



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



UNIVERSITÉ
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par

IKHLEF MELISSA

&

HAGANI LOUDJEINA

Thème :

Etude de la bioremédiation des sols fertiles et biodégradation des pesticides par les bactéries telluriques

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

Président	Dr. BELARBI A	MCA	Université de Mostaganem
Encadreur	Dr. BEKENNICHE N	MCB	Université de Mostaganem
Examinateur	Dr. BAHLOUL H.A	MCB	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement



Nous tenons à saisir cette occasion pour exprimer notre profonde gratitude envers vous ainsi que toutes les personnes qui ont joué un rôle crucial dans la réalisation de notre mémoire. Votre soutien inconditionnel, votre expertise et votre encouragement ont été essentiels à notre parcours et à la réussite de ce projet.

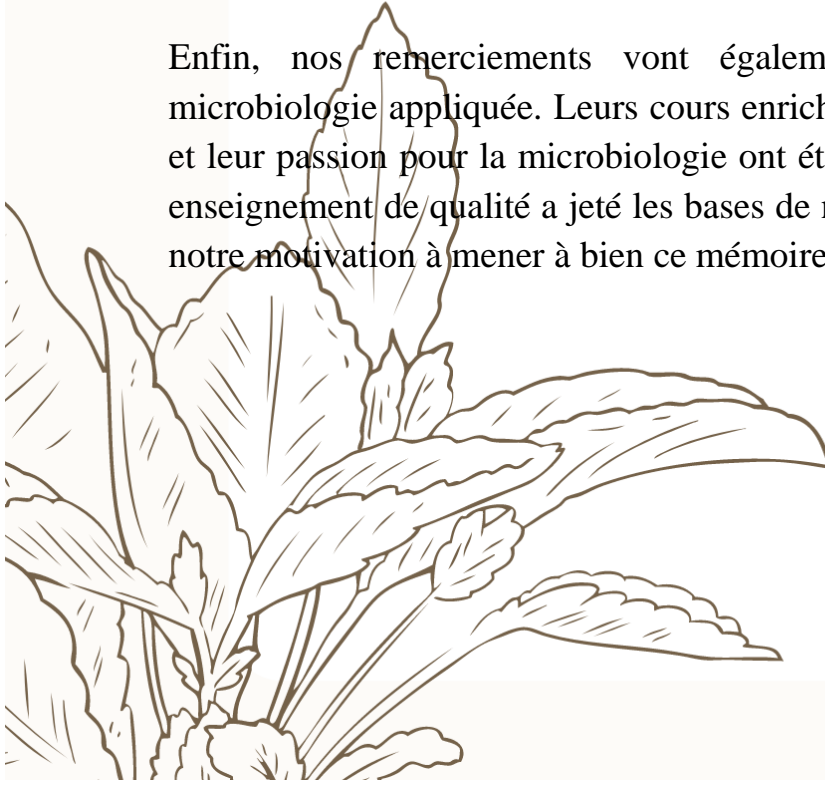
Tout d'abord, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance envers notre encadrante Dr. BEKENNICHE N, pour votre dévouement et votre précieuse guidance tout au long de ce processus. Vos conseils éclairés, votre soutien constant. Grâce à vous, nous avons pu développer nos compétences et approfondir notre compréhension.

Nous tenons également à adresser nos remerciements les plus sincères aux membres du jury Dr. BELARBI A et Dr. BAHLOUL H.A qui ont consacré leur temps et leur expertise à évaluer notre mémoire. Leurs commentaires constructifs et leurs suggestions nous ont permis de perfectionner notre travail. Leur contribution précieuse a été déterminante dans l'amélioration de notre mémoire.

Nous souhaitons également exprimer notre gratitude envers le directeur de laboratoire de microbiologie alimentaire et nutrition Pr. Ait Saada Djamel, pour avoir mis à notre disposition les ressources nécessaires à la réalisation de nos expériences.

Un remerciement spécial est également adressé aux techniciens du laboratoire pédagogique de microbiologie et biochimie. Leur expertise technique et leur disponibilité ont été d'une grande aide tout au long de nos expériences en laboratoire.

Enfin, nos remerciements vont également aux enseignants de la spécialité microbiologie appliquée. Leurs cours enrichissants, leurs connaissances approfondies et leur passion pour la microbiologie ont été une source d'inspiration constante. Leur enseignement de qualité a jeté les bases de notre intérêt pour le domaine et a renforcé notre motivation à mener à bien ce mémoire



Dédicace

C'est avec une immense gratitude que je vous dédie cette étape cruciale de ma vie. Vos encouragements, votre soutien infaillible et votre amour indéfectible ont été les piliers de ma réussite.

À mes chers parents, vous avez été mes premiers guides et mes plus grands inspireurs. Votre confiance en moi m'a donné la force nécessaire pour aller de l'avant et atteindre mes objectifs. Votre amour inconditionnel m'a permis de croire en mes capacités.

À mes adorables frères Ayoub, Imad et Mhamed, vous êtes ma source constante de motivation.

À mon cher et tendre mari, mon partenaire inébranlable. Ta présence aimante et ton soutien sans faille ont été mon refuge et ma source d'inspiration. Je te suis infiniment reconnaissante pour avoir toujours cru en moi

À mes chères tantes et ma deuxième mère ma grand-mère et à ma belle-famille. A mes copines Chaimaa, Lydia. Votre soutien indéfectible m'a apporté un réconfort inestimable. Vos encouragements chaleureux et votre présence bienveillante ont fait de cette étape une aventure collective.

Avec tout mon amour et ma reconnaissance éternelle,

Melissa

Dédicace

*Je tiens à dédier cet humble travail à : A ma tendre mère SAMIRA et
mon très cher père FOUDIL, mes sources d'inspiration et de soutien
inconditionnel*

*Merci à mes frères, ma famille, mes collègues et à tous ceux qui m'ont
encouragé tout au long de cette étape importante de ma vie
académique.*

*Votre présence et vos conseils ont été inestimables. Je vous suis
profondément reconnaissant(e) pour votre soutien précieux.*

Loudjeina

Résumés

Résumé

La présence de pesticides dans l'environnement suscite de vives inquiétudes en raison de leurs effets néfastes sur la santé humaine et les écosystèmes. Les cultures d'agrumes sont soumises à l'utilisation fréquente de pesticides. Cette étude explore la possibilité de démontrer la dégradation des pesticides en isolant des micro-organismes bénéfiques à partir d'un échantillon de sol agricole prélevé dans ces cultures.

L'échantillon de sol a été collecté dans un champ d'agrumes situés dans la région de Mesra. L'analyse de l'échantillon a permis de détecter la présence de pesticides spécifiques utilisés dans la culture des agrumes, tout en identifiant les micro-organismes présents. Des méthodes de culture sélective ont été employées pour isoler les micro-organismes capables de dégrader les pesticides ciblés utilisés dans ces cultures.

Les micro-organismes isolés ont ensuite été soumis à des tests de dégradation des pesticides en laboratoire. La diminution de la concentration de pesticides au fil du temps a été mesurée pour évaluer l'efficacité de dégradation des micro-organismes isolés. Des témoins ont été utilisés pour comparer la dégradation des pesticides en présence et en absence de ces micro-organismes bénéfiques.

Les résultats démontrent que les micro-organismes isolés à partir de l'échantillon de sol agricole des cultures d'agrumes ont la capacité de dégrader efficacement les pesticides ciblés utilisés dans ces cultures, confirmant ainsi leur potentiel bénéfique tout en étant soutenu par des analyses microbiologiques.

Cette étude démontre ainsi que l'utilisation de micro-organismes bénéfiques constitue une approche prometteuse pour évaluer la dégradation des pesticides spécifiques à la culture des agrumes, offrant une alternative écologiquement durable pour réduire la pollution par ces produits phytosanitaires. Ces résultats encouragent des recherches futures visant à exploiter davantage ces micro-organismes bénéfiques afin de mettre en place une gestion plus efficace de la pollution agricole dans les cultures d'agrumes.

Mots clés : Pesticides, Cultures d'agrumes, Micro-organismes bénéfiques, Biodégradation, Criblage.

Abstract

The presence of pesticides in the environment raises serious concerns due to their detrimental effects on human health and ecosystems. Citrus crops are frequently subjected to pesticide use. This study explores the possibility of demonstrating pesticide degradation by isolating beneficial microorganisms from a soil sample taken from these citrus crops.

The soil sample was collected from a citrus field located in the Mesra region. Analysis of the sample detected the presence of specific pesticides used in citrus cultivation while identifying the microorganisms present. Selective culture methods were employed to isolate microorganisms capable of degrading the targeted pesticides used in these crops.

The isolated microorganisms were then subjected to pesticide degradation tests in the laboratory. The decrease in pesticide concentration over time was measured to evaluate the degradation efficiency of the isolated microorganisms. Controls were used to compare pesticide degradation in the presence and absence of these beneficial microorganisms.

The results demonstrate that microorganisms isolated from the agricultural soil sample of citrus crops have the ability to effectively degrade the targeted pesticides used in these crops, confirming their beneficial potential supported by microbiological analyses.

This study thus demonstrates that the use of beneficial microorganisms constitutes a promising approach to assess the degradation of pesticides specific to citrus cultivation, offering an ecologically sustainable alternative to reduce pollution from these phytosanitary products. These results encourage future research aiming to further exploit these beneficial microorganisms to establish more effective management of agricultural pollution in citrus crops.

Keywords : Pesticides, Citrus crops, Beneficial microorganisms, Biodegradation, Screening

ملخص

تثير وجود المبيدات الحشرية في البيئة قلقًا كبيرًا بسبب آثارها الضارة على الصحة البشرية والنظم البيئية. تخضع زراعة الحمضيات للاستخدام المتكرر للمبيدات الحشرية. تستكشف هذه الدراسة إمكانية إظهار تحليل المبيدات الحشرية عن طريق عزل الكائنات الدقيقة المفيدة من عينة تربة زراعية مأخوذة من هذه الزراعات.

تم جمع عينة التربة من حقل للحمضيات في منطقة مسرة. تحليل العينة قد أظهر وجود مبيدات حشرية محددة تستخدم في زراعة الحمضيات، مع تحديد الكائنات الدقيقة الموجودة. تم استخدام أساليب الزراعة الانتقائية لعزل الكائنات الدقيقة التي تستطيع تحليل المبيدات الحشرية المستهدفة المستخدمة في هذه الزراعات.

تم تعريض الكائنات الدقيقة المعزولة لاختبارات تحليل المبيدات الحشرية في المختبر. تم قياس انخفاض تركيز المبيدات الحشرية مع مرور الوقت لتقييم كفاءة التحلل من قبل الكائنات الدقيقة المعزولة. تم استخدام شواهد لمقارنة تحليل المبيدات الحشرية بوجود وعدم وجود هذه الكائنات الدقيقة المفيدة.

تظهر النتائج أن الكائنات الدقيقة المعزولة من عينة تربة زراعية في زراعات الحمضيات لديها القدرة على تحليل المبيدات الحشرية المستهدفة المستخدمة في هذه الزراعات بكفاءة، مما يؤكد إمكاناتها المفيدة ومدعومة بالتحليلات الميكروبيولوجية.

توضح هذه الدراسة أن استخدام الكائنات الدقيقة المفيدة يشكل نهجًا واعدًا لتقييم تحليل المبيدات الحشرية المحددة لزراعة الحمضيات، مما يوفر بديلًا مستدامًا بيئيًا للحد من التلوث الناتج عن هذه المبيدات الزراعية. تشجع هذه النتائج الأبحاث المستقبلية لاستغلال الكائنات الدقيقة المفيدة بشكل أكبر لتحقيق إدارة أكثر فعالية للتلوث الزراعي في زراعة الحمضيات.

الكلمات المفتاحية

المبيدات الحشرية، زراعة الحمضيات، الكائنات الدقيقة المفيدة، التحلل الحيوي، الفحص

Liste des abréviations

BN : Bouillon Nutritif

DO : Densité Optique

EC : Concentré émulsionnable

FUE : L'efficacité de l'utilisation des engrais

GN : Gélose Nutritive

MSM : Mineral Salt Medium

nm : Nanomètre

OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé

SC : Suspension concentrée

SL : Concentré soluble

SP : Poudre soluble dans l'eau

T.S.I : Triple Sugar Iron

UHT : Upérisation à Haute température

USD : Dollar of United State

UV : Ultra-Violet

V.F : Viande-Foie

WP : Poudre mouillable

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Production, importation et exportation des pesticides en Algérie.....	17
Tableau 2 Caractéristiques des pesticides utilisés	18
Tableau 3 Biodégradation des différents pesticides carbamates par les microorganismes	23
Tableau 4 Différents types de traitements biologiques et chimiques pour la culture d'agrumes	29
Tableau 5 Résultat des caractères macroscopique des isolats	44
Tableau 6 Résultats de l'étude biochimique.....	52

Liste des Figures

Figure 1. Le labourage (Destoc, 2022)	8
Figure 2 Système de drainage agricole du sol cultivé (Anonyme, 2009).....	9
Figure 3. Un Système de drainage agricole du sol cultivé (anonyme ,2009).....	9
Figure 4 Classification des pesticides (El-kady, 2019).	14
Figure 5 Site de collection de l'échantillon du sol d'agrume (orange) de la région de Touahria.....	28
Figure 6 Localisation de site d'échantillonnage par le service de cartographie en ligne : Google Earth.....	28
Figure 7 Schéma représentatif des différents étapes d'isolement et purification des isolats	32
Figure 8 Préparation des isolats pour l'étude de la biodégradation des pesticides	33
Figure 9 Résultat de criblage des bactéries qui tolèrent les pesticides additionnés dans Le MSM.....	41
Figure 10 Observation macroscopique des colonies isolées de l'échantillon de sol d'agrume sur milieu MSM solide additionné de pesticides	42
Figure 11 Observation microscopique des isolats bactériens après coloration de Gram (X100).....	43
Figure 12 Croissance bactérienne des isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pesticide a une concentration 200 mg/l	46
Figure 13 Croissance bactérienne des isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pesticide a une concentration 500 mg/l	49
Figure 14 Croissance bactérienne des isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pesticide a une concentration 700 mg/l	51

Figure 15 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Nitrate réductase, Catalase, TSI	54
Figure 16 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : V.F, Mannitol Mobilité, Estérase	55
Figure 17 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : King A et King B.....	56
Figure 18 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Indole, Lécithinase	57
Figure 19 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Amylase, Lipase	58
Figure 20 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Test MEVAG.....	59

Table des matières

Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Partie Bibliographique	3
1. Aperçue sur le sol agricole	5
2. Définition du sol agricole des agrumes	6
3. Traitement des sols agricoles.....	7
4. Les méthodes de traitement du sol	7
1.2 Traitement chimique	10
1.2.2 Les bio-fumigateurs.....	10
4.2.2 Les engrais.....	11
4.2.3 Les pesticides	11
1. Les pesticides.....	13
2. Classification des pesticides	13
3.3 Effets des pesticides sur les micro-organismes	16

Partie Expérimentale.....	25
I. Matériel et Méthode.....	27
1. L'objectif.....	27
2. Echantillonnage	27
4. Isolement des bactéries sur milieu solide	30
5. Repiquage et purification des isolats	30
8. La conservation des isolats	31
9. Etude de la biodégradation des pesticides par les isolats	32
II. Résultats.....	41
2. Isolement des bactéries sur milieu solide	42
3. Etude macroscopique et microscopique	43
Discussion.....	61
Conclusion.....	64
Perspectives	65
Références	66
Annexes.....	73

Introduction

Introduction

Les pesticides sont des substances chimiques toxiques ou des mélanges intentionnellement libérés dans l'environnement pour prévenir, dissuader, contrôler, tuer ou éliminer les populations d'insectes, de mauvaises herbes, de rongeurs, de champignons ou d'autres nuisibles. Leur utilisation a augmenté de manière significative ces dernières décennies, atteignant environ 5,2 milliards de livres par an à l'échelle mondiale.

Cependant, ces pesticides présentent des risques qui dépassent leurs effets bénéfiques. Leur utilisation entraîne des conséquences importantes sur les espèces non ciblées, ainsi que sur la biodiversité animale et végétale, les réseaux alimentaires et les écosystèmes aquatiques et terrestres. Une grande partie des pesticides appliqués peut se volatiliser en quelques jours, ce qui peut causer des dommages aux organismes non visés. **(Mahmoud, 2016)**

Face à ces défis environnementaux, on suppose que la bioremédiation représente une alternative prometteuse pour le traitement des pesticides à l'essor mondial. Cette technique repose sur la biodégradation de ces composés chimiques par les microorganismes, exploitant ainsi leur capacité naturelle à convertir les contaminants organiques en composés simples et inoffensifs pour l'environnement. Grâce à la bioremédiation, on peut supposer surmonter les limites des méthodes traditionnelles d'élimination des substances dangereuses, tout en proposant une solution efficace et peu coûteuse pour la décontamination des écosystèmes pollués et la destruction des pesticides. **(Singh et Walker, 2006)**

Néanmoins, la biodégradation de nombreux pesticides par les microorganismes n'a pas encore été pleinement étudiée. C'est dans ce contexte là que ce travail de mémoire a été mené. En effet, nous avons entrepris dans ce contexte une étude sur la dégradation des pesticides par des bactéries isolées à partir de sols agricoles.

L'objectif principal était d'évaluer l'efficacité de ces bactéries dans la dégradation des pesticides, le mémoire est structurée en trois parties distinctes. La première partie est consacrée à une bibliographie scientifique, où nous avons recueilli des informations pertinentes sur les sols agricoles (caractéristiques, types, flore associée) et sur les pesticides utilisés dans la cultivation des arbustes d'agrumes (composition, toxicité).

La deuxième partie de la mémoire présente en détail le matériel et les méthodes mise en œuvre. La troisième partie présentera les résultats obtenus de la caractérisation des sols étudiés et le potentiel de dégradation des pesticides par des bactéries isolées et identifiées par une étude biochimique. Ces résultats sont ensuite discutés en détail, en s'appuyant sur des études et des travaux antérieurs réalisés dans le domaine de la dégradation des pesticides.

Partie Bibliographique

Chapitre 1 : Le sol

1. Aperçue sur le sol agricole

L'agriculture est une profession ancienne pratiquée depuis des siècles par l'humain. Pour répondre à la demande du besoin nutritionnelle de la population humaine, à la nécessité de produire plus de variation de nourriture à partir de ressources environnementales limitées, en assurant de ne pas vouloir causer aucun dommage en utilisant ces ressources de manière plus durable. (**Jackson, 2010**).

Le sol agricole est la base de la ressource fondamentale pour le soutien de toute activité humaine. Une population qui est en augmentation du nombre, ce qui fait en parallèlement l'obligation de fournir des aliments pour couvrir le besoin de toute une population. En prenant compte ces besoins, l'agriculture se dirige vers l'utilisation des produits agrochimiques en gardant la productivité des cultures et maintenir la qualité du sol, en assurant une utilisation judicieuse de ces produits pour ne pas causer des effets néfastes sur la terre. (**Alessandro et al., 2022**)

Le rôle écologique le plus important du sol est largement dû à son microbiote, qui a une grande diversité taxonomique et fonctionnelle. Ce deuxième élément est le facteur clé qui permet au microbiote du sol de piloter notre écosystème. Les principaux processus écosystémiques attribués à l'activité microbienne du sol expliquent la régulation de la dynamique du carbone, la régulation des gaz à effet de serre (tels que l'hydrogène, le dioxyde de carbone, l'oxyde nitrique, l'oxyde nitreux, le méthane), la réduction de l'érosion du sol, la dégradation des polluants, la régulation de l'acidité du sol et la médiation du cycle des nutriments (**Fierer, 2017**)

Les microbes se développent dans de micro habitats au sein de l'environnement complexe du sol, qui possède une diversité microbienne introuvable ailleurs. Ces niches environnementales sont conçues pour s'adapter précisément à chaque type de climat et de sol, ce qui entraîne le développement de communautés microbiennes distinctes. Les espaces interstitiels des particules de sol offrent un habitat idéal à de nombreux micro-organismes, tandis que d'autres coexistent avec la végétation (**Bonaterre et al., 2003**).

La structure du sol détermine la fertilité du sol, la productivité des cultures et la tolérance au stress. Les micro-organismes et sa corrélation avec l'agrégation et la connectivité des pores ont une influence directe sur ces facteurs (**Martin et al. 2022**)

L'infestation par les mauvaises herbes, le stress hydrique et le stress salin sont endurés par des micro-organismes utiles du sol qui améliorent également la disponibilité des nutriments et sécrètent divers métabolites secondaires (Sharma, 2020). Certains microbes du sol contribuent également à la décomposition des déchets organiques et détoxifient les substances toxiques telles que les pesticides (Nihorimbere, 2011)

2. Définition du sol agricole des agrumes

Les agrumes sont des arbres fruitiers épineux, ronds et persistants cultivés en différentes variétés pour le fruit, le parfum ou la décoration (Bache, 2004). Les Agrumes, appartenant au genre *Citrus* de la famille des Rutacées, composés principalement d'oranges douces (*Citrus sinensis Osbeck*), la mandarine (*C. reticulata Blanco*), le pamplemousse (*C. paradisi Macf.*), le pomelo (*C. maxima Burm*), le citron vert (*C. aurantifolia Christm*) et le citron (*C. limon (L) Burm*) (Webber, 1967).

Ils sont également une bonne source de certains minéraux (potassium, calcium, phosphore, magnésium, cuivre), du complexe vitaminique B (thiamine, riboflavine, acide nicotinique/niacine, acide pantothénique, pyridoxine, acide folique, biotine, choline et inositol), fibres alimentaires et des substances phytochimiques secondaires (caroténoïdes, phénols, y compris flavonoïdes, coumarines, limonoïdes, les alcaloïdes et les huiles essentielles), a le potentiel de prévenir les maladies inflammatoires, les maladies dégénératives, les maladies cardiaques et même le cancer (Lv et al.,2015)

Par ailleurs, ils exigent très peu par rapport aux conditions climatiques et à la qualité du sol. Cependant, ils préfèrent un sol ni trop perméable ni trop lourd (Jaen-Marie, 2008).

Les agrumes ont une plasticité édaphique réduite car ils ne se développent pas dans tous les types de sols même s'il y a des racines avec des systèmes racinaires différents.

Ils ont une plasticité édaphique réduite car ils ne se développent pas dans tous les types de sol. Même en disposant de porte-greffes avec des systèmes racinaires différents, il faut éviter de cultiver des agrumes sur des sols : - excessivement humides, avec stagnation d'eau et nappes superficielles, provoquant généralement l'asphyxie racinaire ; trop lourds, compacts, humides en hiver, avec un excès d'argile superficiel et trop calcaires et/ou trop salins ; excessivement superficiels, avec une couche explorable pour les racines, inférieure à 70 cm d'épaisseur excessivement épuisés, à cause de cultures consécutives avec la même espèce ou le même porte-greffe (Giovanni et al, 2022). Les propriétés physiques et chimiques du sol doivent correspondre aux attentes de l'arbre.

La composition idéale d'un sol pour les agrumes est d'environ 50% de sable grossier, de 10% de sable fin, de 15 à 20% d'argile, de 15 à 20% de limon (un sable très fin) et de 2 ou 3% de matière organique. Si le sol est trop argileux (taux d'argile supérieur à 25%), on peut lui rendre une certaine perméabilité en le mélangeant étroitement avec du sable grossier.

Le niveau de pH doit être compris entre 6 et 7, ce qui correspond à un sol légèrement acide et neutre. Si le pH est inférieur à 6, il peut être légèrement augmenté en ajoutant de la chaux ou de la dolomite. Si le pH est supérieur à 7, il peut être abaissé en ajoutant de la tourbe ou, mieux encore, de la terre de geyser. Les engrais tels que le sulfate d'ammonium sont également un moyen d'acidifier le sol. Les sols dont le niveau d'eau est très proche de la surface ne conviennent pas, car ils conduisent à l'évaporation des racines. **(Jean-Marie, 2008)**

Les bactéries du sol sont de plus en plus reconnues comme des éléments cruciaux pour le développement agricole durable et sont impliquées dans la promotion de la santé des sols et de la croissance des agrumes. Les micro-organismes du sol constituent un indice sensible reflétant la qualité du sol **(Kaurin et al. 2018)**.

3. Traitement des sols agricoles

Le traitement du sol englobe l'ensemble des actions entreprises de manière régulière et à long terme pour améliorer et préserver la fertilité du sol, en tenant compte des pratiques d'exploitation agricole. Une planification appropriée et une mise en œuvre soignée de techniques agronomiques garantissent un rendement optimal en termes de tubercules de qualité, tout en minimisant les répercussions négatives de la culture sur l'environnement.

Il est important de noter que si aucune mesure adéquate n'est mise en place pour améliorer les sols, cela peut entraîner des conséquences néfastes telles qu'une érosion hydrique excessive, la diminution de la matière organique présente dans le sol, le compactage et la dégradation de la structure et de la capacité de drainage du sol **(New Nouveau Brunswick Canada)**

4. Les méthodes de traitement du sol

Il existe différentes approches pour le traitement du sol, et chacune d'entre elles doit faire l'objet d'études, de planifications et d'exécutions soignées afin d'obtenir et de maintenir une production de qualité optimale. Parmi les méthodes de traitement du sol, on peut citer les suivantes : **(New Nouveau Brunswick Canada)**

4.1 Traitement physique

Ce traitement est défini par l'utilisation de techniques et d'opérations mécaniques pour manipuler et modifier les caractéristiques du sol afin d'atteindre la capacité à créer et à maintenir un état physique du sol favorable qui peut avoir des impacts positifs sur la croissance des plantes et la gestion des cultures en améliorant la structure, la texture, la porosité et d'autres propriétés physiques du sol (**Monnier *et al.*, 1982**). Voici quelques exemples courants de traitements physiques des sols agricoles :

4.1.1 Le labour

Le labourage implique la préparation de la couche arable d'un champ cultivé en utilisant généralement une charrue. Cette méthode permet de retourner le sol à une certaine profondeur et de le réensemencer par la suite.

En règle générale, la profondeur de labour ne dépasse pas 20 cm. En conséquence, le sol est décompacté et bénéficie d'une meilleure aération. Le labour permet également de mélanger les résidus de récolte, les fumiers, la chaux ou les engrais minéraux avec le sol, tout en apportant de l'oxygène.

Cependant, il convient d'être prudent, car en présence d'humidité excessive, cette opération peut entraîner une compaction du sol sous la zone labourée, formant ainsi une semelle de labour (figure1). (**Duquef, 2017**)



Figure 2. Le labourage (Destoc, 2022)

4.1.2 Le drainage Agricole

Le drainage agricole est essentiel dans les régions caractérisées par des territoires hydromorphes (figure 2), où il permet d'optimiser le potentiel de rendement des sols. Il s'agit d'un élément incontournable de l'agriculture dans ces régions. Un système de drainage bien planifié, correctement mis en place et régulièrement entretenu constitue une infrastructure durable, capable de perdurer sur plusieurs décennies, voire plusieurs siècles.

Il joue un rôle essentiel en assurant un environnement propice à la productivité des cultures en éliminant l'excès d'eau et en favorisant un équilibre approprié entre l'air et l'eau dans le sol. (Vincent, 2020)

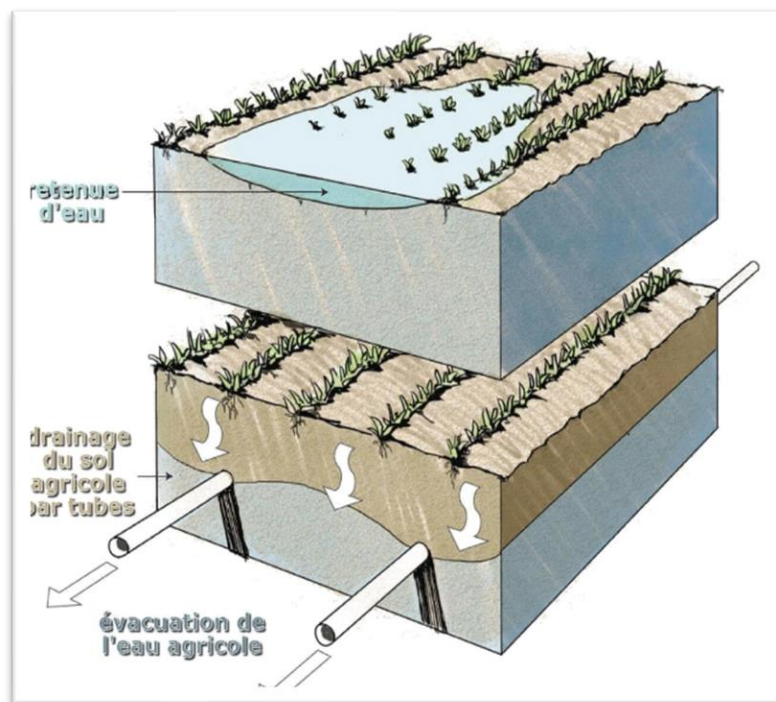


Figure 3 Système de drainage agricole du sol cultivé
(Anonyme, 2009)

4.1.3 Le désherbage mécanique

Le désherbage mécanique utilise des outils de travail du sol pour contrôler les mauvaises herbes et limiter leur développement. Cela permet de réduire la compétition avec les cultures, d'éviter la propagation des graines de mauvaises herbes et de réduire l'utilisation d'herbicides chimiques (**Lozano *et al.*, 2018**)

Il est souvent considéré comme la méthode préférentielle pour maîtriser la prolifération des mauvaises herbes, malgré les investissements nécessaires dans l'acquisition d'outils appropriés (**Blanc, 2021**)

4.2 Traitement chimique

Dans l'agriculture, le traitement chimique est basé sur l'utilisation des produits de formule chimique afin d'améliorer le rendement et la production agricole par l'ajout des sources de nutriments au sol, ou pour contrôler la présence des mauvaises herbes et ravageurs des plantes.

4.2.1 Les bio-fumigateurs

Les fumigants sont utilisés depuis des décennies pour lutter contre de précieux agents pathogènes des cultures transmis par le sol. (**Castellano *et al.*, 2022**). La fumigation du sol avant la plantation est l'application d'un composé chimique volatil comme le bromure de méthyle sur le sol avant la plantation d'une culture et couramment utilisée en agriculture pour contrôler les pathogènes fongiques, les nématodes et les mauvaises herbes transmis par le sol. Les avantages de la fumigation du sol avant la plantation comprennent la réduction de l'incidence des maladies des plantes, l'augmentation des rendements des cultures et l'amélioration de la salubrité des aliments, qui créent tous des avantages économiques directs pour les producteurs (**Cooper, 2007**). Le bromure de méthyle a été remplacé par des produits tels que la chloropicrine (CP), le dazomet (DZ), le 1,3-dichloropropène (1,3-D), le métasodium (MS), le disulfure de diméthyle (DMDS) et l'allyl isothiocyanate (AITC), entre autres (**Dangi *et al.*, 2015**)

En fait, de plus en plus de preuves indiquent que ces produits peuvent également affecter la diversité, la composition et l'abondance des communautés microbiennes du sol non ciblées (**Imfeld *et al.*, 2012**)

4.2.2 Les engrais

Les plantes ont besoin de différents nutriments pour remplir des fonctions structurales et métaboliques essentielles à leur croissance et développement. Toutefois, certains nutriments, appelés macronutriments, sont nécessaires en quantités relativement conséquentes. L'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) sont trois macronutriments importants qui peuvent limiter la croissance des plantes, et sont donc souvent utilisés comme engrais dans les systèmes agricoles modernes.

L'efficacité de l'utilisation des engrais dépend de plusieurs interactions, notamment entre le génotype de la plante et l'environnement, les facteurs abiotiques et biotiques en particulier. Pour une fertilisation optimale des plantes dans les pratiques agricoles, il est nécessaire de bien reconnaître ces facteurs en vue de maximiser les valeurs FUE. Le sol est non seulement le milieu de croissance des plantes mais également leur principale source d'eau et de nutriments. En conséquence, l'impact des facteurs du sol sur l'absorption des nutriments et la FUE doit être pris en compte à différents niveaux de phénomènes et de processus. **(Kulcheski *et al.*, 2015)**

4.2.3 Les pesticides

Les pesticides sont des substances ou combinaisons de substances utilisées pour éliminer, contrôler ou prévenir les nuisibles tels que les rongeurs, les insectes, les mauvaises herbes, les oiseaux, les micro-organismes ou les mammifères qui peuvent causer des dommages. Outre leur effet toxique, les pesticides présentent également des avantages pour les humains. Les pesticides sont classés en fonction de leur structure chimique, de leur forme ou de l'espèce cible.

Ils peuvent être inorganiques, synthétiques ou biologiques (biopesticides). Ils sont également regroupés en familles chimiques, notamment les organophosphorés, les pyréthrinoïdes, les organochlorés et les carbamates, qui sont ensuite classés comme rodenticides, herbicides, fongicides, herbicides et insecticides **(Omar-mustapha *et al.*, 2019)**

Chapitre 2 : Les pesticides

1. Les pesticides

Le terme pesticide trouve ses origines dans le latin *caedere* qui signifie "tuer" et *pestis* qui signifie "fléau". De manière plus générale, ce terme désigne une substance ou un produit chimique utilisé pour lutter contre les espèces nuisibles et les maladies qui affectent les plantes et les cultures, pour contrôler les maladies transmises par les insectes (comme le paludisme et la dengue) en éliminant les vecteurs d'insectes. Cependant, les pesticides peuvent avoir des effets négatifs sur l'environnement et la santé humaine, c'est pourquoi leur utilisation doit être réglementée et restreinte. Les pesticides, également appelés produits phytosanitaires, produits de protection des plantes ou produits phytopharmaceutiques, sont couramment utilisés en agriculture, dans les jardins des particuliers et dans les espaces publics pour contrôler les organismes vivants qui sont considérés comme nocifs pour les plantes. (Blogowski, 2022)

Les pesticides sont soit des composés naturels, soit des produits synthétiques, et peuvent appartenir à différentes classes de pesticides. Parmi les classes les plus communes, on trouve les organochlorés, les carbamates, les organophosphates, les pyréthroïdes et les néonicotinoïdes, cette dernière regroupant la majorité des pesticides actuellement largement utilisés. (Mahmood *et al.*, 2016)

2. Classification des pesticides

La classification des pesticides est basée sur leur composition chimique et les ingrédients actifs qui les composent. Cette classification indique leur efficacité, leurs propriétés chimiques et physiques. La caractérisation des pesticides est utile pour définir les modes d'application, les précautions à prendre et les doses à appliquer. Les pesticides sont principalement classés en quatre groupes selon leur composition chimique (figure 3) : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, et les pyréthrines et pyréthrinoïdes. La classification par composition chimique des pesticides est plutôt complexe car les pesticides modernes comprennent des produits chimiques organiques, synthétiques et naturels. Cependant, certains composés inorganiques sont également utilisés comme pesticides. (Kaur *et al.*, 2019)

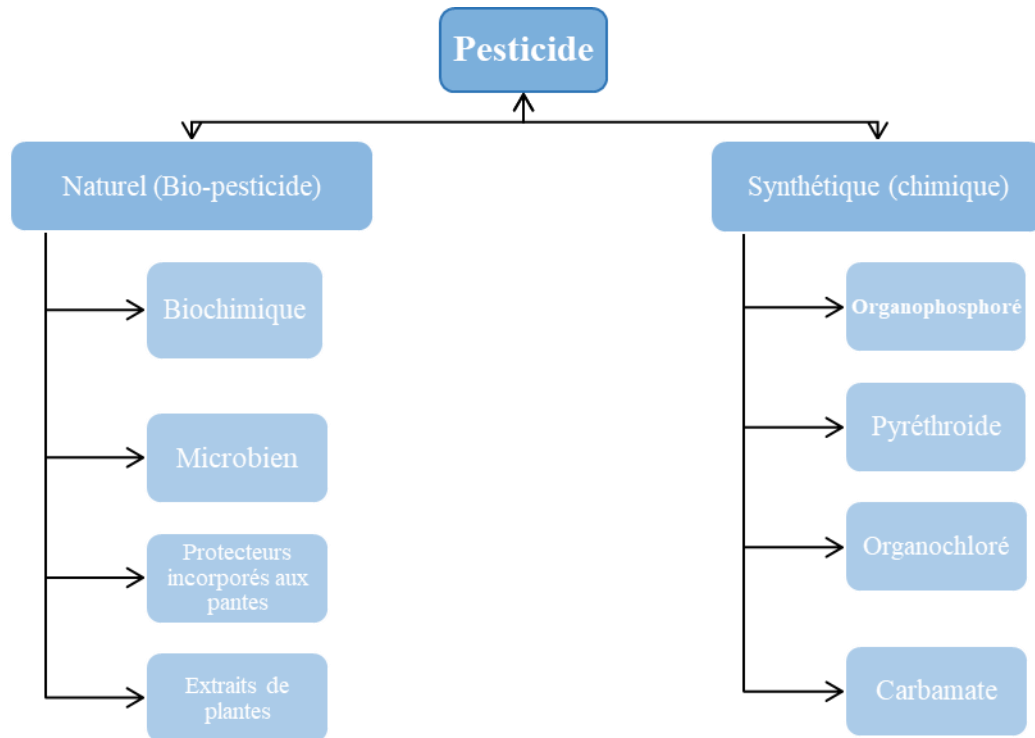


Figure 5 Classification des pesticides (El-kady, 2019).

3. Effet des pesticides

Pendant plus de cinquante ans, de nombreux produits chimiques toxiques ont été développés et utilisés pour protéger les cultures et améliorer les rendements, entraînant des quantités massives de pesticides épandues chaque année dans le monde entier. Bien que l'agriculture biologique progresse, il est indéniable que la plupart des agriculteurs continuent de dépendre des pesticides. (Jouzel, 2019)

Cependant, il est crucial de prendre en compte la gravité des effets néfastes des pesticides sur différentes composantes de l'environnement. Les effets de ces produits peuvent se manifester de différentes manières :

3.1 L'impact des pesticides sur la santé humaine

L'utilisation des pesticides a apporté des améliorations dans le domaine de la santé humaine en contribuant à la maîtrise des maladies transmises par les vecteurs. Cependant, il est

important de noter que l'utilisation excessive et sans discernement de ces produits a entraîné des conséquences néfastes à long terme sur la santé.

Chaque année, des millions de cas d'intoxication aux pesticides et des milliers de décès sont enregistrés dans les pays en développement, selon l'OMS. Les personnes les plus exposées sont principalement celles vivant dans ces pays, notamment les nourrissons, les jeunes enfants, les travailleurs agricoles et les applicateurs de pesticides. Les pesticides peuvent pénétrer dans le corps humain par ingestion, inhalation ou contact cutané, mais c'est principalement par la consommation d'aliments contaminés qu'ils affectent la majorité des personnes. Après avoir franchi plusieurs barrières, les pesticides atteignent les tissus humains ou les compartiments de stockage.

Bien que le corps humain dispose de mécanismes d'élimination des toxines, il peut parfois les retenir dans le système circulatoire. Les effets toxiques surviennent lorsque la concentration de pesticides dans le corps dépasse celle présente dans l'environnement. Les effets des pesticides sur la santé humaine varient considérablement, avec des manifestations aiguës ou chroniques à court ou long terme. **(Mahmood, 2016)**

3.2 L'impacts des pesticides sur la biodiversité terrestre

L'exposition aux pesticides a des effets néfastes sur les plantes terrestres, même à des doses faibles. Les herbicides phénoxy peuvent endommager les arbres et arbustes à proximité par dérive ou volatilisation. Le glyphosate, un herbicide courant, augmente la sensibilité des plantes aux maladies et réduit la qualité des graines.

Les herbicides, sulfonamides, sulfonamides et imidazolinones ont un impact dévastateur sur la productivité des cultures non ciblées et la vie sauvage. Les populations d'insectes bénéfiques, comme les abeilles et les coléoptères, diminuent en raison de l'utilisation de pesticides à large spectre tels que les carbamates, les organophosphates et les pyréthroïdes. Ce qui a entraîné la disparition soudaine des abeilles dès le début du XXI^e siècle, ce qui est préoccupant car 1/3 de la production alimentaire dépend de la pollinisation par les abeilles. Les populations d'abeilles ont diminué de 29 à 36 % chaque année depuis 2006.

Les pesticides ont également entraîné un déclin important des populations d'oiseaux, avec une baisse de 20 à 25 % depuis les temps préagricoles. Les pesticides s'accumulent dans les tissus des oiseaux, provoquant leur mort. Les pesticides peuvent également affecter les

mammifères en tuant les vers de terre dont ils se nourrissent. Les effets sublétaux des pesticides peuvent affecter le système nerveux des animaux, entraînant des changements de comportement. **(Mahmood, 2016)**

3.3 Effets des pesticides sur les micro-organismes

Il est nécessaire de déterminer les effets des pesticides sur les micro-organismes du sol et la fertilité du sol. La fertilité du sol dépend non seulement de sa texture, mais également de sa capacité biologique interne. L'utilisation de pesticides peut entraîner des modifications de la diversité microbienne. La compréhension de l'impact des pesticides sur la microflore du sol et leurs activités bénéfiques constitue une composante essentielle de l'évaluation des risques liés à ces produits. La prédiction de la relation entre la structure chimique des pesticides et leur effet sur les différents groupes de micro-organismes du sol n'est pas aisée. Certains pesticides favorisent la croissance des micro-organismes, tandis que d'autres ont des effets inhibiteurs ou n'ont aucun effet lorsqu'ils sont utilisés à des doses normales.

La méthode de comptage standard sur boîtes de Petri ne donne pas des résultats précis sur la flore microbiologique. Il est clair que seulement 1% des micro-organismes du sol peuvent être cultivés. Donc les recherches se dirigent vers l'utilisation des méthodes moléculaires qui fournissent de bons résultats. **(Chi-chu, 2010)**

4. L'utilisation des pesticides en Algérie

4.1 Les statistiques

En Algérie, la production des pesticides est estimés environ 400 produits phytosanitaires, quarantaine de variétés sont destinés au domaine de l'agriculture dont la consommation est 6000 à 10000 tonnes par an. (Arkoub, 2012) Selon les données de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FOASTAT,2014). En 2010 l'Algérie à importer 59,6 millions USD de pesticides, en 2012 près de 92 millions USD et près de 108 millions USD en 2014 et 2015, l'Algérie est un pays à faible utilisation des pesticides par rapport aux pays développés.

Conformément aux normes légales, aucun produit phytosanitaire ne peut être commercialisé, importé ou fabriqué s'il n'a pas fait l'objet d'une homologation comme il est indiqué sur le tableau 1. Selon le journal officiel de la république Algérienne n°9 du 18 safar 1431, 3 février 2010, L'homologation des produits phytosanitaires a été instituée en Algérie par les décrets exécutifs suivant qui fixent les mesures applicables lors de l'importation et l'exportation des produits phytosanitaires à usage agricole, No 95-405 du décembre 1995 et No 10-69 du 31 janvier 2010 (Index phytosanitaire, 2017).

Tableau 1 : Production, importation et exportation des pesticides en Algérie (*Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Mai 2006*)

Production/Fabrication (tonnes)	Poudre : 3745 T/an Liquide : 2617 10³ Litres/an Insecticides : 13676 Boites/an
Production/Fabrication (valeur 10⁶DA)	1912
Importation	8927 tonnes/an
Importation (valeur)	4418 10⁶DA
Exportation (valeur 10⁶DA)	7

4.2 Les normes Algérienne d'utilisation des pesticides

En 2017, le Ministre de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche met en disposition des agriculteurs un index des produits phytosanitaire à usage agricole. Cet index contient le nom commercial du pesticides, la constitution chimique, la dose d'utilisation et la culture destinée.

Tableau 2 Caractéristiques des pesticides utilisés (Index phytosanitaire, 2017)

Nom commercial	Matière active	Concentration	Formulation	Déprédateur	Culture	Dose	Représentant
LAMDOC 50 EC	LAMBDA- CYHALOTHRIN E	50 G/L	EC	Cératite	Agrumes	25 ml/hl	ASTRACHEM
				Carpocapse	Arboriculture fruitière	20-25 ml/hl	
				Noctuelles Défoliatrices/Foreuses	Cultures légumières	250 ml/hl	
BACTIME C	ABAMECTINE	18 G/L	SC	Mineuse	Agrumes	50 ml/hl	ACI
				Acarions/Mineuse	Cucurbitacées	25-35	
					Cultures maraichères	ml/hl	
Psylle	Arboriculture fruitière	50 ml/hl					
FUCUS ULTRA	CYCLOXYDIM	100 G/L	EC	Graminées bisannuelles et vivaces	Pomme de terre/cultures maraichères/lég umineuses/arbor cultures fruitière	2-4 L/HA	BASF SPA ALGERIE

				Graminées annuelles	Pomme de terre/cultures maraichères/légumineuses/arboricultures fruitière	1-1,5 L/HA	
RUSTILAN	ACERAMIPRIDE	20%	SP	Aleurodes/ Mineuses	Cultures Maraichères	200-	SARL AGRO- RAYANE
					Arbres fruitiers/Agrumes	300 g/Ha	
				Pucerons	Cultures Maraichères	100-	
					Arbres fruitiers/Agrumes	125 g/Ha	
MUSTANG 360 SE	FLORASULA M+2,4 D	6,25 G/L+300 G/L	SL	ADVENTICES DICOTYL- DONES	Blé	0,6 L/Ha	DOW CHEMICAL ALGERIE
DECAFATE	SULFATE DE CUIVRE+ CYMOXANIL	20% + 1,6%	WP	Milidiou/alternaria	Tomate	750 g/Ha	MEDMAC ALGERIE
					Vigne		

EC : Concentré émulsionnable

SC : Suspension concentrée

SL : Concentré soluble

SP : Poudre soluble dans l'eau

WP : Poudre mouillable

Chapitre 3 :

La bioremédiation

1. La bioremédiation des pesticides

Il existe un équilibre naturel entre l'évolution microbienne et la bioremédiation (**Hodgson *et al.*, 1993**). L'utilisation continue de pesticides dans les champs agricoles a des effets délétères sur l'environnement. La dégradation microbienne des pesticides, connue sous le nom de bioremédiation, est une méthode rentable permettant d'éliminer les polluants de l'environnement. La biodégradation implique des réactions biologiques qui altèrent la structure chimique du composé, entraînant ainsi une diminution de sa toxicité. (**Sylvia *et al.*, 2005**)

La bioremédiation, qui utilise des microorganismes, émerge comme une technologie prometteuse pour dégrader les pesticides toxiques présents dans le sol. La présence de microorganismes résistants dans les sols où les pesticides ont été utilisés par le passé témoigne de la présence de bactéries capables de dégrader ces produits chimiques. Les pesticides peuvent entraîner des modifications dans la structure et la diversité des populations microbiennes, en affectant certaines communautés de microorganismes. Certains microorganismes ont la capacité d'utiliser les pesticides comme source de nutriments et d'énergie, ce qui leur confère un avantage lorsqu'ils sont exposés à ces produits. De nombreux scientifiques ont identifié différentes espèces bactériennes capables de dégrader les pesticides. (**Mustapha *et al.*, 2019**)

2. La dégradation des pesticides par les microorganismes

La dégradation des pesticides entraîne la formation de dioxyde de carbone (CO₂) et d'eau (H₂O) par l'oxydation des composés d'origine. La bactérie impliquée dans le processus de dégradation tire de l'énergie à partir de ces produits de dégradation. L'efficacité de ce processus dépend de conditions atmosphériques optimales telles que la température, le pH du sol et la teneur en humidité. De plus, la modification génétique de différentes souches

bactériennes améliore également l'efficacité des micro-organismes appliqués. (**Javaid *et al.*, 2016**) L'adaptation microbienne est un autre facteur influençant la dégradation des pesticides. Il est défini comme le temps nécessaire à la population microbienne pour s'adapter à un nouveau produit chimique introduit (**Alexander, 1999**) L'élimination biodégradable des pesticides présente des effets bénéfiques sur la fertilité des sols agricoles. (**Javaid *et al.*, 2016**)

La biodégradation bactérienne peut s'effectuer tant dans des conditions anaérobies que dans des conditions aérobies. Bien que chaque condition respective nécessite l'action de différentes enzymes, il semble que les processus de dégradation aérobie et anaérobie doivent tous deux avoir lieu pour parvenir à la minéralisation (**Langerhoff *et al.*, 2001**) La durée de persistance prolongée des composés pesticides dans des conditions aérobies par rapport aux conditions anaérobies peut être due à l'absence d'enzymes ou, plus probablement, aux dommages oxydatifs résultant du métabolisme de ces composés. (**Singh *et al.*, 1999**)

Ainsi, les conditions anaérobies sont plus efficaces pour la biodégradation des pesticides organochlorés, tandis que les conditions aérobies sont plus adaptées pour la biodégradation des métabolites hydrocarbonés de ces pesticides (**In situ treatment technologies for contaminated soil, 2006**). Malgré de telles exigences, certains exemples de bioremédiation des pesticides organochlorés ont été réalisés in situ (**Langerhoff *et al.*, 2001**)

3. Les bactéries impliquées dans la dégradation des pesticides

Lors de la dégradation des pesticides, il est généralement nécessaire de faire intervenir plusieurs microorganismes. Chaque microorganisme contribue aux réactions de biodégradation des pesticides (Tableau 3), mais il n'existe aucun exemple de minéralisation réalisée par une seule souche. (**Sylvia *et al.*, 2005**)

Les classes bactériennes gamma-proteobacteria (comme *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Plesiomonas*), beta-proteobacteria (comme *Burkholderia*, *Neisseria*), alpha-proteobacteria (comme *Sphingomonas*), Actinobacteria (*Micrococcus*) et Flavobacteria (*Flavobacterium*) sont considérées comme des micro-organismes actifs dans la biodégradation (Geetha et Fulekar, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008; Mamta et Khursheed, 2015). Cinq genres bactériens, à savoir *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* et *Bacillus*, ont démontré leur capacité à dégrader l'endosulfan. Au cours de la biodégradation, des métabolites tels que l'endosulfan diol, l'endosulfan lactone et l'endosulfan éther ont été produits, mais leur toxicité est moindre par rapport au composé d'origine (endosulfan) (Kafilzadeh *et al.* 2015).

Tableau 3 Biodégradation des différents pesticides carbamates par les microorganismes (Mustapha, 2019)

<i>Pesticide</i>	<i>Espèce</i>	<i>Support environnemental</i>	<i>Mécanisme impliqué</i>
<i>Carbofuran</i>	Consortia	Sol	Dégradation
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sol	Dégradation
	<i>Pseudomonas</i> et <i>Alcaligenes</i>	Sol	Dégradation
	<i>Enterobacter cloacae</i> souche TA7		
	<i>Mucor ramannianus</i>	Sol	Dégradation
	<i>Novosphingobium</i> sp	Sol	Dégradation
	<i>Aspergillus</i> sp.	Sol	Dégradation
		Sol	Dégradation

<i>Carbaryl</i>	Bacillus, Morganella,	Sol	Dégradation
	Pseudomonas, Aeromonas,	Sol	Dégradation
	Corynebacterium sp.	Sol	Dégradation
	Micrococcus sp.		
	Enterobacter cloacae sp.		
	Paecilomyces	Sol	Dégradation
<i>Propoxur</i>	<i>Corynebacterium kutscheri</i> ,	Déchets solide	Dégradation
	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus</i>	municipaux	
	<i>pasteurii</i> et <i>Aeromonas sp.</i>		
	<i>Consortia</i>		
<i>Methomyl</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sol	Dégradation
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Sol	Dégradation
	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Sol	Dégradation
<i>Oxamyl</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Sol	Transformation
	<i>Micrococcus luteus</i>	Sol	Dégradation
	<i>Aminobacter sp.</i>	Sol	Dégradation
	<i>Trichoderma sp.</i>	Sol	Dégradation
	<i>Aspergillus niger</i>	Sol	Dégradation
<i>Aldicarb</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sol	Dégradation
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sol	Dégradation
	<i>Consortia</i>	Sédiment	Transformation
<i>Carbenzidi m</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>	Sol	-
	<i>Rhodococcus sp.</i>	Sol	Dégradation
	<i>Trichomonas sp.</i>	Sol	Dégradation
	<i>Nocardioides soli</i>	Sol	-

Partie Expérimentale

Matériel et Méthode

I. Matériel et Méthode

1. L'objectif

L'objectif de ce travail est d'isoler des bactéries telluriques qui tolèrent différents types de pesticides utilisés dans la culture des agrumes en Algérie.

2. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé le 2 février 2023 à la région de Touahria à Mesra, Mostaganem, sur un verger d'agrumes. Nous avons collecté un sol agricole préalablement traité par des pesticides pendant plusieurs années.

Le prélèvement a été réalisé selon un protocole rigoureux d'asepsie. Pour tenir compte de l'histoire d'utilisation de pesticides, des sites représentatifs ont été sélectionnés en prenant en compte les pratiques agricoles antérieures. À chaque site, un prélèvement minutieux a été effectué en utilisant une tarière de sol appropriée.

L'échantillon a été collecté à une profondeur spécifique de 15 Cm de profondeur. Après le prélèvement, l'échantillon de sol a été collecté avec soin, placé dans des récipients propres et étiquetés de manière précise pour garantir sa traçabilité.

Un questionnaire détaillé avec l'agriculteur a permis d'obtenir des informations précises sur la méthode de traitement et le type de culture effectués tout au long de la vie des arbustes.



Figure 6 Site de collection de l'échantillon du sol d'agrumes (orange) de la région de Touahria

2.1 Condition d'échantillonnage

L'échantillonnage du sol agricole qui a été fait à Touahria, Mostaganem, Algérie :

Latitude 35,81061° ou 35° 48' 38" nord Longitude 0,21093° ou 0° 12' 39" avec les conditions suivantes : Température de 6°C et un vent 6 km/h.

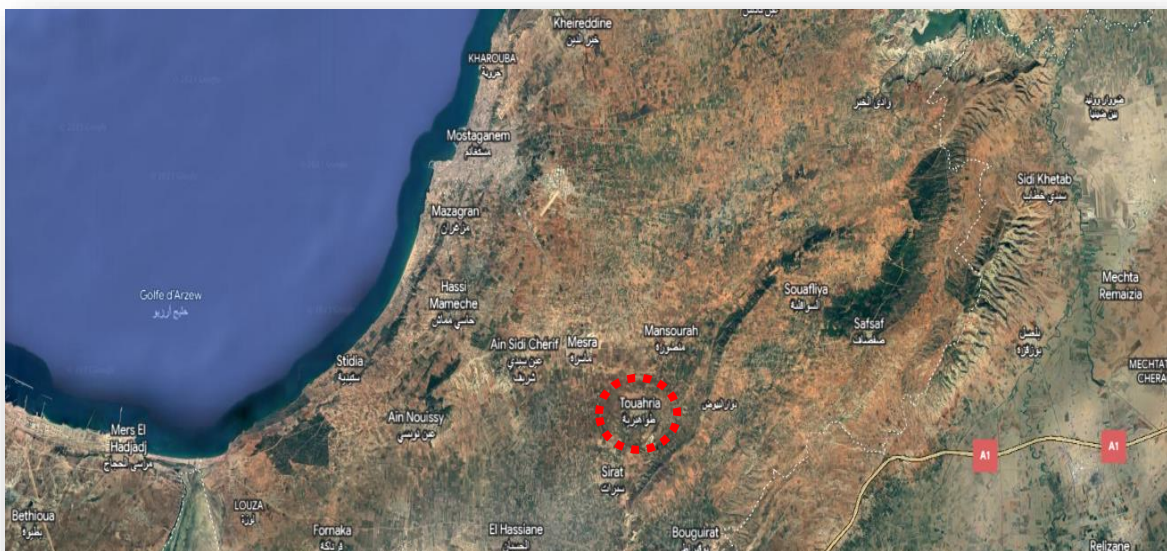


Figure 7 Localisation de site d'échantillonnage par le service de cartographie en ligne : Google Earth.

2.2 Questionnaire et types de traitements

Ces arbres fruitiers nécessitent un traitement particulier et régulier du feuillage aux fleurs et aux fruits. Voici les traitements les plus fréquemment suivis par les agriculteurs lors de la culture des agrumes (Tableau 4).

Tableau 4 Différents types de traitements biologiques et chimiques pour la culture d'agrumes

Traitement Biologique	Engrais
Engrais azoté	Ammonitrate 33.5
Arachnicide/acaricide (araignée rouge)	Bactimec
Insecticides (mouches/larves)	Lamdoc
Fongicide (mildiou)	Decafate
Compost décomposé	En automne

3. Criblage des bactéries qui tolèrent les pesticides

Le criblage des bactéries qui tolèrent les pesticides a été réalisé par l'ajout du sol agricole dans un milieu minéral salin (MSM).

Une quantité de 1g de sol a été cultivée dans un Erlenmeyer (EA1) contenant 200 ml de MSM additionné de deux types de pesticides ; LAMDOC et BACTIMEC à une concentration de 50mg/L.

Un deuxième Erlenmeyer (EA2) a été additionné par deux autres types de pesticides ; FOCUS ULTRA et RUSTILAN à la même concentration.

Le contenu a été soigneusement mélangé puis l'incubation des flacons a été faite à 30°C pendant 6 jours sous agitation continue et dans l'obscurité. Cette suspension a été considérée comme suspension mère (**Díaz et al., 2016**).

4. Isolement des bactéries sur milieu solide

Un milieu MSM solide additionné (EA1) de 50mg/L de LAMDOC + BACTIMEC et un autre (EA2) additionné de FOCUS ULTRA + RUSTILAN a été préparé. Une série de dilutions a été réalisée à partir de chaque flacon de la suspension mère, en utilisant les facteurs de dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Une quantité de 0,1 ml des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} ont étéensemencées et incubées à une température de 30°C pendant 7 jours à l'obscurité afin de permettre une bonne croissance des bactéries (**Lourthuraj et al., 2022**).

5. Repiquage et purification des isolats

La purification a été faite à partir des boîtes incubées, dont 7 colonies sélectionnées etensemencé dans des boîtes de GN. Incubé pendant 24 heure à une température de 30°C.

6. Etude macroscopique

Sur gélose GN, les colonies des isolats ont été observées afin d'évaluer différents paramètres après incubation. Ces paramètres comprennent la taille, la couleur (pigmentation), l'aspect de la surface, la transparence, la forme des contours (**Singleton, 1999**).

7. Etude microscopique par coloration de Gram

Cette coloration permet de connaître le type de Gram de bactérie, sa forme (Cocci, bacille...), sa taille, et le mode de regroupement (en chaîne, en amas, en palissades...) et parfois l'observation la forme sporulée. Nous commençons par réalisation d'un frottis, à partir d'une culture jeune, sur lame de microscope et le fixer à la chaleur. D'abord, une première coloration par le violet de gentiane (ou cristal violet) pendant 1 min. En suit le mordantage par l'ajout du Lugol durant 1 min, puis un rinçage à l'eau. Troisièmement, une décoloration avec de l'alcool 90° (10 seconde) succédé par un rinçage à l'eau. Enfin la contre

coloration avec la safranine (ou Fuschine) durant 1 min. les lame sont rincé à l'eau distillée et sécher à l'air.

L'observation microscopique se fait à l'objectif x100 avec de l'huile à immersion. Les Gram positives apparaissent en violet foncé, et les Gram négatives apparaissent rose (**Kumar *et al.*, 2020**).

8. La conservation des isolats

8.1 Conservation courte durée

Les souches isolées ont été conservées à court terme en les repiquant sur des géloses nutritives inclinées dans des tubes, placé à une température de conservation appropriés à 5°C. Cette méthode de conservation permet de préserver les isolats bactériens dans un état viable jusqu'à leur utilisation ultérieure (**Toukara *et al.*, 2017**).

8.2 Conservation longue durée

Les isolats purifiés ont été cultivés pendant 24 heures dans un milieu de BN. Après cette période, la culture a été centrifugée à 3000 tours par minute pendant 20 minutes. Le culot résultant a été additionnée par un milieu de conservation préalablement stérilisé par autoclavage, composé de BN et de glycérol à une concentration de 20% (v/v) conservée dans des tubes Eppendorf stériles à une température de -20 °C (**Tortora, 2003**).

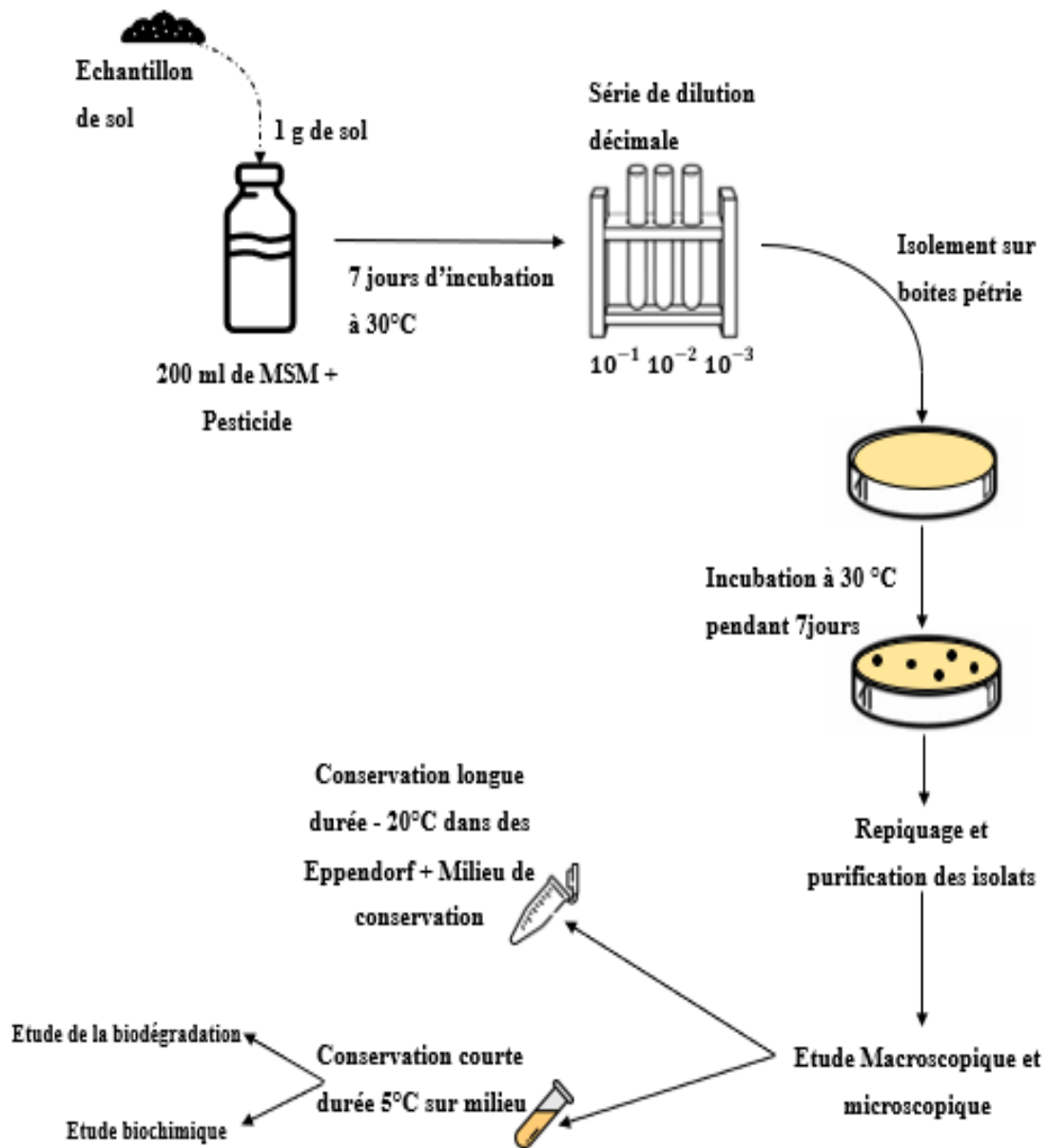


Figure 8 Schéma représentatif des différents étapes d'isolement et purification des isolats

9. Etude de la biodégradation des pesticides par les isolats

9.1 . Préparation des cellules

Les isolats bactériens obtenus suite au criblage ont été soumis à un protocole de dégradation de différents pesticides et à différentes concentrations.

Les bactéries isolées ont été cultivées pendant 24 heures dans un bouillon nutritif, en conditions aérobies à une température de 30 °C. La croissance de ces bactéries s'est manifestée par la présence d'un trouble dans le milieu de culture.

Après l'incubation, les cultures ont été soumises à une centrifugation à 3000 tr/min pendant 20 minutes dans des Eppendorf, permettant de séparer le culot (sédiment) du surnageant. Le culot a été récupéré, tandis que le surnageant a été soigneusement éliminé.

Les culots bactériens ont subi un lavage répété avec 1000 µl de MSM stérile et recentrifugé à 3000 tr / min pour 20 minutes. Cette opération de lavage a été répétée 3 fois pour éliminer toute source de carbone dans les cellules.

Une suspension de 1ml de chaque isolat dans MSM a été conservé pour l'utilisation dans l'analyse de la biodégradation des différents pesticides (Ammeri *et al.*, 2021)

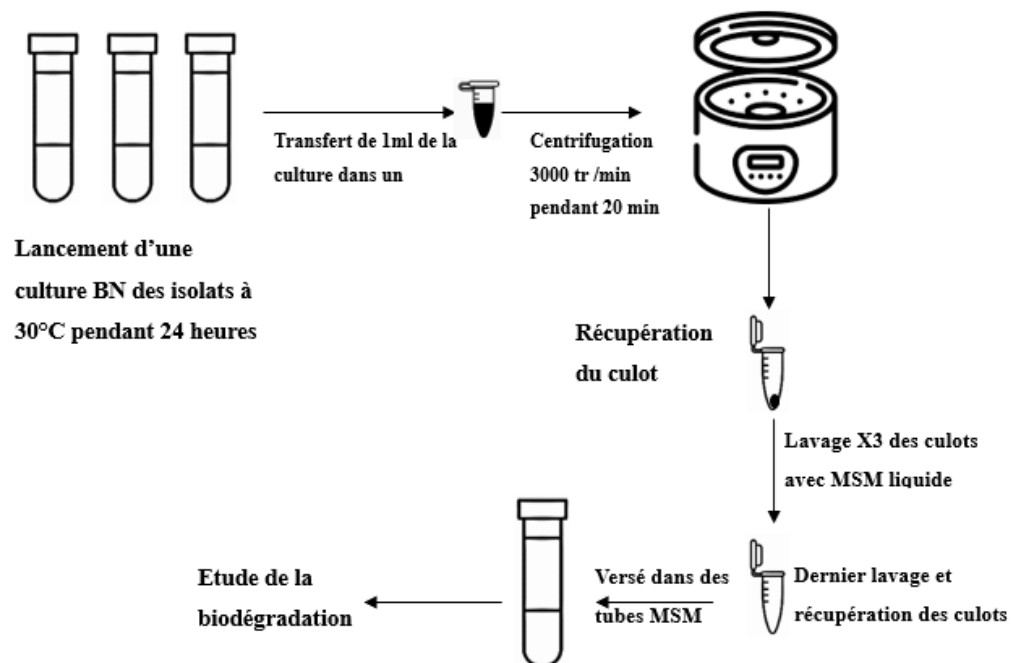


Figure 9 Préparation des isolats pour l'étude de la biodégradation des pesticides

9.2 Etude de la biodégradation des pesticides dans un milieu liquide

La turbidité consiste à déterminer la croissance bactérienne en utilisant les pesticides comme source de carbone dans le bouillon MSM. Cela montre si la bactérie possède l'activité dégradante des pesticides ou non.

Les culots lavés ont été mis en culture dans 10ml de MSM et additionnés à des pesticides à des concentrations croissantes comme seule et unique source de carbone pour voir leur potentiel de dégradation.

Les différents pesticides utilisés sont LAMDOC, BACTIMEC, FOCUS ULTRA, DECAFATE, MUSTANG et RUSTILAN à des concentrations croissantes de : 200 mg/l, 500 mg/l et 700 mg/l.

L'incubation était réalisée à 30°C à l'obscurité pendant 7 jours sous agitation continue.

Un tube de MSM additionné de pesticide sans cellules bactériennes a été considéré comme contrôle négative.

Une mesure quotidienne de la densité optique des cultures a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V) à 600 nm pour évaluer la croissance et l'activité métabolique des isolats bactériens qui tolèrent les pesticides (**Ammeri et al., 2021**).

Les cultures avec une turbidité accrue et croissante quotidiennement ont été notés comme cultures à croissance cellulaire présente (+).

10. Etude biochimique des isolats

10.1 Test de catalase

La catalase est une enzyme qui est capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce test est couramment utilisé dans l'identification des bactéries Gram+.

On dépose une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes sur une lame propre et sèche. Ensuite, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on prélève une colonie isolée de la souche bactérienne à tester et on la dépose dans la goutte d'eau oxygénée.

Si des bulles apparaissent, cela indique que la bactérie possède l'enzyme catalase. (**Joffin et Leyral, 1997**).

10.2 Nitrate réductase

On réalise le test de réduction des nitrates en nitrites en ensemencant les isolats dans un bouillon nitraté. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, on ajoute quelques gouttes des réactifs Nitrates 1 et 2 (ou du réactif de Griess) aux cultures.

Une coloration rouge indique la présence de nitrites, ce qui signifie que la bactérie est nitrate réductase positive au stade nitrites. En absence de coloration rouge (incolore), l'ajoute du zinc comme un réducteur des nitrates. Après quelques minutes, une coloration rouge apparaît, confirmant la réduction des nitrates en présents de zinc et non pas par la bactérie.

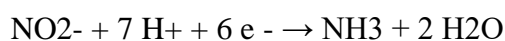
Si la couleur rouge n'apparaît pas cela indique l'absence de nitrate dans le milieu qui a été réduit par la bactérie (**Joffin et Leyral, 1997**).

Les bactéries peuvent utiliser les nitrates de deux façons :

- ❖ Réduction des nitrates en azote : respiration nitrates en anaérobiose



- ❖ Réduction des nitrates en nitrites puis NH_3 : réduction assimilatrice



10.3 Type respiratoire à la gélose Viande-foie

On ensemence les isolats dans des tubes contenant de la gélose Viande-Foie, dégazés et maintenus en surfusion à une température de 45°C. L'ensemencement est réalisé en effectuant une spirale ascendante dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Après solidification, on incube les tubes à une température de 30°C pendant 24 heures.

L'observation de la croissance bactérienne nous a permis de déterminer les types respiratoires des bactéries :

- Si la croissance bactérienne était présente uniquement en surface du tube, les bactéries étaient qualifiées d'aérobies strictes.
- Si la croissance était située au fond du tube, les bactéries étaient considérées comme anaérobies strictes.
- Si la croissance était observée sur toute la hauteur du tube, les bactéries étaient classées comme aéro-anaérobies facultatives.
- Si la croissance était limitée entre 0,5 et 1,5 cm à partir du haut de la gélose, les bactéries étaient identifiées comme micro-aérophiles. (Joffin et Leyral, 1997).

10.4 Test gélose TSI

On ensemence les isolats dans des tubes contenant de la gélose TSI, l'incubation à une température de 30°C pendant 24 à 48 heures (Delarras, 2007).

- Si le milieu reste rouge, cela indique l'absence de fermentation et la bactérie est aérobie.
- Si la pente du tube est rouge et le culot jaune, cela signifie une fermentation du glucose positive, mais une absence de fermentation du lactose et du saccharose.
- Si le milieu vire au jaune, cela indique une fermentation positive du glucose, ainsi que du lactose et/ou du saccharose.
- En cas de fissure et de décollement de la gélose, cela suggère la production de gaz par les bactéries.

- La formation d'une coloration noire dans la gélose indique la production de sulfure d'hydrogène (H₂S).

10.5 Test Mannitole mobilité

Le mannitol rend la lecture possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. Il acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune) par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. Incuber 24 heures à 37°C.

Si les isolats fermentent le mannitol, le milieu prend une couleur jaune. De plus, la mobilité des bactéries se manifeste par leur diffusion dans la gélose autour de la piqûre centrale.

10.6 Milieu sélectif King A et King B

L'ensemencement des isolats a été fait dans un milieu King A et King B solide (Annexe 1) par stries et incubé à 30°C pendant 24 heures.

10.7 Test MEVAG: milieu Hugh et Leifson

Les isolats ont été ensemencés par piqûre centrale une fois solidifiée dans des tubes contenant du Hugh et Leifson avec un seul glucide (fructose, galactose, maltose et glucose), puis incubés avec le bouchon dévissé pendant 24 heures à 35°C.

Lecture :

- Couleur verte : indique que la bactérie n'utilise pas ce glucide comme source d'énergie.
- Couleur jaune en haut et verte en bas : indique une utilisation du glucide en voie oxydative.
- Couleur jaune : indique une utilisation du glucide en voie fermentative.
- Couleur bleue en haut et verte en bas : indique que la bactérie ne peut pas utiliser ce glucide et n'utilise pas de peptone comme source d'énergie.

10.8 Recherche de la production d'indole

Le milieu peptone exempt d'indole (**Annexe1**) permet la mise en évidence de la dégradation de tryptophanes en indole grâce à tryptophanase.

La culture a étéensemencée sur des milieux peptoné puis incubés à 37 °C. Après 24h d'incubation, l'indole produit est révélé par un réactif spécifique (Kovacs), en produisant un anneau rouge (**Joffin et Leyral, 2006**).

10.9 Activité Amylase

Les isolats microbiens à activité amylase sont détectés par culture sur milieu gélosé à base d'amidon (1%) (**Annexe 1**) par un ensemencement par touche, incubé pendant 24 heures à 37°C. La visualisation des halos clairs d'activité amylase autour des colonies est déterminée par ajout de 3ml d'une solution iodée.

10.10 Enzyme protéolytique

Pour mettre en évidence la présence l'activité protéolyse des isolats, on utilise 20 ml de la gélose blanche (**Annexe 1**) additionnée par 100 ml de lait écrémé UHT (Upérisation à Haute température).

Ce test repose sur le fait que les enzyme protéases secrétées par les isolats se traduit par un halo transparent au tour de la colonie.

L'ensemencement a été fait en spot ou en touche et incubé à 37°C pendant 24heures. Le diamètre du halo est proportionnel à la quantité d'enzymes libérée par la bactérie. (**Williams et Cross, 1971**)

10.11 Enzyme lécithinase

La lécithinase est une enzyme qui possède certain micro-organisme, responsable de la dégradation de la lécithine phospholipidique.

Pour mettre en évidence la présence de cette enzyme chez les isolats, une gélose nutritive a été additionnée par l'émulsion de jaune d'œuf qui contient la lécithine (**Annex 1**) dans des boîtes Pétri.

L'émulsion contient un volume de 5ml de jaune d'œuf plus son double volume 10ml de solution NaCl (9%) bien mélanger en gardant la préparation dans des conditions aseptique.

Un volume de 100 ml de la gélose nutritive stérile en surfusion a été additionné par 12,5 ml de l'émulsion de jaune d'œuf mélangé et couler dans des boîtes Pétries stériles.

L'ensemencement se fait par touche à partir des colonies des isolats, et incubé a 37°C pendant 24heures.

Les résultats se traduit par la présence des précipités au tour de la zone d'ensemencement.

10.12 Enzyme estérase

L'activité estérasique a été testée sur le milieu de culture contenant 100 ml de gélose nutritive additionnée par 1ml de Tween 80 autoclavé et 0,01 g de Chlorure de calcium CaCl_2 coulé dans des boîtes de Pétri. Après ensemencement par spot du milieu, les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C.

La présence de l'enzyme estérase se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la zone d'ensemencement (**Sierra, 1957**).

10.13 Enzyme lipase

Dans un flacon contient 100 ml de gélose nutritive stérile, 5 ml de gomme d'arabique et 5 ml de l'huile d'olive pasteurisé dans un bain marie à 95°C pendant 30 minutes a été ajouté à la gélose et bien mélanger et couler dans les boîtes.

Après la solidification, l'ensemencement a été fait par touche. Les précipitations autour de la colonie indiquent la dégradation des lipides par l'enzyme bactérien lipase (**Chittepu, 2019**).

Résultats

II. Résultats

1. Criblage des bactéries qui tolèrent les pesticides

Après 7 jours d'incubation sous agitation la croissance sur le milieu MSM a été remarqué par un trouble dans les deux flacons (figure 9).

Le trouble indique une croissance importante des bactéries tolérantes aux pesticides fournit comme une seule source de carbone.



EA1



EA2

Figure 10 Résultat de criblage des bactéries qui tolèrent les pesticides additionnés dans Le MSM

2. Isolement des bactéries sur milieu solide

L'ensemencement sur milieu MSM solide additionnés de pesticides a permis d'isoler 7 colonies différentes (Figure 10).

Dans la boîte (EA 2) a la dilution 10^{-2} , on a pu sélectionner 5 colonies (C_1, C_2, C_3, C_4, C_5) et une seule colonie C_6 dans la dilution 10^{-3} .

La boîte (EA1) de la dilution 10^{-3} contient la colonie 7 uniquement.

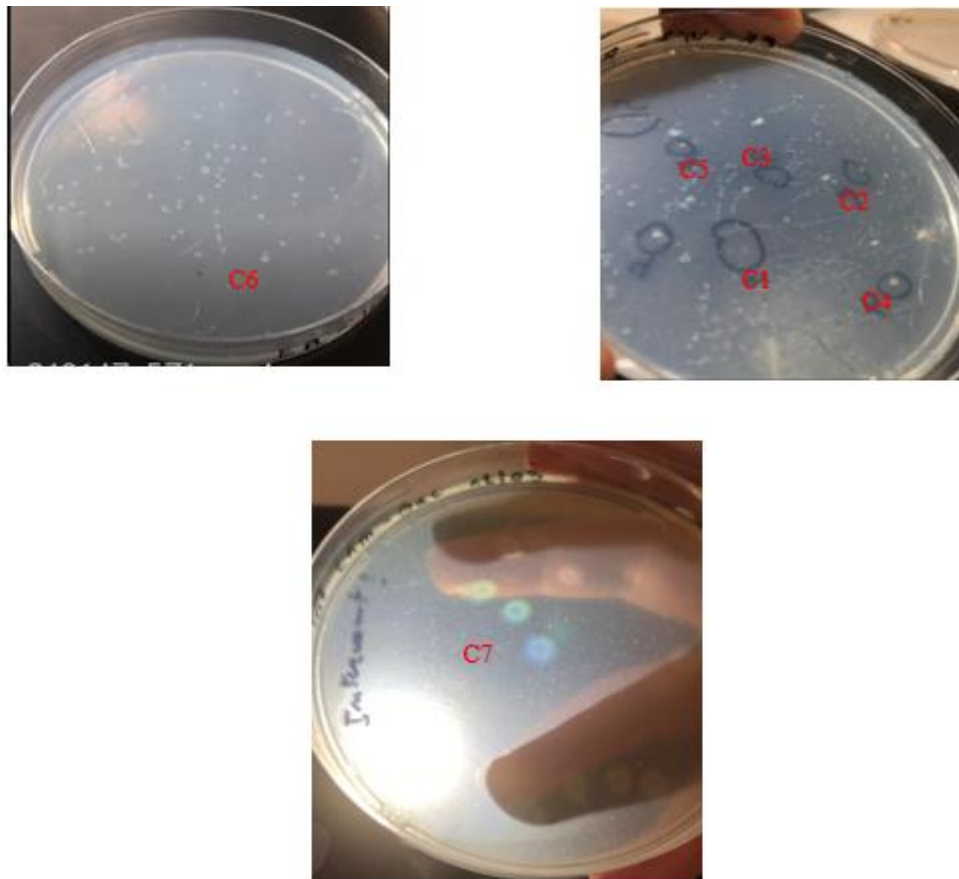


Figure 11 Observation macroscopique des colonies isolées de l'échantillon de sol d'agrumes sur milieu MSM solide additionné de pesticides

3. Etude macroscopique et microscopique

Les sept isolats sélectionnés par la méthode de criblage ont été observé par microscope après une coloration de Gram. L'observation macroscopique relève une diversité des isolats selon leurs formes et le Gram.

L'observation microscopique a démontré un assemblage entre la colonie C₃ et C₄, et la colonie C₅ et C₆.

Après la sélection des colonies, 5 colonies ont été distingué parmi les sept colonies (figure 11).

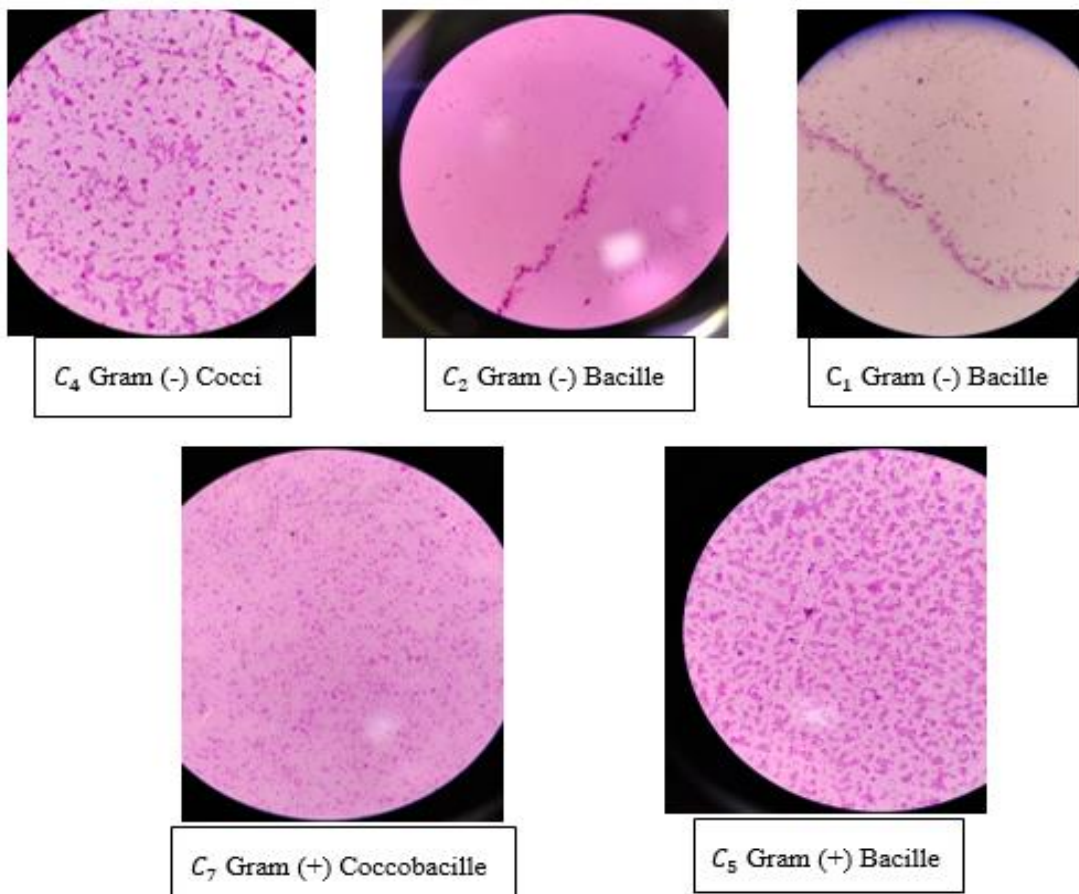


Figure 12 Observation microscopique des isolats bactériens après coloration de Gram (X100)

Le tableau 5 présente les caractéristiques macroscopiques des isolats cultivés dans le milieu gélosé nutritif (GN) en fonction de leurs propriétés distinctes. Ces caractéristiques permettent d'obtenir des informations préliminaires sur les colonies bactériennes étudiées.

Les caractéristiques macroscopiques observées comprennent la taille des colonies, leur forme, leur texture, leur couleur, leur transparence, leur bordure et leur élévation.

Les colonies C_1 et C_2 ont les mêmes critères macroscopique et microscopique, tandis que C_4 , C_5 , C_7 se différent.

La colonie C_7 diffuse une odeur spéciale et pigmente la gélose nutritive en couleur verte.

Tableau 5 Résultat des caractères macroscopique des isolats

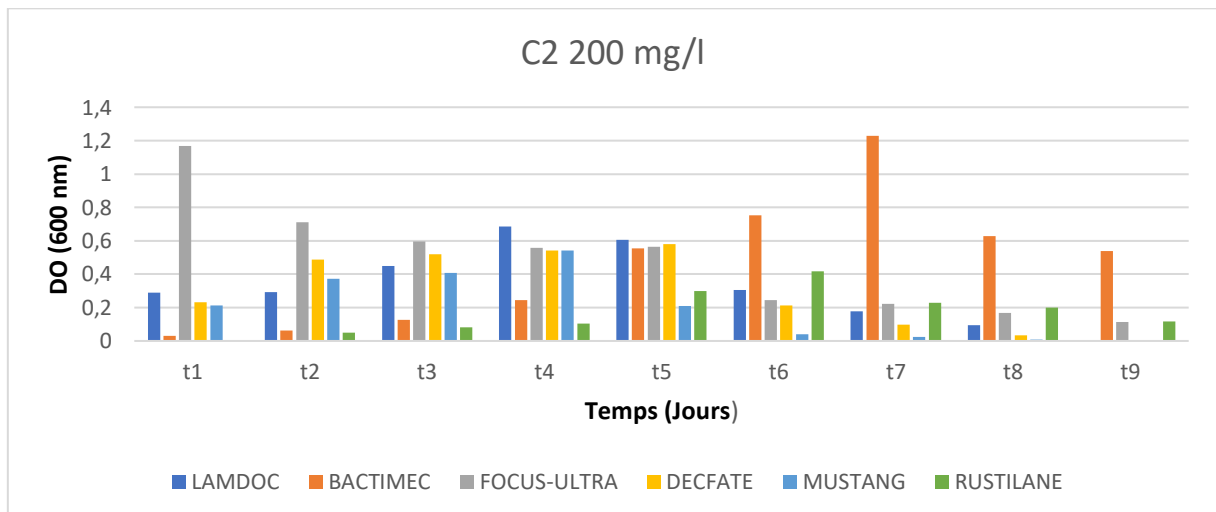
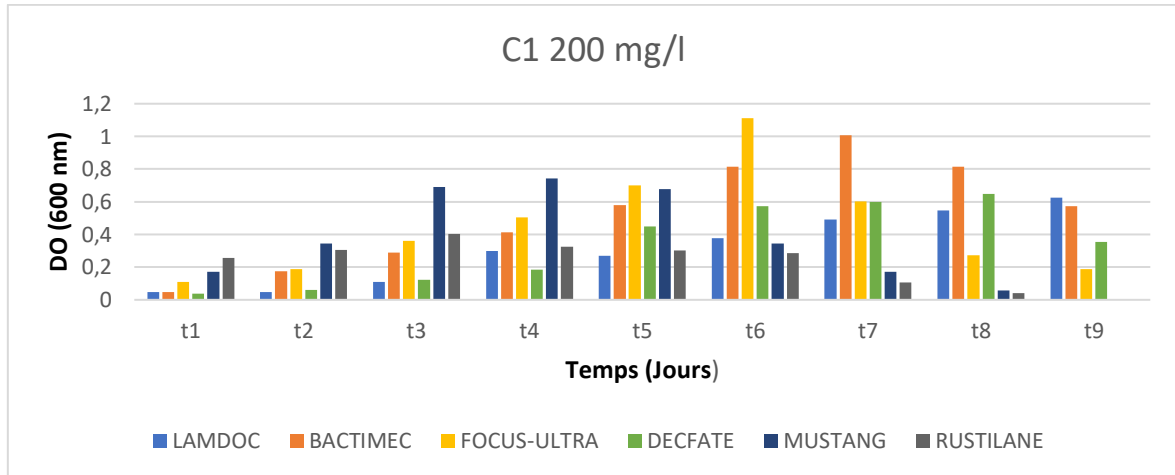
Colonie	C_1	C_2	C_4	C_5	C_7
Observation macroscopique	Ronde transparente/ contour transparent	Ronde Beige/ contour transparent	Contour irrégulier/transparente/ centre visqueux	Visqueuse brillante	Grande/ petit contour/odeur

4. Etude de la biodégradation des pesticides dans un milieu liquide

La biodégradation des pesticides a été mesuré par la densité optique des isolats pendant 9 jours.

Suite à la mesure de la DO mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV à partir des cultures liquides précédentes, nous avons remarqué que la croissance avait commencé dès le deuxième jour d'incubation.

Les figures 12, 13 et 14 regroupent des histogrammes présentant les résultats de taux de la croissance des isolats mesuré par la densité optique afin de déterminer la tolérance des bactéries isolées aux différents pesticides fournis selon les concentrations 200 mg/l, 500 mg/l, 700 mg/l.



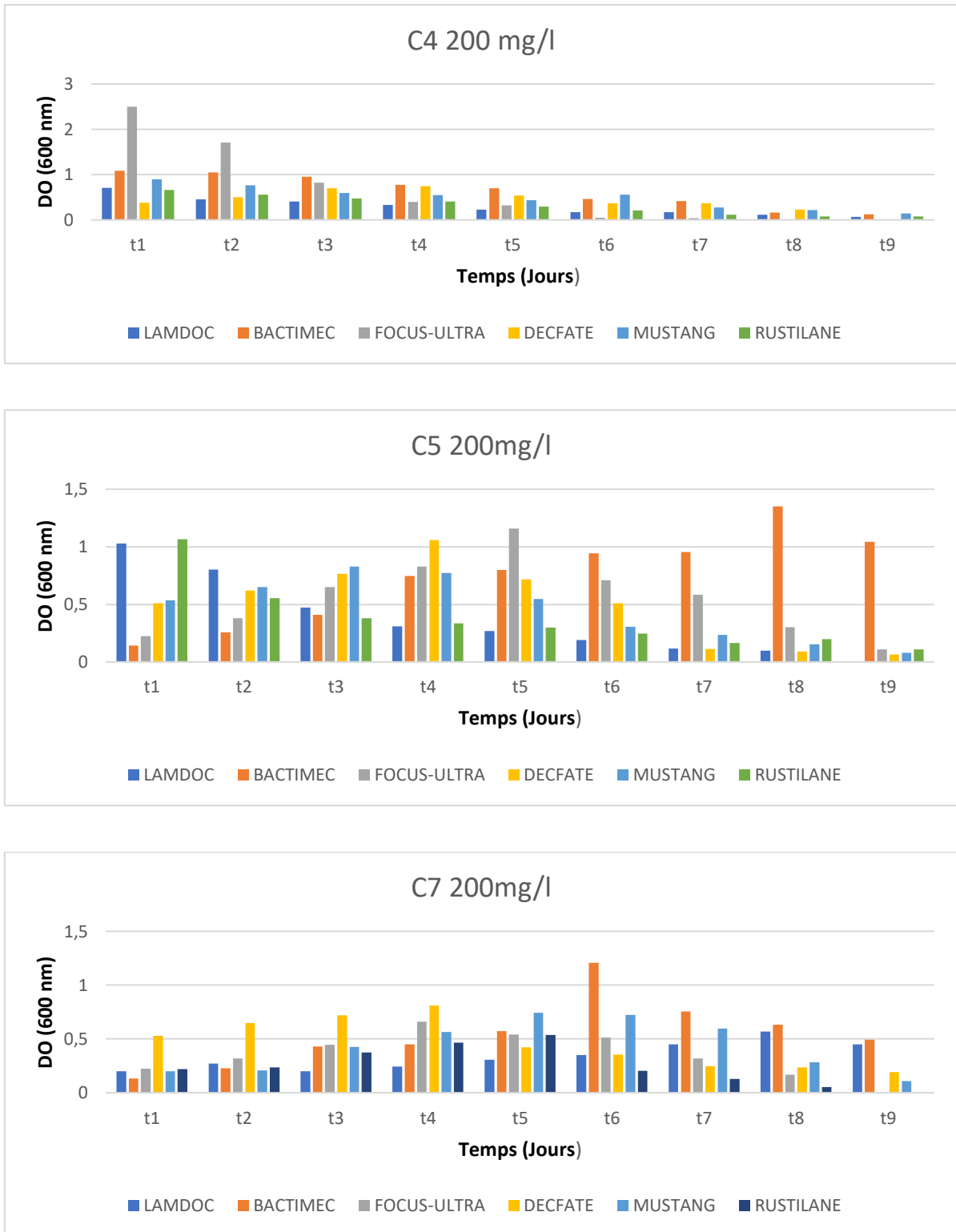
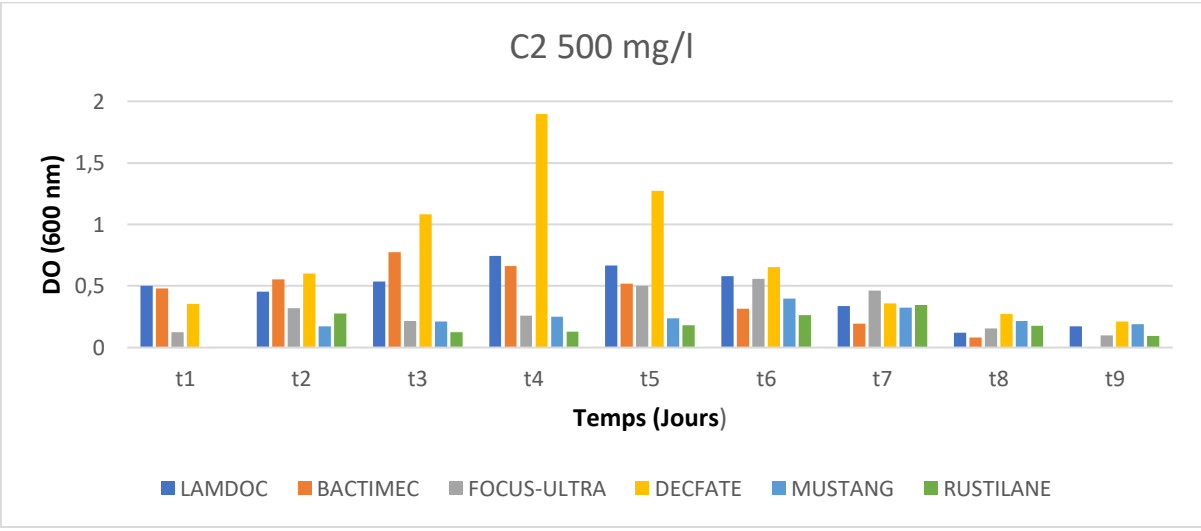
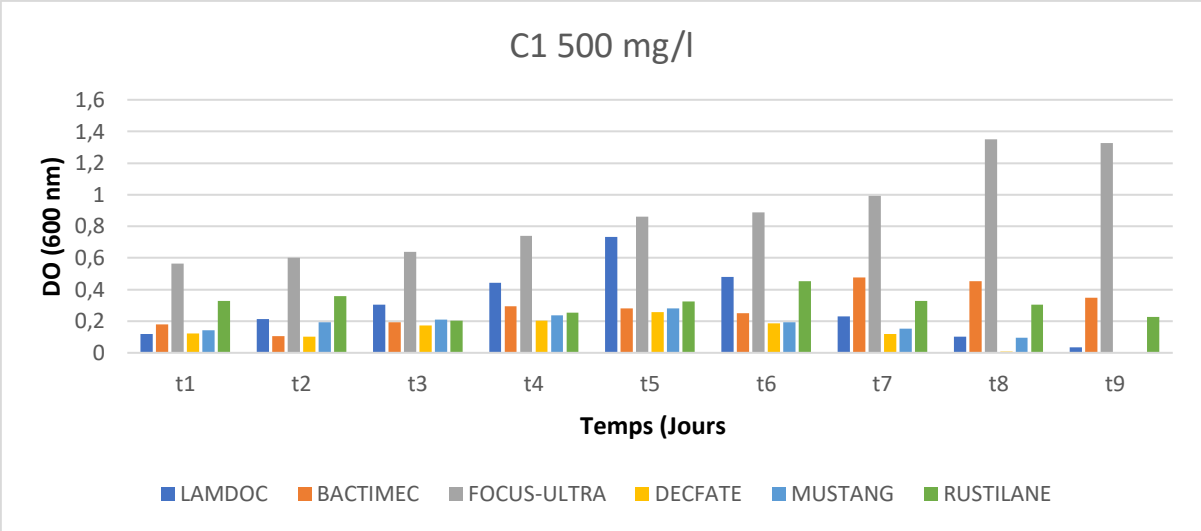
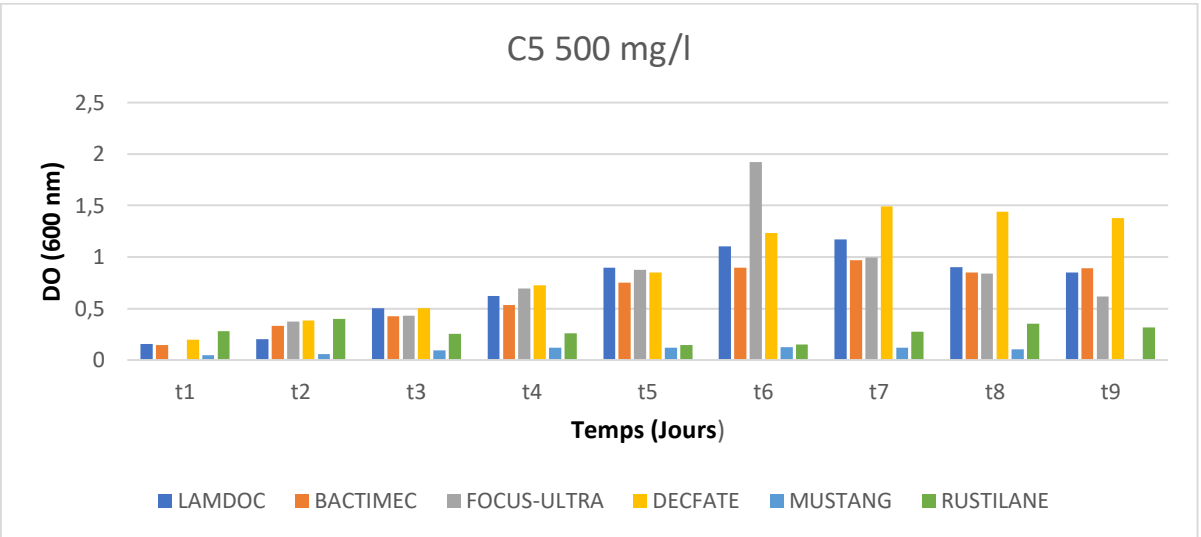
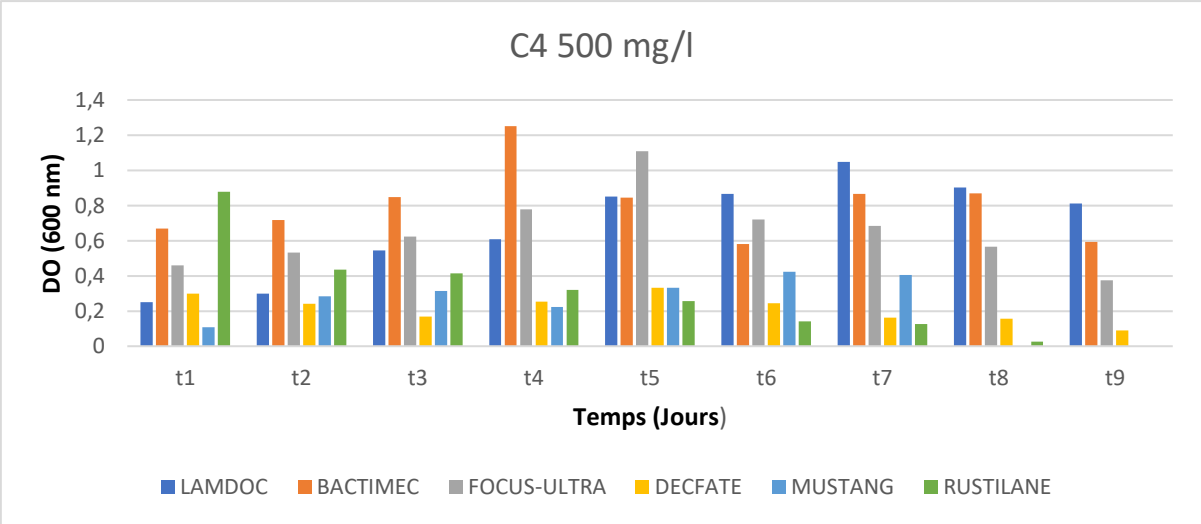


Figure 13 Croissance bactérienne des isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pesticide a une concentration 200 mg/l





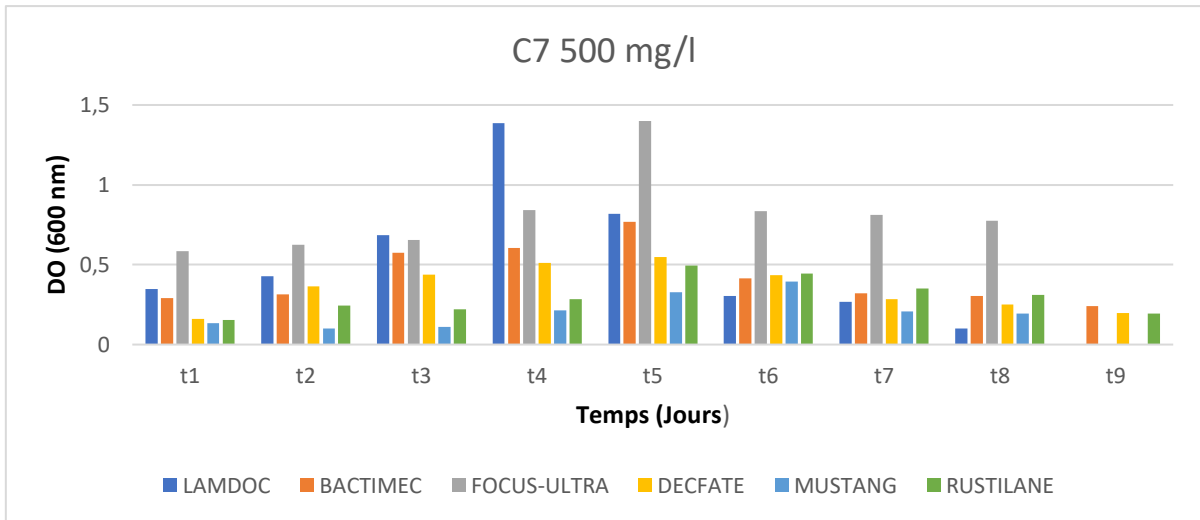
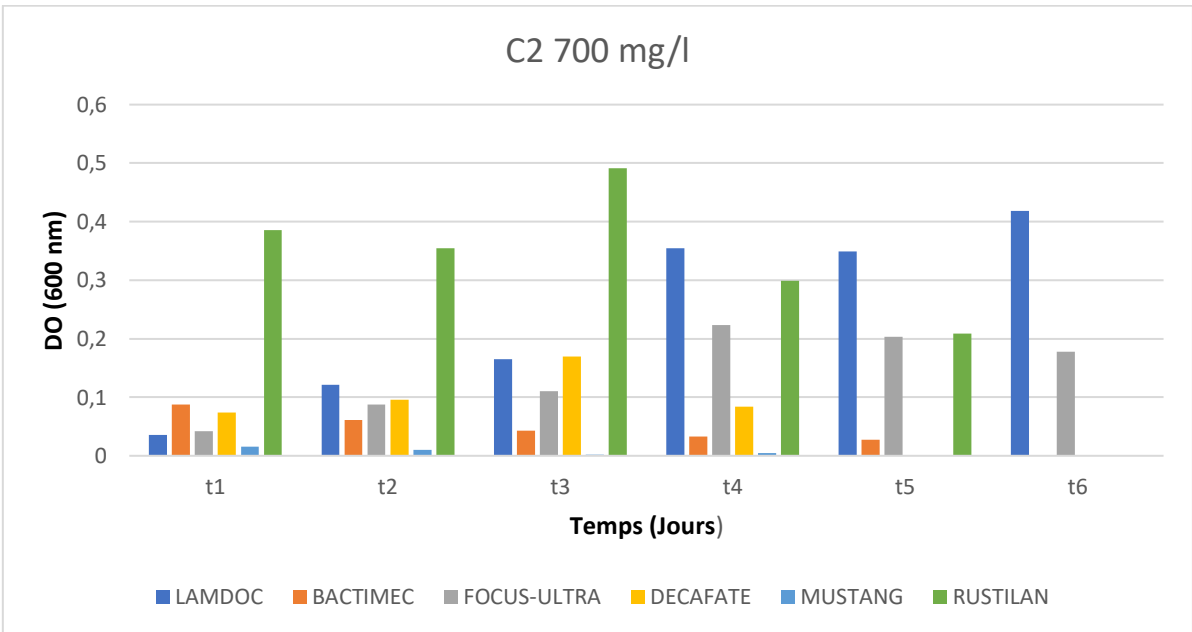
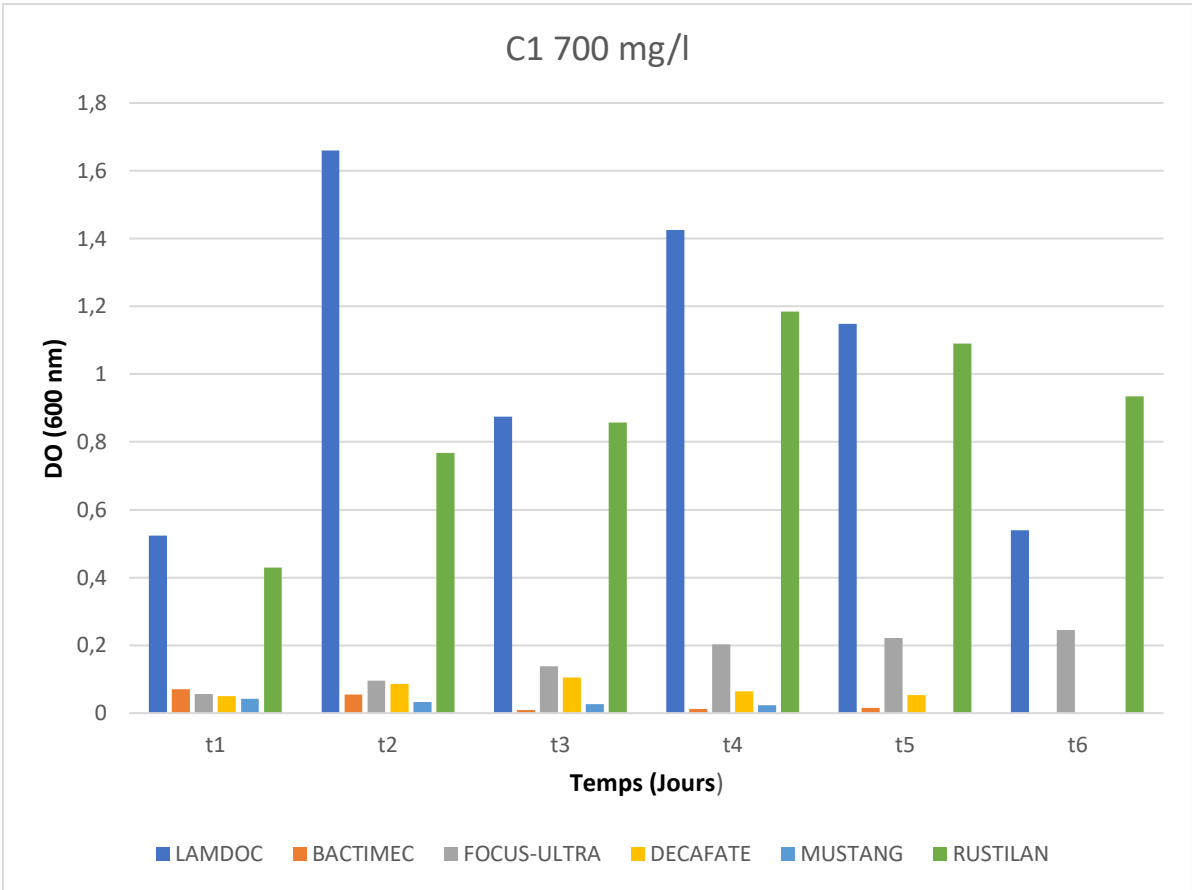


Figure 14 Croissance bactérienne des isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pesticide a une concentration 500 mg/l



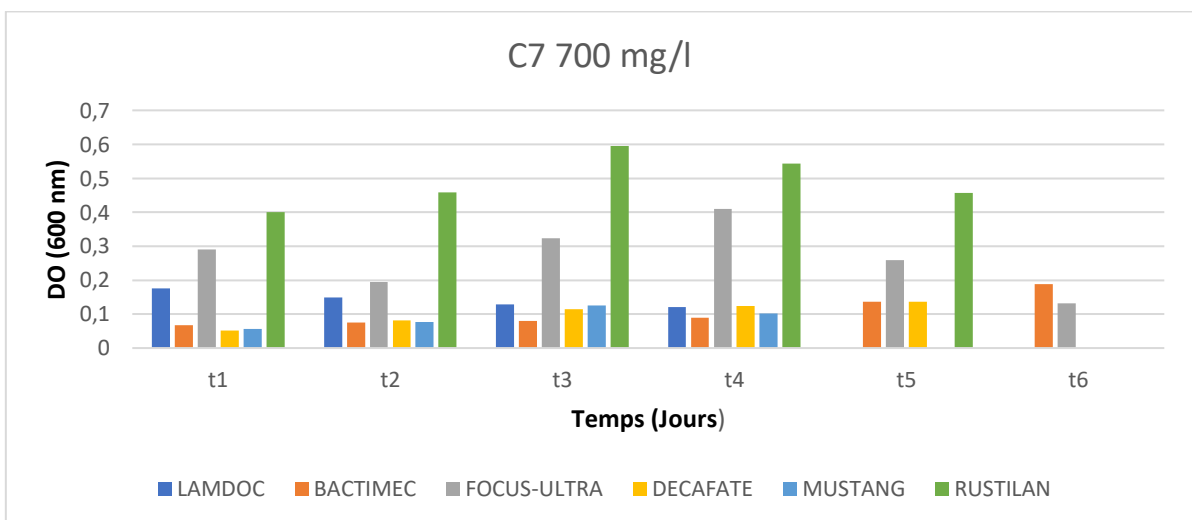
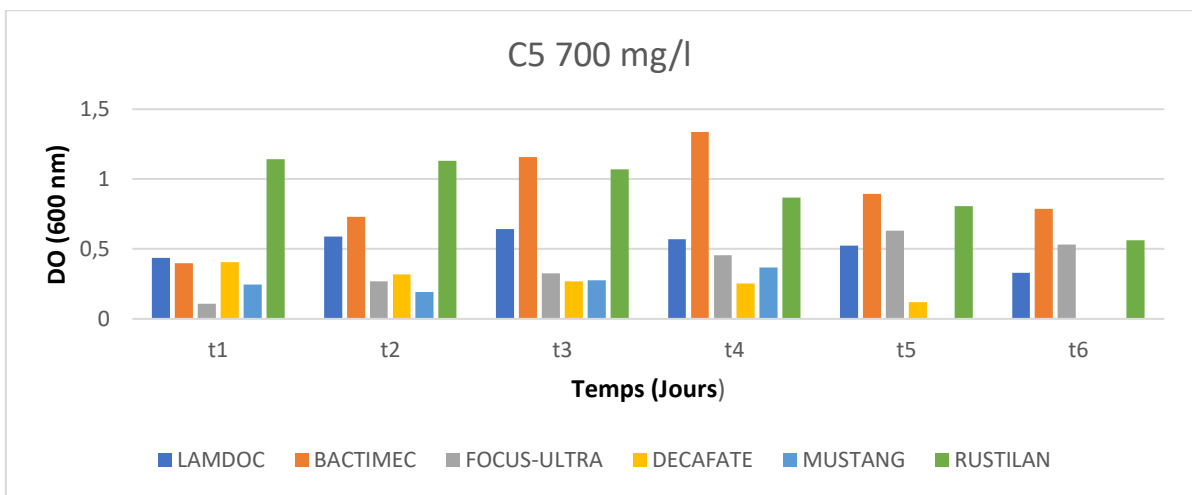
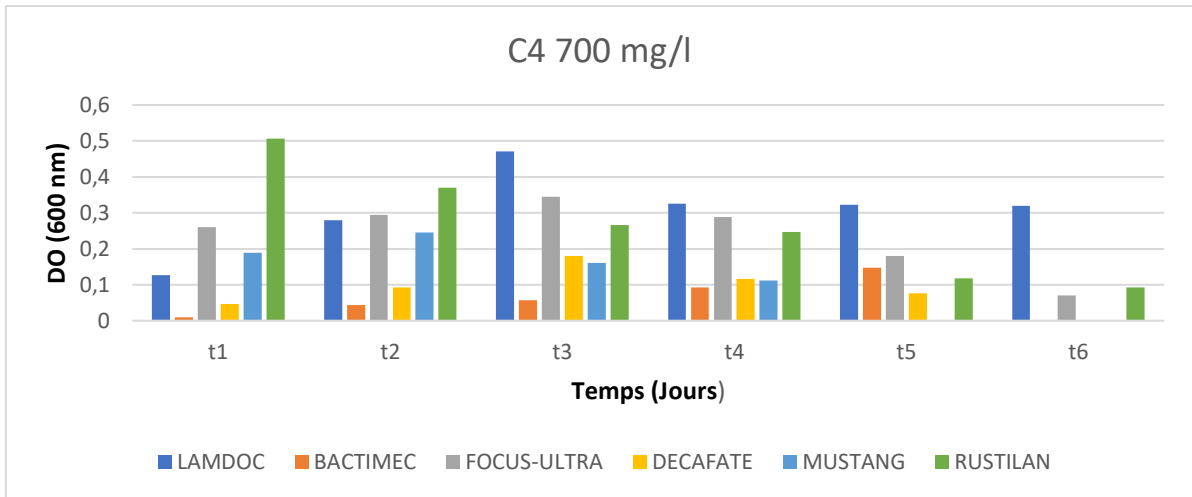


Figure 15 Croissance bactérienne des isolats dans milieu MSM liquide additionné de Pesticide a une concentration 700 mg/l

5. Etude biochimique

Le tableau 6 présente les résultats des tests biochimiques réalisés sur les différents isolats du sol agricole des agrumes. Les figures 14 ,15 ,16 et 17 illustrent les résultats des tests biochimiques effectués sur les cinq isolats sélectionnés dans la biodégradation.

Ces tests sont : test de catalase, nitrate réductase, Mannitol mobilité, TSI, Indole, King A et King B, le type respiratoire sur gélose Viande-Foie, Amylase, Protéolyse, Estérase, Lécithinase, Lipase et Test MEVAG le type respiratoire sur gélose Viande-Foie.

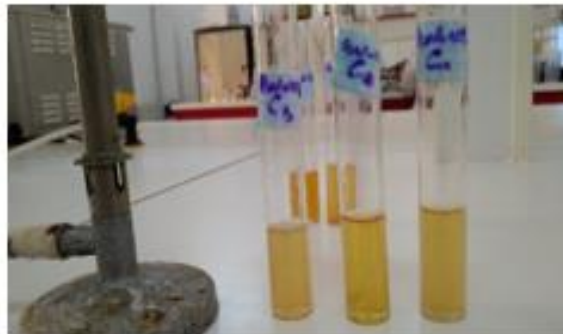
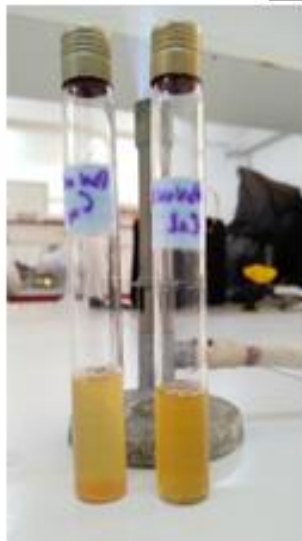
Tableau 6 Résultats de l'étude biochimique

		C1	C2	C4	C5	C7
Caractérisation biochimique	Catalase	+	+	+	+	+
	Nitrate réductase	+	+	+	+	+
	Mannitol mobilité	Mobile Man (-)	Mobile Man (-)	Immobile man (-)	Immobile man (-)	Mobile Man (-)
	T.S.I	-	-	-	-	-
	Indole	-	-	-	-	-
	King A	+	+	+	+	+
	King B	+	+	+	+	+
	V.F	Aérobie stricte	Aérobie stricte	Aérobie facultatif	Aérobie facultatif	Aérobie facultatif
	Amylase	+	+	+	+	+
	Protéolyse	+	+	+	+	+++
	Estérase	+	+	+	+	+
	Lécithinase	+	+	+	+	+

	Lipase	+	+	+	+	+
	Lactose	+	Inerte	Inerte	-	-
	Glucose	+	+	+	+	+
	Fructose	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	Inerte

D'après les tests enzymatiques (figures 15, 16, 17, 18, 19, 20) tous les isolats possèdent les enzymes amylase, estérase, Lécithinase, catalase, lipase et protéase, et capable de réduire le nitrate en nitrite.

Nitrate Réductase



Test catalase



Test TSI

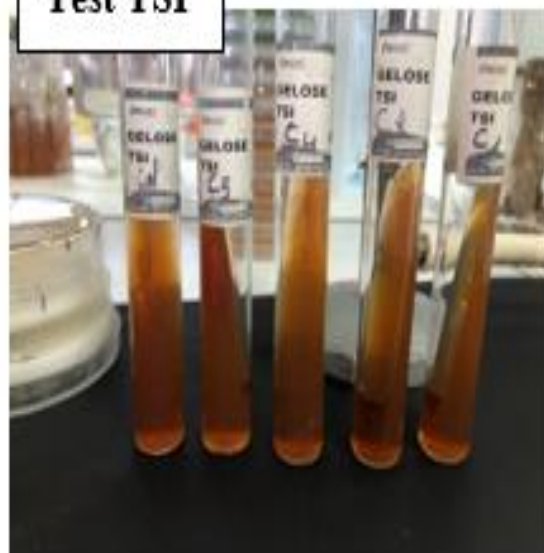
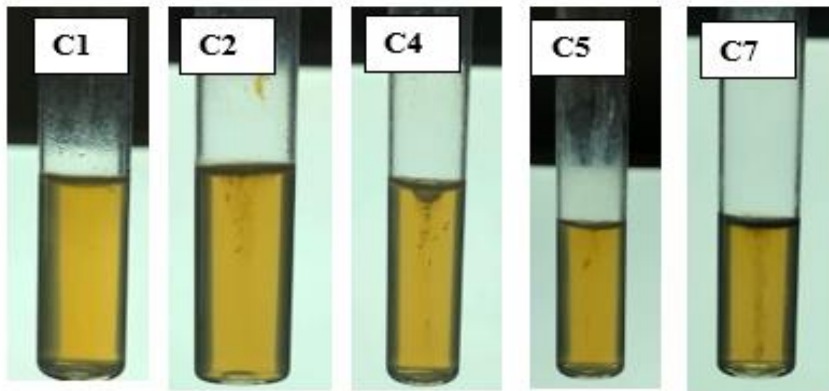
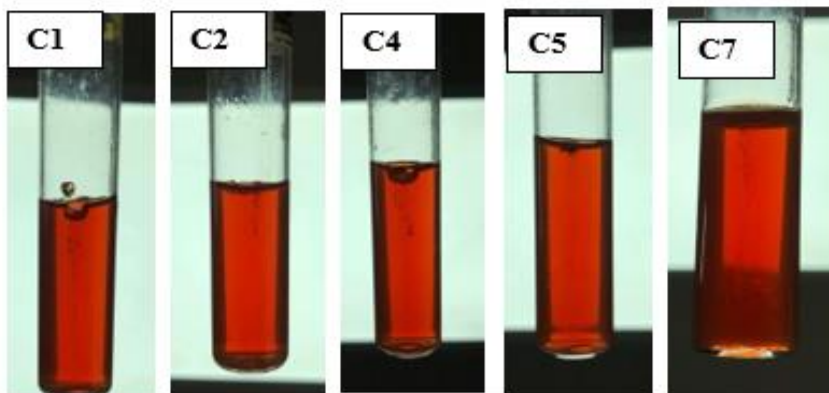


Figure 16 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Nitrate réductase, Catalase, TSI

le type respiratoire sur gélose Viande-Foie



Mannitol mobilité



Test Estérase

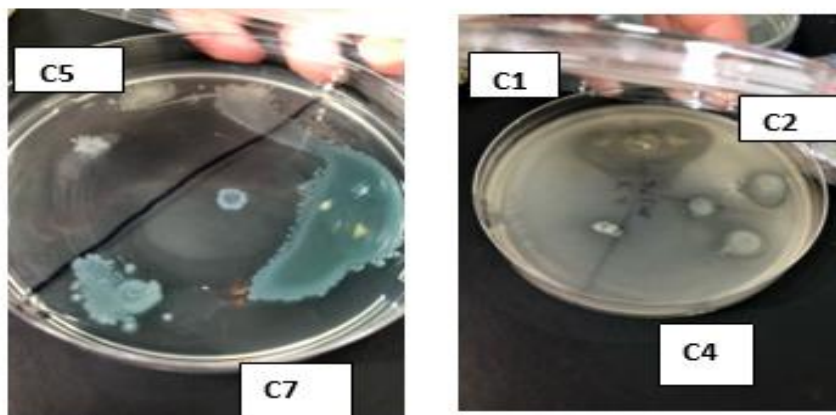


Figure 17 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : V.F, Mannitol Mobilité, Estérase

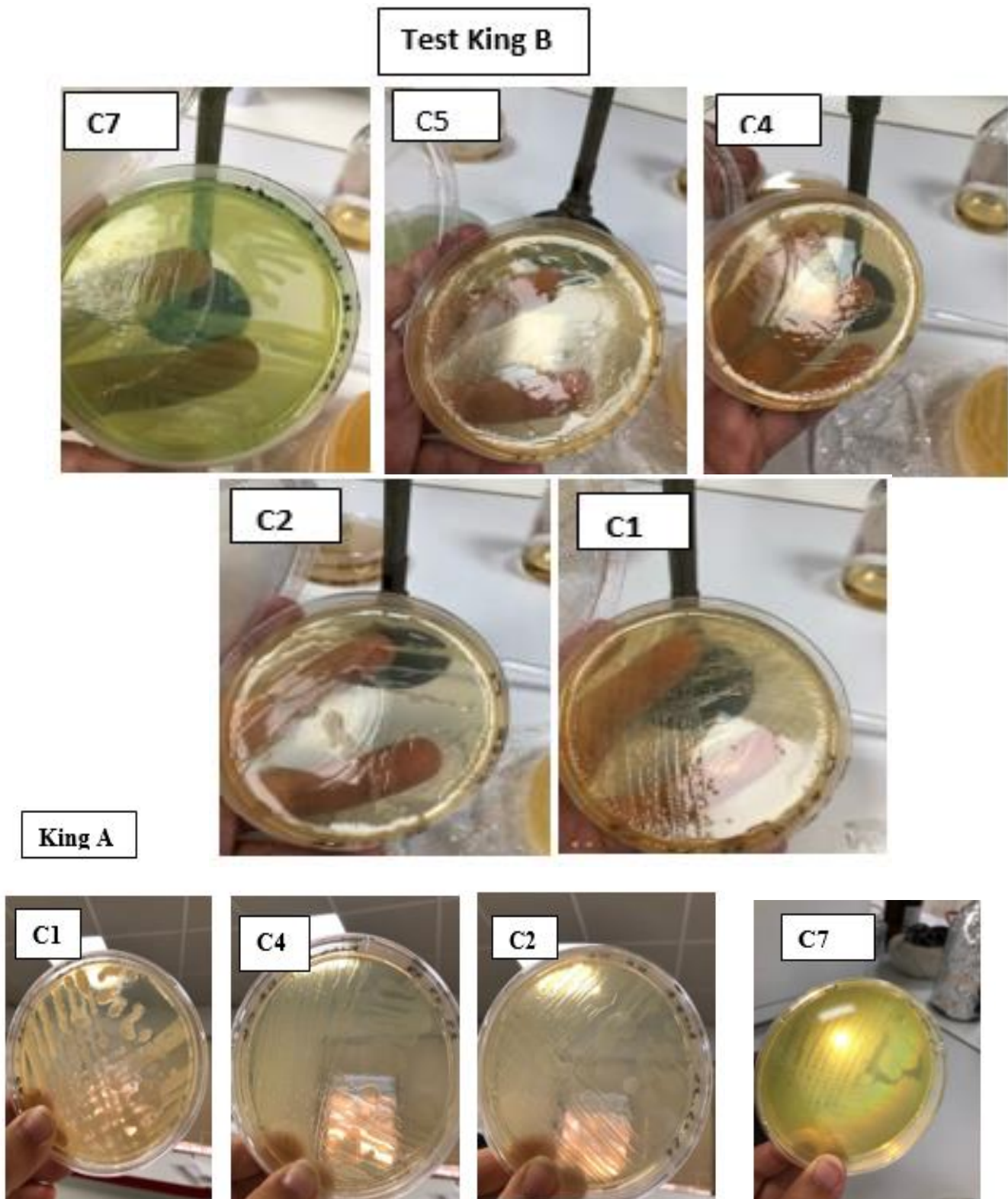


Figure 18 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : King A et King B

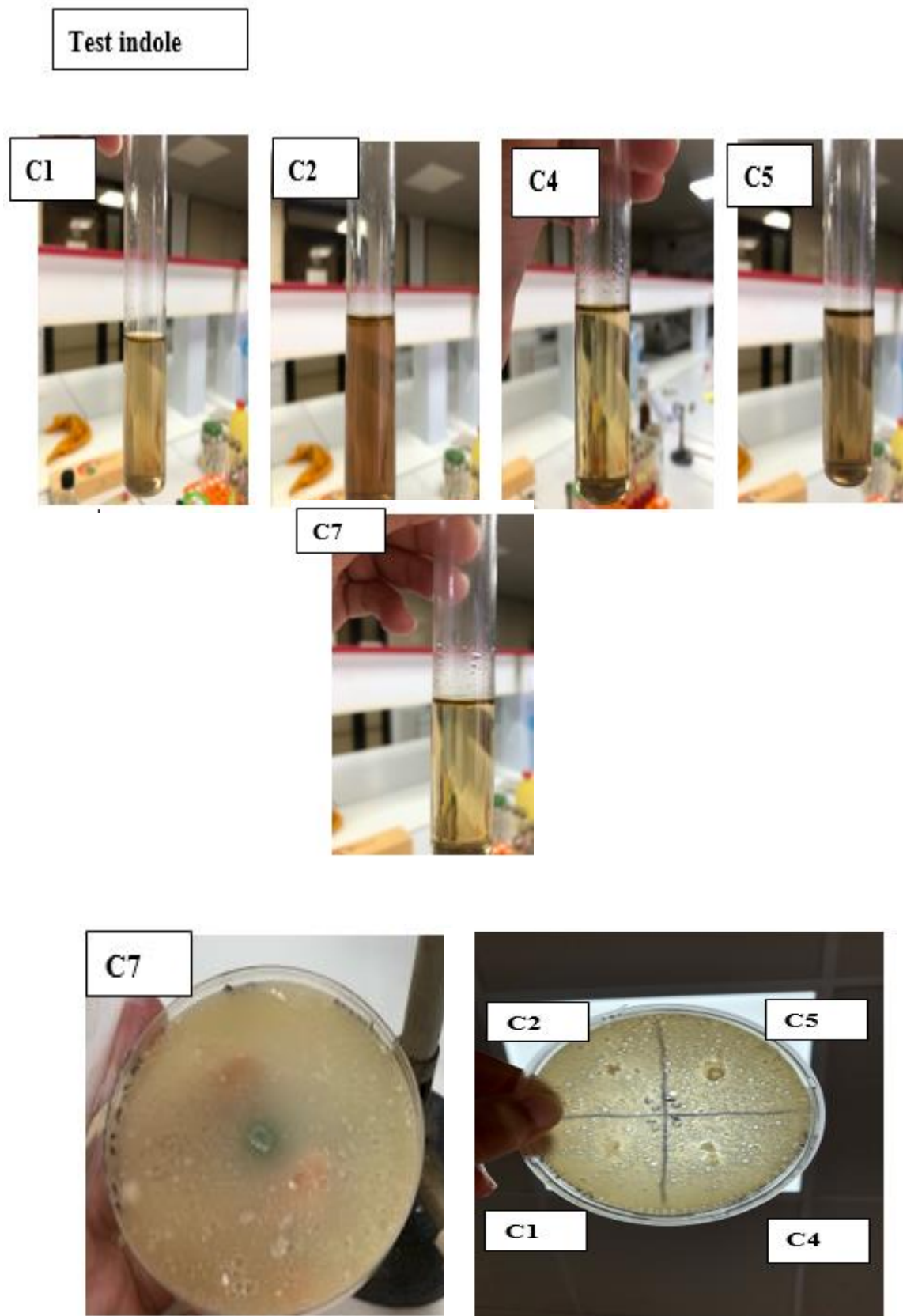


Figure 19 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Indole, Lécithinase

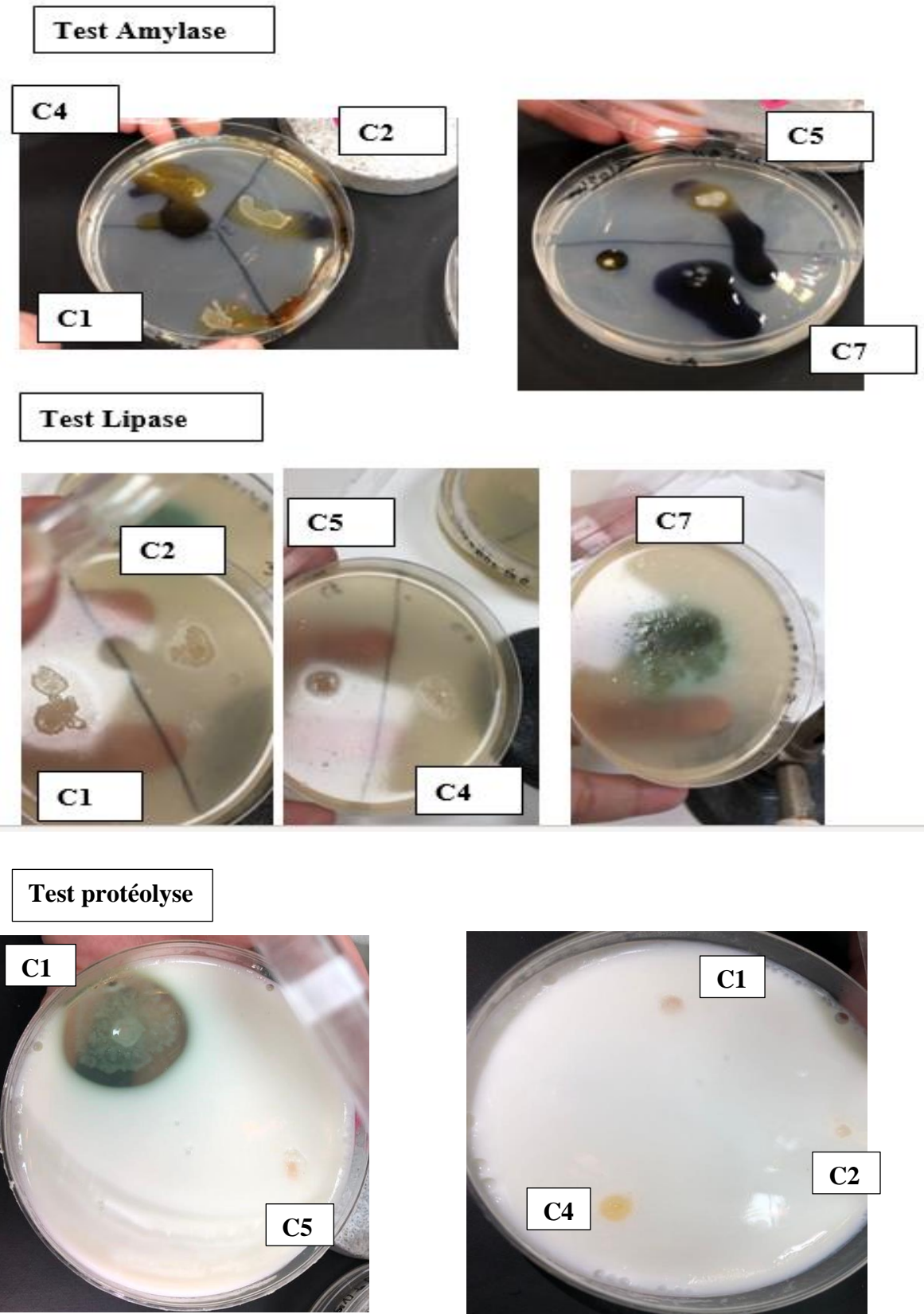


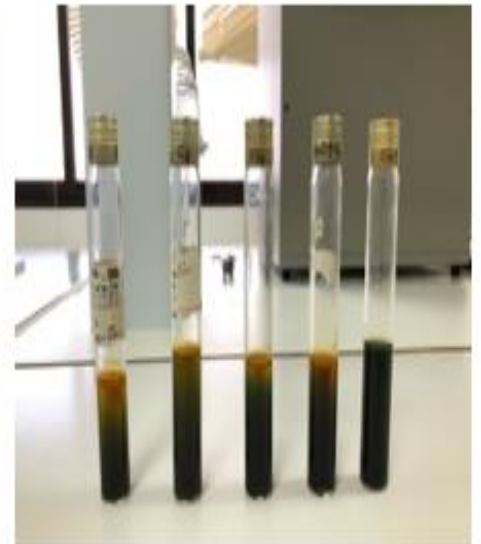
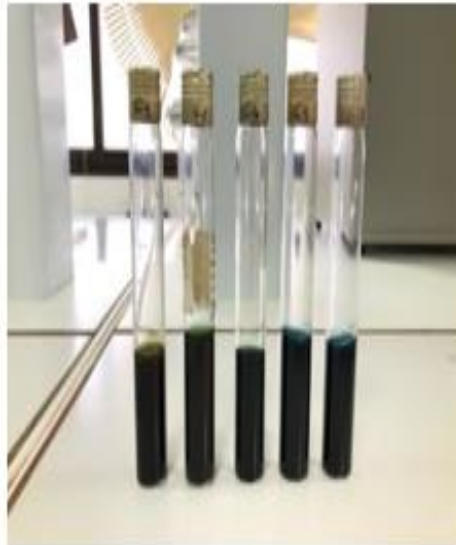
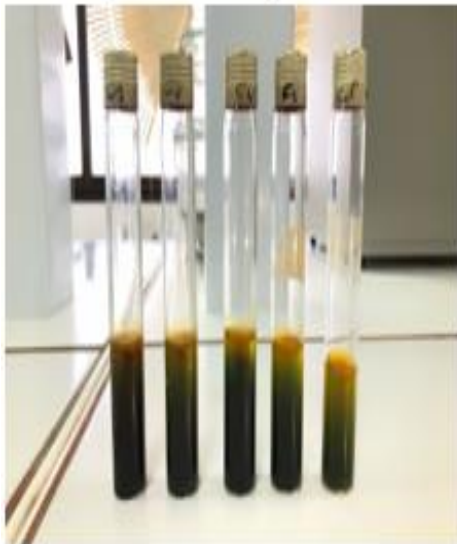
Figure 20 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Amylase, Lipase, Protéolyse

Test MEVAG

Fructose

Lactose

Maltose



Glucose

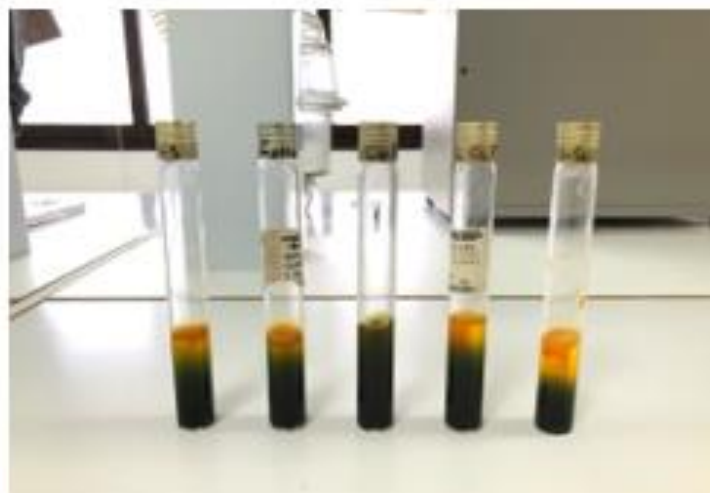


Figure 21 Résultats des tests biochimiques des 5 isolats sélectionnés pour la biodégradation : Test MEVAG

Discussion

Discussion

L'application continue de pesticides dans les champs agricoles à un effet négatif sur l'environnement. La bioremédiation à l'aide de microbes est une technologie émergente et un phénomène utile pour la dégradation des pesticides toxiques dans le sol.

Les conditions environnementales, le pH du sol, la gestion agricole et la quantité de pesticides ajoutés sont des facteurs importants pour l'utilisation bactérienne des composés xénobiotiques (tels que les pesticides) comme substrat de croissance.

La survie des souches inoculées est l'une des questions les plus difficiles car de nombreux microorganismes endogènes diminuent généralement après l'inoculation dans le milieu (**Bidja Abena et al., 2020**).

John et al. (2012) ont témoigné que la dégradation et l'utilisation des polluants comme les pesticides par les bactéries entraînent une augmentation de la densité optique des organismes vivants.

Les isolats C1, C2, C3, C5 et C7 ont montré une augmentation de la DO les 4 premiers jours d'incubation avec de faibles variances qui peuvent s'expliquer par la période d'adaptabilité des bactéries. Leur capacité de biodégradation se manifeste par la densité optique qui commence à augmenter dès les premiers jours, et ceci résulte de la production d'enzymes extracellulaires qui agissent sur un large éventail de composés organique (**Książek-Trela et Szpyrka, 2022**).

Lors de l'étude de la biodegradation des bactéries dans MSM additionné de pesticides à des concentrations croissantes (200mg/l, 500mg/l, 700mg /l), les isolats ont pu tolérer et dégrader les pesticides dès le deuxième jour d'incubation. Après le 4^{ème} jour, les valeurs de la DO ont marqué une stabilité (**Berman et al., 2017**).

Les altérations de la structure et de la diversité des populations microbiennes après exposition aux pesticides comme seule source de carbone peuvent résulter des effets toxiques des pesticides sur certaines communautés de microbes stressés.

Certains micro-organismes ont la capacité d'utiliser les pesticides comme nutriments et source d'énergie et peuvent bénéficier de l'exposition à ces pesticides, d'autres ont besoin d'une biostimulation comme l'ajout de nutriments ou d'une bio augmentation pour un meilleur rendement.

Les résultats microscopiques nous révèlent que les isolats sont de forme bacillaire, Gram négatif et pas de formation de spores. Selon **Denis et Ploy (2011)**, les bacilles à Gram négatif sont les plus rencontrés dans notre environnement.

Dans ce groupe figurent des familles bactériennes très variées sur le plan du type respiratoire. Nos isolats sont apparentés à la famille des enterobactéries et représentants les caractéristiques suivantes : forme bacillaire, à Gram négatif, catalase positive, aéro-anaérobie, fermentent le glucose, pousse sur milieu ordinaire (gélose GN). L'isolat C1, C2, et C4 se rapproche de l'espèce *Cronobacter universalis*, tandis que les isolats C5 et C7 peuvent être apparenté au genre serratia (**Brenner, 2005**). D'autres tests doivent être effectués pour compléter ces approches.

Pour conclure, l'application de pesticides biologiques est le meilleur moyen recommandé dans les programmes de lutte et qui pourrait améliorer sensiblement la qualité du sol, des plates et leur rendement, de l'environnement ainsi que la santé humaine.

Conclusion & perspectives

Conclusion

Cette étude met en évidence l'utilité émergente de la bioremédiation des pesticides toxiques à l'aide de bactéries isolées à partir d'un environnement naturel exposé à ces produits phytosanitaires. Malgré les bénéfices initialement attribués aux pesticides lors de leur développement, leur présence et leur accumulation demeurent préjudiciables pour l'environnement. Notre mémoire se concentre principalement sur l'évaluation du potentiel de biodégradation de ces bactéries dans un milieu minéral dépourvu de toute source de carbone et de nutriments.

Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en œuvre une méthodologie rigoureuse qui a permis de sélectionner les bactéries les plus prometteuses pour la biodégradation du pesticide étudié. À travers un processus de criblage minutieux et des observations macroscopiques et microscopiques détaillées, nous avons isolé des isolats présentant des caractéristiques propices à la biodégradation.

La survie des isolats après leur introduction dans un milieu contenant des concentrations croissantes de pesticides s'est avérée être un défi complexe, en raison de la tendance des microorganismes indigènes à diminuer. Néanmoins, les résultats obtenus ont démontré la capacité des bactéries à dégrader et à utiliser les polluants tels que les pesticides, dès le deuxième jour d'incubation ce qui s'est traduit par une augmentation de la densité optique des organismes vivants.

Par la suite, une étude biochimique a été réalisée afin de caractériser les isolats sélectionnés. Les résultats ont révélé une pré-identification prometteuse des bactéries, offrant ainsi des informations supplémentaires sur leur profil métabolique et leurs capacités de dégradation. Nos isolats sont apparentés à la famille des entérobactéries, l'isolat C1, C2, et C4 se rapproche de l'espèce *Cronobacter universalis*, tandis que les isolats C5 et C7 peuvent être apparentés au genre *Serratia*.

Tous ces résultats démontrent de manière concluante que le phénomène de la biodégradation est non seulement réalisable, mais également prometteur.

Perspectives

Les futures recherches sur la biodégradation des pesticides par les bactéries telluriques se concentreront sur plusieurs aspects clés. Tout d'abord, il sera important d'explorer de nouvelles souches bactériennes capables de dégrader efficacement un large éventail de pesticides. En identifiant et en étudiant ces nouvelles souches, nous pourrons développer des applications potentielles pour la décontamination des sols contaminés par des pesticides.

En outre, il sera crucial de comprendre en détail les mécanismes de dégradation spécifiques utilisés par ces bactéries. Cette connaissance approfondie nous permettra de développer des approches plus ciblées et efficaces pour la dégradation des différents types de pesticides.

L'optimisation des conditions environnementales sera également un domaine clé de recherche. En comprenant comment la température, le pH, la disponibilité des nutriments et la concentration des pesticides influencent la biodégradation, nous pourrons maximiser l'activité de dégradation des bactéries telluriques.

Parallèlement, l'utilisation de techniques de biotechnologie, telles que l'ingénierie génétique, pourrait permettre d'améliorer les capacités de biodégradation des bactéries telluriques. En manipulant génétiquement ces bactéries, il sera possible d'accroître l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des pesticides, rendant ainsi les bactéries plus efficaces dans la dégradation des contaminants.

Enfin, il sera essentiel de mener des études approfondies sur l'impact environnemental de la biodégradation des pesticides par les bactéries telluriques. En évaluant les produits de dégradation formés et leur stabilité dans l'environnement, nous pourrons mieux comprendre les conséquences de la biodégradation sur les écosystèmes et minimiser tout effet néfaste.

Ces recherches futures permettront d'améliorer notre compréhension de la biodégradation des pesticides par les bactéries telluriques et de développer des stratégies plus durables pour la dégradation des contaminants chimiques dans l'environnement.

Références

- Alessandro B., Stephen J. and Claudio S., 2022. The Soil Microbiota Recovery in the Agroecosystem: Minimal Information and a New Framework for Sustainable Agriculture, 1-9
- Alexander M, 1999, Biodegradation and Bioremediation, Gulf Professional Publishing, New York, 380p.
- Ammeri WR., Hidri Y., Hassen W., Mehdi I., Khlifi N., Hassen A., 2021, Surfactant efficiency on pentachlorophenol contaminated wastewater enhanced by pseudimonas putida AJ785569, 1-12p
- Arkoub F, 2012-Impacts des pesticides sur la santé des agriculteurs dans la wilaya de Bejaia, Mémoire de fin de cycle, Université de Abderrahmane Mira, Bejaia,45p.
- BACHÉ M., 2004. Agrumes : Comment les choisir et les cultiver facilement. *Ed INRA*, Paris .210p
- Barłóg P., Grzebisz W., Łukowiak R.,2022-Fertilizers and Fertilization Strategies Mitigating Soil Factors Constraining Efficiency of Nitrogen in Plant Production., *Plants*, 11, 1-35p
- Berman, T. T., Goen, T., Novack, L., Beacher, L., Grinshpan, L., Segev, D., & Tordjman, K. ,2017 . Corrigendum to Urinary concentrations of organophosphate and carbamate pesticides in residents of a vegetarian community. *Environment International*, 96, 34-40p
- Bidja Abena MT., Chen G., Chen Z, Zheng X., Li S., Li T. & Zhong W. (2020). Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil, diesel, and gasoline contaminated soil. *Biotechnology* 3, 10-42p
- Blanc L., 2021. Prix DEMETER, Quelles alternatives au glyphosate en agrumiculture corse. IRIS, France, 368p
- BLOGOWSKI A, 2022-PESTICIDES, *Encyclopædia Universalis*, 7p.
- Bonatterra A, Ruz L, Badosa E, Pinochet J, Montesinos E,2003. Growth Promotion of Prunus Rootstocks by Root Treatment with Specific Bacterial Strains. *Plant Soil*, 255, 555–569p

- Brenner D. J & Farmer J.J., (2005). Family I. Enterobacteriaceae. In.: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume Two the Proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria. Eds.: (Brenner D. J., Krieg N. R. et Staley J.T.), © Springer.
- Castellano-Hinojosa A., Boyd N., Strauss S., 2022-Impact des fumigants sur les micro-organismes non ciblés du sol : un bilan, *Journal des Matériaux Dangereux.*, 427, 1-10
- Chi-Chu L, 2010, Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 45(5), 348–359
- Cooper J, Dobson H, 2007-The benefits of pesticides to mankind and the environment, *ELSEVIER*, 26, 1-10p
- Dangi SR., Tirado-Corbala R., Cabrera JA., Wang D et Gerik J., 2015, Réponses biotiques et abiotiques du sol à la fumigation au goutte-à-goutte au disulfure de diméthyle dans les vignes établies, *Soil Science Society of America Journal*, 78, 520–530p
- Denis F. et Ploy M.C. (2011). Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies, Chapitre 34.1 Généralités. In. : *Bactériologie médicale*. © Elsevier Masson SAS.
- Díaz JMC., Delgado-moreno L., Nunez R., Nogales R., Romero E., 2016, Enhancing pesticide degradation using indigenous microorganisms isolated under high pesticide load in bioremediation systems with vermicomposts, *ELSEVIER*, 1-8p
- Fierer N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome, *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, 15 , 579–59
- Geetha M., Fulekar MH., 2008, Bioremediation of pesticides in surface soil treatment unit using microbial consortia, *Afr J Environ Sci Technol*, 2(2), 36–45
- Giovanni M. ; Franck C. ; Gianni N. ; François L. 2022-Les agrumes du nord de la méditerranée, *Alain Piazzola*, Italie, 180p.
- Hodgson E., Roe RM., Goh DKS., Rock GC., Rose RL, 1993, Insect cytochrome P-450: metabolism and resistance to insecticides, *Biochemical Society Transactions*, vol. 21, no. 4, 1060–1065p.

- Imfeld G, Vuilleumier S, 2012-Mesure les effets des pesticides sur les communautés bactérienne du sol, *Soil biology*, 49, 22-30p
- Index des produits phytosanitaires à usage agricole, Juillet 2015, 18p.
- Jackson-Smith D, 2010. DB Vers des systèmes agricoles durables au 21e siècle ; *National Academies Press* : New York, NY, États-Unis, 598p.
- Javaid MK., Ashiq M., Tahir M. 2016-Potential of biological agents in decontamination of agricultural soil, *Scientifica*, 1-9p.
- Jean-Marie P., 2008 -La culture des agrumes, Editions Artémis, France, 93p.
- John R.C., Essien J.P., Akpan S.B. & Okpokwasili G.C. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading Bacteria from Aviation Fuel Spill Site at Ibeno, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:1014–1019.
- Jouzel J., 2019. Dans Pesticides, Presses de Sciences Po, Paris, 262p
- Kafilzadeh F., Ebrahimnezhad M., Tahery Y., 2015, Isolation and identification of endosulfan degrading bacteria and evaluation of their bioremediation in Kor River Iran. *Osong Public Health Res Perspect*, 6(1), 39–46p
- Kaur R., Mavi GR., Raghav S., 2019-Pesticides Classification and its Impact on Environment, *Exellent Publishers*, N° 3, 8, 1-19p
- Kaurin A, Mihelic R, Kastelec D, Grčman H, Bru D, Philippot L, Suhadolc M (2018) Résilience des bactéries, des archées, des champignons et des guildes microbiennes à cycle N sous labourage et travail de conservation du sol, à la sécheresse agricole., *Soil Biol Biochem*, 120, 233–245p.
- Książek-Trela P., Szpyrka E. (2022): The effect of natural and biological pesticides on the degradation of synthetic pesticides. *Plant Protect. Sci.*, 58: 273–291.
- Kulcheski R, Correa R, Gomes I, Delima J, Margis R., 2015- MacronutrimentsNPK et homéostasie des microARN, *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-19
- Kumar M., Yadav NA., Saxena R., Paul D., Tomar RS., 2020, Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact, *ELSEVIER*, Volume 31, 1-42p

- Langerhoff A., Charles P., Alphenaar A., Zwiép G., Rijnaarts H., 2001-Intrinsic and stimulated in situ biodegradation of Hexachlorocyclohexane (HCH), 132–185p Los Angeles.
- Lourthuraj A., Hatsham MR., Hussein DS., 2022, Biocatalytic degradation of organophosphate pesticide from the wastewater and hydrolytic enzyme properties of consortium isolated from the pesticide contaminated water, *ELSEVIER*, 1-6p
- Lozano Vita J., Jaquet F., Thoyer S., 2018. Les motivations économiques et non économiques dans le choix de pratiques des viticulteurs. Une approche par la programmation mathématique de *Économie rurale* , 365, 1-20
- Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., et al., 2015. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chem. Cent. J. (BMC Chemistry, Springer Nat.)* volume 9, 14p
- Mahmood I., Imadi SR., Shazadi K., Gul A., Hakeem KR., 2016-Effects of pesticides on environment, *Plant Soil and Microbs*, 253-269p
- Mamta RJR., Khursheed AW., 2015, Bioremediation of pesticides under the influence of bacteria and fungi Chapter 3, *In: Handbook of Research on Uncovering New Methods for Ecosystem Management through Bioremediation*, pp 51–72
- Martin H, Johan S., 2022. Soil structure and microbiome functions in agroecosystems, 1-15p
- Matsumoto E., Kawanaka Y., Yun SJ., Oyaizu H., 2008, Isolation of dieldrin- and endrin-degrading bacteria using 1,2- epoxycyclohexane as a structural analog of both compounds, *Appl Microbiol Biotechnol*, 80(6),1095–1103
- Mazumdar T., Goswami C., Talukar NC., 2007. Characterization and screening of beneficial bacteria obtained on King's B agar from tea rhizosphere. *Indian, journal of Biotechnology*, Vol 6: 490-494.
- Monnier, G., Stengel, P., Guérif, J., 1982. Recherche de critères de la fertilité physique du sol et de son évolution en fonction du système de culture. *Evol. Niv. Fertil. Sols Dans Différents Systèmes Cult.* 35-52.
- Mustapha MU., Halimoon N., Wan Johar W., Abd Shukor M., 2019-Biodegradation of Carbamate Pesticides by Soil Bacteria, 27, 2, 19p

- Nihoeimbere V., 2011-Rhizosphere-driven lipopeptide production by different strains of *Bacillus* spp. as mechanism involved in biological control of plant pathogens, Thèse de doctorat, Université de Liège de Belgique, 151p
- Sharma JK, Gautam RK, Nanekar SV, Weber R, Singh BK, Singh SK, Juwarkar AA., 2018. *Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils, Environ Sci Pollut Res, 25,16355–16375*
- Singh BK, Walker A. 2006 Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (3): 428–471.
- Singh BK., Kuhad RC., Singh A., Lal R., Tripathi K. ; 1999-Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms, *Crit Rev Biotechnol* 19(3), 197–225p
- Sylvia DM, ; Fuhrmann JF, ; Hartel PG, ; Zuberer DA., 2005, Bioremediation of contaminated soils, *In : Education Principles and applications of soil microbiology*, ed. Prentice Hall PTR, New Jersey, 469-481
- Tortora G. J., Funke D. R., Case C. L., 2012.- Introduction à la microbiologie. 2^{ème} édition, Erpi Sciences, Paris, 624 p.
- Toukara LS., Sow MS., Beye C., Ly AF., Sambe M., Ndiae Y., Seck MA., 2017, Fortification des farines tropicales par l'introduction de protéines végétales comestibles, *Agronomie Africaine*, 1-9p
- Vincent B., 2020. Principes techniques et chiffres du drainage agricole. *De la tuyautique à l'hydro-diplomatie de Sciences Eaux & Territoires*, 32, 1-7
- Webber, H.J., Batchelor, L.D., 1943. The Citrus Industry, 2. Univ. Calif. Press, Berkeley, 431-459.
- Site Web consultée le 28/05/23 :
- https://www2.gnb.ca/content/gnb/fr/ministeres/10/agriculture/content/cultures/pommes_terre/gestion_sol.htm

Site Web consultée le 29/05/23 :

<https://www.terre-net.fr/2017/amp/article/124164/faut-il-encore-labourer>

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

<p>Gélose nutritive</p> <p>Peptone.....10 g</p> <p>Extrait de levure.....3 g</p> <p>Extrait de viande.....3 g</p> <p>Le chlorure de sodium.....5 g</p> <p>Agar.....18 g</p> <p>pH7,2</p>	<p>Bouillon nutritif</p> <p>Peptone.....10 g</p> <p>Extrait de levure.....3 g</p> <p>Extrait de viande.....3 g</p> <p>Le chlorure de sodium.....5 g</p> <p>pH7,2</p>
<p>King B solide</p> <p>Peptone de caséine20 g</p> <p>Sulfate de magnésium1,5 g</p> <p>Phosphate bi-potassique.....1,5 g</p> <p>Glycérol10 ml</p> <p>Agar20 g</p> <p>pH7,2</p>	<p>King A solide</p> <p>Peptone de caséine20 g</p> <p>Sulfate de potassium...10 g</p> <p>Chlorure de magnésium.....1,5 g</p> <p>Glycérol10 ml (1%)</p> <p>Agar20 g</p> <p>pH :.....7,2</p>
<p>Mannitol- Mobilité</p> <p>Peptone..... 20 g</p> <p>Nitrate de potassium1 g</p> <p>Mannitol2 g</p> <p>Rouge de phénol0,04 g</p> <p>pH8,1</p>	<p>Milieu Clark et Lubs</p> <p>Peptone tryptique de viande5 g</p> <p>Glucose6 g</p> <p>Phosphate bipotassique5 g</p> <p>pH7</p>
<p>Milieu urée Indole</p> <p>Tryptone.....10 g</p> <p>NaCl.....5 g</p>	<p>Bouillon Nitraté</p> <p>Bouillon Nutritif.....1 L</p> <p>Nitrate de potassium.....10 g</p>

Milieu Hugh et Leifson	Milieu à base d'amidon
Extrait de levure.....1 g	Gélose nutritive.....100 ml
Peptone pancréatique de caséine...2 g	Amidon.....1 g
NaCl.....1 g	
K_2HPO_40,3 g	
Agar.....3 g	
Bleu de bromothymol.....15 ml	
pH7	

Gélose TSI	Le milieu Mineral Salt Medium (MSM)
Extrait de viande de bœuf3 g	Solide
Extrait de levure3 g	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 10,74 g
Peptone tryptique20 g	NH_4Cl1 g
Chlorure de Sodium5 g	KH_2PO_42,6 g
Citrate ferrique0,3 g	$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$0,4 g
Thiosulfate de sodium0,3 g	K_2HPO_40,2 g
Lactose10 g	Agar.....36 g
Glucose1 g	
Saccharose10 g	
Rouge de phénol0,05 g	
Agar18 g	
pH7,4	

<p>Milieu Viande-Foie (semi solide)</p> <p>Base viande foie.....30 g</p> <p>Glucose.....2 g</p> <p>Agar.....6 g</p>	<p>Milieu Estérase</p> <p>Gélose nutritive.....1 g</p> <p>Ca Cl₂.....0,1 g</p> <p>Tween 80.....10 ml</p>
<p>Milieu à base de jaune d'œuf</p> <p>Gélose nutritive.....1 L</p> <p>Nacl (0,9 %).....100ml</p> <p>Jaune d'œuf.....50ml</p>	<p>Milieu à base de l'huile d'olive et gomme d'arabique</p> <p>Gélose nutritive.....100ml</p> <p>Gomme d'arabique.....10 g</p> <p>L'huile d'olive.....5 ml</p>
<p>Gélose blanche</p> <p>Agar.....20 g</p> <p>Eau distillée.....100 ml</p>	<p>Milieu à base de lait écrémé UHT</p> <p>Gélose blanche.....20 ml</p> <p>Lait écrémé UHT.....100 ml</p>

Annexe 2 : Les colorants

<p>Fuschine de ziehl</p> <p>Fuchsine.....0.2g</p> <p>Alcool éthylique à 90°10g</p> <p>Phénol.....5g</p> <p>Eau distillée.....100 ml</p>	<p>Violet de gentiane</p> <p>Violet de gentiane1g</p> <p>Ethanol à 90°10g</p> <p>Phénol.....2g</p> <p>Eau distillée.....100 ml</p>
<p>Lugol</p> <p>Iode.....1g</p> <p>Iodure de potassium10g</p> <p>Eau distillée50 ml</p>	

Annexe 3 : Les réactifs

<p>NIT 1 (5 ml)</p> <p>Acide sulfanilique.....0,4 g</p> <p>Acide acétique.....30 g</p> <p>H₂O.....70 ml</p>	<p>NIT 2 (5 ml)</p> <p>N,N-diméthyl-1-naphtylamine...0,6 g</p> <p>Acide acétique.....30 g</p> <p>H₂O.....70 ml</p>
<p>Kovax</p> <p>4-(diméthylamino)benzaldehyde.....50 g/L</p> <p>hydrochloric acid.....240 g/L</p> <p>isoamyl alcohol.....710 g/L</p>	

Annexe 3 : fiches techniques des pesticides utilisés

Nom commercial		Matière active	Déprédateur	Culture	Dose
LAMDOC 50 EC		LAMBDA- CYHALOTHRIN E 50 G/L	Cératite	Agrumes	25 ml/hl
BACTIMEC		ABAMECTINE 18 G/L	Mineuse	Agrumes	50 ml/hl
FUCUS ULTRA		CYCLOXYDI M 100 G/L	Graminées bisannuelles et vivaces	Pomme de terre/cultures maraichères/lég umineuses/arbo ricultures fruitière	2-4 L/HA

			Graminées annuelles	Pomme de terre/cultures maraichères/légumineuses/arboricultures fruitière	1-1,5 L/HA
RUSTILAN		ACERAMIPRIDE 20%	Aleurodes/ Mineuses	Cultures Maraichères Arbres fruitiers/Agrumes	200-300 g/Ha
			Pucerons	Cultures Maraichères Arbres fruitiers/Agrumes	100-125 g/Ha
MUSTANG 360 SE		FLORASULA M+2,4 D 6,25 G/L+300 G/L	ADVENTICES DICOTYL- DONES	Blé	0,6 L/Ha
DECAFATE		SULFATE DE CUIVRE+ CYMOXANIL 20% + 1,6%	Milidiou/alternaria	Tomate Vigne	750 g/Ha

Annexe 4 : les tableaux de la mesure de la densité optique des isolats dans les concentrations des pesticides ; 200 mg/l, 500 mg/l, 700 mg/l

➤ **Concentration 200 mg/l**

C1	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,047	0,049	0,109	0,299	0,270	0,376	0,490	0,547	0,626
BACTIMEC	0,046	0,174	0,288	0,414	0,580	0,814	1,008	0,814	0,572
FOCUS-ULTRA	0,111	0,189	0,361	0,504	0,700	1,110	0,602	0,272	0,189
DECFATE	0,038	0,059	0,121	0,183	0,448	0,572	0,600	0,647	0,353
MUSTANG	0,173	0,346	0,691	0,743	0,679	0,346	0,173	0,057	
RUSTILANE	0,255	0,305	0,403	0,326	0,301	0,287	0,106	0,040	

C2	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,290	0,294	0,449	0,684	0,606	0,304	0,176	0,094	0,004
BACTIMEC	0,029	0,063	0,125	0,244	0,554	0,754	1,230	0,628	0,540
FOCUS-ULTRA	1,167	0,712	0,597	0,559	0,563	0,246	0,223	0,167	0,112
DECFATE	0,232	0,486	0,520	0,541	0,581	0,214	0,097	0,033	
MUSTANG	0,212	0,371	0,407	0,542	0,210	0,040	0,023	0,009	
RUSTILANE	0,006	0,049	0,082	0,104	0,299	0,417	0,229	0,201	0,118

C4	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,711	0,457	0,402	0,328	0,231	0,174	0,168	0,113	0,067
BACTIMEC	1,086	1,049	0,952	0,774	0,700	0,463	0,417	0,164	0,119
FOCUS-ULTRA	2,500	1,708	0,820	0,398	0,317	0,050	0,041	0,008	
DECFATE	0,380	0,501	0,699	0,750	0,541	0,371	0,372	0,231	
MUSTANG	0,900	0,763	0,596	0,546	0,437	0,553	0,277	0,215	0,144
RUSTILANE	0,660	0,555	0,471	0,405	0,295	0,207	0,118	0,075	0,074

C5	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	1,030	0,802	0,474	0,311	0,268	0,189	0,118	0,096	
BACTIMEC	0,143	0,259	0,411	0,748	0,800	0,942	0,956	1,352	1,045
FOCUS-ULTRA	0,225	0,378	0,650	0,830	1,157	0,708	0,585	0,302	0,110
DECFATE	0,511	0,620	0,764	1,057	0,717	0,511	0,112	0,089	0,065
MUSTANG	0,535	0,649	0,828	0,773	0,547	0,305	0,235	0,154	0,078
RUSTILANE	1,065	0,553	0,378	0,335	0,298	0,246	0,163	0,197	0,109

C7	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,198	0,271	0,200	0,244	0,305	0,350	0,448	0,570	0,451
BACTIMEC	0,132	0,229	0,428	0,450	0,574	1,208	0,755	0,634	0,494
FOCUS-ULTRA	0,224	0,317	0,444	0,661	0,539	0,512	0,317	0,169	
DECFATE	0,530	0,647	0,718	0,811	0,422	0,355	0,246	0,237	0,193
MUSTANG	0,198	0,207	0,426	0,565	0,745	0,724	0,598	0,282	0,109
RUSTILANE	0,218	0,234	0,375	0,467	0,537	0,204	0,130	0,054	

➤ Concentration 500 mg/l

C1	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,120	0,213	0,305	0,444	0,734	0,481	0,231	0,101	0,034
BACTIMEC	0,180	0,104	0,193	0,294	0,282	0,249	0,478	0,452	0,347
FOCUS-ULTRA	0,566	0,600	0,637	0,741	0,861	0,888	0,992	1,351	1,327
DECFATE	0,122	0,102	0,174	0,205	0,259	0,185	0,119	0,009	
MUSTANG	0,144	0,194	0,211	0,238	0,282	0,194	0,154	0,095	
RUSTILANE	0,327	0,357	0,205	0,255	0,325	0,453	0,329	0,306	0,226

C2	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,500	0,452	0,537	0,746	0,665	0,580	0,337	0,120	0,174
BACTIMEC	0,481	0,553	0,774	0,660	0,518	0,314	0,196	0,081	
FOCUS-ULTRA	0,123	0,321	0,214	0,258	0,500	0,560	0,461	0,154	0,100
DECFATE	0,356	0,602	1,084	1,897	1,273	0,652	0,358	0,273	0,210
MUSTANG	0,016	0,171	0,211	0,249	0,236	0,396	0,323	0,214	0,190
RUSTILANE	0,130	0,276	0,126	0,131	0,181	0,264	0,346	0,177	0,096

C4	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,250	0,300	0,546	0,607	0,850	0,865	1,048	0,903	0,813
BACTIMEC	0,670	0,717	0,848	1,252	0,845	0,582	0,865	0,868	0,593
FOCUS-ULTRA	0,459	0,534	0,625	0,777	1,108	0,720	0,685	0,567	0,376
DECFATE	0,299	0,240	0,168	0,254	0,331	0,243	0,164	0,156	0,091
MUSTANG	0,109	0,283	0,313	0,223	0,331	0,424	0,404		
RUSTILANE	0,877	0,435	0,413	0,321	0,257	0,142	0,125	0,025	

C5	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,156	0,200	0,503	0,624	0,898	1,103	1,172	0,900	0,848
BACTIMEC	0,148	0,333	0,424	0,533	0,753	0,895	0,968	0,848	0,890
FOCUS-ULTRA	0,256	0,373	0,432	0,697	0,876	1,921	0,996	0,842	0,616
DECFATE	0,198	0,384	0,503	0,723	0,852	1,233	1,494	1,442	1,380
MUSTANG	0,046	0,055	0,093	0,119	0,121	0,126	0,117	0,105	
RUSTILANE	0,278	0,397	0,255	0,258	0,144	0,151	0,277	0,351	0,317

C7	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	t_7	t_8	t_9
LAMDOC	0,198	0,271	0,200	0,244	0,305	0,350	0,448	0,570	0,451
BACTIMEC	0,132	0,229	0,428	0,450	0,574	1,208	0,755	0,634	0,494
FOCUS-ULTRA	0,224	0,317	0,444	0,661	0,539	0,512	0,317	0,169	
DECFATE	0,530	0,647	0,718	0,811	0,422	0,355	0,246	0,237	0,193
MUSTANG	0,198	0,207	0,426	0,565	0,745	0,724	0,598	0,282	0,109
RUSTILANE	0,218	0,234	0,375	0,467	0,537	0,204	0,130	0,054	

➤ Concentration 700 mg/l

C1	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
LAMDOC	0,523	1,660	0,875	1,426	1,148	0,540
BACTIMEC	0,070	0,055	0,010	0,012	0,016	
FOCUS-ULTRA	0,057	0,096	0,138	0,203	0,221	0,245
DECAFATE	0,050	0,086	0,105	0,064	0,053	
MUSTANG	0,043	0,033	0,026	0,024		
RUSTILAN	0,429	0,767	0,858	1,184	1,090	0,934

C2	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
LAMDOC	0,036	0,121	0,165	0,355	0,349	0,418
BACTIMEC	0,088	0,061	0,043	0,033	0,027	
FOCUS-ULTRA	0,042	0,088	0,110	0,223	0,203	0,178
DECAFATE	0,074	0,096	0,170	0,084		
MUSTANG	0,016	0,010	0,002	0,005		
RUSTILAN	0,386	0,355	0,491	0,299	0,209	

C4	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
LAMDOC	0,127	0,280	0,471	0,325	0,323	0,320
BACTIMEC	0,009	0,043	0,057	0,092	0,147	/
FOCUS-ULTRA	0,260	0,295	0,345	0,289	0,180	0,071
DECAFATE	0,046	0,092	0,180	0,116	0,076	/
MUSTANG	0,189	0,245	0,161	0,112	/	/
RUSTILAN	0,506	0,370	0,266	0,247	0,117	0,092

C5	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
LAMDOC	0,436	0,589	0,641	0,570	0,525	0,331
BACTIMEC	0,398	0,731	1,156	1,336	0,894	0,789
FOCUS-ULTRA	0,108	0,268	0,326	0,457	0,632	0,532
DECAFATE	0,406	0,318	0,268	0,255	0,121	/
MUSTANG	0,245	0,194	0,277	0,367	/	/
RUSTILAN	1,143	1,131	1,070	0,869	0,808	0,563

C7	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
LAMDOC	0,176	0,149	0,128	0,120		
BACTIMEC	0,068	0,075	0,080	0,090	0,136	0,188
FOCUS-ULTRA	0,290	0,194	0,323	0,409	0,259	0,132
DECAFATE	0,051	0,082	0,115	0,124	0,136	
MUSTANG	0,057	0,076	0,126	0,102		
RUSTILAN	0,401	0,458	0,595	0,543	0,457	