements et la stabilité de la production. Les produits phytosanitaires de synthèse, qui sont facilement accessibles, faciles à utiliser et relativement abordables, se sont avérés extrêmement efficaces et fiables dans de nombreuses situations (**Auberto *et al.*, 2005**).

Après la 2^{ème} Guerre mondiale, l'utilisation des pesticides a joué un rôle crucial dans le progrès de l'agriculture en favorisant des rendements plus élevés et en aidant à contrôler la production agricole. De plus, l'application des produits phytosanitaires a permis de limiter voire d'éradiquer plusieurs maladies parasitaires extrêmement dangereuses (**Bourbia, 2013**).

En Algérie, l'utilisation croissante des pesticides à des fins agricoles est directement liée à l'augmentation des surfaces cultivées. Chaque année, environ 400 substances actives de pesticides, regroupées dans environ 7000 produits différents, sont commercialisées dans le pays. Ces pesticides sont considérés comme des outils nécessaires, voire indispensables, pour les agriculteurs, car ils garantissent la rentabilité de la majeure partie de leur production (**Bouziyani, 2007**).

L'utilisation généralisée de ces produits est aujourd'hui remise en cause, étant donné que de plus en plus de personnes prennent conscience des risques potentiels qu'ils peuvent entraîner pour l'environnement et même pour la santé humaine.

Une proportion considérable des pesticides utilisés ne parvient malheureusement pas à atteindre leur cible prévue. Ces substances chimiques se dispersent largement dans l'atmosphère, que ce soit pendant leur application, par évaporation ou par dispersion depuis les plantes ou les sols sur lesquels elles sont répandues. En raison du vent, ces pesticides peuvent se déplacer sur de longues distances par rapport à leur point d'épandage initial, avant de retomber sur les plans d'eau et les sols avec les précipitations. Par la suite, ils sont entraînés vers les écosystèmes aquatiques par les eaux de pluie, à travers le ruissellement et l'infiltration (**Fenske *et al.*, 2002**).

Le sol joue un rôle essentiel dans la fourniture de divers services écologiques à l'humanité. Il sert de support physique à l'agriculture, en fournissant un milieu de croissance pour les plantes. De plus, il participe à la conservation et à la distribution des nutriments nécessaires aux plantes. Le sol est également responsable de la décomposition de la matière

organique morte et des déchets tels que les résidus agricoles et industriels. Il joue un rôle crucial dans le recyclage des nutriments et la régulation des cycles des éléments majeurs tels que le carbone, l'azote, le soufre et le phosphore (**Lavelle et Spain, 2001**).

Il est essentiel d'analyser les effets de ces produits dans les sols, car cela détermine leur impact sur d'autres aspects de l'environnement. Il est donc crucial d'étudier les sols et d'examiner comment les pesticides se comportent sur différents types de sols afin de comprendre, voire de prédire, comment ils se disperseront ultérieurement dans l'environnement (**SAIBI, 2008**).

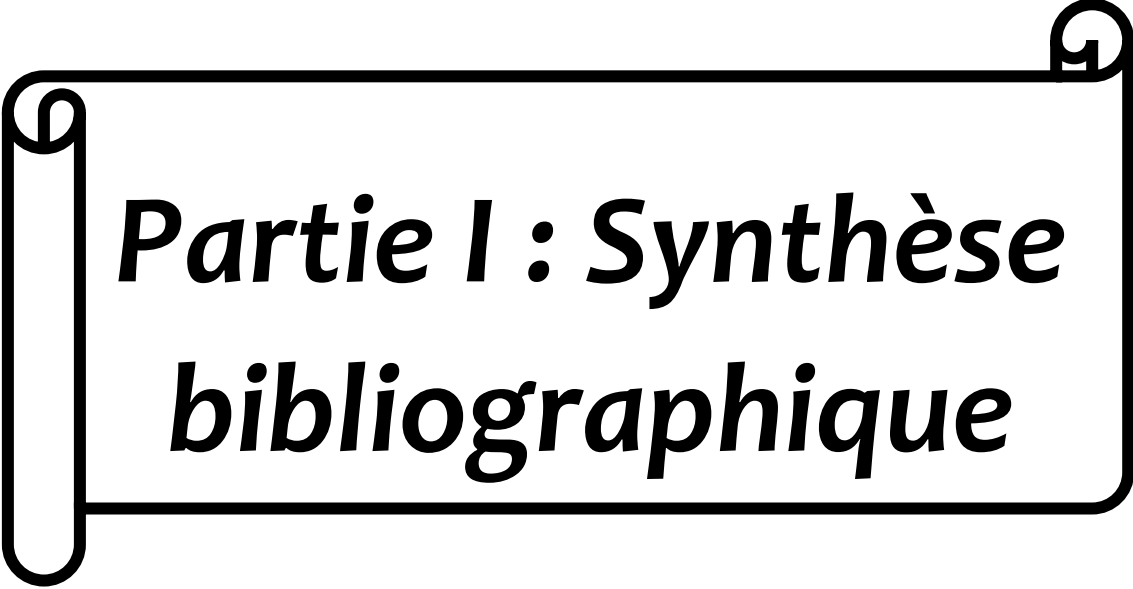
Nous avons la connaissance que les microorganismes présents dans le sol sont responsables de 90% des réactions chimiques impliquées dans le cycle de la matière organique et dans la fertilité chimique du sol. De plus, ces microorganismes ont la capacité de décomposer divers polluants en les utilisant comme source de nutriments (**Prosser, 2002 ; Lavelle et al., 2005**).

La dégradation des insecticides par ces endosymbiotes a été étudiée en détail par plusieurs chercheurs et ces isolats se sont avérés capables de se développer de manière sélective sur milieu additionné d'une quantité substantielle de pesticide (**Blanton et Peterson, 2020**).

C'est dans ce contexte que la présente étude intitulée « Etude de la croissance microbienne de bactéries isolées de sols agricoles pollués par des pesticides » a été vue jour afin d'acquérir une meilleure connaissance sur l'effet des pesticides sur les microorganismes du sol et leurs utilisations dans les biodégradations de ces substances nocives (**Cycon et al., 2017**).

Le présent mémoire comprend trois parties : la première est consacrée à une synthèse bibliographique qui regroupe 3 chapitres, le premier présente un aperçu sur le sol et ses microorganismes, le deuxième présente une généralité sur les pesticides et le troisième est consacré pour la biodégradation des pesticides. La seconde partie présente 2 chapitres, le 1er chapitre indique la méthodologie adoptée pour atteindre les objectifs fixés et le 2ème rend compte des résultats et de la discussion.

En fin de compte, nous sommes arrivés à une conclusion qui comprend un résumé de l'idée générale d'un ensemble d'études ainsi que des perspectives qui pourront être appliquées ultérieurement.



***Partie I : Synthèse
bibliographique***



Chapitre I :
Généralité sur le sol agricole
et ses microorganismes

Chapitre I. Généralité sur le sol agricole et ses microorganismes

1. Généralités sur le sol agricole

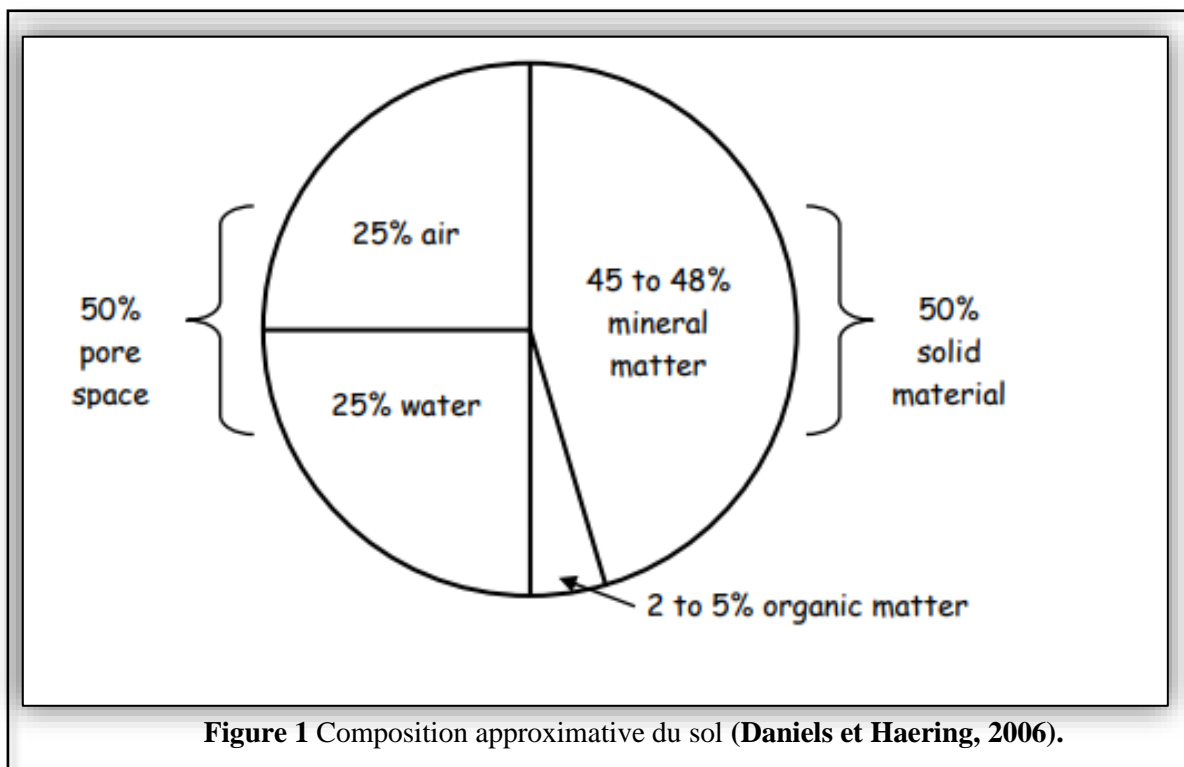
1.1 Définition

Le sol recouvre d'une fine couche la majeure partie de la partie exposée de la terre. Il fournit de l'air, de l'eau, des nutriments et un support mécanique aux racines des plantes en croissance (**Daniels et Haering, 2006**).

L'une des définitions récentes du sol est la couche de matière minérale et/ou organique généralement meuble, affectée(s) par des processus physiques, chimiques et/ou biologiques, qui contient généralement des liquides, des gaz et des biotes et qui abrite des plantes (**Van es et Harold, 2017**).

1.2 Composition de base du sol

Les composants de base du sol sont les minéraux, la matière organique, l'eau et l'air. La figure 1 montre la composition approximative du sol, un sol typique est composé d'environ 45 % à 48% de minéraux, 2 à 5 % de matières organiques, 25 % d'eau et 25 % d'air. Ces pourcentages ne sont au mieux que des généralisations. En réalité, le sol est très complexe et dynamique (**Daniels et Haering, 2006**).



1.3 Les facteurs influençant la formation du sol

La formation du sol est un processus à long terme. Il faut plusieurs millions d'années pour former une fine couche de sol. Le sol étant un mélange complexe de divers composants, sa formation est également plus complexe. La formation d'un type particulier de sol dépend des propriétés physico-chimiques de la roche mère, de l'intensité et de la durée de l'altération, du climat et d'autres paramètres (**Balasubramanian, 2017**).

Hans Jenny, pédologue, a suggéré que le type de sol trouvé sur un site dépend de l'interaction de cinq facteurs. L'équation des facteurs d'état de Jenny pour la genèse des sols :

$S = f(C, O, R, P, T, \dots) \rightarrow C = \text{Climat}, O = \text{Organismes}, R = \text{Relief (topographie)}, P = \text{Matériau parental}, T = \text{Temps}, \dots = \text{Autres facteurs non spécifiés}.$

2. Le sol agricole

2.1 Définition

Une définition agricole du sol est "un corps naturel dynamique à la surface de la terre dans lequel les plantes poussent, composé de matériaux minéraux et organiques et de formes vivantes" (**Brady, 1974**). C'est une définition un peu classique du sol agricole.

2.2 Le sol agricole des pommes de terre

Les pommes de terre doivent être plantées dans un sol humifère profond, fertile et meuble, en plein soleil ou à mi-ombre, Le sol ne doit pas être trop humide et pas trop salé avec un PH neutre (pH = 5,5 à 6) (**Chaumeton et al., 2006**).

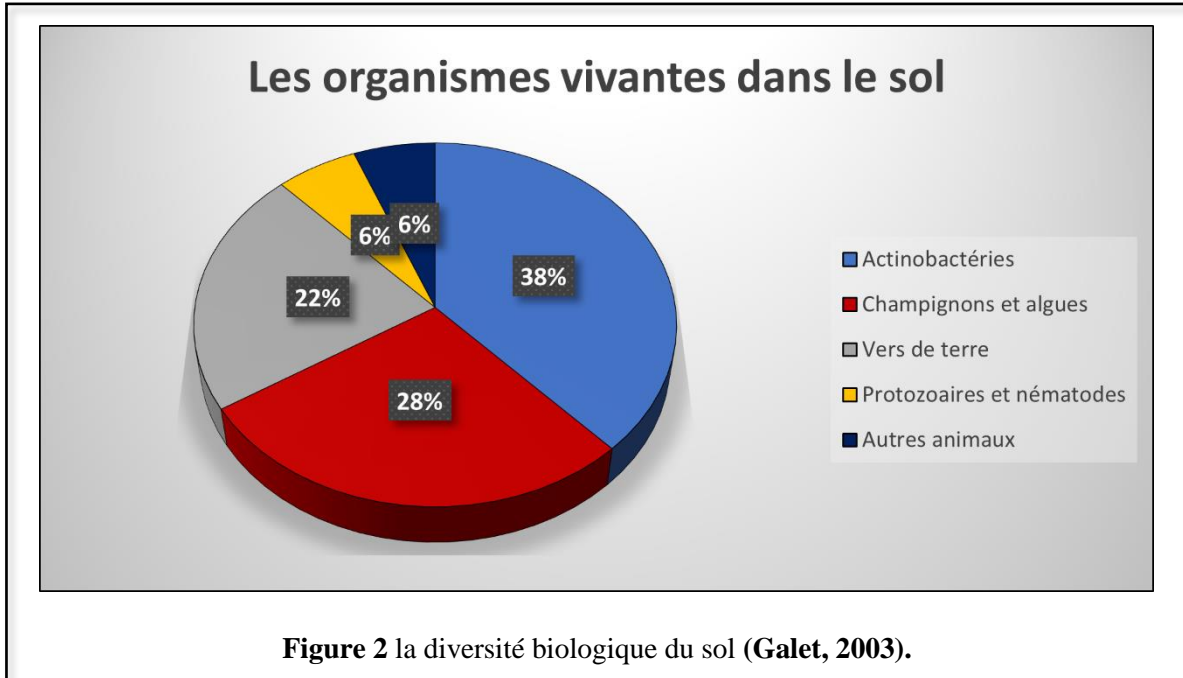
Généralement, les pommes de terre poussent mieux dans un sol à texture plus ou moins grossière que dans un sol à texture plus fine, ce qui empêche les grossissements des tubercules (**TOUMI, 2014**).

Les pommes de terre favorisent le sol léger sableux, ce type du sol donne un bon développement de la plante et le lessivage des sels, le développement rapide des racines et des tubercules de cette plante facilite les travaux du sol (**Anonyme 1, 2015**).

3. Les organismes vivants dans le sol

En raison de leurs propriétés chimiques et physiques très différentes, les sols offrent un habitat très diversifié aux organismes qui les habitent. La figure 2 représente un schéma de la diversité biologique du sol. C'est donc un réservoir de vie extrêmement riche, dans

lequel vivent plantes, des animaux, en plus une communauté microbienne très diversifié. Selon (Gobat *et al.*, 2003) Les organismes vivants du sol sont constitués de (38 %), champignons et algues (28%), protozoaires et nématodes (6 %), vers de terre (22 %) et autres animaux (6 %).



Les composants libres du biote du sol sont les bactéries, les champignons, les algues, les actinomyotes et la faune (Sharmilia *et al.*, 2008), le tableau 1 montre la classification du biote du sol.

Tableau 1. Classification du biote du sol en fonction de la taille du corps (Sharmilia *et al.*, 2008)

Organism	Taille (mm)	Exemples
Microflore	< 1	Bactéries, algues, champignons, actinomycètes
Microfaune	< 2	Protozoaires, nématodes
Mésafaune	2-10	Collemboles, acariens
Macrofaune	>10	Vers de terre, termites, escargots, arachnides

3.1 Classification du biote du sol

Tous les êtres vivants peuvent être classés dans l'un des cinq règnes fondamentaux de la vie, à savoir Monera, Protista, Fungi, Plantae, Animalia.

1. Royaume Monera : comprend les procaryotes - organismes unicellulaires qui ne possèdent pas de noyau, par exemple les bactéries, les actinomycètes et les algues bleues.
2. Règne Protista : comprend les organismes unicellulaires qui possèdent un noyau, par exemple les algues nucléées et les moisissures visqueuses
3. Royaume des champignons : Ces eucaryotes non mobiles sont dépourvus de flagelles et développent des spores, comme les levures, les moisissures et les champignons.
4. Royaume des plantes : ces eucaryotes se développent à partir d'embryons et utilisent la chlorophylle, comme les mousses et les plantes vasculaires
5. Règne Animalia : les eucaryotes multicellulaires se développent à partir d'une blastula (une boule de cellules en forme de halo) **Sharmilia et al., 2008.**

4. Diversité des micro-organismes du sol

Les micro-organismes du sol tels que les champignons, les bactéries, les protozoaires et les virus représentent une fraction considérable de la biomasse vivante de la Terre. Ils ont estimé que les sols de surface contiennent 10^3 à 10^4 kg de biomasse microbienne par hectare. (**Fierer et al., 2007**).

Si l'on considère la biomasse que présente chaque groupe dans le sol, les micro-organismes sont les plus abondants. Les groupes suivants sont courants dans le sol :

4.1 Microorganismes procaryotes

a. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, Ils ont été les premiers organismes à apparaître sur terre il y a environ trois milliards d'années. Les bactéries sont à l'origine de toutes les autres formes de vie (**Callenbach, 1998**).

Les bactéries sont très petites, les plus grandes dépassant rarement quatre à cinq micromètres (μm) ou 0,004 à 0,005 millimètre de longueur. Ils se présentent sous différentes formes (formes en spirale, en bâtonnet et rondes), les deux premières formes sont plus courantes dans les sols (**Gobat, et al., 2004**).

De nombreuses bactéries sont capables de produire des spores qui leur permettent de supporter des conditions défavorables. Les bactéries du sol sont soit autotrophes, soit hétérotrophes. Les autotrophes tirent leur énergie de l'oxydation des éléments minéraux du sol. Cependant, la plupart des bactéries sont hétérotrophes ; leurs besoins en énergie et en carbone proviennent directement de la matière organique. (Gobat *et al.*, 2004).

b. Les Actinobactéries

Les actinomycètes sont l'une des principales composantes des populations microbiennes présentes dans le sol. Ils appartiennent à un groupe étendu et diversifié de bactéries Gram-positives, aérobies et mycéliennes qui jouent un rôle écologique important dans le cycle des nutriments du sol. En outre, ils sont connus pour leur importance économique en tant que producteurs de substances biologiquement actives, telles que les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (De boer *et al.*, 2005).

4.2. Microorganismes eucaryotes

a. Les Champignons

Les champignons sont un royaume d'organismes eucaryotes généralement multicellulaires qui sont hétérotrophes (incapables de produire leur propre nourriture) et jouent un rôle important dans le cycle des nutriments au sein d'un écosystème. Les champignons se reproduisent à la fois de manière sexuée et asexuée, et ils ont également des associations symbiotiques avec des plantes et des bactéries. Cependant, ils sont également responsables de certaines maladies chez les plantes et les animaux (Carlile *et al* 2001).

Les champignons du sol sont également abondants. Comme la plupart des bactéries, ils dépendent de la matière organique du sol pour leurs besoins en énergie et en carbone ou en reçoivent des racines des plantes en croissance. Le groupe de champignons le plus répandu dans le sol est celui des moisissures, qui peuvent se développer dans tous les types de sols, acides, neutres ou alcalins, mais préfèrent les sols légèrement acides (Tedersoo *et al* 2014).

b. Les protozoaires

Les protozoaires sont des eucaryotes aérobies unicellulaires. Ils possèdent un noyau, des organites complexes et se nourrissent par absorption ou ingestion grâce à des structures

spécialisées. Ils constituent le groupe d'organismes le plus important au monde en termes de nombre, de biomasse et de diversité. Leurs parois cellulaires sont constituées de cellulose (**Li et al, 1996**). Les protozoaires utilisent divers moyens pour se déplacer dans le sol. Ils sont principalement des consommateurs secondaires de matières organiques, se nourrissant de bactéries, de champignons, d'autres protozoaires et de molécules organiques dissoutes dans l'eau du sol (**Cavalier-smith et al, 1993**).

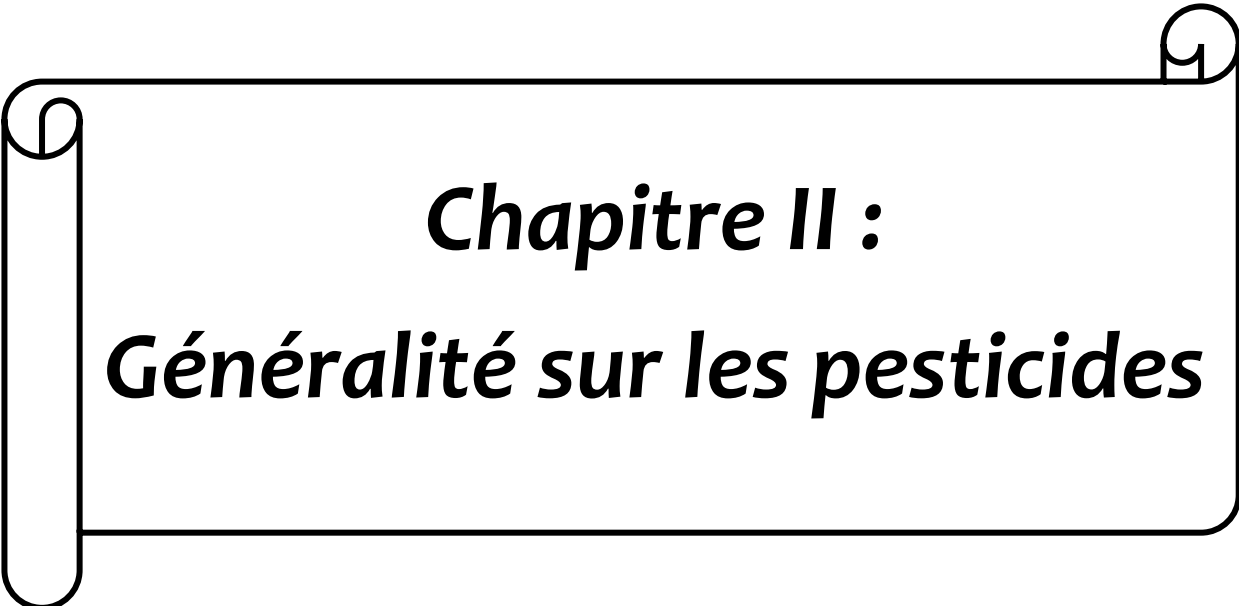
c. Les algues

Les algues du sol sont généralement des organismes chlorophylliens et, comme les plantes supérieures, elles sont capables de réaliser la photosynthèse. Les algues se trouvent en abondance dans les sols inondés des marécages et des rizières, ainsi qu'à la surface des sols mal drainés et dans les dépressions humides. Les algues peuvent également se trouver dans des sols relativement secs et elles forment des relations mutuellement bénéfiques avec d'autres organismes. Parmi les quatre groupes d'algues, ce sont les algues bleues qui sont les plus abondantes et les plus importantes sur le plan écologique dans les sols tropicaux (**Samolov et al 2021**).

5. Action des organismes de sol

Les organismes du sol sont très importants en agriculture parce qu'ils sont les médiateurs de nombreux processus bénéfiques qui comprennent le recyclage des nutriments des plantes : des nutriments tels que l'azote, le phosphore et le soufre qui se présentent principalement sous forme de composés organiques, etc. Au cours de la décomposition, les organismes du sol décomposent ces composés et convertissent les nutriments en formes inorganiques que les plantes peuvent absorber par leurs systèmes racinaires (**Newton et Chantal, 2010**).

Les microbes (bactéries, *Achaea*, champignons et protozoaires) sont très importants dans tous les processus liés à la fonction du sol. Les constituants microbiens du sol sont entièrement responsables de la décomposition de la matière organique et de la dégradation des molécules toxiques. Et d'autres bactéries ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes -PGPR- (**Adekunle et Dafiwahare 2011**).



Chapitre II :
Généralité sur les pesticides

Chapitre II. Généralité sur les pesticides

1. Introduction

La pollution des sols est un problème mondial qui trouve son origine dans des sources anthropologiques et naturelles. L'urbanisation, l'industrialisation et l'augmentation de la demande alimentaire ont nécessité l'utilisation de composés, de substances et d'agents chimiques qui, au fil des ans, ont entraîné la dispersion et l'accumulation de polluants dans l'environnement. Les polluants les plus courants présents dans le sol sont les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou les pesticides (**Mirsal et al, 2008**).

2. Définition et classification des pesticides

2.1. Définition

Le mot pesticide composé de deux parties : le suffixe « cide » qui a pour origine le verbe latin « caeder » qui signifie « tuer ». On lui a adjoint la racine anglaise « Pest » qui signifie animal ou plantes nuisibles à la culture (**Colin, 2000**).

Les pesticides se réfèrent à toutes les substances ou compositions utilisées pour éliminer les organismes indésirables, qu'ils soient utilisés dans le domaine agricole ou dans d'autres applications. La substance active, autrefois appelée matière active, est la composante qui éradique ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les plantes, les parties des plantes ou les produits végétaux. Ces substances actives sont souvent associées à plusieurs "formulants" tels que des mouillants, des solvants et des anti-mousses, qui permettent à l'agriculteur de les utiliser plus efficacement (**Anonyme 2, 2005**).

2.2. Classification

Nous pouvons classer les pesticides en fonction de leur composition chimique, de leur cible (insectes, herbes, champignons, bactéries, algues, etc.), de leur formulation (émulsions concentrées, poudres mouillables, solutions aqueuses, granulés) et de leur niveau de toxicité (modérément toxique, hautement toxique, extrêmement toxique) (**Bouchon et Lemoine 2003**). On peut catégoriser les pesticides de trois manières différentes : par leurs caractéristiques chimiques, par les organismes vivants visés et par leur usage (**Calvet et al., 2005**).

a. Selon leurs caractéristiques chimiques

❖ **Les pesticides organiques** : Ces substances synthétiques à base de carbone peuvent être produites en laboratoire ou se trouver naturellement dans la nature. Elles peuvent être d'origine animale, végétale ou microbienne, comme les Organochlorés, les Organophosphorés, les Carbamates, les Triazines et l'urée substituée (Agoussar, 2017).

❖ **Les pesticides inorganiques** : Il s'agit d'éléments qui ne se dégradent pas et qui sont principalement obtenus à partir de minéraux contenant du cuivre, de l'arsenic, du cyanure, du soufre, et ainsi de suite (Agoussar, 2017). Après leur utilisation, ces produits ont un impact toxique important sur l'environnement en raison de leur accumulation dans les sols, parmi lesquels le plomb et le mercure sont considérés comme les plus dangereux (Mokhtari, 2012).

❖ **Les biopesticides** : Les biopesticides sont des substances élaborées à partir de plantes, d'animaux ou d'organismes vivants bénéfiques tels que les bactéries, les moisissures, les virus et certains nématodes, qui sont utilisées pour lutter contre les ravageurs et les maladies des cultures (Mokhtari, 2012). Un exemple de substance utile dans la lutte contre les nuisibles est le *Bacillus thuringiensis*, qui peut agir comme insecticide pour éliminer les moustiques porteurs du paludisme et les lépidoptères qui endommagent les cultures. Ces produits jouent un rôle important dans la gestion des ravageurs (Agoussar, 2017).

b. Selon les organismes vivants ciblés

❖ **Les Insecticides** : Les insecticides sont des produits chimiques qui ont pour fonction de tuer les insectes, de bloquer l'éclosion des œufs, de perturber le développement normal des larves ou d'empêcher la maturation sexuelle (Faurie et al 2003). Il s'agit d'un groupe de pesticides majeur qui comprend plusieurs familles de produits, notamment les insecticides organophosphorés, les insecticides à base de plantes et d'autres produits similaires (Vega et al, 2005).

❖ **Les Fongicides** : Les fongicides ont pour fonction d'éliminer ou de limiter la propagation des champignons parasites qui affectent les plantes. Ils peuvent agir de différentes manières sur ces organismes, notamment en bloquant leur système respiratoire ou leur division cellulaire, ou encore en perturbant la production de stérols, d'ARN polymérase ou d'adénosine désaminase (Aloui, 2020).

❖ **Les Herbicides** : Les phénoxydes, triazines, amides, dinitro-anilines dérivées d'urée, sulfonilurées et uraciles sont des substances largement utilisées dans le monde pour éliminer les mauvaises herbes des cultures, en termes de tonnage et de surface traitée (**Benziane, 2014**).

3. Composition et formulation

Les produits phytosanitaires sont composés de substances chimiques minérales ou organiques, qu'elles soient synthétiques ou naturelles. La plupart des produits utilisés actuellement sont d'origine organique, bien que certains soient extraits ou dérivés de plantes.

Les formulations de ces produits sont généralement constituées d'une ou plusieurs substances actives et d'un ou plusieurs adjuvants. La substance active agit de manière générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou les végétaux, conférant ainsi au produit l'effet souhaité. L'adjuvant, quant à lui, est une substance dépourvue d'activité biologique jugée suffisante dans la pratique, mais capable de modifier les propriétés physiques, chimiques ou biologiques des produits phytosanitaires. Il renforce l'efficacité, la sécurité et la facilité d'utilisation du produit (**Anonyme 3, 2006**).

La formulation d'un produit phytopharmaceutique désigne également la présentation physique sous laquelle il est commercialisé. Cette formulation est obtenue en mélangeant les substances actives avec des adjuvants et peut se présenter sous différentes formes, qu'elles soient solides ou liquides. La concentration en substances actives est exprimée en grammes par litre (g/l) pour les formulations liquides et en pourcentage (%) pour les formulations solides. La quantité recommandée d'utilisation du produit commercialisé est exprimée en litres par hectare (l/ha) pour les formulations liquides et en kilogrammes par hectare (ou parfois en grammes par hectare) pour les formulations solides. La quantité recommandée d'utilisation en substances actives est toujours exprimée en grammes par hectare (g/ha) (**Alamine, 2020**).

4. Domaines d'utilisation des pesticides

4.1. Dans l'agriculture

Les pesticides sont employés en agriculture afin d'améliorer la stabilité des rendements et de réduire les pertes de récolte causées par les maladies fongiques, les insectes et les rongeurs lors du stockage. En outre, ces produits chimiques sont largement utilisés pour protéger les bâtiments agricoles et les équipements d'élevage. En somme, la protection

des infrastructures agricoles est la raison principale de l'utilisation de ces produits (**Calvet et al., 2005**).

4.2. Dans l'industrie

Les pesticides sont employés dans diverses industries pour préserver les produits en cours de fabrication, tels que les textiles et les papiers, afin de lutter contre les moisissures dans les circuits de refroidissement, de combattre les algues, et de désinfecter les locaux (**Zeboudji, 2005**).

4.3. Dans les constructions

Les pesticides sont appliqués dans le domaine de la construction pour protéger le bois et d'autres matériaux (**Zeboudji, 2005**).

4.4. En médecine

Ces produits sont couramment employés en médecine pour limiter la croissance de certains micro-organismes dans les produits vétérinaires, ainsi que pour prévenir la propagation de maladies transmises par des vecteurs tels que le paludisme, le typhus, et la malaria, contribuant ainsi à limiter la propagation des épidémies. Selon l'OMS, le DDT, seul insecticide connu, a permis de sauver la vie de 25 millions de personnes touchées par le paludisme (**Boland et Florijn, 2004**).

5. Marché des Pesticides

5.1. Dans le monde

Environ 100 000 spécialités commerciales sont approuvées pour la vente à travers le monde, sont créées à partir de 900 actifs différents. Chaque année, 15 à 20 nouveaux ingrédients actifs sont ajoutés à cette liste, Au cours des dernières années, le marché mondial, qui représente environ 40 milliards de dollars, est resté relativement stable. La figure 3 montre le marché mondial des pesticides, il convient de souligner que certains événements météorologiques récents, tels que les vagues de chaleur et la sécheresse en Europe et les précipitations en Océanie, ont eu une forte incidence sur ces chiffres, notamment en Europe et en Amérique du Nord (**Bouziyani, 2007**).

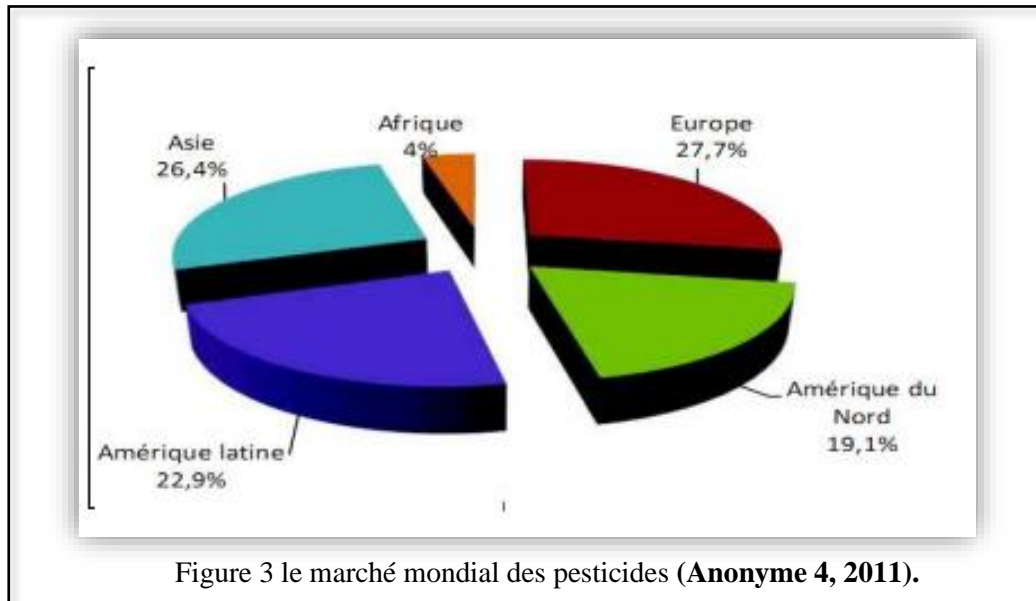


Figure 3 le marché mondial des pesticides (Anonyme 4, 2011).

5.2. En Algérie

Des organismes indépendants tels qu'Asmidal et Moubydal ont été responsables de la production de pesticides en Algérie. Toutefois, en raison de l'économie du marché actuel, de nombreuses entreprises se concentrent sur l'importation d'insecticides et d'autres produits similaires. Il existe environ 400 produits phytosanitaires homologués en Algérie, parmi lesquels une quarantaine de variétés sont couramment utilisées par les agriculteurs, C'est la loi n° 87-17 du 1er août 1987, relative à la protection phytosanitaire, qui a instauré au départ les mécanismes qui permettent une utilisation efficace des pesticides (Bouziane, 2007), la figure 4 montre la quantité de produits phytopharmaceutiques importés en Algérie en tonnes depuis 1975 jusqu'à 2007.

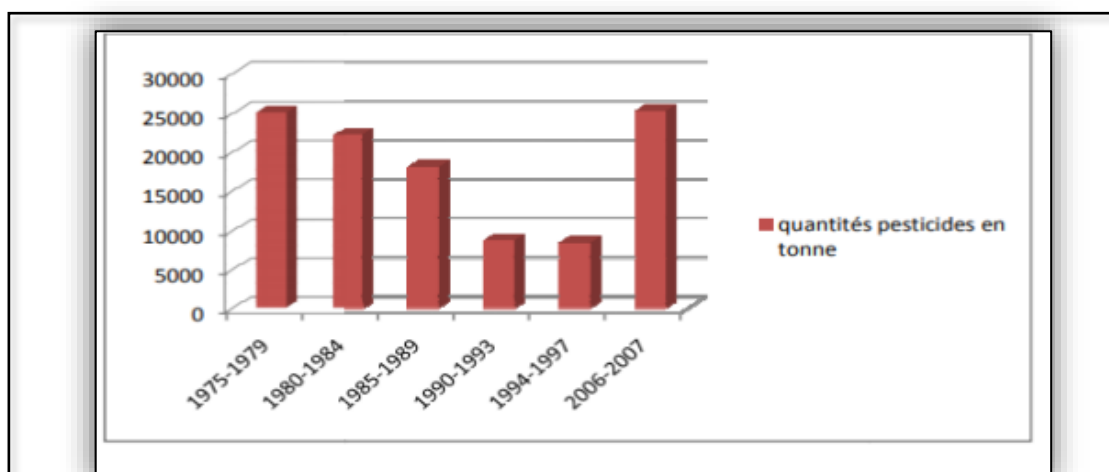
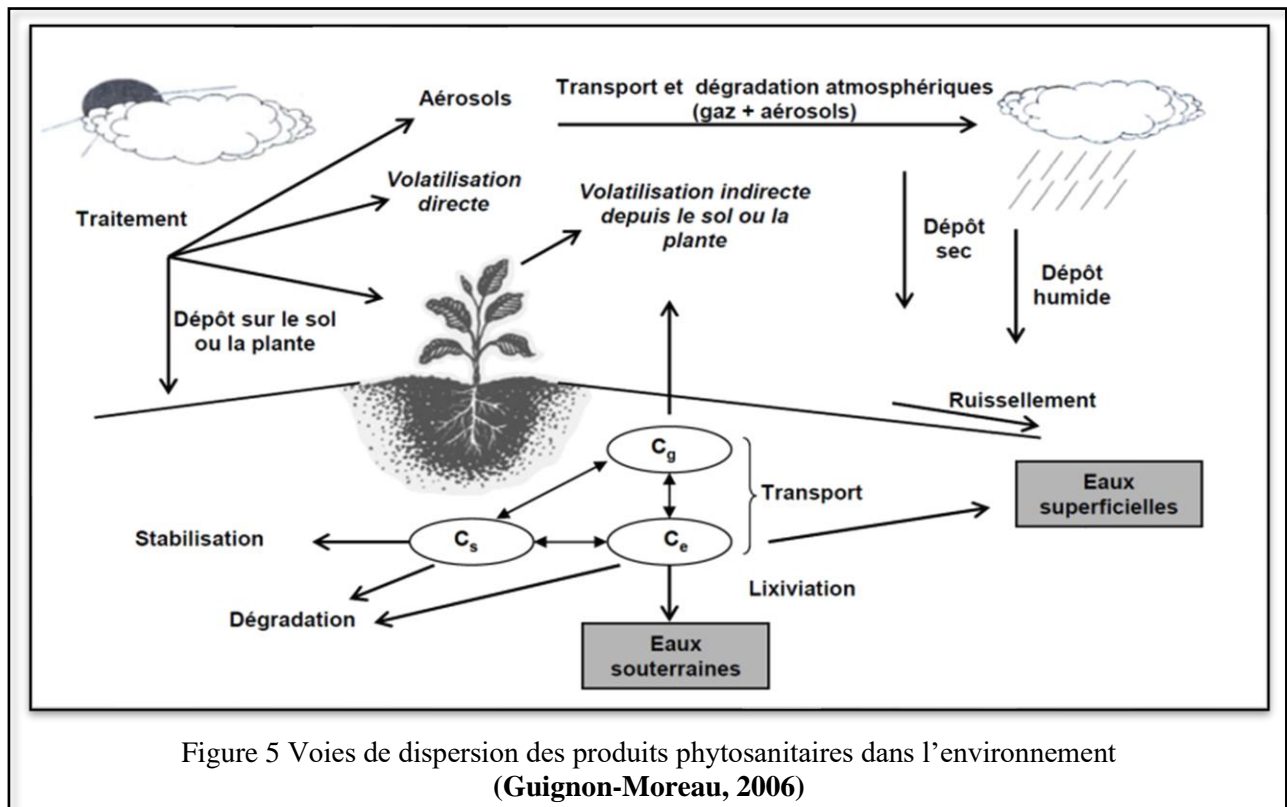


Figure 4 Quantité de produits phytopharmaceutiques importés en Algérie en tonnes depuis 1975 jusqu'à 2007 (Anonyme 5, 2010).

6. Devenir des pesticides dans l'environnement

Lorsque les pesticides sont utilisés, les molécules actives qui ne parviennent pas à atteindre leur cible peuvent se retrouver dans l'environnement, contribuant ainsi de manière significative à la pollution diffuse. Dans les milieux naturels, ces molécules subissent trois processus importants : l'adsorption, la dispersion (entraînement du produit par ruissellement, etc.) et la dégradation biotique ou abiotique (**Johnson et coll., 2003 ; Zertal et coll., 2005**). La figure 5 illustre la trajectoire des molécules actives des pesticides dans différents compartiments de l'environnement.



Les voies de dissipation potentielles des pesticides à partir du sol sont représentées par :

C_g : dispersion par volatilisation.

C_s : dispersion par dégradation ou stabilisation.

C_e : dispersion par solubilisation dans l'eau

7. L'impact des pesticides sur l'environnement

Il est important de prendre en compte les risques liés à l'utilisation non réglementée de pesticides, car cela peut non seulement affecter les espèces cibles, mais aussi directement ou indirectement menacer la biodiversité animale et végétale. Cela peut mettre en péril la survie de nombreuses espèces et perturber les réseaux trophiques, les écosystèmes terrestres et aquatiques (**Mahmood *et al*, 2016 ; Houyvet 2019**).

8. L'impact des pesticides sur la santé humaine

La dissémination généralisée des pesticides au cours des dernières décennies et leur utilisation persistante ont entraîné des conséquences dramatiques sur la santé, en particulier pour les groupes vulnérables comme les nourrissons et les enfants. Ces produits chimiques ont été détectés dans de nombreux organismes, y compris chez les populations humaines, ce qui soulève des préoccupations quant à leur impact sur la santé à long terme (**Rajveer *et al*, 2019 ; Mahmood *et al*, 2016**).

9. Alternative aux pesticides chimiques

Les méthodes chimiques de protection des plantes sont utilisées depuis des décennies. Depuis quelque temps, la société s'intéresse aux risques pour la santé humaine résultant de l'utilisation excessive de produits de protection chimique. Pour protéger la santé des hommes, des animaux et de l'environnement, en donnant la priorité aux méthodes biologiques de protection des plantes, comme l'utilisation des micro-organismes (bactéries, levures, champignons). L'application des pesticides biologiques recommandés dans les systèmes de lutte intégrée contre les ravageurs pourrait améliorer de manière significative la qualité du sol, de l'environnement et de la santé humaine (**Książek-Trela et Szpyrka, 2022**).

10. Fiche technique des pesticides

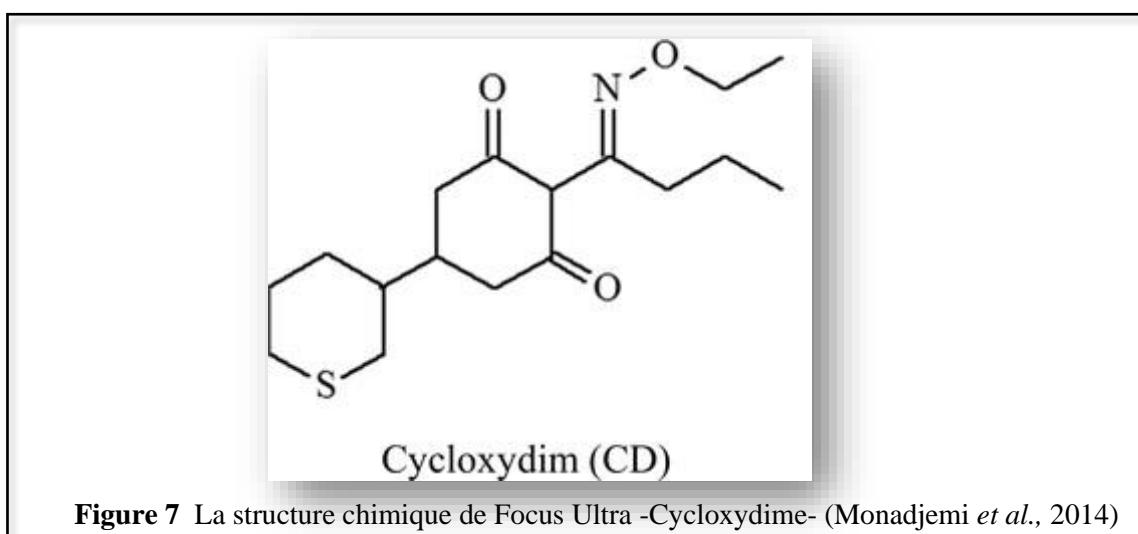
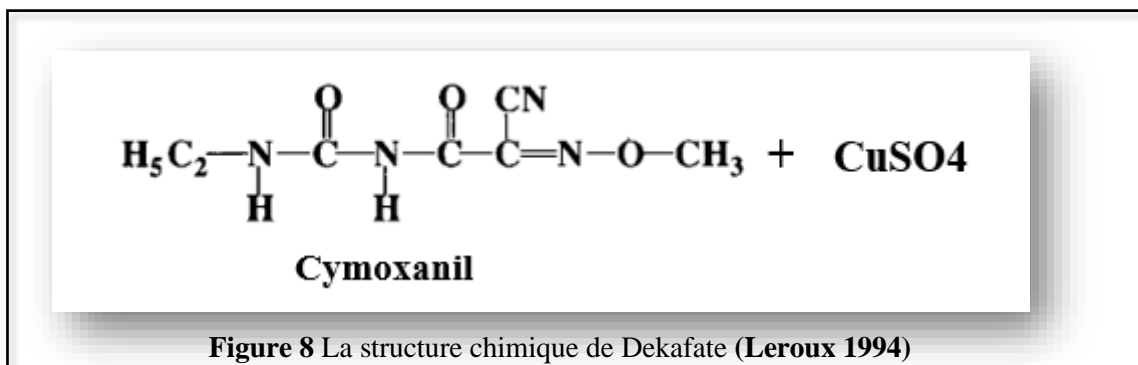
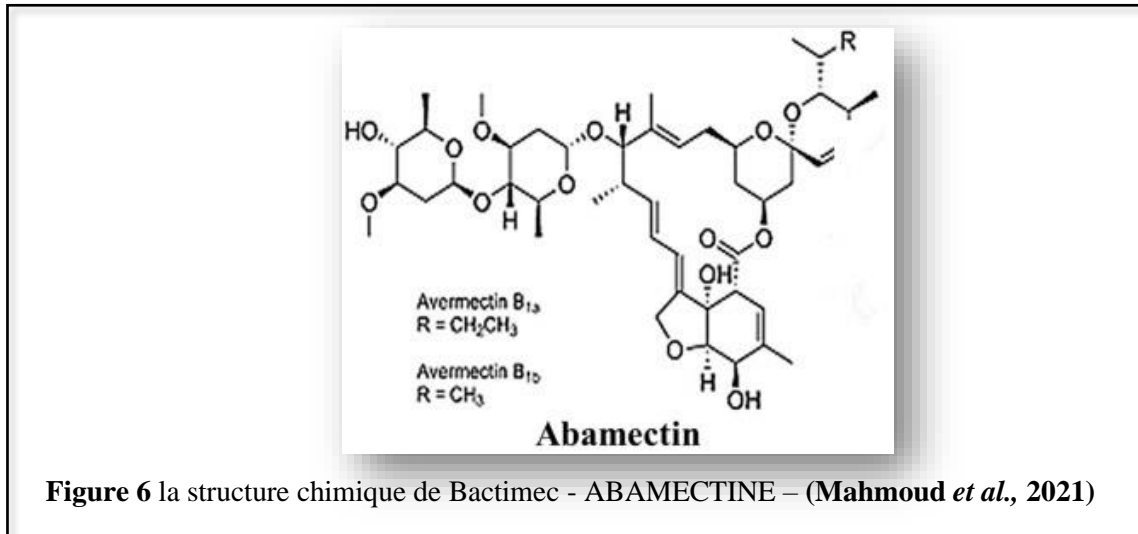
Le tableau 2 représente une fiche technique générale de quelques types de pesticides utilisés dans l'agronomie et la culture de la pomme de terre.

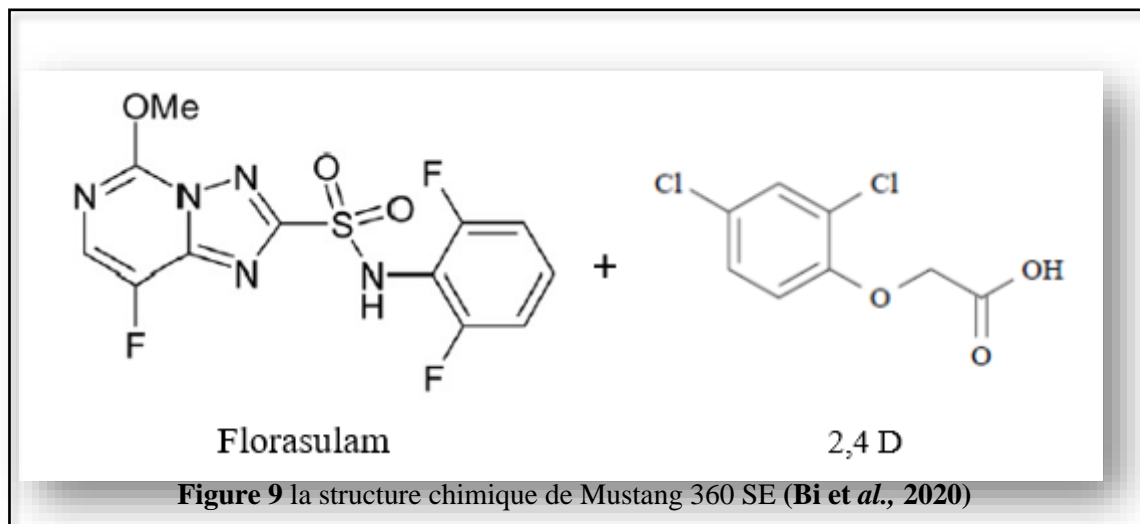
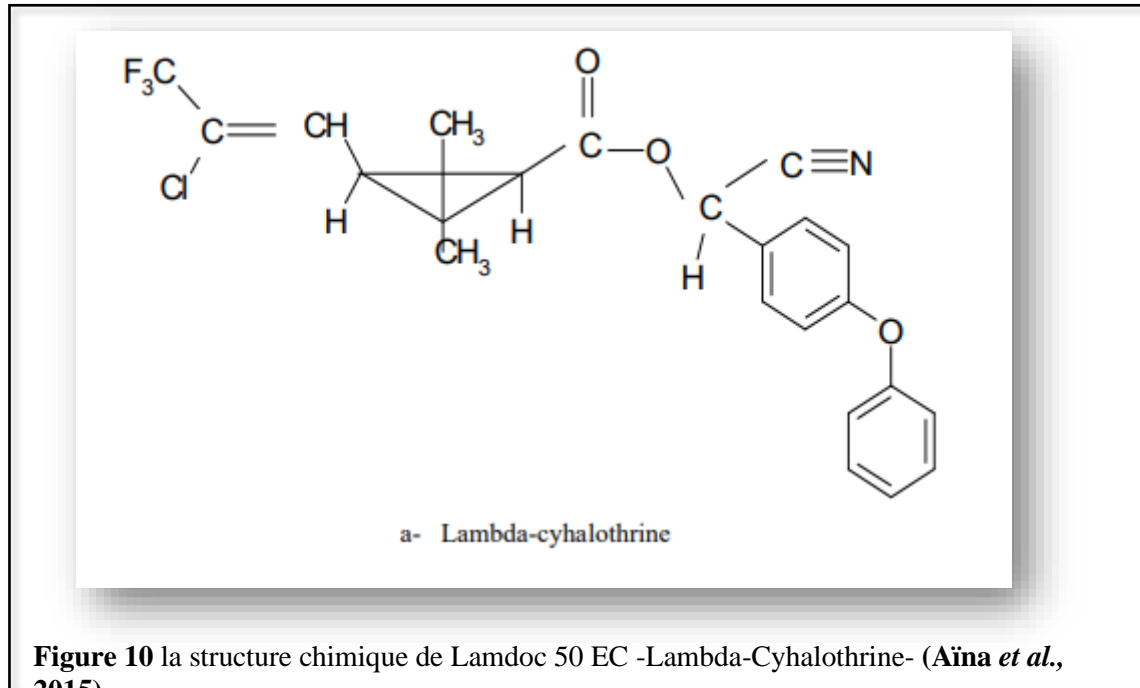
Tableau 2 : Fiche technique de quelques types de pesticides

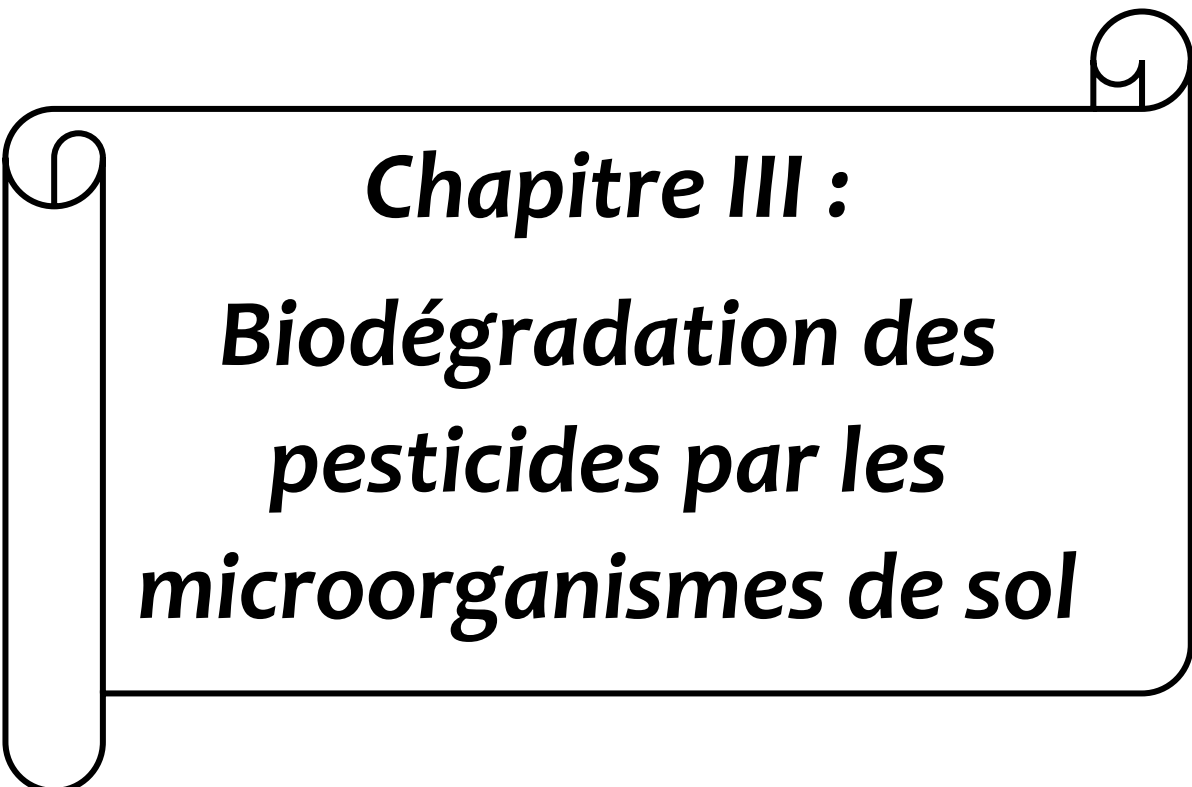
Nom commercial / N° d'homologation	Matière Active	Concentration	Déprédateurs	Cultures	Doses d'utilisation
Bactimec (insecticide) / 19 58 40	ABAMECTINE	18 G/L	Mineuse Acariens Mineuse Psylle	Agrumes Cultures maraîchères Cucurbitacée Arboriculture Agrumes	25-50 ml/hl
BONALAN (herbicide) / 17 56 024	Benfluraline	180 g/l	Graminées annuelles/ dicotylédones	Luzerne	7 l/ha
BYSPORE (fungicide) / 20 59 177	Chlorhydrate de propamocarbe	722 G/l	Mildiou	Tomate	3l/ha
CABRIO DUO (fungicide) / 17 56 012	Dimethomorphe + Pyraclostrobine	72 g/l + 40g/l	Mildiou	Culture maraichères	2,5 l/ha
Dekafate (fungicide) / 56 344 16	CYMOXANIL + SULFATE DE CUIVRE	16% + 20%	Mildiou Alternaria	Vigne Pomme de terre Tomate	750 g/ha
Focus Ultra herbicide) / D10-1-001	Cycloxydime	100g/l	Repousses des céréales Adventices graminées annuelles et vivaces	Vigne Tomate Agrume	4l/Ha
Lamdoc 50 EC (insecticide) / 17 57 18	Lambda-Cyhalothrine	5%	Cératite Carpocapse Pucerons Cicadelle	Agrumes Tabac Légumineuse	170-250 ml/Ha
Mustang 360 SE (herbicide) / 14 54 031	FLORASULA M+ 2,4 D	6,25 G/L + 300 G/L	Adventices dicotylédones	Blé	0,6 L/Ha
UPHOLD (insecticide) / 19 58 100	Methoxyfenozid + Spinetoram	300g/l + 60g/l	Noctuelles	Cucurbitacée	0,35 l/ha

11. Structure chimique des pesticides

Les figures suivantes représentent la structure chimique de quelques types de pesticides utilisés dans l'agronomie et la culture de la pomme de terre.







Chapitre III :
***Biodégradation des
pesticides par les
microorganismes de sol***

Chapitre III. Biodégradation des pesticides par les microorganismes de sol

1. La biodégradation des pesticides

1.1. Définition

La biodégradation implique une altération structurelle induite biologiquement d'un composé initial, ce qui modifie son intégrité moléculaire. Toutefois, cette transformation ne peut avoir lieu que si le composé (en particulier les pesticides) est biodégradable, ce qui signifie que les microorganismes présents dans le sol ont les enzymes nécessaires pour le décomposer (**Barriuso et al., 2000**). Lorsque la microflore dégradante utilise directement une molécule comme source de carbone et d'énergie, cela est appelé métabolisme. En revanche, si les micro-organismes obtiennent l'énergie nécessaire à partir de la dégradation d'un autre substrat appelé Co-substrat, on parle de Co-métabolisme. Les réactions principales impliquées dans la biodégradation des pesticides par la microflore du sol comprennent des réactions d'hydrolyse, d'oxydation, de réduction et de conjugaison, qui génèrent parfois des métabolites plus polaires, plus solubles dans l'eau et potentiellement plus toxiques que le composé initial (**Yaron, 1989**).

1.2. Facteurs affectant la biodégradation

La dégradation biologique des produits phytosanitaires dépend de plusieurs facteurs tels que le nombre et le type de micro-organismes, l'activité métabolique d'un micro-organisme donné, la résistance du micro-organisme aux conditions environnementales, la concentration et la structure chimique du pesticide traité, et les facteurs environnementaux, tels que le pH, la température, l'humidité, la lumière, la salinité, la disponibilité des nutriments, et les niveaux d'oxygène et de dioxyde de carbone (**Huang et al., 2018**).

1. La relation entre la structure chimique du pesticide et sa biodégradabilité peut être utilisée pour identifier les groupements chimiques qui rendent le squelette carboné plus fragile ou plus stable (**Guimont, 2005**).
2. La relation entre la composition du sol et la persistance d'un pesticide peut être ambiguë. D'un côté, une concentration élevée de matière organique favorise le développement d'une microflore active qui peut dégrader les pesticides. D'un autre côté, cela peut entraîner une adsorption accrue des pesticides, ce qui peut empêcher leur dégradation (**Yaduraju, 1994**).

3. Le pH du sol peut affecter la dégradation des pesticides de plusieurs façons, notamment en influençant la flore microbienne et le temps de demi-vie des molécules. (**Hultgren *et al.*, 2002**).
4. La biodégradation n'est pas spécifiquement contrôlée par des facteurs pédo-climatiques tels que l'humidité et la température, mais plutôt par l'activité métabolique microbienne (**Yaron, 1989**).

Donc l'efficacité du processus de dégradation dépend des conditions atmosphériques optimales, c'est-à-dire de la température, du pH du sol, de l'humidité, etc (**Chishti *et al.*, 2013**).

1.3. Différents types de biodégradation

Bien qu'il existe un certain nombre de techniques de biodégradation, les plus importantes sont abordées ici :

a. Dégradation bactérienne

La dégradation des pesticides conduit à la formation de dioxyde de carbone (CO₂) et d'eau (H₂O) par l'oxydation des composés d'origine. Les bactéries utilisent ces produits de dégradation comme source d'énergie dans le processus de dégradation. L'efficacité de ce processus dépend de conditions atmosphériques optimales telles que la température, le pH du sol, l'humidité, etc. De plus, les modifications génétiques de différentes souches bactériennes, notamment par le biais de mutations, améliorent également l'efficacité des microbes appliqués. L'élimination biodégradable des pesticides présente des effets positifs sur la fertilité des sols agricoles (**Chishti *et al.*, 2013**).

b. Dégradation fongique

Les champignons, provenant de sources naturelles, peuvent être utilisés comme un moyen efficace de biodégradation des produits chimiques organiques toxiques. Une souche spécifique de champignon, le *Fusarium verticillioides*, est capable d'utiliser le lindane comme source de carbone et d'énergie en présence d'oxygène. Lorsque l'azote et le phosphore sont présents dans l'environnement, une plus grande efficacité de dégradation est observée (**Hai *et al.*, 2012 ; Pinto *et al.*, 2012**). Les facteurs environnementaux et la concentration de lindane et de levure ont joué un rôle essentiel dans l'amélioration de l'efficacité du processus de biodégradation. Différentes souches fongiques sont étudiées en raison de leur capacité à dégrader les pesticides DDD. Il est possible d'utiliser des souches

fongiques mixtes pour dégrader efficacement les insecticides mélangés, tels que le DDT et le chlorpyrifos, lorsque de faibles concentrations de ces insecticides sont utilisées (Kulshrestha *et al.*, 2010).

c. Dégradation enzymatique

Les enzymes jouent un rôle crucial dans la dégradation des pesticides, tant dans les plantes que dans les microbes du sol, ce qui permet la biorestauration de ces substances. L'efficacité de l'élimination des composés toxiques intermédiaires est favorisée par des conditions environnementales optimales (Kumar *et al.*, 2019). Pour le traitement du carbofuran, un insecticide présent dans les sols contaminés, une méthode appelée MSM est utilisée avec une bactérie nommée *Paracoccus* sp. YM3. Cette bactérie dégrade enzymatiquement le carbofuran en métabolites qui ont été analysés par HPLC (Peng *et al.*, 2008). Il est important de noter que cette bactérie utilise uniquement le carbofuran comme source de carbone.

1.5. La biodégradation et la génique microbienne

L'utilisation de micro-organismes pour la dégradation des pesticides présente un avantage vital. Cela est dû à la diversité, à la large distribution et à l'adaptation de voies métaboliques variables. Les groupes de gènes sont impliqués dans la dégradation microbienne. La manipulation génétique et la construction de bactéries d'ingénierie génétique sont également utilisées pour la dégradation des pesticides (Cui *et al.*, 2012). Les modifications de différents spécimens bactériens par le biais de mutations génétiques améliorent également l'efficacité des microbes utilisés (Chishti *et al.*, 2013).

2. Les bactéries impliquent dans la biodégradation des pesticides.

2.1 *Bacillus*

La biodégradation des pesticides est le plus souvent observée chez les bactéries du genre *Bacillus*. Leur capacité de biodégradation résulte de la production d'enzymes extracellulaires qui agissent sur une large gamme de composés organiques (Bass *et al.* 2011). Les enzymes participant à la biodégradation des pesticides par *Bacillus* sont : la laccase, l'estérase, l'hydrolase (Gangola *et al.* 2018).

a. *Bacillus amyloliquefaciens*

Lee *et al.*, (2016) en utilisant la souche APO1 de *B. amyloliquefaciens* dans le milieu minéral ont démontré la dégradation de la cyperméthrine (Insecticide) à un niveau de 45% en 5 jours.

Meng *et al.*, (2019a) ont démontré la dégradation du phoxime (Insecticide) à un niveau de 96,1 % en utilisant la souche YP6 de *B. amyloliquefaciens*. La bactérie utilise le phoxime comme seule source de phosphore. Les conditions optimales de biodégradation étaient 40 °C, un pH de 7,20.

b. *Bacillus firmus*

Cette souche peut dégrader le fipronil (Insecticide). Des échantillons de sol ont été fortifiés avec du fipronil à des concentrations de 0,50-1,50 mg/kg et inoculés avec des cellules de *B. firmus*. Aucun résidu de pesticide n'a été détecté après 35 jours aux doses inférieures de fipronil (0,50, 0,75, 100 mg/kg), et aux concentrations supérieures (1,25 et 1,50 mg/kg), et le pesticide s'était complètement dégradé après 42 jours (Mandal *et al.*, 2014).

c. *Bacillus pumilus*

La souche bactérienne *B. pumilus* C2A1 isolée du sol peut dégrader le chlorpyrifos (Insecticide) et son métabolite le TCP. Le pesticide a été utilisé par les micro-organismes comme seule source de carbone et d'énergie. La dégradation maximale du pesticide a été observée à un pH élevé (8,5) et à une forte densité d'inoculum. La souche C2A1 a montré une dégradation de 90% du TCP (300 mg/L) en 8 jours d'incubation (Anwar *et al.*, 2009).

d. *Bacillus subtilis*

D'autres études ont porté sur l'impact de la souche *B. subtilis* 1D sur la dégradation de la cyperméthrine (insecticide). Dans des conditions de croissance optimisées, les bactéries ont atteint un niveau de dégradation de la cyperméthrine de 95 % après 15 jours. Cette bactérie utilise l'enzyme lactase dans la voie métabolique de la dégradation de cet insecticide. La souche utilise la cyperméthrine comme seule source de carbone pour sa croissance, ce qui suggère l'adaptation de *B. subtilis* à l'environnement oligotrophe -milieu pauvre en substances nutritives- (Gangola *et al.*, 2018).

e. *Bacillus thuringiensis*

Cette bactérie est responsable de la dégradation de malathion (Insecticide). L'élimination d'une quantité considérable de malathion a été observée après trois jours d'incubation dans un milieu salin inoculé, plus de 50 % du malathion a été dégradé en d'autres composés. Après une semaine d'incubation, les niveaux de pesticide résiduel ont diminué à 26,5 % et ont atteint 0,68 % après 30 jours d'incubation. *Bacillus thuringiensis* MOS-5 a été capable d'utiliser le malathion comme seule source d'énergie et de le dégrader par cométabolisme (Kamal *et al.*, 2008).

2.2 *Pseudomonas*

Pseudomonas est un genre diversifié qui possède un grand nombre de voies cataboliques et d'enzymes impliquées dans la dégradation des pesticides. *Pseudomonas* s'est avéré avoir un potentiel de dégradation élevé de chlorpyrifos (Insecticide), en raison de sa grande adaptabilité environnementale, suivi par *Agrobacterium* et *Bacillus* (Gilani *et al.*, 2016).

Les enzymes participant à la biodégradation des pesticides par les bactéries du genre *Pseudomonas* comprennent : les oxydoréductases, le cytochrome P450, les dioxygénases, les phosphotriestérases et les carboxylestérases (Saafan *et al.*, 2016).

a. *Pseudomonas aeruginosa*

Une culture pure de *P. aeruginosa* a été réalisée dans un milieu minimal complété par du diazinon (Insecticide) comme seule source de carbone. La capacité maximale de dégradation du diazinon (83,6 %) a été atteinte à un pH de 7,0 et à une température de 30 °C en 14 jours (Essa *et al.*, 2016).

b. *Pseudomonas fluorescens*

Dans les études sur la dégradation de l'aldrine (Insecticide chloré fait partie des substances extrêmement dangereuses) par *P. fluorescens*, il a été démontré que ce microorganisme dégrade le pesticide en utilisant l'hydroxylase du cytochrome P450. La bactérie étudiée a dégradé 43,2 % de l'aldrine au cours de 12 jours (Doolotkeldieva *et al.*, 2018).

c. *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas mendocina*

Les souches *P. putida* et *P. mendocina* ont une grande capacité à biodégrader les pesticides perméthrine et cyperméthrine (insecticides). Ces souches bactériennes permettent d'obtenir une biorémediation allant jusqu'à 90 % dans un délai de 15 jours (**Mendoza et al., 2011**).

2.3. *Streptomyces*

Plusieurs rapports font état de l'effet des bactéries du genre *Streptomyces* sur les résidus de pesticides. Les *Streptomyces* sont capables d'éliminer les polluants organiques et inorganiques, tels que les hydrocarbures, les pesticides, les composés aliphatiques et aromatiques, ce qui en fait de bons outils pour le processus de bioremédiation (**Sambasiva Rao et al., 2012**).

Streptomyces ont la capacité de se développer et de dégrader plusieurs familles chimiques de pesticides, notamment les organochlorés, les organophosphates, les pyréthroïdes, les urées et les chloroacétanilides (**Alvarez et al., 2017**).

Ces micro-organismes représentent une source efficace d'oxydoréductases et d'enzymes hydrolytiques. Les amylases, protéases, cellulases, xylanases, estérases, nitrile hydratases, laccases, déshydrogénases sont des enzymes qui pourraient être impliquées dans la dégradation des pesticides (**Kariga et Rao 2011**).

Une étude a porté sur la dégradation du carbofuran (insecticide) par trois isolats : *S. alanonosinicus*, *S. album* et *S. atratus*, qui étaient capables de résister au pesticide et de croître sur un milieu avec une concentration de pesticide de 20 µg/L. Après 10 jours, 65,5 %, 64,9 % et 34,8 % du carbofuran ont été dégradés par *S. alanonosinicus*, *S. atratus* et *S. album*, respectivement (**Jayabarath et al., 2010**).



***Partie II : Synthèse
expérimentale***



Chapitre I :
Matériel et Méthodes

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Situation Géographique

1.1 Localisation

Mostaganem est la 27^{ème} wilaya dans l'administration territoriale Algérienne. Elle se trouve au Nord-Ouest de l'Algérie sur la méditerranée (Afrique du Nord), à 350 Km à l'Ouest d'Alger et à 80 Km à l'Est d'Oran.

La wilaya de Mostaganem (Fig.6) compte plus de 800 000 habitants (statistiques de 2008) et se compose de 32 communes, réparties sur 10 Dairas (sous-préfectures).

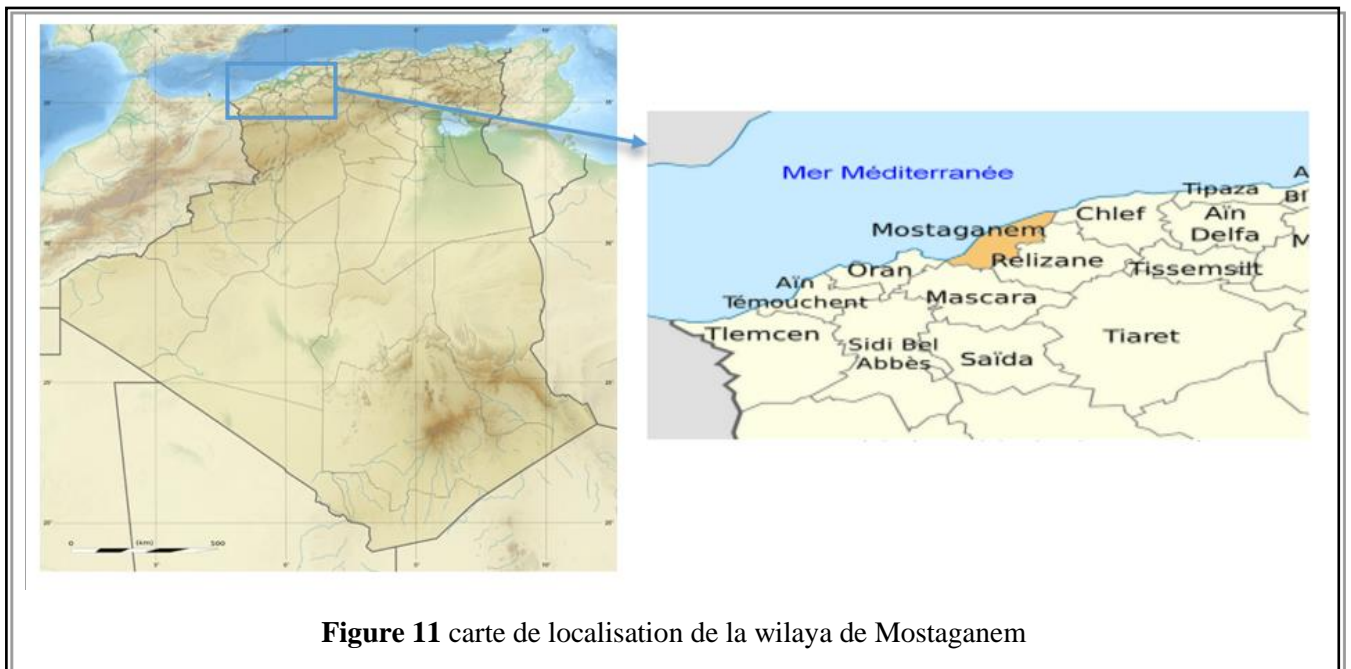


Figure 11 carte de localisation de la wilaya de Mostaganem

1.2. Cadre pédologique

La région du Dahra mostaganémois présente une diversité de sols qui varient en fonction de leur nature lithologique, tels que le grès, le calcaire, la marne et l'argile. On y trouve notamment des zones marneuses datant du Miocène, situées principalement au nord, qui sont les plus exposées aux différents processus d'érosion (**Mazour, 2004**).

La grande majorité des matériaux qui constituent les roches-mères des sols sont principalement des marnes calcaires ou des alluvions résultant de l'altération et de l'érosion de ces roches (**EL Garouani et al. 2003**).

2. Objectifs du travail

Nous avons tracé comme objectif principal d'isoler des bactéries ayant le potentiel de résister à différentes concentrations de pesticides utilisés dans la culture de la pomme de terre : *Solanum tuberosum*, dans la région de d'El Touahria, wilaya de Mostaganem.

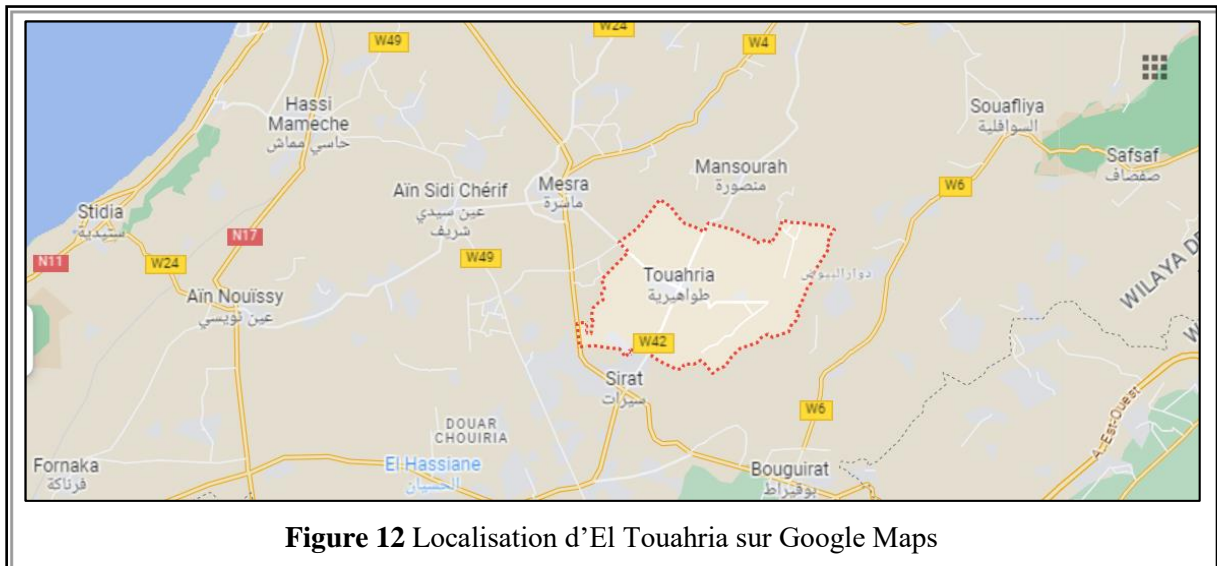
3. Matériel

3.1 Les pesticides

Le choix des pesticides s'est fait selon une enquête menée auprès des points de vente des produits phytosanitaires et des produits agricoles dans la wilaya de Mostaganem, les pesticides utilisés sont : Dekafate, Lamdoc, Mustang, Focus Ultra et Bactimec.

3.2 L'échantillon du sol

L'échantillon de sol a été prélevé à partir d'un champ agricole d'une culture de pomme de terre traité par les pesticides à la commune d'El Touahria, située dans la wilaya de Mostaganem en Algérie. Elle est rattachée à la daïra de Mesra. Les coordonnées géographiques de la commune sont 35° 48' 38" nord, 0° 12' 34" (Fig.7).



3.3.1 Choix de la station d'étude

Le choix de cette station d'échantillonnage est soutenu par l'idée que le milieu est déjà traité par les pesticides (Fig.13).

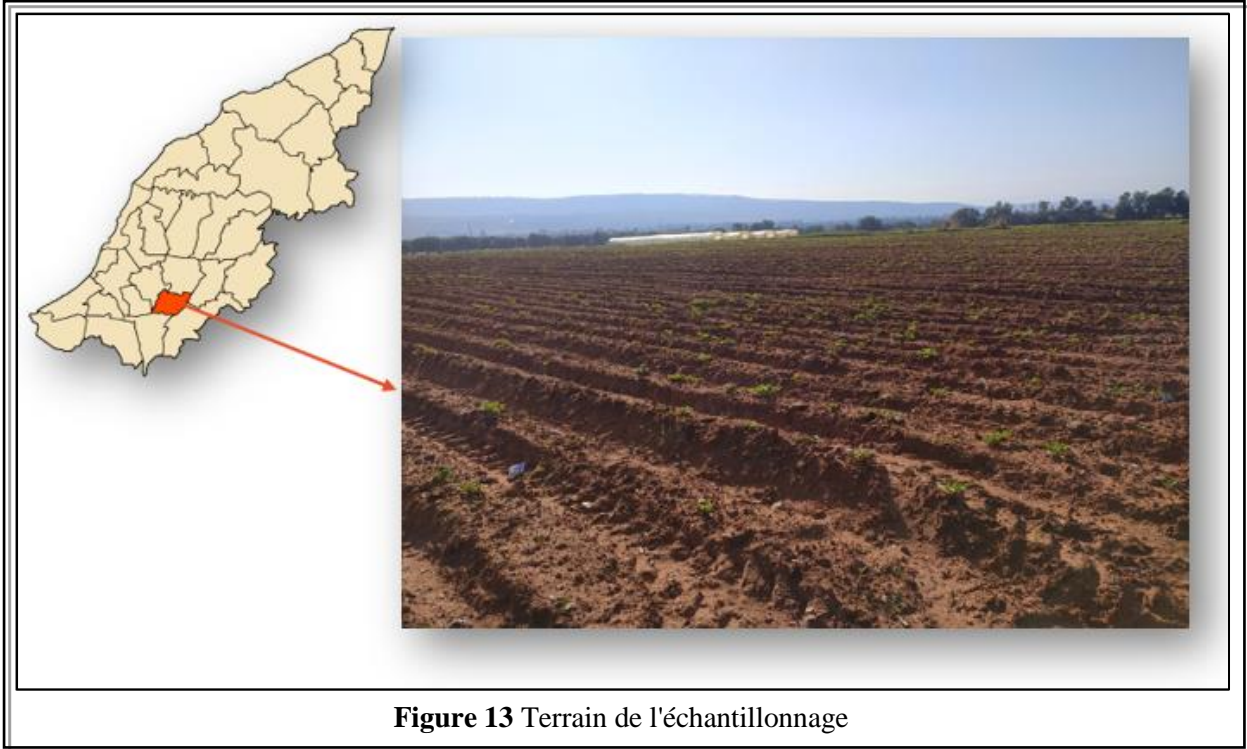


Figure 13 Terrain de l'échantillonnage

4. Méthode

4.1. Échantillonnage du sol

L'échantillonnage a été réalisé le jeudi 02 février 2023 à 11:00 du matin. Les prélèvements ont été effectués à une profondeur allant de 0 à 20 cm. La biodiversité atteint son niveau maximum dans la couche superficielle du sol, puis diminue plus ou moins rapidement à mesure que l'on s'enfonce en profondeur. Le prélèvement des échantillons a été effectué à l'aide d'une cuillère dans des conditions de stérilité rigoureuse. Une quantité de sol de champ agricole a été prélevée et placée dans des flacons stériles, il est conseillé de prendre le sol à l'endroit où l'eau d'arrosage est fossilisée.

Les échantillons sont transportés pour être analysés au niveau du laboratoire, Les flacons contenant les échantillons de faune récoltée sont étiquetés afin de faciliter l'identification tout en indiquant la date de l'échantillonnage et le numéro de l'échantillon.

4.2 Préparation de milieu de criblage

Dans cette partie, un isolement a été effectué sur un milieu MSM liquide additionné par un pesticide avec une quantité de 50mg/L comme seule source de carbone.

Les pesticides choisis pour la préparation de milieu de criblage sont :

- Dekafate
- Lamdoc et Mustang

Deux milieux de criblage ont été préparés :

Milieu de criblage 1 : flacon contient 200ml de MSM liquide + 1g du sol + 0.125g de dekafeate.

Milieu de criblage 2 : flacon contient 200ml de MSM + 1g du sol +400µL lamdoc + 66µL mustang.

Après la préparation des milieux de criblage, les flacons ont été incubés sous agitation pendant 5 jours (120h) à 30°C, La figure 14 montre les étapes de préparation de milieu de criblage (**Ambreen et Yasmine, 2021**).

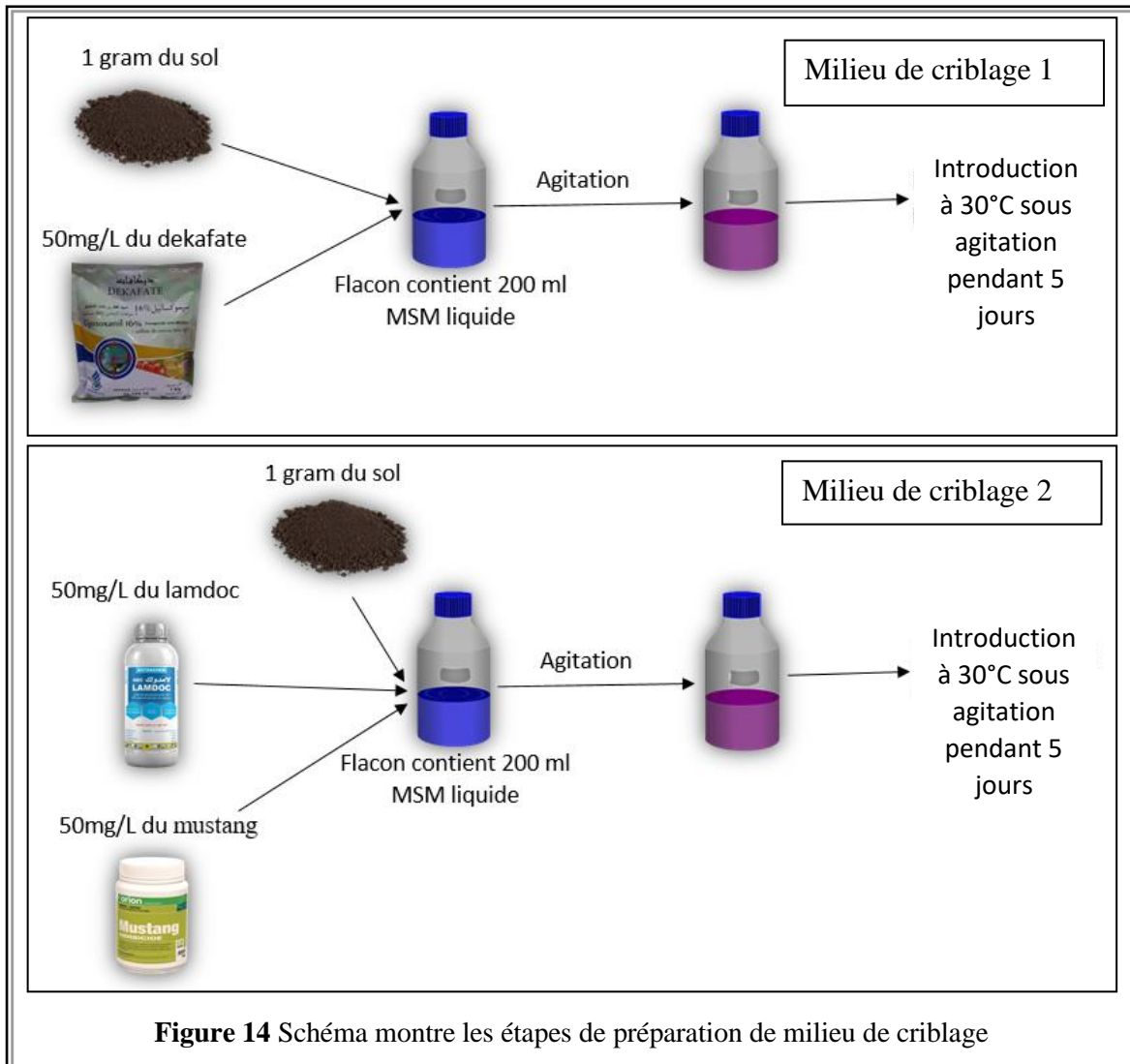


Figure 14 Schéma montre les étapes de préparation de milieu de criblage

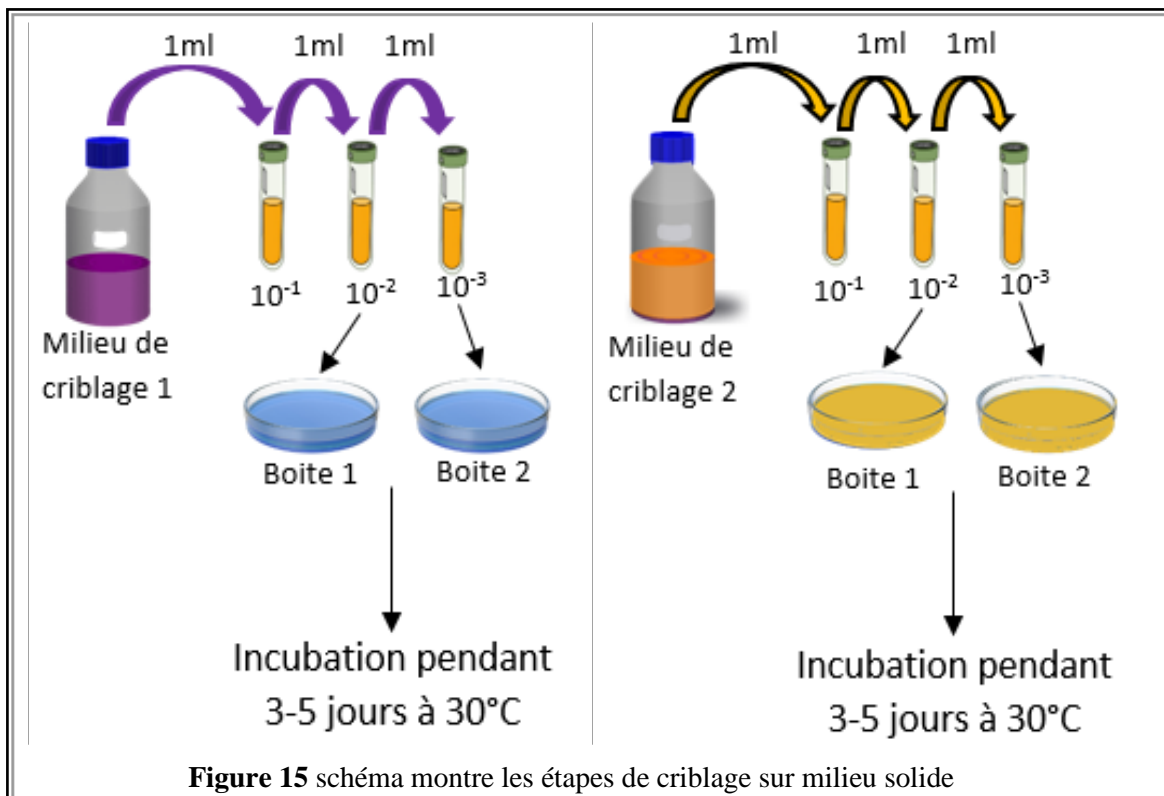
4.3. Criblage sur milieu MSM solide

Dans cette partie, un deuxième isolement a été effectué sur un milieu MSM solide additionné par la même quantité de pesticide utilisé dans l'isolement sur milieu liquide.

La 1^{ère} étape est la préparation d'une série de dilution décimale de 10^{-1} jusqu'à 10^{-3} (1ml de milieu de criblage + 9ml de NaCl à 0,9% ainsi de suite ...)

Ensuite, 1ml des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} a été ensemencé sur un milieu MSM solide additionné par les pesticides utilisés déjà dans la préparation de milieu de criblage (Fig.15).

Enfin, les 4 boîtes (10^{-2} et 10^{-3} pour les dilutions du bouillon de criblage 1 / 10^{-2} et 10^{-3} pour les dilutions du bouillon de criblage 2) ont été Incubés pendant 3-5 jours à 30°C (Ambreen et Yasmine, 2021).



4.4. Purification

Après isolement, ensemencement et incubation, 6 différentes colonies sont obtenues. La purification est une étape très importante et très délicate, qui demande beaucoup de temps, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes, et c'est de la pureté des cultures que va dépendre, la purification des isolats se fait par repiquage par la méthode des stries des colonies sur une gélosé nutritive (GN), cette opération est répétée jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. Après plusieurs passages sur milieu gélosé, l'isolat est donc purifié (**Botton et al, 1990**)

4.5. Conservation

a. Conservation a courte durée

Les colonies obtenues ont été conservés dans une gélose inclinée par ensemencement en stries, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h puis conserver à 3-4 C° dans un réfrigérateur.

b. Conservation a longue durée

Une colonie bien isolé a été prélevée à partir d'une boîte de pétri qui contient des colonies pures, Les colonies ont été ensemencées dans un bouillon nutritif, après une incubation à 37 °C pendant 24h, 1ml de la suspension bactérienne a été centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min dans des Eppendorfs, le culot a été éliminé, 0.8ml de bouillon nutritif stérile et 0.2 ml solution glycérol stérile ont été ajoutés à les Eppendorfs qui contient le culot, les Eppendorfs ont été vortexé et conservé à -20 °C (au congélateur).

4.6. Caractéristiques macroscopique et microscopique

a. Observation macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être convenablement décrit qu'à partir de colonies bien isolées, Il faut donc noter :

- La couleur des colonies
- La taille : petite, grande, moyenne.
- La forme : ronde, irrégulière ...etc.

- L'aspect de la surface : sèche, lisse, rugueuse.
- Opacité : opaque ou transparent.
- L'élévation : plate, concave ou convexe.

b. Observation microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes après une coloration de Gram.

La coloration de Gram est une technique courante utilisée pour différencier deux grands groupes de bactéries sur la base des différents constituants de leur paroi cellulaire. La procédure de coloration de Gram permet de distinguer les groupes à Gram positif et à Gram négatif en colorant ces cellules en rose ou en violet.

1^{ère} étape : préparation de frottis

1. Une goutte d'eau physiologique a été déposée sur une lame propre, à l'aide d'une anse de platine une colonie bien isolée a été prélevée puis déposée sur la goutte d'eau physiologique.
2. Ensuite, notre colonie a été fixée par la chaleur, en passant soigneusement la lame sur le bec bunsen.

2^{ème} étape : La coloration

1. Tout d'abord, le cristal violet a été ajouté sur la lame pendant 1 minute.
2. Après, lame a été rincé avec un léger courant d'eau pour éliminer le cristal violet non lié.
3. Lugol a été ajouté pendant 1 minute (il s'agit d'un agent qui fixe le cristal violet à la paroi cellulaire bactérienne).
4. Ensuite, la lame a été rincé avec l'éthanol (l'éthanol décolore l'échantillon s'il est Gram négatif, si l'alcool reste trop longtemps sur l'échantillon, il peut aussi décolorer les cellules à Gram positif).
5. Après, le colorant secondaire (safranine) a été ajouté sur la lame pendant 1 minute.
6. Enfin, la lame a été lavée avec un léger courant d'eau, puis passée à l'observation microscopique à l'objectif X 100 avec une goutte d'huile d'immersion.

4.7. Les tests biochimiques

4.7.1 Tests respiratoires

a. Test TTC (sel de tétrazolium)

C'est une méthode de réduction de colorant utilisée pendant de nombreuses années pour évaluer la viabilité cellulaire et pour déterminer la croissance bactérienne. Pour cette dernière application, les plus utilisés sont le bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl) -2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT) et le chlorure de 5-cyano-2,3-di-(p-tolyl) -tétrazolium (CTC) pour les tests de viabilité des cellules eucaryotes et des bactéries. Dans ces cas, les coenzymes et déshydrogénases du nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD(P)H) des cellules métaboliquement actives réduisent les sels de tétrazolium en produits formazaniques, cette réduction se manifeste par une couleur rouge visible en 30min à 1h à température ambiante (Coudron et al., 1983, Stockert et al., 2018)

❖ Préparation de la solution TTC

0.3g du sel de tétrazolium a été ajouté dans un tube contient 10 ml d'eau distillée, il faut bien mélanger la solution jusqu'à la dissolution complète du sel. A l'aide d'un micro filtre micropore (0.22 µm) la solution a été filtrée puis conservé à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur.

❖ Préparation de l'inoculum

Une culture jeune des isolats C1, C2 et C3 a été lancée dans des tubes à centrifuger contentent un bouillon nutritif.

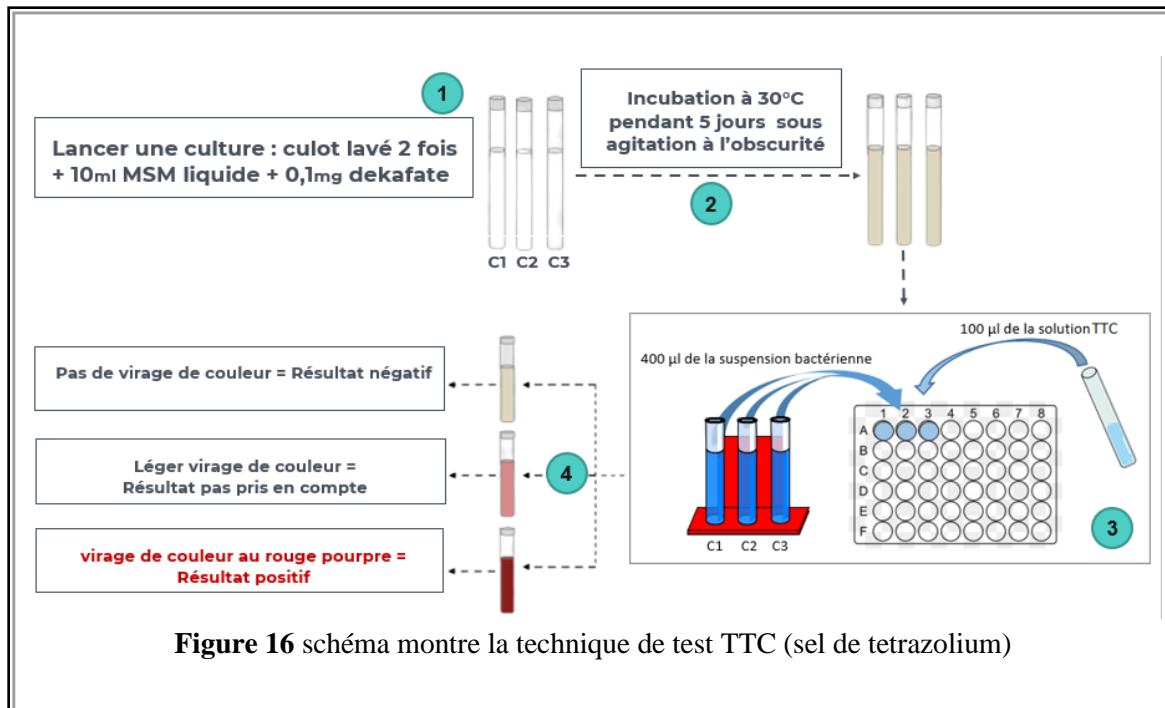
Après 24h d'incubation à 30°C, une centrifugation a été réalisée à 3000 rpm pendant 20min, Les culots cellulaires ont été lavés 2 fois avec MSM liquide, le lavage a été effectué en jetant le surnageant après la centrifugation et en ajoutant le MSM liquide stérile, le lavage des cellules a été effectuée pour éliminer toute source de carbone.

❖ Technique du test

Les culots obtenus ont été inoculés dans 10ml de MSM liquide additionné par une concentration très élevé du pesticide dekafate (1000mg/L), et l'incubation a été réalisée à 37C° pendant 24h. Le contrôle négatif consistait en un milieu de culture MSM additionné de pesticide (Dekafat) seulement sans bactéries.

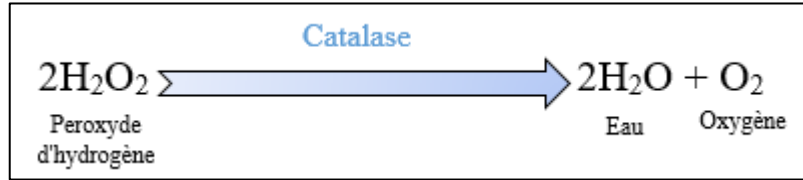
Le test a été réalisé dans une microplaque stérile, à l'aide d'une micropipette une quantité de 400 µl de la suspension bactérienne C1 a été prélevée et déposée dans le premier puits de la microplaque, ensuite 100 µl de la solution du sel de tétrazolium a été ajouté sur le 1^{er} puits et ainsi de suite jusqu'à la suspension bactérienne C3.

La microplaque a été laissée à une température ambiante pendant une heure pour voir s'il y a eu une activité respiratoire qui se manifeste par une couleur rouge (pourpre), la figure 16 montre comment faire le test de TTC (sel de tétrazolium).



b) test de catalase

Ce test permet de détecter la présence de catalase, une enzyme qui produite par les bactéries qui respirent en utilisant de l'oxygène.

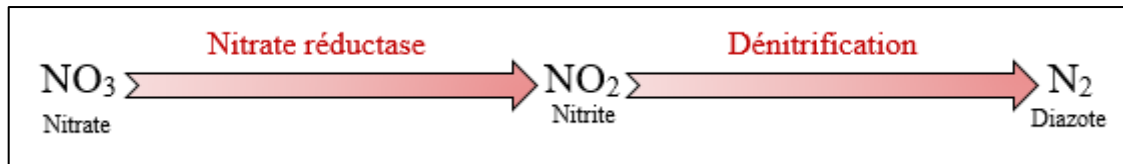


❖ La technique

1. Tout d'abord, une pipette pasteur a été utilisée pour transférer une petite quantité de colonie à la surface d'une lame propre et sèche.
2. Ensuite, une goutte de H₂O₂ à 3% a été placée sur la lame.
3. Enfin, l'observation de l'évolution des bulles d'oxygène.

c) Nitrate réductase

Le test de réduction du nitrate est un test qui détermine la production d'une enzyme appelée nitrate réductase, qui entraîne la réduction du nitrate (NO₃).



❖ La technique

1. A l'aide d'une anse les bouillons de nitrate ont été inoculés avec la suspension bactérienne.
2. Ensuite les tubes ont été incubés à une température optimale (37°C) pendant 24 heures.
3. Après l'incubation, 6-8 gouttes de réactif de Griess (Nitrite I + Nitrite II) ont été ajoutées aux tubes.
4. Enfin, l'observation de la réaction (dans une minute ou moins).

« **Remarque** : Si aucune couleur ne se développe, ajouter la poudre de zinc. Si la couleur de bouillon devient rouge après l'addition de zinc, cela indique que cette bactérie est nitrate réductase (-) ».

d) Gélose viande foie

La gélose viande foie (VF) est un milieu utilisé pour la recherche du type respiratoire des bactéries, ainsi que pour l'isolement en profondeur des anaérobies.

❖ La technique

1. Un échantillon d'isolat a été piqué à travers le centre du milieu jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette Pasteur.
2. Les tubes ont été incubés dans l'incubateur à 37°C pendant 24 heures.

4.7.2 Métabolisme glucidique

a) Milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Dans ce milieu l'identification est basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S.

❖ La technique

1. L'isolat à étudier a été prélevé et ensemencé par un mouvement de va-et-vient le long de la surface de la gélose.
2. Enfin, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

« **Note :** Le milieu TSI doit être lu après une incubation de 24 heures seulement, car un temps d'incubation plus long peut entraîner un faux négatif ».

b) Mannitol mobilité

Est un milieu semi-solide qui permet de déterminer la mobilité et la fermentation du mannitol.

❖ La technique

1. Les tubes mannitol ont été ensemencé par piqure centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette pasteur
2. Les tubes ont été incubés pendant 24 heures à 37°C.

c) Citrate de Simmons

Ce test permet de tester la capacité des organismes à utiliser le citrate comme source de carbone, Les organismes qui peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone utilisent l'enzyme citrate ou citrate-perméase pour transporter le citrate dans la cellule.

❖ **La technique**

1. La pente du milieu Citrate de Simmons a été ensemencée par des stries (un mouvement de va-et-vient le long de la surface de la gélose) à l'aide d'une pipette Pasteur.
2. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

d) Test MEVAG (milieu Hugh et Leifson)

Le principe de ce test est la mise en évidence de la voie d'attaque des glucides par l'utilisation des milieux contenant un seul glucide et bleu de bromothymol (BBT) comme un indicateur de pH.

❖ **La technique**

1. Tout d'abord, le milieu MEVAG a été préparé et rempli dans des tubes stériles.
2. Un seul type du glucide a été ajouté (glucose, lactose, fructose, mannose) dans chaque tube (7 gouttes avec concentration de 20%)
3. Ensuite l'isolat à étudier a été piqué à travers le centre du milieu jusqu'au fond du tube, les mêmes étapes ont été répétées avec tous les tubes.
4. Enfin, les tubes ont été incubés dans l'incubateur à 37°C pendant 24 heures avec un bouchon un peu dévissé.

4.7.3. Isolement sur milieu King A et King B

Les milieux King A et King B permettent de différencier entre les espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigment spécifique. Le King A est un milieu de culture utilisé pour mettre en évidence la pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa* (pigment bleu). Le King B est un milieu de culture utilisé pour mettre en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent (pigment jaune-vert fluorescents).

❖ **La technique**

1. Une goutte de notre bouillon qui contient l'isolat a étudié a été pris à l'aide d'une anse de platine.
2. La pente des tubes (la surface de gélose sur boîte) a été ensemencée par des stries.
3. Enfin, les tubes (les boîtes) ont été incubés dans l'incubateur à 37°C pendant 24-48h.

4.7.4 Test de production de l'indole

Ce test détermine la capacité d'une bactérie à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane par un enzyme appelée tryptophanase.

❖ **La technique**

1. La bactérie à tester a étéensemencée sur des milieux riches en tryptophane (eau peptone exempte d'indole)
2. Après 24h d'incubation à 37°C, 0,5 ml (environ 5 gouttes) de réactif de Kovác a été ajouté dans les tubes.
3. Avec une douce agitation, les résultats du test apparaissent en environ 1 min.

4.7.5. Test de Clark & Lubs (RM-VP)

Ce milieu permet l'étude des produits de fermentation du glucose et la différenciation entre les fermentations acide butanediolique et acides mixtes. Ainsi que la différenciation entre les Enterobacteriaceae et la caractérisation d'autres groupes de bactéries comme les Actinobactéries.

❖ **La technique**

1. Le bouillon Clark & Lubs a été inoculé avec les isolats.
2. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 2,5 ml de bouillon a été transformé dans un nouveau tube stérile puis additionné avec environ 5 gouttes du réactif rouge de méthyle (RM).
3. Ensuite, 12 gouttes de réactif VP1 et 4 gouttes de réactif VP2 ont été ajoutés à la culture restant dans le bouillon Clark & Lubs, le tube a été agité soigneusement pendant 30 secondes pour exposer le milieu à l'oxygène (laisser le tube reposer pendant 30 minutes).

4.8 Tests enzymatiques

a. Test d'Amylase

La présence de cet enzyme est déterminée par l'ensemencement de notre isolat sur gélose additionné par l'amidon. Après incubation à 37°C pendant 24 jusqu'à 72h, nous avons recouvert les boîtes par une solution d'iodure.

b. Test d'Estérase

Nôtres colonies ont été ensemencement par stries en spot sur une gélose nutritive au CaCl₂ (0,1 g) (1000 ml) stérile + 10 ml de Tween 80. Les résultats du test ont été observés après une incubation à 37°C pendant 24.

c. Test de protéolyse

On peut déterminer la présence de cet enzyme par un ensemencement par stries en spot sur un milieu contient 100 ml de lait écrémé UHT additionné de 20 ml gélose blanche stérile, après l'ensemencement les boites ont été incubées à 37°C pendant 24.

4.9 Tolérance des bactéries à différentes concentrations de pesticides sur milieu liquide (MSM liquide + pesticide)

La capacité des 3 bactéries isolées à dégrader les pesticides a été testée dans un milieu minéral liquide (MSM liquide) additionné par 5 différents types des pesticides.

❖ Préparation de l'inoculum

Les isolats ont été pré-cultivées pendant 18 à 24h dans des tubes à essais contentent un bouillon nutritif.

Après incubation, 2ml de la suspension bactérienne a été versé dans des tubes Eppendorf stériles pour passer à la centrifugation à 3000 rpm pendant 20 minutes.

Les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec MSM liquide, le lavage a été effectué en jetant le surnageant après chaque centrifugation et en ajoutant 1ml de MSM liquide stérile, la technique de lavage des cellules est montrée dans la figure suivant.

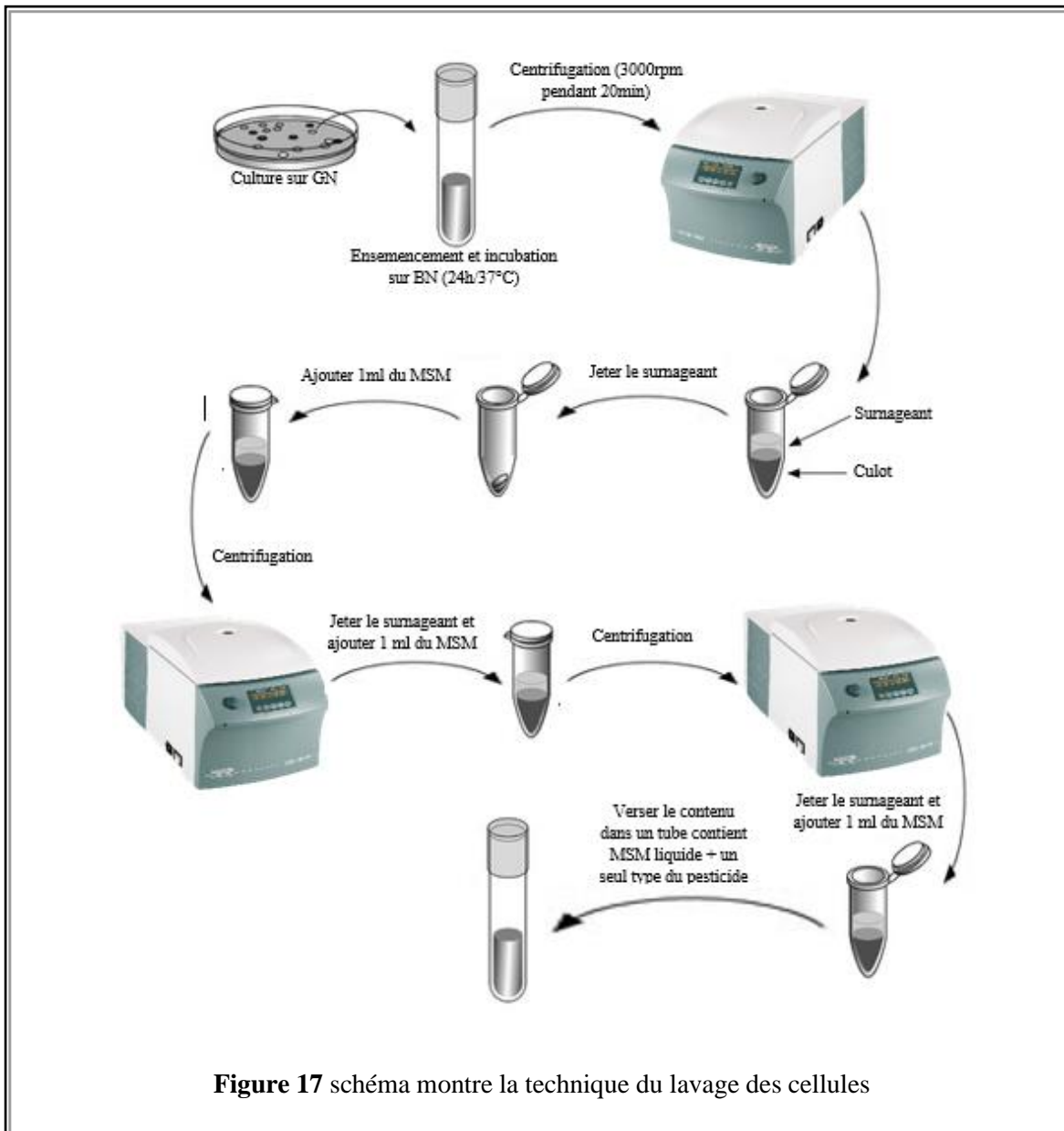


Figure 17 schéma montre la technique du lavage des cellules

❖ **Technique**

L'étude de la biodégradation a été effectuée en inoculant dans des tubes à essais 2ml de la suspension bactérienne qui a été déjà centrifugée et lavée dans 18ml de MSM liquide additionné par chacun des pesticides (les solutions MSM + pesticides ont été déjà préparés dans des flacons, puis versées dans des tubes).

Nous avons testé l'aptitude de chacune des 3 isolats à dégrader chacun des cinq pesticides dans deux différentes concentrations (200 mg/L et 500 mg/L).

La quantité ajoutée dans 1l de MSM :

➤ **Concentration 200mg/L**

Pesticide	Dekafate	Lamdoc	Mustang	Focus ultra	Bactimec
Quantité	0,833g	2.667 Millilitres	0.44 Millilitres	1.333 Millilitres	7.4 Millilitres

➤ **Concentration 500mg/L**

Pesticide	Dekafate	Lamdoc	Mustang	Focus ultra	Bactimec
Quantité	2.083g	6.667 Millilitres	1.1 Millilitres	3.333 Millilitres	18.5 Millilitres

La variation de la densité bactérienne des isolats dans les cinq pesticides au cours de 5 jours d'incubation sous agitation à 30°C a été enregistrée par spectrophotométrie, en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm en utilisant un spectrophotomètre ultraviolet-visible avec MSM + pesticide comme Blanc (**Ambreen et Yasmine, 2021**).



Chapitre II :
Résultats et Discussion

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Résultat de criblage sur milieu MSM solide

Après une incubation des 4 boîtes pendant 5 jours à 30°C, nous avons obtenu 6 colonies en totale (Tab.3).

Tableau 3 : les colonies obtenues à partir de criblage sur milieu MSM solide additionné par des pesticides







Milieu de criblage		Colonies
Milieu de criblage 1 (MSM solide + Dekafat)	Boîte 10 ⁻²	2 colonies (C1, C1')
	Boîte 10 ⁻³	2 colonies (C2 et C2')
Milieu de criblage 2 (MSM solide + Lamdoc + Mustang)	Boîte 10 ⁻²	2 colonies (C3 et C3')
	Boîte 10 ⁻³	0 colonie

2. Aspect macroscopique des colonies isolées

Tableau 4 : Aspect macroscopique des colonies

	Couleur	Taille	Forme	Élévation	Aspect	Caractéristiques
C1	Blanche	Grande	Diffuse	Convexe	Crémeuse, rigoureuse	Fluorescente
C1'	Blanche	Moyenne	Diffuse	Convexe	Crémeuse, rigoureuse	Fluorescente
C2	Translucide	Grande	Irrégulière	Plate	Visqueuse, lisse	Brillante et Nombreuses
C2'	Translucide	Petite	Irrégulière	Plate	Visqueuse, lisse	Brillante
C3	Beige	Très petite	Irrégulière	Plate	Visqueuse, lisse	Brillante
C3'	Beige	Très petite	Irrégulière	Plate	Visqueuse, lisse	Brillante et Nombreuses

Tableau 5 : photos des colonies

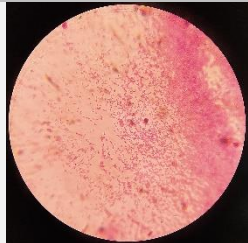
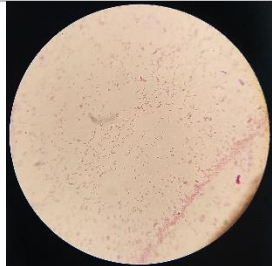


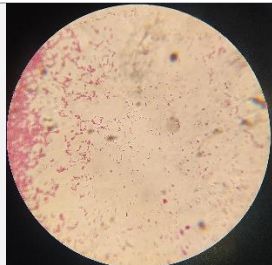

Isolats	Photos	Isolats	Photos
C1		C3	
C1'		C3'	
C2			
C2'			

3. Observation microscopique

Avec la coloration double, les Gram bactéries positif se colorent en violet en raison de la présence d'une épaisse couche de peptidoglycane dans leur paroi cellulaire. Les bactéries Gram négatives se colorent en rose, ce qui est attribué à une paroi de peptidoglycane plus fine, qui ne retient pas le cristal violet pendant le processus de décoloration (**Delarras, 2007**)

L'observation microscopique a été faite par la coloration de Gram. Le tableau 6 montre les caractéristiques microscopiques des bactéries isolées.

Tableau 6 : Résultats de la coloration de gram

Isolats	Forme	Gram	Observation microscopique
C1	Bacille	Gram négatif (-)	
C1'	Bacille	Gram négatif (-)	
C2	Bacille	Gram négatif (-)	
C2'	Bacille	Gram négatif (-)	
C3	Bacille	Gram négatif (-)	
C3'	Bacille	Gram négatif (-)	

Après les résultats obtenus à partir des observations macroscopiques et microscopiques nous avons éliminé 3 isolats (C1', C2' et C3'), Parce qu'il semblait être similaire à C1, C2 et C3 respectivement.

4. Les tests biochimiques

4.1 Tests respiratoires

a. Test TTC (sel de tetrazolium)

Ce test a été réalisé pour détecter la viabilité cellulaire des bactéries dans une concentration très élevée de pesticide, la viabilité se manifeste par une couleur rouge après quelques minutes de l'addition de TTC, les résultats obtenus ont montré aucun virage de couleur vers le rouge, donc nous pouvons peut-être dire que ces bactéries sont moins résistantes à des concentrations très élevées des pesticides.

La figure 18 montre les résultats de test TTC après l'addition de TTC sur les cultures bactériennes déjà ensemencées sur un milieu MSM liquide + dekaflate comme seule source de carbone et d'énergie.

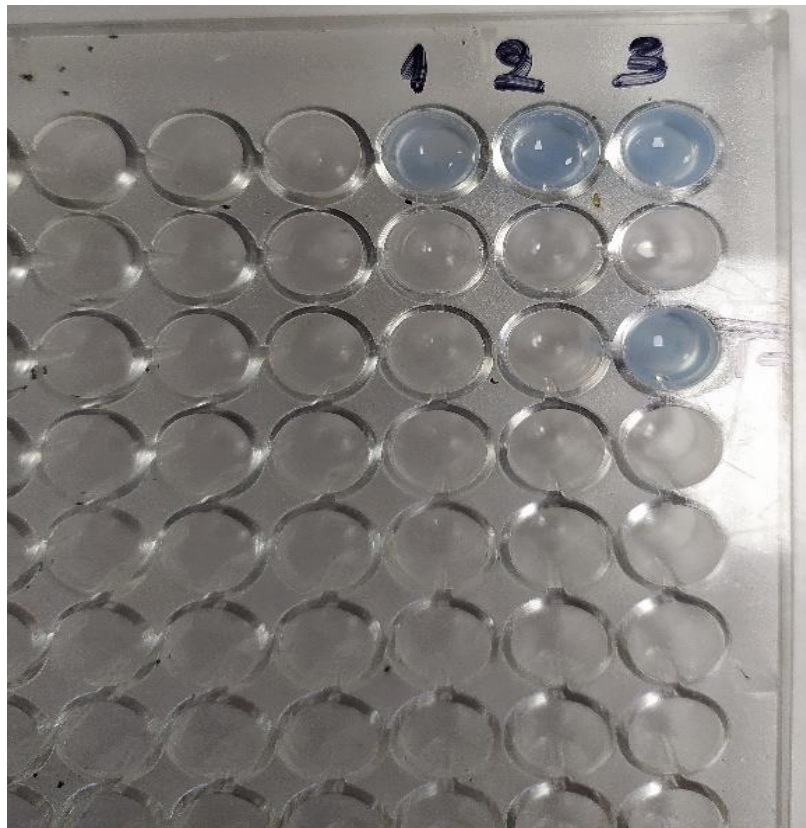


Figure 18 Résultat de test TTC

b) Test de catalase

La présence de l'enzyme est évidente par une élaboration rapide de bulles d'oxygène se produit (catalase +), et son absence est mise en évidence par une absence ou une faible production de bulles (catalase -) (Joffin *et* Leyral, 2006).

Selon les résultats obtenus, 2 isolats C1 et C2 possèdent l'enzyme de catalase (+) et C3 est catalase (-), le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Tableau 7 : Résultats de test catalase

Isolats	C1	C2	C3
Catalase	+	+	-

c) Nitrate réductase

Dans ce test si la couleur du tube devient rouge, cela indique la présence de NO_2^- issus de la réduction des NO_3^- , donc cette bactérie est de nitrate réductase (+). Si la couleur du tube reste jaune, cela indique que cette bactérie est de nitrate réductase (-) (Joffin *et* Leyral, 2006). Selon les résultats obtenus, toutes les isolats testés posséder la nitrate réductase (Fig.19).

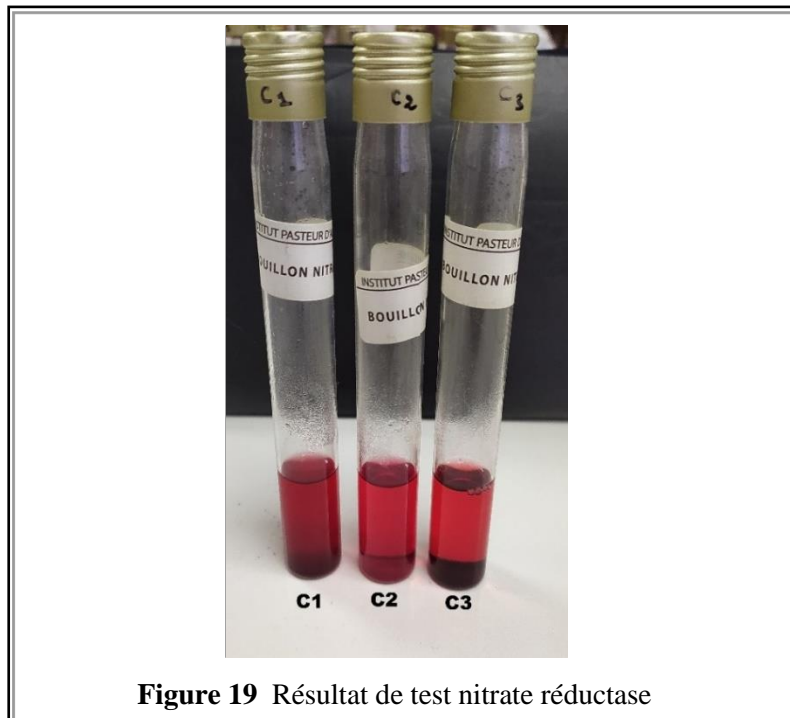


Figure 19 Résultat de test nitrate réductase

d) Gélose viande foie

Dans ce test, les résultats sont lus comme suit :

- Aérobie-anaérobie facultatif : développement sur toute la hauteur du tube.
- Aérobie strict : qui cultivent uniquement dans la zone superficielle du tube.
- Anaérobie strict : qui cultivent uniquement en profondeur du tube.
- Micro-aérophile : formation d'un anneau dans la zone intermédiaire (0,5 et 1,5 cm du haut).

Les résultats obtenus sur le milieu viande-foie montrent que deux isolats se développent uniquement dans la partie supérieure de tube, cela indique que ce sont des bactéries aérobies strictes, et la 3^{ème} isolat se développe dans toute la longueur de piquer, cela indique que cette bactérie est aérobie-anaérobie facultatif, les résultats sont montrés dans le tableau 8 et la figure 20.

Tableau 8 : Résultats de test viande foie

Isolats	C1	C2	C3
Test viande foie	Aérobie stricte	Aérobie stricte	Aéro-anaérobie facultative

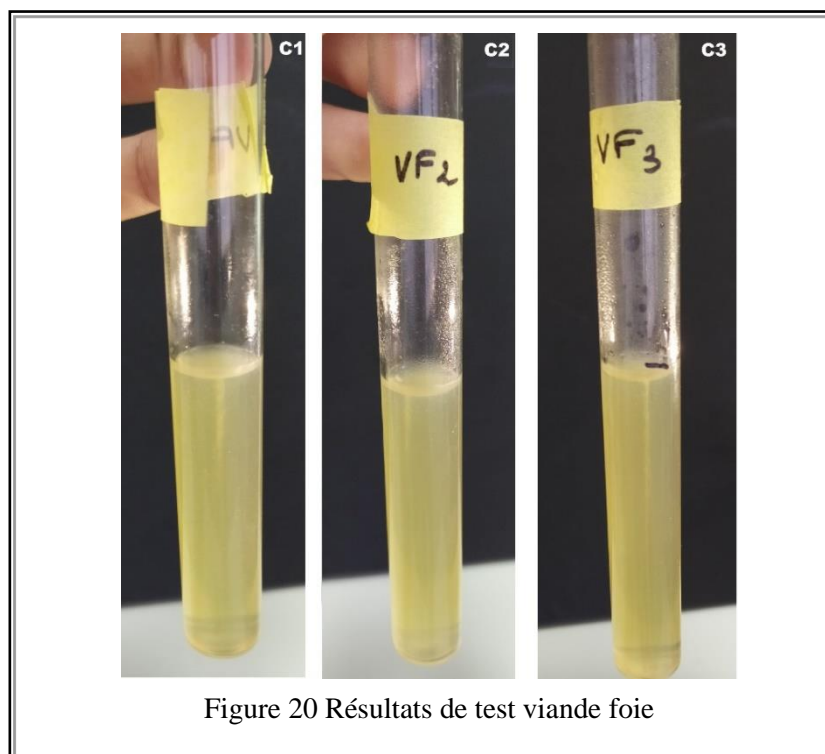


Figure 20 Résultats de test viande foie

4.2 Métabolisme glucidique

a) Milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Selon **Joffin et Leyral, (2006)**, les résultats sont lus comme suit :

- Si le culot du tube devient jaune et la pente reste rouge, Il se réfère uniquement à la fermentation du glucose (glucose +, lactose et saccharose -).
- Si le culot du tube et la pente devenant jaunes, Il se réfère à la fermentation du glucose et du lactose (glucose +, lactose et/ou saccharose +).
- Si le culot du tube reste rouge et la pente devient jaune, Il se réfère uniquement à la fermentation du lactose et/ou saccharose (glucose -, lactose et saccharose +).
- Si la gélose se divise, donc cette bactérie produise du gaz.
- Si on trouve des précipités noirs dans la gélose, donc cette bactérie capable de produire du sulfure d'hydrogène (H₂S).

Selon les résultats obtenus, les 3 isolats ont dégradé le glucose, mais aucun isolat n'est capable de dégrader ni le lactose ni le saccharose. Concernant la production de gaz et H₂S, Aucun des isolats n'a produit ni de gaz ni du sulfure d'hydrogène (Tab.9 et Fig.21).

Tableau 9 : Résultats de test TSI

	C1	C2	C3
Glucose	+	+	-
Lactose	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Gaz	-	-	-
H₂S	-	-	-

+ : Dégradation/production, - : Pas de dégradation /production

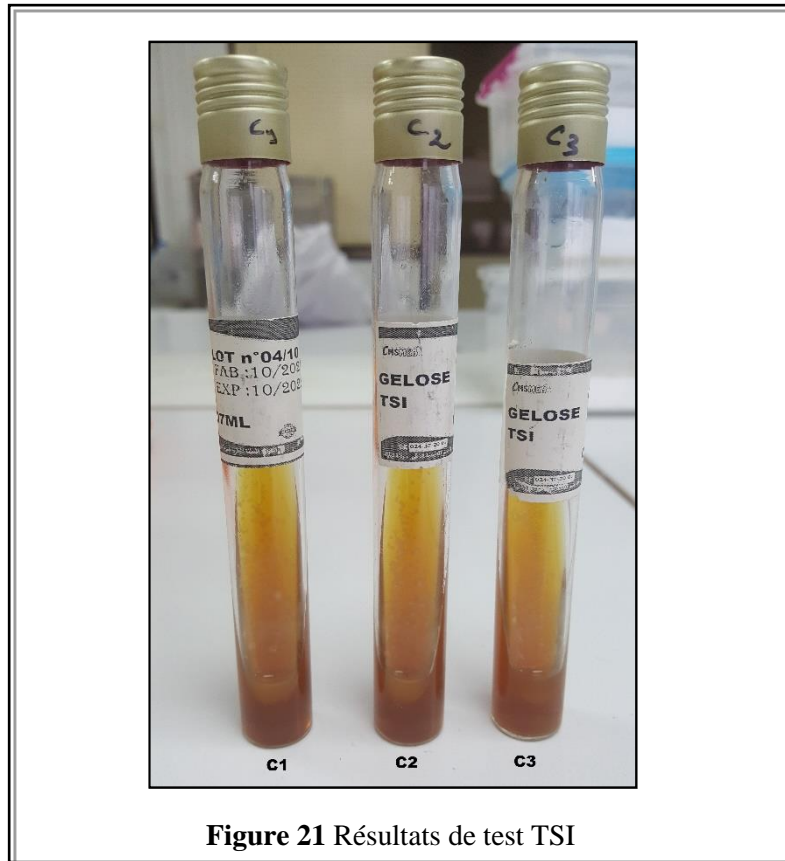


Figure 21 Résultats de test TSI

b) Mannitol mobilité

Selon **Joffin et Leyral, (2006)**, les résultats sont lus comme suit :

- Fermentation de mannitol : Si la bactérie fermente le mannitol, le milieu change de couleur, passant du rouge au jaune (mannitol +), si la bactérie ne fermente pas le mannitol, le milieu reste rouge (mannitol -).
- La mobilité : Les bactéries mobiles produisent une croissance diffuse dans tout le milieu et les bactéries non mobiles ne se développent que le long de la ligne d'inoculation.

Les résultats obtenus sur le milieu mannitol mobilité montrent que les 3 isolats ne fermentent pas le mannitol (mannitol négatif -), Concernant la mobilité, les trois isolats se sont développés uniquement le long de la ligne d'inoculation, donc ce sont des bactéries non mobiles (immobiles). Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Tableau 10 : Résultats de test de mannitol mobilité

	C1	C2	C3
Fermentation de mannitol	Négatif (-)	Négatif (-)	Négatif (-)
Mobilité	Immobile	Immobile	Immobile

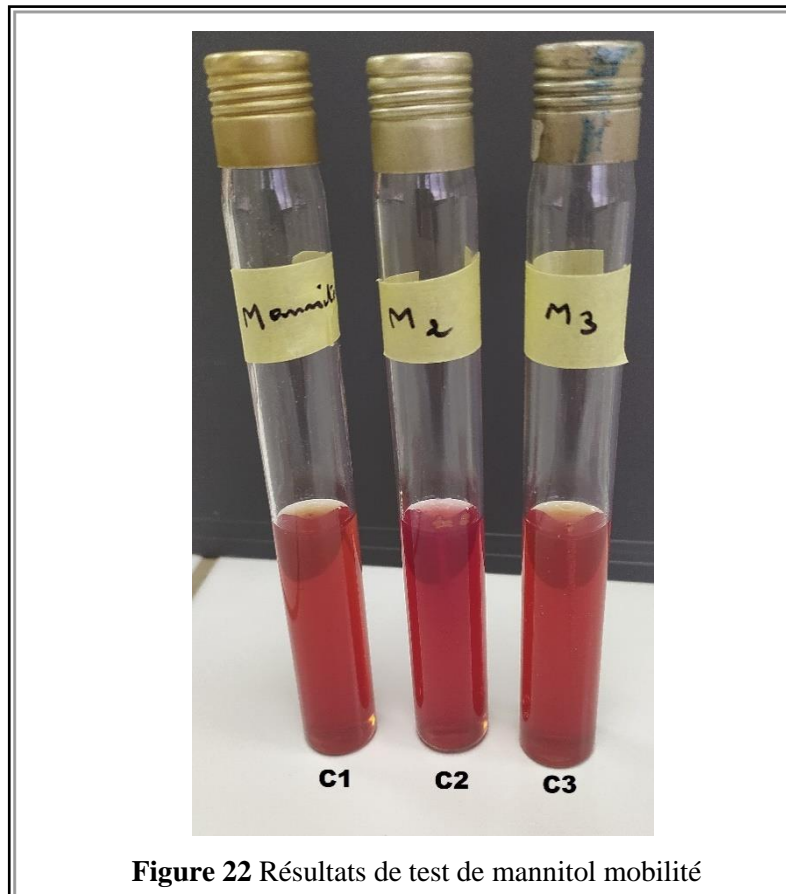


Figure 22 Résultats de test de mannitol mobilité

c) Citrate de Simmons

L'utilisation de citrate comme source de carbone se traduit par un virage de couleur du vert vers le bleu (citrate positive +), Pas de changement de la couleur de milieu (reste verte) indique que cette bactérie est citrate négative (-) (Joffin *et* Leyral, 2006).

Après 24h d'incubation nous avons remarqué une apparition d'une couleur bleue intense dans l'inclinaison des tubes C1 et C2 cela indique que ces isolats sont citrate positive (+), par contre le tube C3 est resté vert (Tab.11 et Fig.23).

Tableau 11 : Résultat de test citrate de Simmons

Isolats	C1	C2	C3
Hydrolyse de citrate	Positif (+)	Positif (+)	Négatif (-)

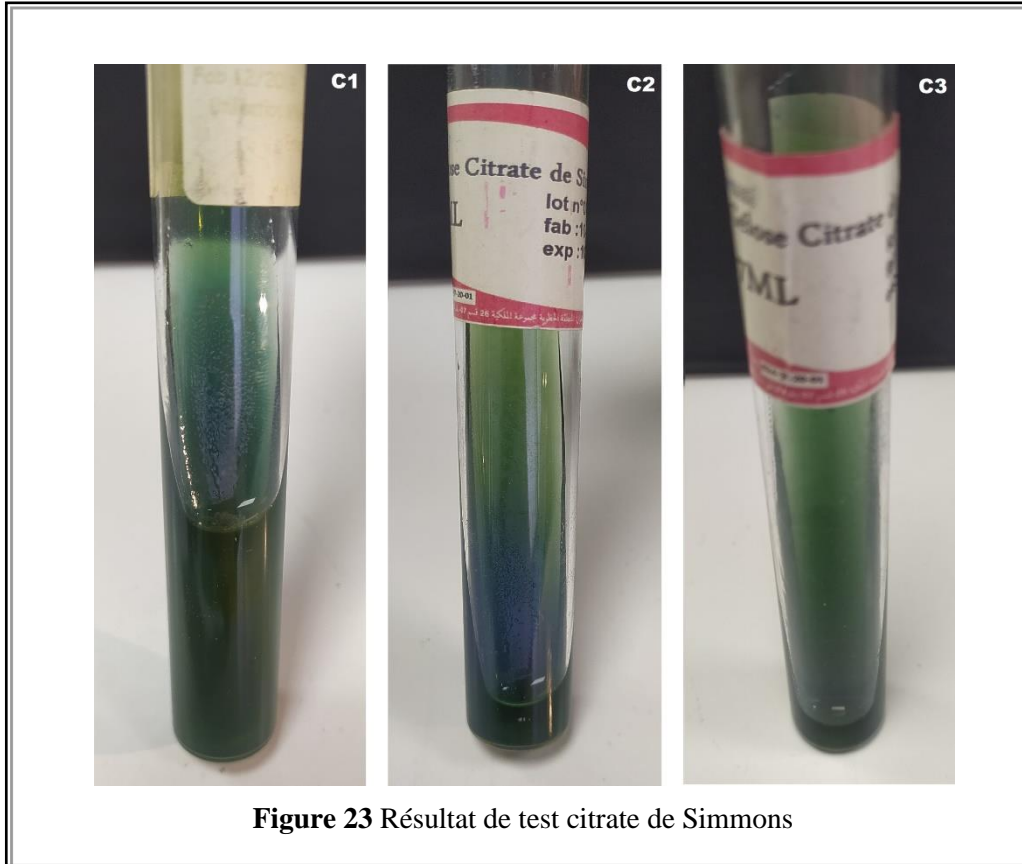


Figure 23 Résultat de test citrate de Simmons

d) Test MEVAG (milieu Hugh et Leifson)

L'utilisation du glucide se traduit par une acidification du milieu révélée par le virage de couleur vert le jaune (la teinte acide de bleu de bromothymol).

- Si la couleur de milieu ne change pas et reste verte, cela indique un métabolisme inerte (pas d'utilisation du glucide).
- Si le haut du tube devient jaune et le reste du tube reste vert, cela indique un métabolisme oxydatif.
- Si le tube devient entièrement jaune, cela indique un métabolisme fermentatif et oxydatif du glucide.
- Si le haut du tube devient bleu, cela indique que la bactérie est inerte au glucose (généralement elle utilise les peptides comme source d'énergie)

Les résultats de test MEVAG après 5 jours d'incubation à 37°C sont montrés dans le tableau et la figure suivants.

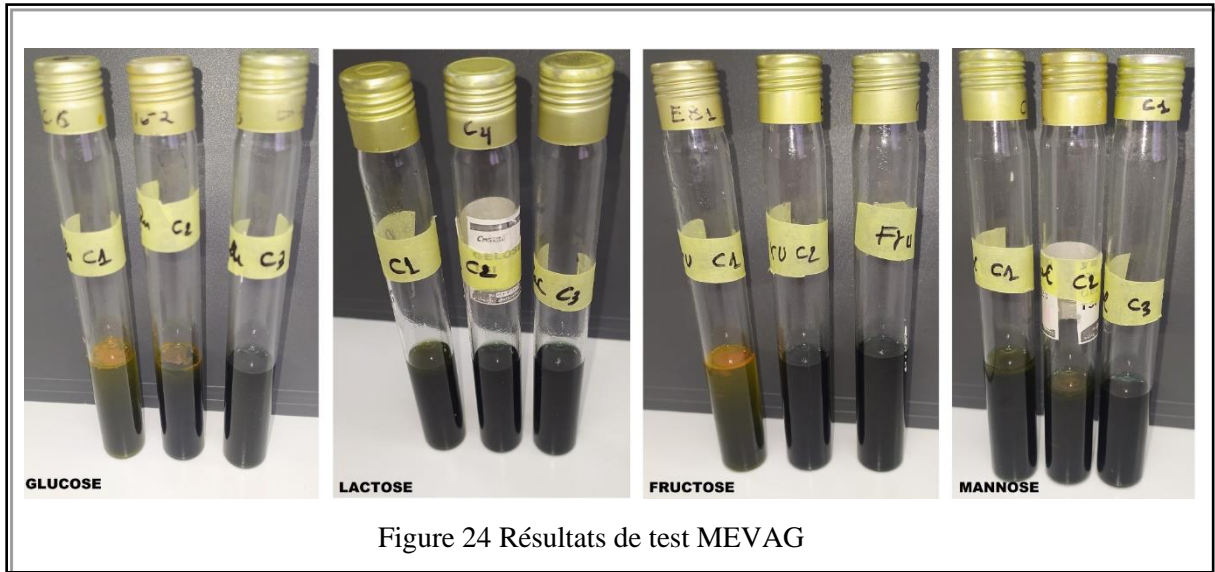


Figure 24 Résultats de test MEVAG

Tableau 12 : Résultats de test MEVAG

Isolats \ Glucide	C1	C2	C3
Glucose	Métabolisme fermentatif et oxydatif	Métabolisme oxydatif	Métabolisme inerte
Lactose	Métabolisme inerte	Métabolisme inerte	Métabolisme inerte
Fructose	Métabolisme fermentatif et oxydatif	Métabolisme inerte	Métabolisme inerte
Mannose	Métabolisme oxydatif	Métabolisme oxydatif	Métabolisme inerte

4.3 Isolement sur milieu King A et King B

L'ensemencement des bactéries a permis d'obtenir une croissance bactérienne des 3 isolats après 24 heures d'incubation sur les milieux King A et King B.

L'exposition des tubes aux rayons UV nous a montré une fluorescent d'une couleur bleu verte sur milieu King A. les figures 25 et 26 montrent les résultats.

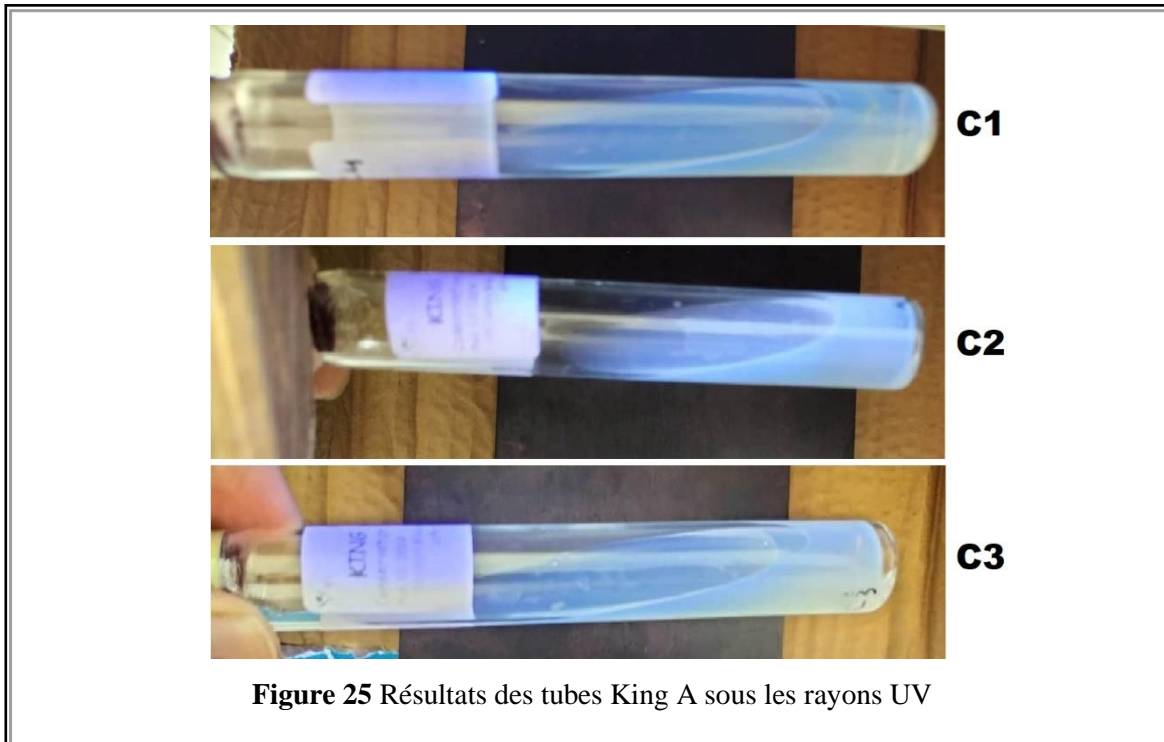


Figure 25 Résultats des tubes King A sous les rayons UV

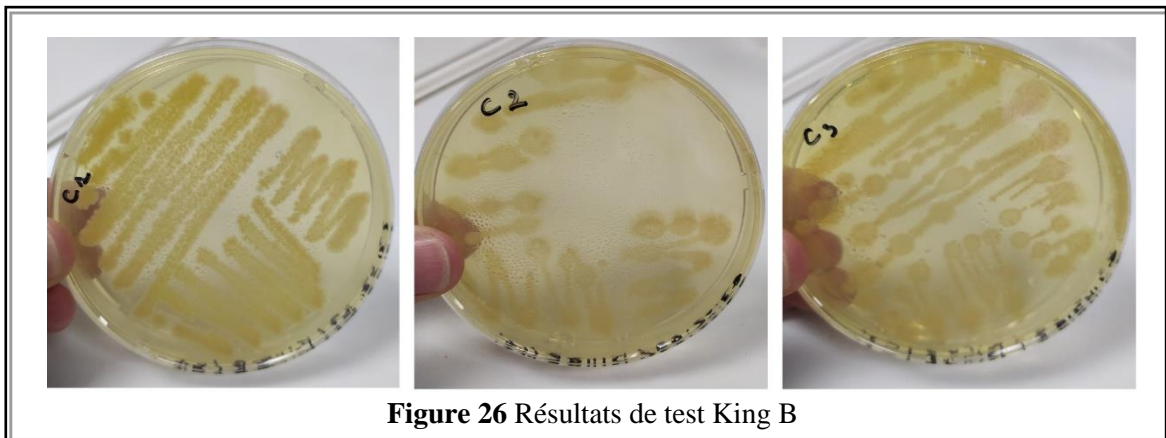


Figure 26 Résultats de test King B

4.4 Test de production de l'indole

La présence d'une couleur rouge (rouge-violet) dans la couche superficielle du bouillon indique un résultat positif (+). Si la couleur de tube reste jaune, cela indique un résultat négatif (-) (Joffin *et* Leyral, 2006).

Selon les résultats obtenus, il y a aucun changement de couleur après l'addition de réactif de Kovác, cela indique que les 3 isolats sont tryptophanase négative (-), la figure 27 montre les résultats obtenus.

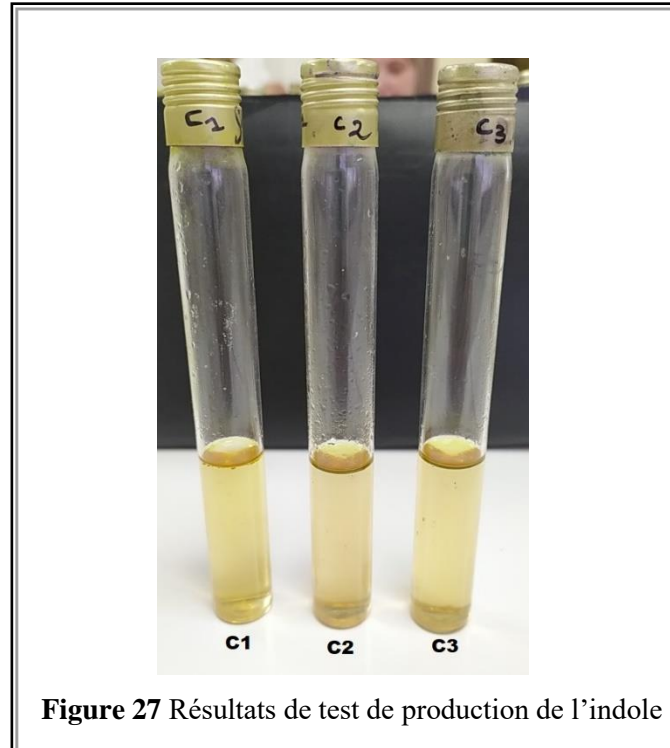
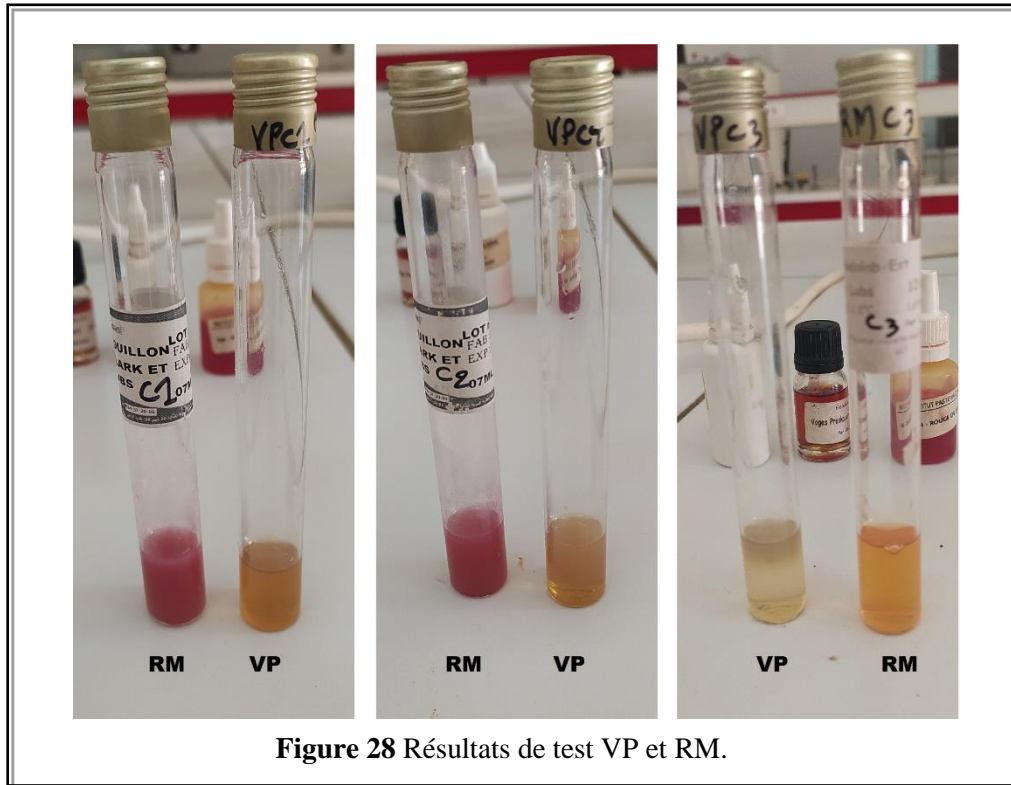


Figure 27 Résultats de test de production de l'indole

4.5 Test de Clark & Lubs (VP-RM)

- Réaction au rouge de méthyle (RM) : Une coloration rouge du milieu est considérée comme test positive. Une coloration jaune du milieu est considérée comme test négative.
- Réaction de Voges-Proskauer (VP) : La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu, cela considérée comme test positive (Joffin et Leyral, 2006).

Après la séparation du boillon en deux tubes et l'addition des réactifs RM et VP, nous avons conclu que tous les isolats sont RM positif (+) et VP négatif (-), la figure suivante montre les résultats obtenus.

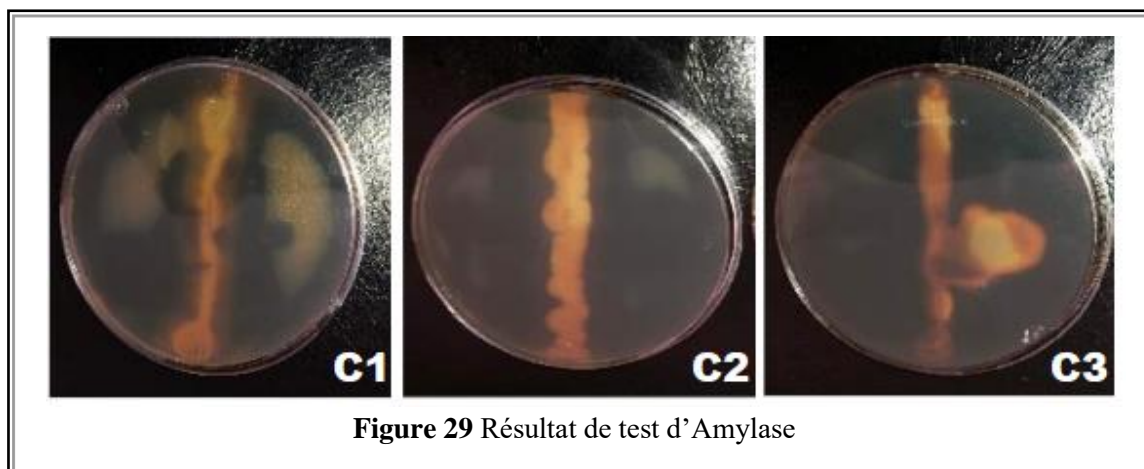


5. Tests enzymatiques

5.1 Test d'Amylase

S'il y a une zone claire autour de la colonie, cela indique la dégradation de l'amidon par cette bactérie, alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun.

Après l'addition d'iode sur notre boîte, nous avons noté que les 3 isolats possèdent l'enzyme de l'amylase (Fig.29).



5.2 Test d'Estérase

L'apparition des précipités d'acide gras indique la présence de l'estérase.

Selon les résultats obtenus, les isolats C1 et C2 sont des bactérie estérase positive (+), et l'isolat C3 est estérase négative (-) la figure suivante montre le résultat.

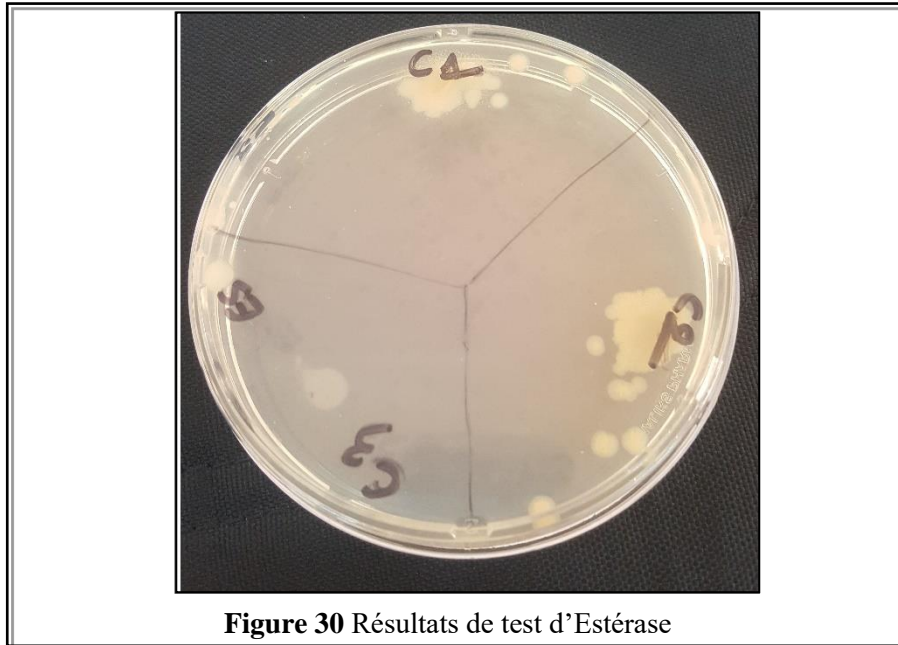


Figure 30 Résultats de test d'Estérase

5.3 Test de protéolyse :

L'apparition d'une zone claire autour de la colonie indique la présence de cet enzyme. Après 48h d'incubation nous avons observé des zones claires autour de C2 et C3

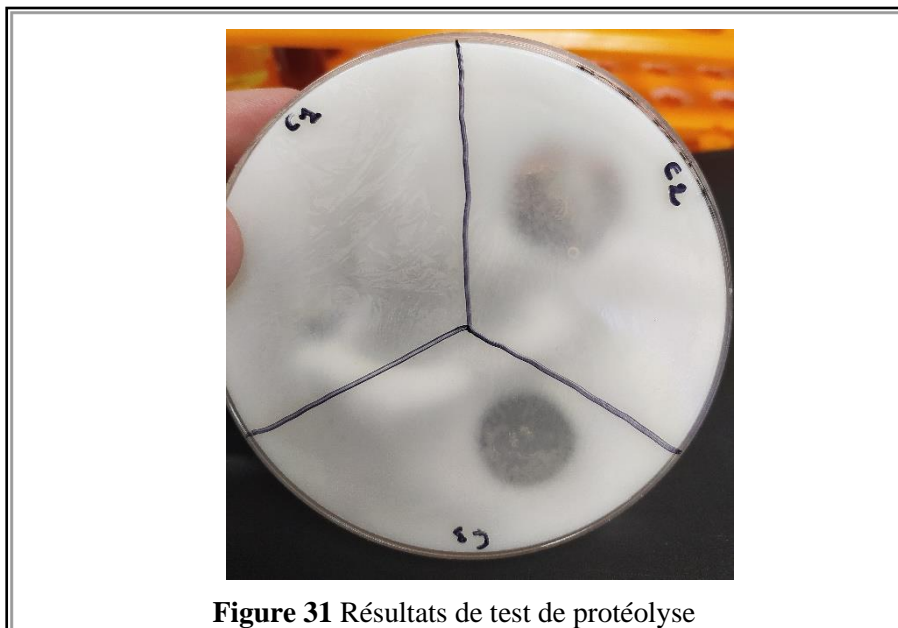


Figure 31 Résultats de test de protéolyse

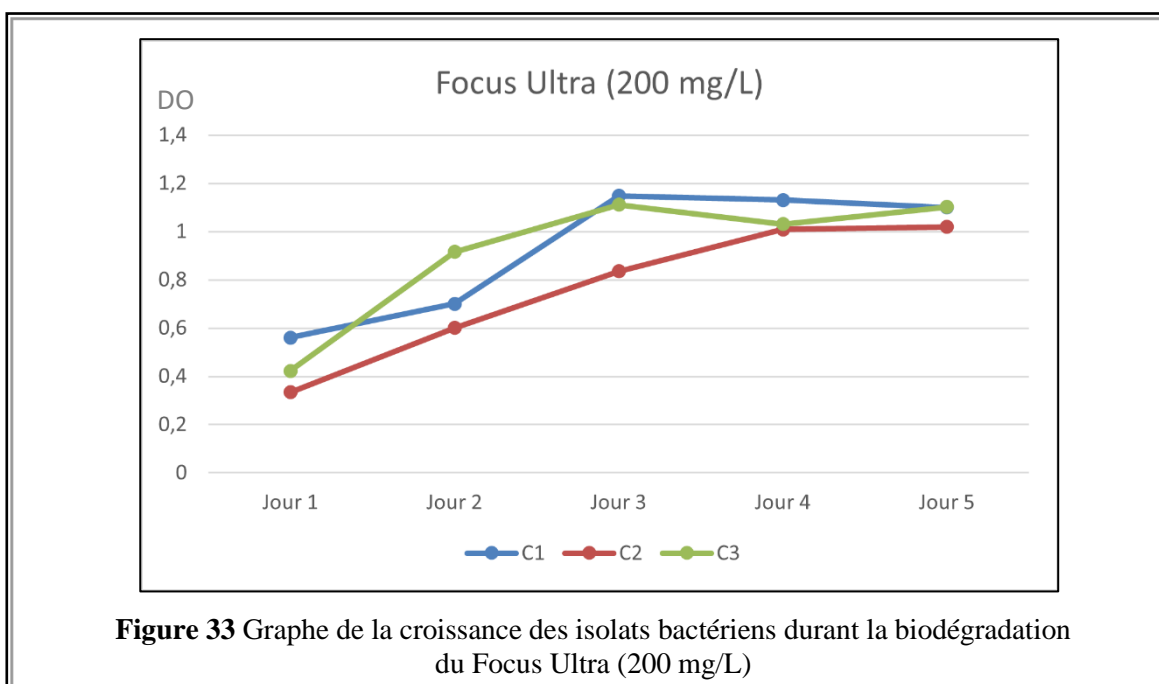
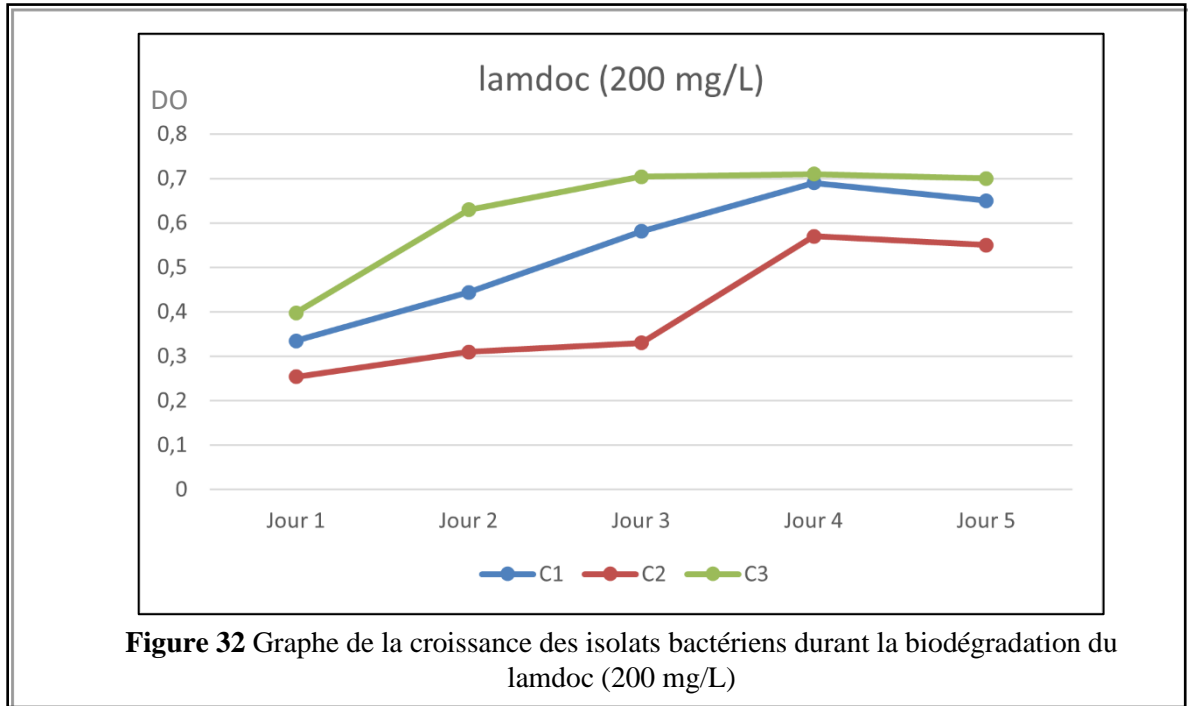
Le tableau suivant résume les résultats de tous les tests biochimiques et enzymatiques.

Tableau 13 : Résultats des tests biochimiques et enzymatiques

Isolat		C1	C2	C3
Tests				
Forme		Bacille	Bacille	Bacille
Gram		-	-	-
Mobilité		-	-	-
Type respiratoire		Aérobie stricte	Aérobie stricte	Aéro-anaérobie facultatif
Enzymes Respiratoires	Catalase	-	+	+
	Nitrate	+	+	+
Métabolismes glucidiques	Glucose	+	+	-
	Lactose	-	-	-
	Fructose	+	-	-
	Mannose	+	+	-
	Saccharose	-	-	-
	Mannitol	-	-	-
	Citrate	+	+	-
	Gaz	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-
Indole		-	-	-
King A		+	+	+
King B		+	+	+
Rouge de méthyle (RM)		+	+	+
Voges-Proskauer (VP)		-	-	-
Eva litsky		-	-	-
Test enzymatique	Amylase	+	+	+
	Estérase	+	+	-
	Protéase	-	+	+
Genre suspecté		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	-

6. Résultats de tolérance des bactéries à différentes concentrations de pesticides sur milieu liquide (MSM liquide + pesticide)

Les courbes suivants montrent les résultats de densité optique des isolats durant la biodégradation des pesticides (concentration 200 mg/L) :



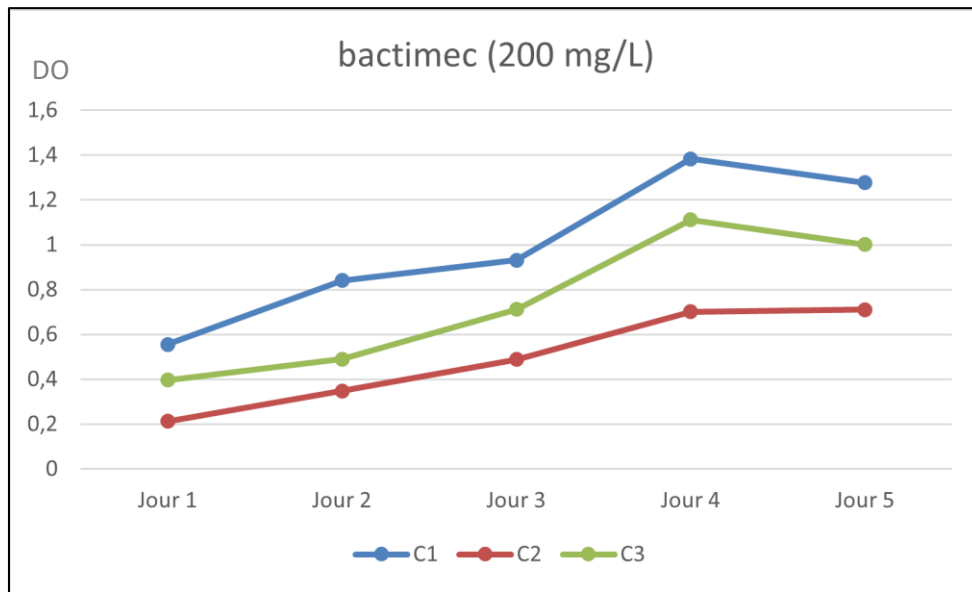


Figure 34 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du bactimec (200 mg/L)

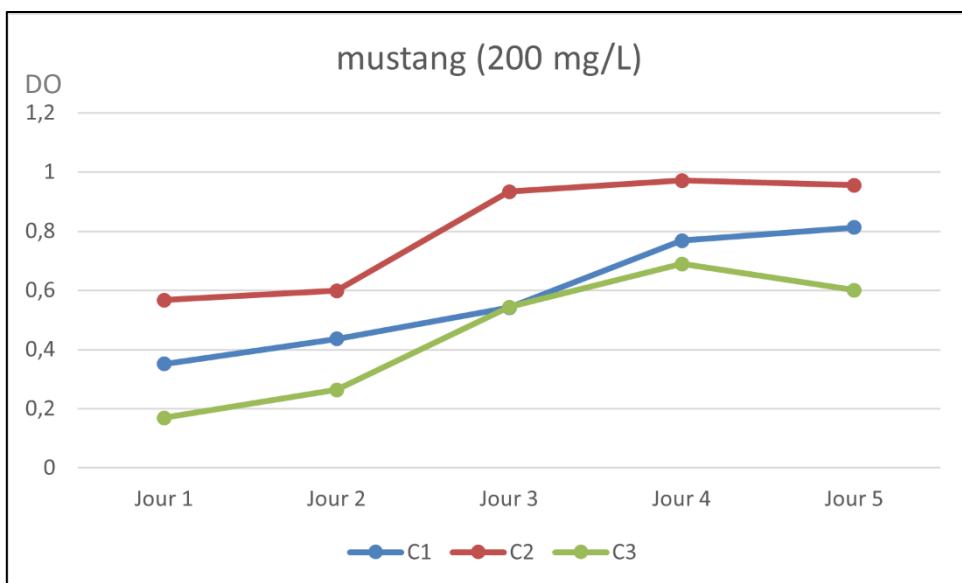


Figure 35 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du mustang (200 mg/L)

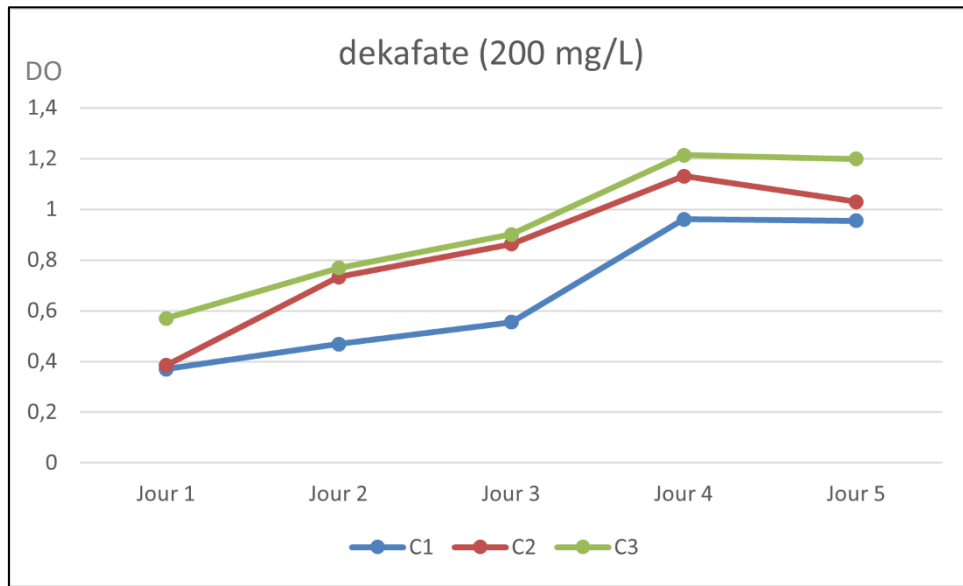


Figure 36 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du dekafeate (200 mg/L)

Les courbes suivants montrent les résultats de densité optique des isolats durant la biodégradation des pesticides (contraction 500 mg/L) :

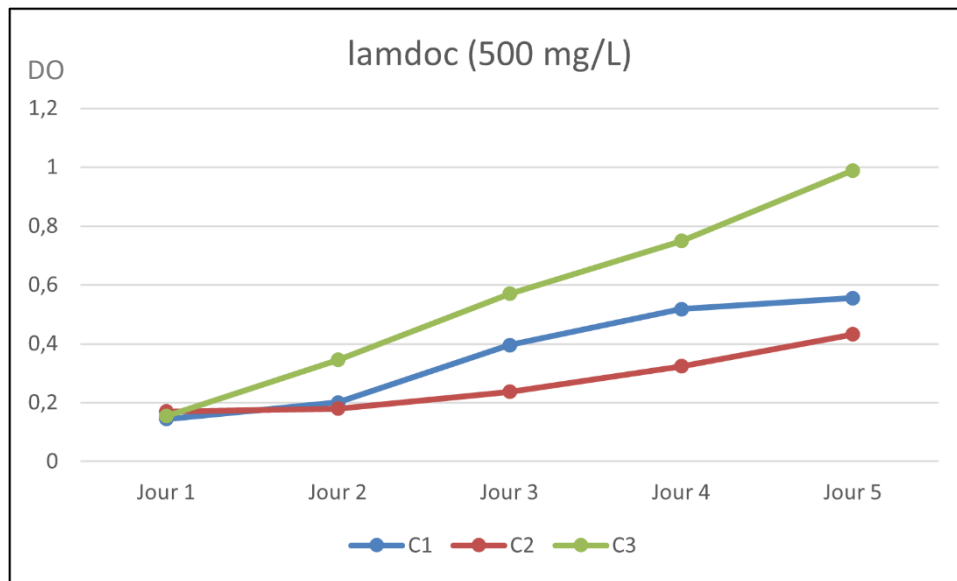


Figure 37 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du lamdoc (500 mg/L)

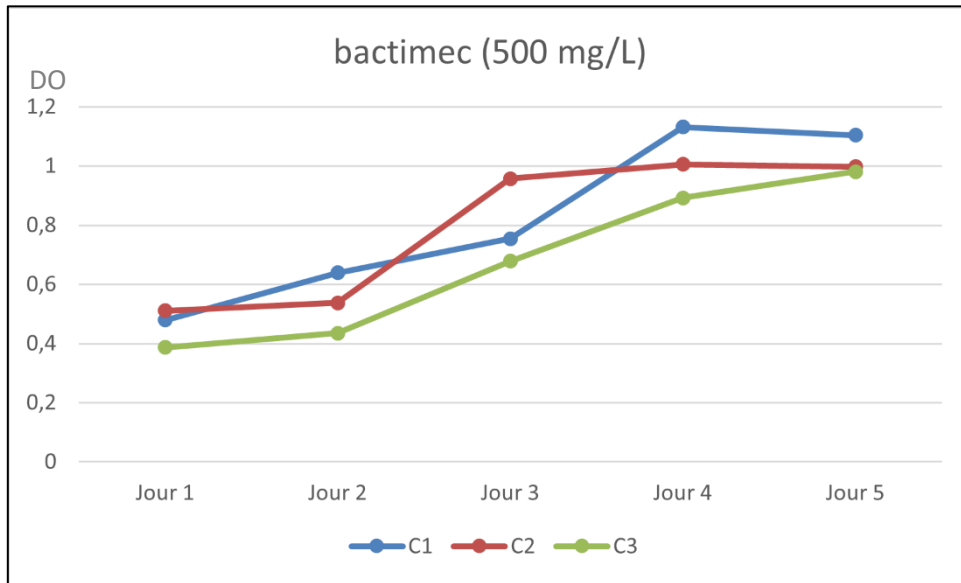


Figure 38 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du bactimec (500 mg/L)

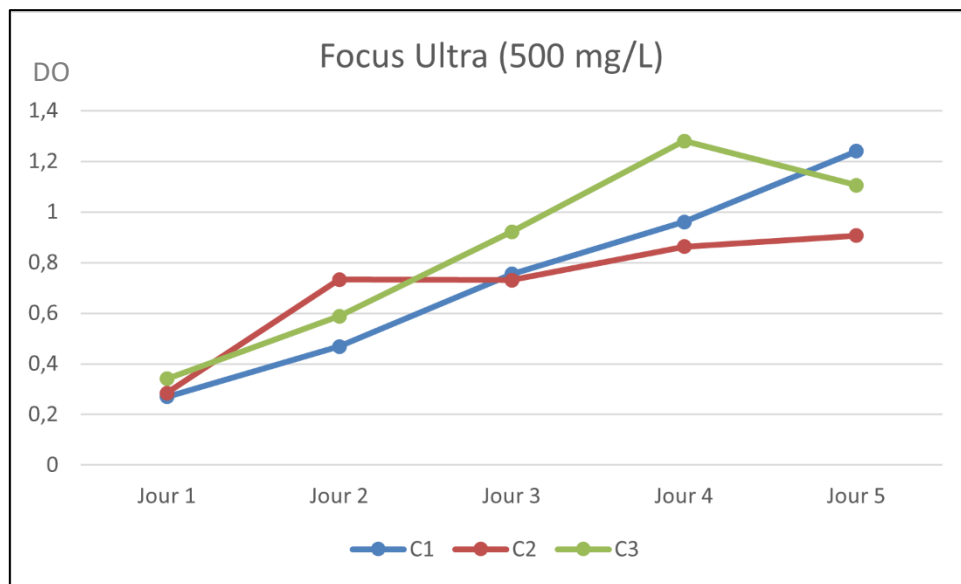


Figure 39 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du Focus Ultra (500 mg/L)

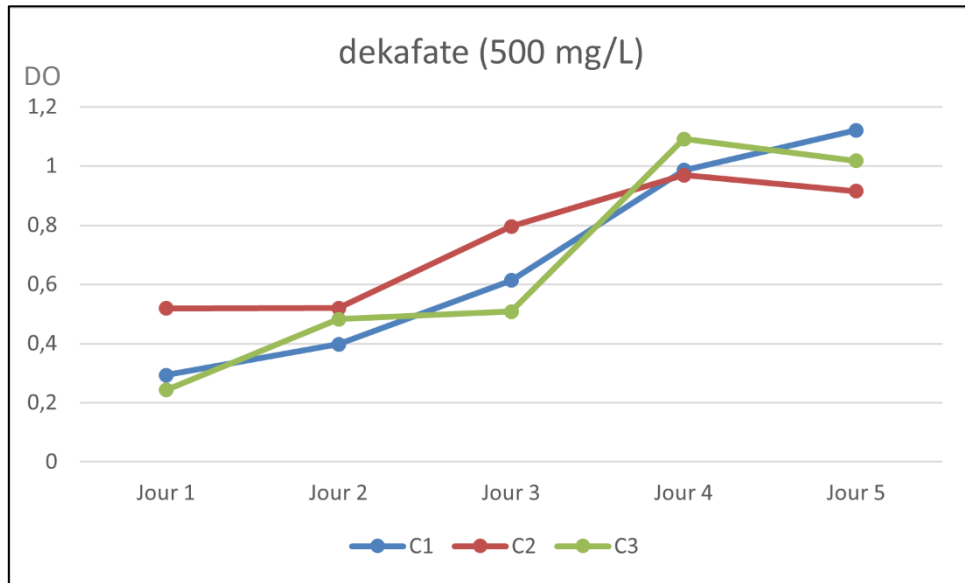


Figure 40 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du dekafate (500 mg/L)

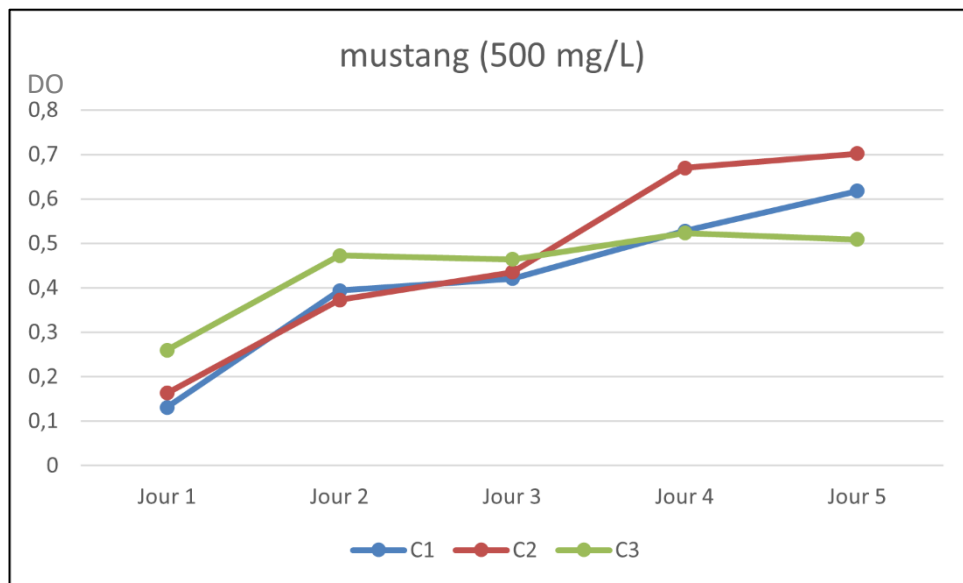


Figure 41 Graphe de la croissance des isolats bactériens durant la biodégradation du mustang (500 mg/L)

7. Discussion :

L'étude a évalué la bioremédiation de quelques pesticides utilisés dans la culture de la pomme de terre par des bactéries isolées des sols agricoles de d'El Touahria, wilaya de Mostaganem.

L'étude préliminaire a été réalisée grâce à une méthode de criblage des bactéries qui tolèrent les pesticides dans un milieu minérale minimum enrichie par des pesticides cibles.

La réponse de croissance des bactéries et la dégradation des pesticides a été surveillée pendant cinq jours à l'aide d'un spectrophotomètre UV- (600 nm).

Les bactéries sélectionnées ont été testées sur un milieu MSM solide additionné de pesticides à des concentrations croissantes.

Il est nécessaire de poursuivre les études pour déterminer les mécanismes possibles et autres métabolites de la dégradation de pesticides par les isolats obtenus.

Diverses études ont montré que l'activité microbienne est le facteur important dans la dégradation des polluants comme les pesticides, d'autres facteurs sont aussi impliqués dans ce phénomène de bioremédiation tels que la teneur en humidité, la température, le pH, la formulation de pesticides, et la teneur en carbone organique (**Kumar et al., 2018a, b**).

Selon **Barathidasan et al. (2014)**, la biodégradation microbienne est assez attrayante pour éliminer les produits chimiques de l'environnement.

Dans cette étude nous avons visé les sols agricoles pour faire notre isolement vu que les espèces indigènes sont préférés car elles n'affectent pas négativement la microflore du sol (**Farhan et al., 2021**).

Le traitement de ce sol par différents pesticides tout au long de plusieurs années l'a rendu une niches écologiques intéressante pour isoler les microorganismes capables de dégrader les pesticides.

Le point principal de cette approche est la création d'un milieu de croissance avec un substrat polluant qui est le pesticide servant de milieu croissance sélectif aux bactéries qui dégradent les pesticides et empêche la croissance des autres qui est le MSM +pesticides (**Verma et al., 2020**).

Le choix des pesticides été basé sur le type de traitement que suis l'agriculteur pour cultiver la pomme de terre. Le Dekafat qui contient 16% de cymoxanil qui est un fongicide en plus du sulfate de cuivre à 20 % fond que la plante puisse s'épanouir sans être touchée par les mildious.

Le Mustang 360SE utilisé en Algérie comme herbicide contient deux genres de pesticides, le florasulam à 6.25g/l et le 2.4D ester2ethyl à 300g/l. le troisième est la marque Lamdoc50EC qui contient la lambda cyhalothrin à 50g/l et qui lutte contre les insectes.

Le criblage des bactéries a permis la sélection de 3 isolats : C1, C2 et C3 sur le milieu MSM solide additionné de différents pesticides et qui ont été étudié en suivant leur croissance dans un milieu liquide à différentes concentrations de pesticides (200mg/L et 500mg/L).

La mesure de la densité optique a montré une croissance aux cinq premiers jours d'incubation sous agitation pour les trois isolats et ceci s'explique par la consommation des pesticides par les bactéries sans nécessiter d'autres nutriments pour induire l'expression d'enzymes dégradant les pesticides.

Les variantes dans la performance de dégradation des souches isolées peuvent être attribuée aux différences d'activité microbienne et de voies de dégradation (**Ambreen et Yasmine, 2021**).

Les tests biochimiques des trois isolats ont pu nous rapprocher à une pré-identification pour l'isolat C1 et C2. Elles sont Gram – et Cat+, non mobiles, pigmentation +, glu+ pourraient appartenir au genre *Pseudomonas* ou *Stenotrophomonas*. Pour la C3 les tests doivent être complétés par d'autres vu qu'elle aéro-anaérobie facultatif et faire éventuelle l'ADH, LDC, ODC pour mieux comprendre son métabolisme.

Pour le test protéolytique, les deux isolats C2 et C3 ont donné une zone claire qui est due à la protéase de paroi.

Pour le test d'estérase, la précipitation des acides gras qui sont hydrophobes par C1 et C2 s'explique par la dégradation du Tween 80 par une enzyme estérase.

Pour le test de l'amidon, les trois isolats possèdent l'enzyme amylase parce qu'elles l'ont dégradé et de ce fait il n'y a pas eu de coloration en bleu lors de l'ajout d'iode.



***Conclusion et
perspectives***

Conclusion

L'application extensive de pesticides en cultures agricoles contamine les écosystèmes et pollue l'environnement et les produits alimentaires en créant des complications pour la santé des humains en raison de sa neurotoxicité.

L'utilisation des méthodes physico-chimiques pour la dégradation des pesticides ne sont pas très efficaces. Ces méthodes sont coûteuses et non respectueuses de l'écosystème. Pour l'élimination des produits chimiques dangereux de l'environnement, l'utilisation d'agents biologiques (bactéries, champignons et enzymes) est très efficace car ils sont rentables et respectueux de l'environnement. Ces agents biologiques ont le potentiel de décomposer les pesticides en leurs sous-produits moins toxiques.

L'objectif de ce travail était la découverte d'une flore bactérienne pouvant dégrader les pesticides. À la fin nous avons pu obtenir trois isolats à potentiel de biodégradation des pesticides et qui tolère les pesticides à une concentration de 50 mg/L, ces isolats ont besoin d'être réétudié dans le domaine de la bioaugmentation et la biostimulation avec des nutriments et avec d'autres Isolats comme consortium pour pouvoir dégrader de concentration beaucoup plus importante que celle que nous avons utilisé dans notre travail.

Perspectives

Notre travail est une étude préliminaire dans le domaine de la biodépollution des pesticides, d'autres études peuvent-être complétées comme l'identification moléculaires de ces isolats, l'évaluation de la quantité de biodégradation des pesticides par HPLC et GC et à la fin pourquoi pas l'utilisation de ces isolats comme des biopesticides sur les champs agricoles.



Référence

Bibliographique

Référence Bibliographique

1. Adekunle V, Dafiwhare H 2011. Diversity and abundance of microbes, pH and organic matter in soils of different forest types in tropical humid lowland forest ecosystem, Nigeria. *Journal of Biodiversity and Ecological Sciences JBES*.
2. Agoussar, A. 2017. Effet des pesticides sur la diversité bactérienne des champs agricoles et la capacité des bactéries à les dégrader. Thèse pour l'obtention du grade de maîtrise : Microbiologie. Faculté de médecine : Université de Montréal ,92p.
3. Aïna, M. P., Agbohessi, P., Toko, I. I., & Scippo, M. L. (2015). Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 2184-2199.
4. Alamine, A. 2020. Étude des connaissances, attitudes et pratiques des maraîchers sur l'usage rationnel des pesticides à Bamako et à Baguineda. Thèses de Doctorat. Département de pharmacie. Université des Sciences des Techniques Bamako, 102p.
5. Aloui, N. 2020. Etude de la biodégradation de quelques pesticides par des bactéries isolées de différentes niches écologiques de la wilaya d'Ouargla. Thèses l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD. Université d'Ouargla ,171p.
6. Alvarez A., Saez J., Davila J., Colin V., Fuentes M., Cuozzo S., Amoroso M. 2017: Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166: 41–62.
7. Ambreen, S., Yasmin, A., 2021. Novel degradation pathways for Chlorpyrifos and 3, 5, 6-Trichloro-2-pyridinol degradation by bacterial strain *Bacillus thuringiensis* MB497 isolated from agricultural fields of Mianwali, Pakistan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 172, 104750.
8. Anonyme 1, 2015, DSA. Campagne 2000.2014. Mostaganem. Statistiques de la Direction des Services agricoles pp. 10.
9. Anonyme 2, 2005, ACTA Index Phytosanitaire, Association de coordination technique agricole 194 rue de Bercy, 75595 Paris
10. Anonyme 3, 2006, ACTA Index Phytosanitaire, Association de coordination technique agricole 194 rue de Bercy, 75595 Paris
11. Anonyme 4, 2011. UIPP The usefulness of phytopharmaceuticals. Union of Plant Protection Industries P: 6.
12. Anonyme 5, 2010, Service statique, Douanes algériennes 2010
13. Anwar S., Liaquat F., Khan Q.M., Khalid Z.M., Iqbal S. 2009: Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 400–405.
14. Aubertot, J. N., Barbier, J. M., Carpentier, A., Gril, J. N., Guichard, L., Lucas, P., et Voltz, M. 2007. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective Inra-Cemagref (décembre 2005) pp. 120-p.
15. Balasubramanian, A. 2017. Soil Forming Processes.
16. Barathidasan, K., Reetha, D., D, J.M., N, S., M, G., 2014. Biodegradation of chlorpyrifos by co-culture of *Cellulomonas fimi* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8 (9), 961–966.
17. Barriuso, E., Soulas G. et Schiavon M. 2000. "Rétention et dégradation des pesticides dans le sol." *Hydrogéologie* 1: 49-56.
18. Benziane A., 2014. Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos chez le rat wistar: étude de l'activité enzymatique des cholinestérases comme indicateur biologique. Thèse de master, université Telemansane. 51p.
19. Bi, Y., Han, L., Song, S., Yao, W., Qin, F., Xu, Y., & Wu, Q. (2020). Method validation, storage stability and field trial for residues of florasulam and pyroxsulam in cereal by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(5), 793-803.

20. Boland, J., Florijn, A. 2004. Les pesticides : composition, utilisation et risques : les pesticides. Wageningen Wageningen:Agromisa CTA. 216p
21. Bouchon C. et Lemoine S., 2003. Niveau de contamination par les pesticides des chaînes trophiques des milieux marins côtiers de la Guadeloupe et recherche de biomarqueurs génotoxicité. Rapportfinal, DRE/Guadeloupe, 71 p.
22. Bourbia A., 2013. Evaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bio indicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Thèse de Doctorat. Univ. Annaba. 110p.
23. BOUZIANI M. 2007. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santé Maghreb
24. Brady, N. 1974. The Nature and Properties of Soils. New York: MacMillan. 639 pp.
25. Callenbach, E 1998 Ecology: A Pocket Guide, University of California Press, Berkley.
26. Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit C., Charnay M.-P. et Coquet Y., 2005. Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. Éditions France Agricole, Paris. 625 p.
27. Carlile, M., Watkinson, S., GOODAY, G. 2001. The fungi. Gulf Professional Publishing,
28. Cavalier-Smith, T. 1993, Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiological reviews, vol. 57, no 4, p. 953-994.
29. Chaumeton H., Jutier S., Fragnaud C., 2006. La culture des pommes de terre. 93 p
30. Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A., et Arshad, M. 2013. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. Journal of environmental management, 114, 372-380.
31. Coudron, P., Ford, J., et Dalton, H. 1983. Tetrazolium reduction as an aid for streptococcal growth detection with agar dilution susceptibility testing. Journal of clinical microbiology, 18(4), 765-769.
32. Cui z., Cui x., Huang Y., Yan X., He J., and Li S.-p., 2012 "Advances and application of microbial degradation in pesticides pollution remediation," Nanjing Nongye Daxue Xuebao, vol. 35, no. 5, pp. 93–102,
33. Cycon, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. 2017. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. Chemosphere, 172, 52-71. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.129
34. Daniels, W., & Haering, K. 2006. Concepts of basic soil science. The Mid-Atlantic Nutrient Management Handbook, 31.
35. De boer W, Folman L, Summerbell R, Boddy L 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiology Rev. 29, 795–811.
36. Doolotkeldieva T., Konurbaeva M., Bobusheva S. 2018: Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. Environmental Science and Pollution Research, 25: 31848–31862.
37. El Garouani A., Merzouk A., Jabrane R., et Boussema M., 2003 : Cartographie de l'érosion des sols dans le bassin versant de L'oued Jemaa (Pre-Rif, Maroc). Lab.Géo.RNE.Fac.Sci.Tech.Fés-saïss (fst).Rev.Géo.Nr.1: 39-46p.
38. Essa A., Reyad A., Redwan T., Ibrahim W. 2016: Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from agricultural drainage ditches. Egyptian Journal of Botany, 56: 353–370.
39. Farhan, M., Ahmad, M., Kanwal, A., Butt, Z.A., Khan, Q.F., Raza, S.A., Qayyum, H., Wahid, A., 2021. Biodegradation of chlorpyrifos using isolates from contaminated agricultural soil, its kinetic studies. Sci. Rep. 11 (1), 10320.
40. Faurie C., Erra C., Médorie P., Devane J., Remptime J. 2003. Ecologie, Scientifique. 5^{ème} édition LAVOISIER. 823P.
41. Fenske R.A, Kedan G, Lu C, Fisker-Andersen J.A, Curl C.L. 2002 Assessment of organophosphorus pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. J. ExposureAnalysis Environ. Epidemiol., 12 21-28.
42. Fierer N, Bradford M, Jackson R. 2007, Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology. Jun; 88(6):1354-64.
43. Gangola S., Sharma A., Bhatt P., Khati P., Chaudhary P. 2018: Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin.

44. Gilani R., Rafique M., Rehman A., Munis M., Rehman S., Chaudhary H. 2016: Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *Journal of Basic Microbiology*, 56: 105–109.
45. Gobat, J., Aragno, M et Matthey, W, 2003. *Le sol vivant. Bases de pédologie – Biologie des sols*. 2e éd. Revue et augmentée. Coll. Gérer l'environnement. Les Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 568 p.
46. Gobat, J., Aragno, M., et Matthey, W. 2004. *The living soil: fundamentals of soil science and soil biology*. Science Publishers.
47. Guignon-Moreau, E. 2006. *Transfert des pesticides vers les eaux superficielles et l'atmosphère : caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. 251p
48. Guimont, S. 2005. *Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol : thèse de doctorat en sciences Agronomiques*. Institut National Polytechnique de Lorraine, France
49. Hai, F. Modin, O. Yamamoto, K. Fukushi, K. Nakajima, F. et Nghiem, L. 2012. *Pesticide Removal by a Mixed Culture of Bacteria and White Rot Fungi*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.
50. Houyvet, J. 2019, *Quels sont les dangers des pesticides*. FUTURA PLANÈTE.
51. Huang Y., Xiao L., Li F., Xiao M., Lin D., Long X., Wu Z. 2018: *Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid, A Review*. *Molecules*. 2018 Sep 11;23(9):2313.
52. Hultgren, R. Hudson, R. Jerry, S. 2002. *Effects of Soil pH and Soil Water Content on Prosulfuron Dissipation*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50. 3236-43.
53. Jayabarath J., Musfira S., Giridhar R., Shyam sundar S., Arulmurugan R. 2010: *Biodegradation of carbofuran pesticide by saline soil actinomycetes*. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6: 187–192.
54. Joffin, J et Layeral, G., 2006. *Microbiologie technique*. Tom 1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, 368
55. Johnson, A., White, C., Bhardwaj, C., Dixon, A., 2003. *The ability of endogenous microorganisms to degrade isoproturon, atrazine and mecoprop with aerobic UK aquifer systems*. *Pest man Sci*. 59 :1291-1302
56. Kamal Z., Fetyan N., Ibrahim M., Sherif E. 2008: *Biodegradation and detoxification of malathion by of Bacillus thuringiensis MOS-5*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2: 724–732.
57. Kariga S., Rao S. 2011: *Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review*. *Enzyme Research*: 805187.
58. Książek-Trela, P., et Szpyrka, E. 2022. *The effect of natural and biological pesticides on the degradation of synthetic pesticides*. *Plant Protection Science*, 58(4), 273-291.
59. Kulshrestha, G., et Kumari, A. 2010. *Simultaneous degradation of mixed insecticides by mixed fungal culture isolated from sewage sludge*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 11852-11856.
60. Kumar, S., Ghosh, P., Malyan, S., Sharma, J., et Kumar, V. 2019. *A comprehensive review on enzymatic degradation of the organophosphate pesticide malathion in the environment*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 37(4), 288-329.
61. Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M.A., Mimesh, S., Lopez-Chuken, U.J., Villarreal-Chiu, J.F., 2018a. *Microbial degradation of Organophosphate Organophosphate pesticides : a review*. *Pedosphere* 28 (2), 190–208.
62. Lavelle, P. and A. V. Spain, 2001 - *Soil Ecology*, Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands
63. Lavelle, P., C. Rouland, M. Diouf, F. Binet and A. Kersante, 2005 - *Regulation of microbial activities in functional domains of roots and invertebrates*. In: F. Buscot and A. Varma (Eds.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*, Vol. 3, Springer-Verlag, Berlin, pp. 291-305

64. Lee Y., Lee J., Hwang E., Lee H., Kim J., Heo J., Choi Y. 2016: Characterization of biological degradation cypermethrin by *Bacillus amyloliquefaciens* AP01. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 59: 9–12.
65. Leroux, P. (1994). Influence du pH, d'acides aminés et de diverses substances organiques sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil vis-à-vis de certaines souches de *Botrytis cinerea*. *Agronomie*, 14(8), 541-554.
66. Mahmood, I., Imadi, S., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K. 2016. Effects of Pesticides on Environment. In: *Plant, Soil and Microbes*.
67. Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Alagawany, M., & Farag, M. R. (2021). The stress of abamectin toxicity reduced water quality, growth performance, immunity and antioxidant capacity of *Oreochromis niloticus* fish: Modulatory role of *Simmondsia chinensis* extract as a dietary supplement. *Aquaculture*, 534, 736247.
68. Mandal K., Singh B., Jariyal M., Gupta V.K. 2014: Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. *Chemosphere*, 101: 55–60.
69. Mazour M., 2004 : Etude des facteurs de risque de ruissellement et de l'érosion en nappe et conservation de l'eau et du sol dans le bassin versant de l'Isser (Tlemcen). Thèse Doct.Détat, Univ.Tlemcen, 184p.
70. Mendoza J., Perea Y., Salvador J. A., 2011. Bacterial biodegradation of permetrina and cipermetrina pesticides in a culture assemblage, *Avances en Cienciase Ingenieria*, vol. 2, no.3, P: 45–55
71. Meng D., Zhang L., Meng J., Tian Q., Zhai L., Hao Z., Guan Z., Cai Y., Liao X. 2019a: Evaluation of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* YP6 in phoxim degradation via transcriptomic data and product analysis. *Molecules*, 24: 3997.
72. Mirsal, I. 2008; *Soil Pollution Origin, Monitoring and Remediation*, 2nd ed.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany,
73. Monadjemi, S., Ter Halle, A., & Richard, C. (2014). Accelerated dissipation of the herbicide cycloxydim on wax films in the presence of the fungicide chlorothalonil and under the action of solar light. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(21), 4846-4851.
74. Newton L, Chantal H 2010. *Soil Biology of the Canadian Prairies*. *Agricultural Soils of the Prairies*. PSetC., *Prairie Soils and Crops Journal.*, Vol. 3 : 16-24.
75. Peng, X., Zhang, J., Li, Y., Li, W., Xu, G, et Yan, Y. 2008. Biodegradation of insecticide carbofuran by *Paracoccus* sp. YM3. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 43(7), 588-594.
76. Pinto, A. Serrano, C. Pires, T. Mestrinho, E., Dias, L., Teixeira, D, et Caldeira, A. 2012. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of the Total Environment*, 435, 402-410.
77. Prosser, J. I., 2002 - Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*. 244, 9-17.
78. Rajveer, K., Gurjot, K. et Shweta, R. 2019, *Pesticides Classification and Its Impact on Environment*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (ijcmas)*. vol 8, n° 3, pp: 1889-1897
79. Saafan A., Azmy A., Amin M., Ahmed S., Essam T. (2016): Isolation and characterization of two malathiondegrading *Pseudomonas* sp. in Egypt. *African Journal of Biotechnology*.
80. SAIBI, A. (2008): Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de lapollution des sols *Helix aspersa*, thèse de doctorat
81. Sambasiva R, Tripathy N., Mahalaxmi Y., Prakasham R. (2012): Laccase- and peroxidase-free tyrosinase production by isolated microbial strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 207–214.
82. Samolov, E., Baumann, K., Büdel, B., Jung, P., Leinweber, P., Mikhailyuk, T., Glaser, K. (2020). Biodiversity of algae and cyanobacteria in biological soil crusts collected along a climatic gradient in Chile using an integrative approach. *Microorganisms*, 8(7), 1047.
83. Sharmila R. Pradeep S. Murari Mohan R. 2008, *Soil Biodiversity Under Forage*

- Stockert, J., Horobin, R., Colombo, L., et Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta histochemica*, 120(3), 159–167.
84. TOUMI I. 2014 : Identification et Biodeversité de L'entamofaune de La Pomme de Terre (*Solanum tuberosum* L.) dans la Région d'El oued p 2
85. Van Es et Harold. 2017 A new definition of soil. *Csa News*, vol. 62, no 10, p. 20-21.
86. Vega, A., Frenich, A., & Vidal, J. (2005). Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 117-127.
87. Verma, S., Singh, D., Chatterjee, S., 2020. Biodegradation of organophosphorus pesticide chlorpyrifos by *Sphingobacterium* sp. C1B, a psychrotolerant bacterium isolated from apple orchard in Himachal Pradesh of India. *Extremophiles* 24 (6), 897–908.
88. Yaduraju, N. (1994). "Influence of soil environmental factors on the efficacy of herbicides." *Soil Environment and Pesticides*: 265-292
89. Yaron, B. (1989). "General Principle of Pesticide Movement to Groundwater." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 26 : 275-297.
90. Zeboudji B. (2005). Contribution à la mise en pointe d'une méthode d'extraction liquide -liquide d'un pesticides organochloré DDT dans l'eau, Mémoire de Magister : Ecole Nationale Polytechnique. Alger, 64p
91. Zertal, A., Jacquet, M., Lavedrine, B., Sehili, T. 2005. Photodegradation of chlorinated pesticides dispersed on sand. *Chemosphere* 58, 1431-1437



Annexes

Annexe 1 : les milieux de cultures et les tests biochimiques utilisés

Milieu	Utilisations	Composition
Bouillon nutritive ou BN	Milieu liquide non-sélectif utiliser pour l'enrichissement des Microorganismes.	Peptone : 10,0g Extrait de viande : 10,0g Chlorure de sodium : 5,0 g Eau distillée : 1000ml PH=7
Gélose nutritive ou GN	Milieu solide de culture non-sélectif utiliser pour l'isolement et la purification des Microorganismes.	Extrait de viande : 1,0g Extrait de levure : 2,5g Peptone : 5,0g Chlorure de sodium : 5,0 g Agar : 15,0 g Eau distillée : 1000ml PH : 7,0
Milieu MSM (Minimal Salt Medium)	Milieu des sels minéraux, non contient aucune source de carbone, a été utilisé pour tester la capacité de dégradation des pesticides par les microorganismes.	K ₂ HPO ₄ :1.5g KH ₂ PO ₄ : 0.5 g NH ₄ NO ₃ :1g MgSO ₄ ·7H ₂ O:0.1g NaCl: 1g Eau distillée : 1000ml PH=7
Bouillon nitraté	Milieu utiliser pour recherche la production de nitrate- réductase.	Extrait de viande : 3g Peptone : 4g Proteose peptone n°3 : 1g Potassium nitrate : 1g Eau distillée : 1000 ml PH : 7
Gélose viande foie (Gélose VF)	Milieu utiliser pour la mettre en évidence le mode respiratoire des bactéries, ainsi que pour l'isolement en profondeur des bactéries anaérobies strictes.	Viande de foie : 30g Glucose : 2g Agar : 6g Eau distillée : 1000ml PH : 7,4

Milieu TSI (taipe suger iron agar)	Utiliser pour une identification basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H ₂ S.	Extrait de viande : 3g Extrait de levure : 3g Peptone : 20g Chlorure de sodium : 5g Lactose: 10g Saccharose: 10g Glucose : 1g Sulfate ferreux ammoniacal : 300mg Rouge de phénol : 24mg Thiosulfate sodium anydre: 300mg Agar: 11g Eau distillée : 1000ml PH=7,4
Mannitol mobilité	Milieu semi-solide qui permet de déterminer la mobilité et la fermentation du mannitol par les bactéries.	Peptone : 20 g Nitrate de potassium : 1 g Mannitol : 2 g Rouge de phénol : 140 mg Agar : 4 g Eau distillée : 1000ml PH = 8,1
Citrate de Simmons.	Milieu permet l'étude de l'utilisation du citrate (acide organique) comme seule source de carbone par la bactérie.	Citrate de sodium : 1g Chlorure de sodium : 5g Sulfate de magnésium : 200mg Dihydrogénophosphate d'ammonium : 1g Monohydrogénophosphate de potassium 1g Bleu de bromotymol : 80mg Agar : 13g Eau distillée : 1000ml PH=6 ,8
Milieu Hugh et Leifson (MEVAG)	Utiliser pour la mise en évidence de la voie d'attaque des glucides par l'utilisation des milieux contenant un seul glucide et bleu de bromothymol (BBT) comme un indicateur de pH.	Tryptone: 2g Bleu de bromothymol : 0,03g Chlorure de sodium : 5g Hydrogénophosphate de potassium : 0,3g Agar-agar : 2,5g Eau distillée : 1000mL PH = 7,1

Milieu King A	Milieu permet l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , par la favorisation de la production de pyocyanine.	Peptone: 20g Glycerol: 10g Sulfate de potassium : 10g Chlorure de magnésium : 1,4g Agar purifiés : 12g Eau distillée 1000 ml PH = 7, 2
Milieu King B	Milieu favorise la synthèse de la pyoverdine, un pigment vert fluorescent produit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et d'autres espèces de <i>Pseudomonas</i> comme <i>P.fluorescens</i> et <i>P.putida</i> .	Peptone dite "B" :20,0 g Glycérol : 10,0 g hydrogénophosphate de potassium : 1,5 g Sulfate de magnésium heptahydraté : 1,5 g Agar purifié : 12,0 g Eau distillée 1000 ml PH = 7,2
Bouillons peptone exempte d'indole	Déterminer la capacité d'une bactérie à produire de l'indole à partir de la dégradation de l'acide aminé tryptophane par un enzyme appelée tryptophanase.	Peptone : 20g Sodium chlorure : 30g Eau distillé 1000ml Ph= 7,2
Milieu de Clark et lubs	Milieu permet l'étude des produits de fermentation du glucose et la différenciation entre les fermentations acide butanediolique et acides mixtes.	Peptone : 5g Glucose : 5g Hydrogénophosphate de potassium : 5g Eau distillée 1000 ml Ph=7