



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

Intitulé :

**Isolement et caractérisation des microorganismes résistants
au fongicide procure (72% propamocarb) et capables de
l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie**

Présenté et soutenu par : *MAROUK Sara*

Le : 01/07/2018

BOUHIDEL Sara

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : *RIAH Nassira* (Maitre de conférence - UFM Constantine).

Rapporteur : *ZERMANE Ferial* (Maitre assistante A - UFM Constantine).

Examinatrice : *MERGOUD Lilia* (Maitre assistante A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Ce travail a été réalisé, au Laboratoire du Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri-Constantine».

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mme : Zermene. F maitre assistante à l'université frères Mentouri, pour l'orientation, la confiance, la patience, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions

Riah. N Maitre de conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine, merci de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de Soutenance.

Nous remercions également Mergoud. S maitre assistante à l'université Mentouri de Constantine d'avoir accepté d'examiner ce travail et faire partie du jury.

Merci à Fergani. M ingénieure principale de laboratoire et pour tout les ingénieurs des laboratoires pédagogiques de microbiologie , pour l'aide, patience et générosité merci à tous ceux qui Ont participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour :

Mes chers parent : Salah et Khaoula

Aucun dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

*Je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

À mon cher frère et mes chères sœurs que j'aime profondément

Foued et sa fiancée Ahlem.

Wafâ et son mari Hichem.

Abir et son mari Nassim.

À ma petite princesse Tesnim.

Et le petit prince Syad.

Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A mon agréable binôme Sara.

Et bien sure mes chères copines et mes proches Rayene, Amira, Manel, Mouna, Halla, Aicha, Rayhana, Manel et Rayene.

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Marouk Sara

Dédicace

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour :

*Ames très chers Parents : Nadir et Selma que j'aime le plus au monde,
Pour leur amour, Sacrifices, aide et soutien, qui m'ont toujours Encouragé
Tout au long de mes études*

*Que dieu les gardes et les protègent, et leurs souhaitant une longue vie pleine
de santé et de bonheur*

A mes chères frères, Oussama et Ahmed Racine

*Aux membres de ma grande famille : mes chères grands parents, oncles,
tantes, cousins, cousines et surtout ma tante Nadjiba pour sa soutien
affectif et morale*

A mon agréable binôme Sara

*A mes chères copines : Cherifa, Manel, Amira, Rayhana, Hella,
Mouna, Manel*

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que
nous avons passés ensemble.*

Bouhidel Sara

TABLE DE MATIERES

Liste des tableaux et figures

Introduction1

Revue bibliographique

I. La pollution :.....	3
1. Définition	3
2. Les formes de pollution :.....	3
II. Pollution par les pesticides	4
1. Définition.....	4
2. Classification des pesticides.....	4
3. Les avantages et les inconvénients des pesticides	4
3.1. Les atouts	4
3.2. Les risques sur l'environnement	5
3.3. Les risques sur la sante :.....	5
4. Comportement et devenir des pesticides dans le sol.....	7
5. Processus de dégradation des pesticides	7
5.1. La dégradation abiotique	8
5.2. La biodégradation :.....	9
5.2.1. Microorganismes impliqués dans la dégradation des pesticides	9
6. Le Co-métabolisme.....	10
7. La persistance	10
III. Les fongicides.....	10
1. Définition	10
2. Classification des fongicides :.....	11
IV. Les carbamates	14
1. Définition :	14

2. Structure chimique des carbamates.....	14
3. Propriétés physicochimiques des carbamates.....	15
4. Le mode d'action des carbamates	15
V. Propamocarb.....	16
1. Définition	16
2. les conséquences	17
VI. Des fongicide à base de propamocarb	17
1. PROCURE	17
2. PROPLANT	17
3. Les maladies traitées par le fongicide procure :	18
Matériel et méthodes	
1. Traitement du sol	20
2. Echantillonnage	20
3. Milieux et réactifs	20
4. Isolement de microorganismes dégradants le fongicide procure.....	21
4.1. Enrichissement	21
4.2. Sélection des souches dégradantes de procure.....	21
5. Purification de quelques souches d'actinomycètes	21
6. Test de la tolérance des bactéries isolées et des souches d'actinomycètes purifiées vis-à-vis du fongicide procure:.....	22
7. Mise en évidence de la biodégradation de fongicide procure par les souches d'actinomycètes	22
8. Identification des bactéries capables d'utiliser le fongicide procure comme SSCE	22
8.1. Examen macroscopique	23
8.2. Examen microscopique	23
8.2.1. Examen à l'état frais	23
8.2.2. L'examen après coloration de Gram.....	23

8.2.3. La technique des lamelles	24
8.3. Les testes biochimiques	25
8.3.1. La recherche de l'oxydase	25
8.3.2. La recherche du catalase	25
8.3.3. La recherche de la mobilité	25
8.3.4. Utilisation du citrate de Simmons comme source de carbone	26
8.3.5 Utilisation du Glucose, Lactose et saccharose et la production de l'H ₂ S.....	26
9. Conservation des souches.....	26

Résultats et discussion

I. Recherche de microorganismes dégradant le fongicide procure	27
1. Isolement des microorganismes capables d'utiliser le fongicide Procure comme SSCE	27
2. Purification de souches d'actinomycètes	27
3. Sélection des souches résistantes au fongicide	
Procure à différentes concentrations	27
4. Mise en évidence de la dégradation du fongicide Procure par les souches d'actinomycètes.....	30
II. Identification présumptive des souches actives	33
1. Identification des bactéries.....	33
1.1. Aspect macroscopique	33
1.2. Observation microscopique	35
1.3. Caractérisation biochimique	36
2. Identification des actinomycètes	39
2.2.1. Observation macroscopique des actinomycètes.....	39
2.2. Observation microscopique des actinomycètes	41
Conclusion	
Conclusion.....	42

Références44

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification des fongicides selon le mode d'action.

Tableau 02 : Classification des fongicides selon le contact.

Tableau 3 : propriétés physico-chimique du Propamocarb.

Tableau 4 : variation de la densité optique des souches A1, A6, A12 au cours des 10 jours d'incubation sur milieu ISP9 additionnées par le fongicide Procure.

Tableau 5 : Aspect macroscopique des souches bactériennes isolées.

Tableau 6 : Aspect microscopique des souches bactériennes isolées.

Tableau 7 : résultats de la coloration de gram des souches bactériennes isolées.

Tableau 8 : caractères biochimiques des bacteries isolées.

Tableau 9 : les caractères macroscopiques des actinomycètes purifiés.

Listes des figures

Figure 01 : Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols.

Figure 02 : Formule chimique des carbamates.

Figure 03 : Le fongicide procure.

Figure 04 : Technique des lamelles sur milieu ISP2.

Figure 05 : souche A1, DR de Procure.

Figure 06 : souche A1, DR×2 de Procure.

Figure 07 : souche A1, DR×5de Procure.

Figure 08 : souche A1, DR ×10 DC de Procure.

Figure 09 : souche A12, DR×10 de Procure.

Figure 10 : souche A6, DR×10 DE Procure.

Figure 11 : variation de la densité optique de la souche A1 au cours du temps en présence du fongicide Procure comme SSCE.

Figure 12 : variation de la densité optique de la souche A6 au cours du temps en présence du fongicide Procure comme SSCE.

Figure 13: variation de la densité optique de la souche A12 cours du temps en présence du fongicide Procure comme SSCE.

Figure 14 : souche X6 isolée sur GN.

Figure 15 : souche X2 isolée sur GN.

Figure 16 : Aspect microscopique des souches bactériennes isolées après la coloration de gram (G×100).

Figure17: souche2 sur mannitol mobilité.

Figure 18 : souche 6 sur mannitol mobilité.

Figure 19: souche 2 sur citrate de Simmons.

Figure 20 : souche 6 sur citrate de Simmons.

Figure 21 : souche 2 sur TSI.

Figure 22 : souche 6 sur TSI.

Figure 23 : souche A1 sur ISP2.

Figure 24 : souche A6 sur ISP 2.

Figure 25 : souche A12sur ISP2.

Figure 26 : A1 mycélium aérienne.

Figure 27 : A1 mycélium de substrat.

Liste des abréviations

DDT : Dichloro Diphényl Trichloroéthane

DR : La Dose Recommandée

FAO : Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.

GN : Gélose Nutritive.

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ISP : International *Streptomyces* Project.

MSM : Minimal Salt Medium.

SSCE : Seule Source de Carbone et d'Energie.

TSI : Triple Sugar Iron Bio- Rad.

Introduction

Introduction

Le marché des produits phytosanitaires a connu un réel essor dans les années 1940 avec l'apparition de molécules synthétiques, dont le fameux DDT. L'émergence des pesticides a produit une révolution économique majeure dans le monde de l'agriculture : amélioration des quantités et des qualités de produits agricoles. L'apparition de ces produits phytosanitaires a été considérée comme une étape clé vers l'éradication de la famine.

Selon le **rapport de l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique 2015**, Qui a annoncé que la productivité a atteint un niveau plus avancé par rapport aux années précédentes. Malgré ces avantages, on ne peut pas ignorer les effets néfastes des pesticides sur la santé et sur l'environnement.

La problématique de l'utilisation des pesticides prenait une dimension internationale suite à la publication du livre « **Le printemps silencieux** » de **Rachel Carson**, La biologiste américaine mettait en garde sur l'usage de certaines molécules (dont le DDT), en encourageant une utilisation prudente et responsable, qui tiendrait compte de l'impact des produits chimiques sur l'ensemble d'un écosystème (**Pflieger, 2009**).

En raison du potentiel écotoxique des pesticides, il est nécessaire de connaître leur devenir environnemental, la majorité des travaux portent sur leurs dispersions, leurs dégradations dans les sols et dans les eaux. La recherche des moyens de dégradation de ces produits est devenue un acte sérieux.

Le développement des systèmes de traitement des déchets phytosanitaires représente un intérêt croissant, L'enjeu est majeur, il s'agit d'éviter la pollution de l'environnement par les pesticides d'une part et de protéger la santé publique d'une autre part.

Parmi les moyens de dépollution, celles qui utilisent les techniques physico-chimiques, sont considérées très coûteuses et nécessitent des moyens généralement lourds. On assiste ces dernières années à l'émergence des techniques biologiques qui sont beaucoup moins onéreuses et très efficaces (**Loqman, 2009**). Ces procédés font appel aux microorganismes capables de biodégrader ces polluants.

Le but essentiel de notre travail est la recherche et l'isolement de microorganismes, Qui tolèrent et utilisent le fongicide procure (722g/l de Promamocarb) comme seule source de carbone et d'énergie. Ce pesticide qui appartient à la famille des carbamates, est largement utilisé en Algérie et très peu étudié.

Introduction

La partie bibliographique, comporte des informations sur les pesticides notamment le fongicide Propamocarb.

La partie matériel et méthodes est basée sur trois étapes :

- L'isolement et la recherche des microorganismes capables de tolérer de fortes concentrations du fongicide procure.
- Mettre en évidence la capacité des isolats, à utiliser le fongicide Propamocarb comme seule source de carbone et d'énergie.
- l'identification présomptive des souches actives.

*Revue
bibliographique*

I. La pollution

1. Définition

La pollution peut être définie comme :

L'introduction des substances ou d'énergie dans l'environnement par l'homme qui cause des risques à la santé, aux ressources biologiques et aux systèmes écologiques (**Ray et Harrison, 2001**).

2. Les formes de pollution :

2.1. Pollution du sol :

Accumulation notable des éléments minéraux, organiques ou pathogènes en quantité telle que leur présence peut revêtir un danger pour les organismes vivants ou compromettre une ou plusieurs grandes fonctions au sol et l'usage qui fait habituellement à ce milieu (**Mathieu et Lozet, 2011**).

2.2. Pollution de l'eau :

La pollution de l'eau est une dégradation qualitative ; signifie une perte de pureté par contamination, résulte d'un événement ou d'un processus qui réduit l'utilité de l'eau (**Stellman, 2002**).

Les polluants chimiques et/ou leur produits de transformation qui sont potentiellement susceptible d'une photolyse directe, comprennent des polluants transportés vers l'eau de surface par décharge ponctuelle directe ou par ruissellement provenant des zones urbaines ou rurales (**oecd, 2008**).

2.3. Pollution de l'air

De nombreuses recherches montrent que l'air véhicule des substances polluantes produites par l'homme. La pollution de l'air diminue sa qualité change de petit à petit l'atmosphère et le climat (**Atelier Sorcier asbl, 2008**).

II. Pollution par les pesticides

1. Définition

Le terme pesticide est la contraction de l'anglais Pest : représente un animal ; plante ou insecte nuisible ; et le suffixe cide provenant du latin caedere signifiant : tuer.

Selon **la directive du conseil européen (1991)**, un pesticide est une préparation contient un ou plusieurs substances actives protéger les végétaux contre tous les organismes nuisibles.

Selon **l'édition du conseil de l'Europe, 1992** cet agent chimique ou biologique peut être appliqué sur les cultures soit avant soit après la récolte pour protéger le produit contre la détérioration durant l'entreposage et le transport.

2. Classification des pesticides

Les pesticide sont classés selon plusieurs critères : leur utilisation ; les caractéristique chimique et selon le microorganisme visé.

- **Les fongicides** : des produits anticryptogamique, sont destinés à lutter contre les champignons parasites.
- **Les Herbicides** : désherbage contre les plantes parasites.
- **Les Insecticides** : destruction des insectes nuisibles.

3. Les avantages et les inconvénients des pesticides

3.1. Les atouts

- Protéger les cultures contre les organismes nuisibles : dans la nature de nombreuses agressions peuvent faire obstacle au bon développement des plantes : insectes ravageur maladies (champignons, bactéries, virus), mauvaises herbes...etc. Les produits phytosanitaires ont pour rôle de protéger la production agricole contre ces menaces ils englobent différentes familles de produits.
- Assurer des récoltes régulières : les pesticides protègent les récoltes contre les maladies provoquées par champignons les insectes et les mauvaises herbes, ces agressions

susceptibles de survenir à chaque étape de la culture nuisent à la production et à la qualité des récoltes.

- Maintenir la qualité des aliments : l'utilisation de produits phytopharmaceutiques contribue à récolter des produits sains bons et appétissants qui évitent certaines allergies ou intoxications à l'homme par exemple : le développement de datura (mauvaise herbe) dans les cultures légumières peut conduire à la présence de graines toxiques.

3.2. Les risques sur l'environnement

L'impact sur l'environnement est pris en compte avant la mise sur le marché de pesticides.

- Risque de pollution de l'eau : l'eau est précieuse au quotidien, qu'il s'agisse de boire, se laver ou se baigner, l'amélioration de la qualité des eaux est donc un enjeu majeur, il faut limiter au maximum la probabilité de retrouver des traces de pesticides dans les nappes phréatiques ou les eaux superficielles.
- Risque de pollution de l'air : lorsqu'un pesticide est pulvérisé pour protéger une culture, une part du produit peut se volatiliser, ainsi des produits phytopharmaceutiques sont parfois détectés dans l'air à des concentrations excessivement faibles, de l'ordre du nano gramme (soit un milliardième de gramme) par mètre cube.
- Risque de pollution de sol : les pesticides sont utilisés pour protéger les cultures, ils agissent parfois au niveau des racines ou bien ils sont utilisés pour assainir les sols, ils rentrent donc en contact avec ce compartiment, il faut donc prévoir leur comportement c'est-à-dire la manière dont ils se dispersent et se décomposent pour ne pas mettre en danger la faune ou les ressources en eau (FAO, 2005).

3.3. Les risques sur la santé :

Depuis les années 1980 l'implication de l'exposition professionnelle aux pesticides dans la survenue de plusieurs pathologies, comme le cancer les maladies neurologiques et des troubles de reproduction. Il est évoquée par des enquêtes épidémiologiques, qui ont attiré l'attention sur les effets éventuels d'une exposition même à faible intensité, au cours de période sensibles du développement (fœtus et pendant l'enfance).

Revue bibliographique

Des études scientifiques de personnes exposées à des pesticides comme les agriculteurs et les applicateurs de pesticides ont trouvé des taux élevés de cancers du sang et du système lymphatique, les cancers de la lèvre, de l'estomac, du poumon, du cerveau, de la prostate et du mélanome et d'autres cancers de la peau. Selon l'institut national de cancer les pesticides tel que le DDT qui est interdit par la loi mais qui était autrefois utilisé dans l'agriculture, ce produit se dégrade lentement et entraîne une accumulation dans la chaîne alimentaire et des résidus persistants dans la graisse corporelle (**Denis, 2007**).

- La plupart des effets chroniques ou retardés des pesticides vont apparaître à la suite d'expositions d'intensités plus faibles, mais répétées et se caractérisent par des troubles neurophysiques et comportementaux ou par des atteintes du système nerveux central à l'origine d'atteintes neurodégénératives (**Multigner, 2005**). Les pesticides font partie des causes de parkinson le risque est plus grand au zone rurale et en cas d'exposition aux herbicides ou aux pesticides (**Perkin, 2002**).

- Les troubles de reproduction :

Une expérience a été faite sur un lapin mâle pour montrer les effets secondaires d'un fongicide sur la fertilité, cette expérience vise à étudier l'effet d'un fongicide organométallique -le Manèbe- sur les paramètres de la fertilité chez le lapin mâle *Oryctolagus cuniculus*. Le fongicide a été appliqué à raison de deux doses: 1g /L et 2 g /L pendant 04 semaines successives. Les paramètres de fertilité y compris le poids testiculaire, quelques caractères biologiques des spermatozoïdes et le taux de la testostérone ont été étudiés. Les résultats révèlent qu'il y a une diminution significative dans le poids des testicules, la concentration et la mobilité des spermatozoïdes, et une augmentation significative dans les malformations morphologiques des spermatozoïdes chez les individus traités. D'autre part l'administration du fongicide entraîne une diminution significative dans le taux de la testostérone (**Djabali et Khelili, 2009**).

Les principaux troubles de la reproduction concernent le fœtus qui est exposé par sa mère. Les conséquences sont des avortements spontanés, des enfants mort-nés et des malformations congénitales. Il est souvent invoqué aussi une baisse de la fertilité qui est peut-être dû à une perturbation endocrinienne (**Amiard, 2011**).

4. Comportement et devenir des pesticides dans le sol

La construction et la mise en œuvre de modèles numériques de simulation nécessitent la formalisation et la hiérarchisation de l'ensemble de phénomènes impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols : phénomène de rétention et de dégradation, modalités de transport en relation avec la circulation de l'eau et des particules.

Deux types de sorties des modèles sont recherchées : les cinétiques de dissipation, c'est-à-dire la variation des concentrations en fonction du temps, permettant de prévoir la persistance des pesticides ; et l'étendue des phénomènes de transfert, en particulier, l'entraînement en profondeur directement lié à la mobilité des produits en relation avec les phénomènes de rétention, la persistance et la rétention des pesticides sont respectivement paramétrés par une durée de demi-vie et un coefficient d'adsorption. D'une manière générale, plus un produit est retenu dans le sol moins il est mobile et moins il va présenter des risques de contaminations des nappes. Plus un produit est persistant ; plus longtemps il va rester dans le sol, avec des problèmes possibles d'accumulation et plus il aura d'occasions d'être soumis à des phénomènes de transferts entraînant une contamination des nappes. Ces deux paramètres permettent de classer les pesticides par rapport à leur caractère polluant potentiel. (**Barriuso, 2004**).

5. Processus de dégradation des pesticides

La dégradation des pesticides reste un phénomène mineur ne contribuant le plus souvent qu'à la perte du pouvoir biocide spécifique de la matière active et à l'introduction dans le milieu de nouvelles structures chimiques (**Regnault, 2014**).

Le processus de dégradation est un facteur de dépollution majeur des compartiments environnementaux contaminés par les pesticides s'il aboutit toutefois à une minéralisation totale (**Cemagref, 2011**).

Ce processus définit la persistance du produit et sa durée d'action, ceci à des conséquences sur son efficacité biologique (**Regnault, 2014**).

Parmi les paramètres qui affectent la dégradation des pesticides, on distingue la stabilité chimique de la molécule, la température, l'humidité de la microflore (**Cemagref, 2011**) et le PH du sol (**Regnault, 2014**).

Il est généralement convenu que les deux forces de dégradation les plus actives sur les produits chimiques dans l'environnement sont les microorganismes et la lumière du soleil (Fumio et al; 2012).

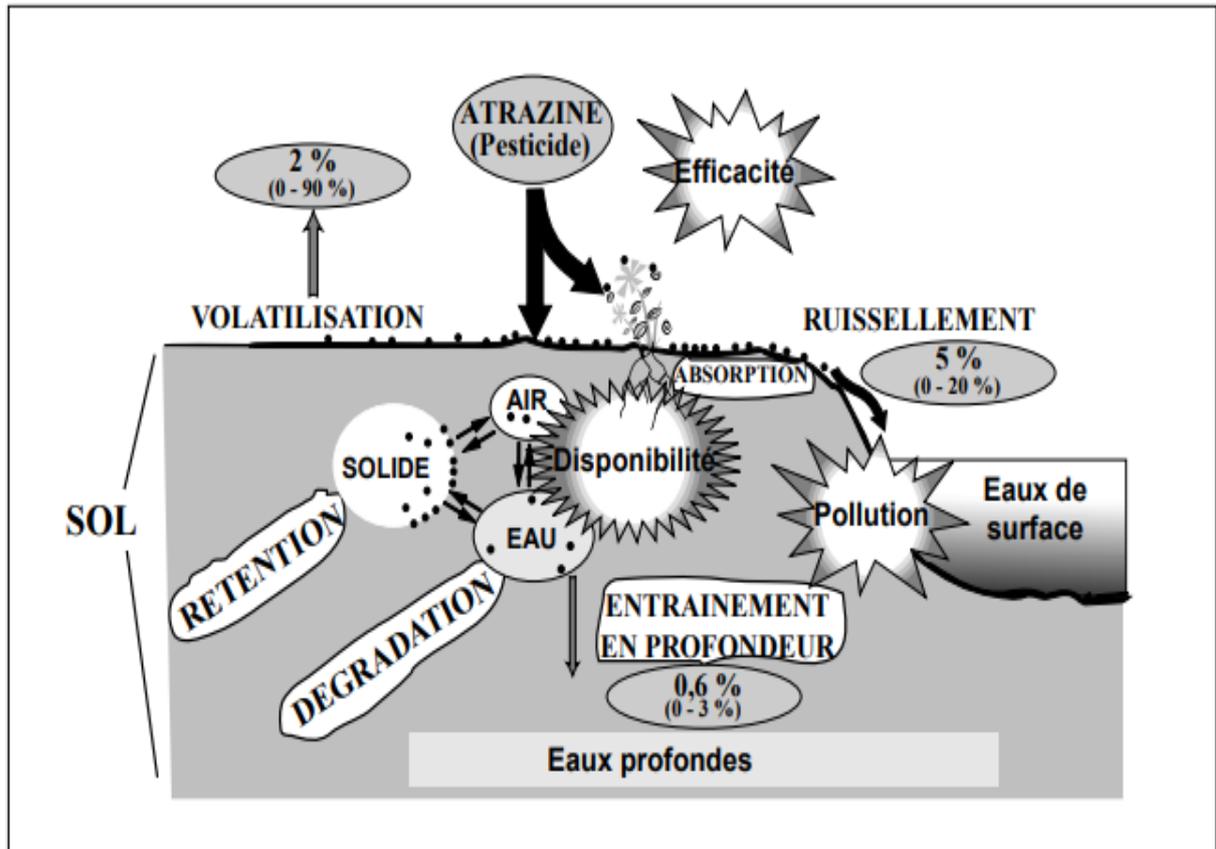


Figure 01 : Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols (Barriusso et al., 1994)

5.1. La dégradation abiotique

Ou par la lumière, la dégradation photochimique se produit sous l'effet des radiations solaires (Regnault, 2014).

Certains pesticides présentent une très bonne activité biologique en serre, lorsqu'ils sont protégés du rayonnement UV, mais pas en champs lorsqu'ils sont exposés à la totalité de la lumière solaire. Une dégradation photochimique par le rayonnement UV est alors suspectée (Maxime, 2015).

5.2. La biodégradation

Le devenir de pesticides dans l'environnement est affecté par l'activité microbienne (Aisalbie et lloyed, 1995). La dégradation biotique ou biologique dans le sol est réalisée essentiellement par les processus impliquent les microorganismes de toutes sortes, ces derniers agissent le plus souvent en complémentarité enzymatique (Regnault, 2014).

5.2.1. Microorganismes impliqués dans la dégradation des pesticides

Les actinomycètes ont un potentiel considérable pour la biotransformation et la biodégradation des pesticides. Les membres de ce groupe de bactéries à Gram positif sont capables de dégrader des pesticides ayant des structures chimiques très différentes, notamment des organochlorés, des s-triazines, des triazinones, des carbamates, des organophosphorés, des organophosphonates, des acétanilides et des sulfonilurées.

Un nombre limité de ces pesticides xénobiotiques peuvent être minéralisés par des isolats uniques, mais des consortiums de bactéries sont souvent nécessaires pour une dégradation complète. Le Co métabolisme des pesticides est fréquemment observé dans ce groupe de bactéries. En comparaison avec la dégradation des pesticides par les bactéries Gram-négatives (Adinda, 2008)

Il apparaît que des résidus chimiques dans les légumes sont le plus souvent transmis par le sol. Des cultures microbiennes capables de dégrader le HCH ont été isolées et utilisées avec succès sous forme d'un produit, "Agrocure", pour accélérer la dégradation du HCH dans le sol. *Pseudomonas ptm+* une souche bactérienne pouvant produire un surfactant cellulaire en présence de HCH, a été caractérisée et utilisée en tant qu'agent de nettoyage, pour lutter contre les pesticides présents dans les légumes (Karanth, 2002).

Le genre *Bacillus* comprend plusieurs espèces dans le sol et l'environnement, cette bactérie a approuvé sa capacité à la biodégradation de plusieurs pesticides tel que les organophosphorés, le chlorpyriphos (Toffaza et al., 2017).

La biodégradation du méthylparathion (MP), un pesticide organophosphoré largement utilisé, a été étudiée en utilisant une souche de bactérie nouvellement isolée *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. MP à une concentration initiale de 1200 mg / L, pourrait être totalement biodégradé par *A. radioresistens* USTB-04 comme seule source de carbone en moins de 4 jours en présence de phosphate et d'urée comme sources de phosphore et d'azote, respectivement (Fang-yao et al., 2007).

6. Le Co-métabolisme

Le Co-métabolisme est un phénomène important qui influence la dégradation des polluants , Les enzymes catalysant la dégradation des polluants sont exprimées en présence d'un inducteur qui est généralement le substrat a dégrader ou l'un de ses métabolites, la croissance microbienne nécessite l'apport d'un substrat organique qui sert de source de carbone et d'énergie , il arrive que les voies cataboliques microbienne puissent transformer des analogues de leur substrat naturel(**Peter et al., 2004**).

7. La persistance

La persistance est en fait la capacité pour un composé à demeurer dans le milieu sans subir aucune transformation, dégradation ou autre. C'est une caractéristique très importante lorsque l'on parle des pesticides, elle affecte son efficacité en tant que pesticide et elle a un impact sur la qualité du milieu. La persistance est caractérisée notamment par la constante de dégradation du contaminant. Cette constante indique la vitesse de disparition de la concentration en contaminant dans le sol. Associé à cette constante, on retrouve le temps de demi-vie, c'est-à-dire le temps nécessaire pour dégrader 50% de la quantité initiale rencontrée (**Cheng et Lehman, 1985**).

III. Les fongicides

1. Définition

Les fongicides sont des produits phytopharmaceutiques (**pesticide et agriculture**) ou anticryptogamique sont destinés à lutter contre les champignons parasites ; bactéries virus pouvant affectent le bon développement des plantes.

Misent au point dans les années 1880, pour lutter contre le mildiou qui est considéré comme le premier fongicide découvert (**scribd**).

Les fongicides sont généralement peu solubles dans l'eau (**Davet et Rooxel, 1997**) et peuvent être détruit par la lumière exemple chloranile ; et même par le ph ;... leur demi vie dans le sol est extrêmement variable de 3 a 4 jours captane jusqu'à 365 jours pour le bynomile (**France ministère des affaires étrangères, 2002**).

2. Classification des fongicides

Les fongicides sont regroupés dans des familles selon des critères suivants :

- **Selon l'utilisation**

Selon l'utilisation, les fongicides sont classés en deux types :

- **Les fongicides préventifs** : ces produits agissent par contact et dont le but est d'empêcher que le champignon pénètre dans la plante, ils bloquent la germination des spores et empêchent le mycélium de coloniser les tissus de son hôte, ils sont inefficaces lorsque la plante est déjà colonisée (**Agroneo, 2014**).

- **Les fongicides curatifs** : stoppent le développement du champignon déjà installés dans la plante (**Berrah, 2011**).

- **Selon Le mode d'action**

Tableau 01 : Classification des fongicides selon le mode d'action (**Calvet et al., 2005**).

Fongicides		
	Mode d'action	Famille chimique
Fongicides affectant les processus respiratoires	Multi-sites	Cuivre ; soufre Dérives du benzène Dithiocarbamate Chloromethyl-mercaptans Guanidines Quinones Hétérocycles azotes Quinoléines Triazines
	Action sur la chaîne respiratoire inhibition du complexe 2	Amines amides
	Action sur la chaîne respiratoire inhibition du complexe 3	Hétérocycles azotes Oxazolinediones Strobilurines

Revue bibliographique

	Phosphorylation oxydative	Amines amides Dérives du phénol Organo- stanniques
Fongicides agissant sur les microtubules	Combinaison avec la tubuline	Carbamate Phenylcarbamate Hétérocycle azotes Benzimidazoles
Fongicides stimulateur de défenses naturelles		Hétérocycles soufre benzothiadiazines
Fongicides affectant des biosynthèses	Inhibition de la biosynthèse des stérols du groupe 1	Amines amides Hétérocycles azotes Imidazoles Pyridines Pyrimidines Azoles
	Inhibition de la biosynthèse des stérols du groupe 2	Amines amides Hétérocycles azotes Morpholines Pipéridines
	Effet sur la biosynthèse de l'ARN inhibition de l'ARN polymérase	Amines. Amides
	Effet sur la biosynthèse de l'ARN inhibition de l'adénosine désaminase	Hétérocycles azotes Hydroxy-pyrimidines

- **Selon le contact:**

On distingue classiquement deux groupes de fongicides

- ✓ Les fongicides systémiques ou pénétrantes dans les plantes
- ✓ les fongicides de contact (**Lachuer, 2011**).

Tableau 02 : Classification des fongicides selon le contact

Les fongicides de contact :	<p>le soufre : le soufre est tout spécialement actif vis-à-vis des oïdiums contre lesquels il peut être employé en poudrage ou en pulvérisation, il agit surtout par ses vapeurs et se montrera plus efficace par temps chaud (>30°) (Regnault, 2014).</p>
	<p>le cuivre : le cuivre est efficace de façon directe vis-à-vis des péronosporales, il suscite des modifications physiologiques dans les tissus superficiels des plantes : épaissement des parois cellulaires, production de phytoalexines (Regnault, 2014).</p>
	<p>le folpel et captane : ou les dicarboxines : ces fongicides très peu toxiques sont en général polyvalents (captane) (France ministère des affaires étrangères, 2002).</p>
	<p>dithianon : et le chloranil, dichlone ont un large spectre d'action et sont très peu toxiques (France ministère des affaires étrangères, 2002).</p>
	<p>le chlorothalonil : et le dichlofluanide sont de plus en plus utilisés, ils ajoutent au spectre d'activité des Dithiocarbamates les oïdiums. Les conidies restent relativement sensibles mais la croissance mycélienne reste possible en présence de ces produits (Regnault, 2014).</p>
	<p>les Dithiocarbamates : parmi lesquels on peut citer : le Zineb, le manébe, le mancozébe, le propinébe. (Regnault, 2014). Ce sont des dérivés de l'acide dithiocarbamique, ils sont presque tous non phytotoxiques, de spectre d'action assez large (France ministère des affaires étrangères, 2002).</p>
Les fongicides systémiques ou pénétrantes :	<p>Ont compris la famille des benzimidazoles, parmi lesquels nous citerons : le thiabendazole, le benomyl, le méthylthiophanate, le carbendazine (Regnault, 2014). Ce sont des dérivés du benzène, se sont en général très peu toxiques mais leur dégradation est parfois lente et elles peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux. Ces dérivés sont employés en traitement des semences ou des sols mais contre certaines maladies foliaires (France ministère des affaires étrangères, 2002).</p>

IV. Les carbamates

1. Définition

La famille des carbamate porte non seulement des insecticides mais également des fongicides et des insecticides (**Pousset, 2003**).

Les carbamates sont des insecticides de synthèse constitués d'esters organiques de l'acide carbamique (**Valade, 1985**).

Quelques carbamates sont utilisés comme analogues de l'hormone mue et d'autres ont une efficacité ovicide. Ce sont en général des neurotoxiques qui agissent comme les organophosphorés.

Les carbamates pénètrent dans la cible essentiellement par contact et par ingestion. Seul le carbofuran est cité pour agir par inhalation.

Certains carbamates ont un très large spectre d'action : l'aldicarbe est doté de propriétés insecticides, acaricides et nématocides. Le carbofuran agit sur les insectes, les myriapodes et les nématodes. Ces substances sont aussi très toxiques pour l'homme.

2. Structure chimique des carbamates.

En général, on a trois classes de carbamates pesticides sont connues :

- Insecticides (NH-CH₃) (activité anticholin-estérase).
- Herbicide (NH-gpe aromatique)
- Fongicide (NH-gpebenzimidazole).

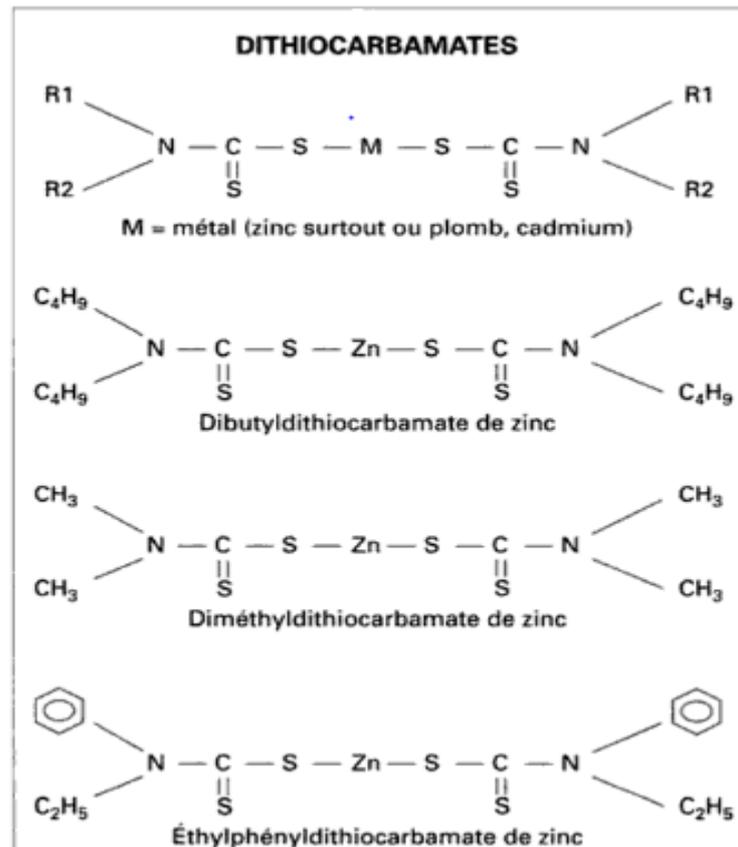


Figure 02 : Formule chimique des carbamates (John Eurotxt, 2002).

3. Propriétés physicochimiques des carbamates

Les carbamates sont des composés globalement non volatiles ; lipophiles, peu solubles dans l'eau, solubles dans la majorité des solvants organiques. Ils se décomposent rapidement par photo dégradation, donc un risque faible de contamination à long terme.

4. Le mode d'action des carbamates

4.1. Les carbamates insecticides

Les organophosphorés et les carbamates prennent la place de l'acétylcholine en se fixant sur son site d'interaction avec l'acétylcholinestérase. Il en résulte un blocage des sites d'action suivi d'un accroissement rapide de l'acétylcholine qui peut s'accumuler jusqu'à 260% de la normale (**champs, 1985**). La propagation de l'influx nerveux est bloquée et l'insecte meurt de paralysie (**Darriet, 2007**).

4.2. Les carbamates fongicides

Les séries des thiocarbamates et dithiocarbamates agissent en libérant des isocyanates ou du thirame, molécules actives qui bloquent les groupements S-H des enzymes perturbant ainsi le métabolisme des champignons a trois niveaux.

- Inhibition de l'oxydation du glucose.
- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique.
- Inhibition de la dégradation des acides gras.

V. Le Propamocarb

1. Définition

Selon la data base 2018 de l'université Hertfordshire

Le Propamocarb est une molécule chimique qui appartient à la famille des carbamates, avec un mode d'action Systémique, absorbé par les racines et les feuilles des plantes. Il inhibe la synthèse des lipides (**Tableau 3**).

Tableau 3 : propriétés physico-chimique du Propamocarb.

Type de pesticide	Fongicide
Famille chimique	La famille des carbamates
Formule chimique	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂
La masse moleculaire	188.3
Autres appellation chimique	propyl [3-(dimethylamino) propyl] carbamate propyl 3-(dimethylamino) propylcarbamate propyl (3-(dimethylamino) propyl) carbamate
La FRAC : classification de la résistance de fongicide	28
Généralité	Ininflammable ou explosif
Seuil de préoccupation toxicologique (classe Cramer)	Elevé (classe III)
La persistance dans le sol	30 jours

2. Conséquences

Selon le rapport de la FAO (**Food & Agriculture Org, 1987**), des monographies toxicologiques étaient faites sur le Propamocarb :

- Des études toxicologiques à court terme :

Un groupe de souris 10 males et 10 femelles a reçu le pesticides dans leur régime alimentaire pendant 5 semaines à des concentrations 0. 50. 500 .5000 ppm

Les examens cliniques tel que ophtalmoscopie, hématologie analyses des urines, examen de la moelle osseuse, la mesure de pois et même l'observation du changement du comportement ont été étudié.

Les statistiques signifie une diminution très notable des lymphocytes a partir des analyses de la moelle osseuse, pour les males la diminution commence a partir de la dose 50 ppm, pour les femelles à partir du la dose 500 ppm, aussi une diminution de cholestérol pour les deux sexes dans les mêmes concentrations.

- Alongterme :

Un développement des tumeurs mortelles.

VI. Fongicides commerciaux à base de Propamocarb

1. PROCURE

Procure est un fongicide sous forme de solution liquide absorbé par les racines, il est doté de propriétés systémiques et conseillé pour la lutte contre le champignon du sol *pythium* et *phytophthora*, qui provoquent la pourriture des racines sur plants en pépinière et le contrôle du mildiou sur la culture de pomme de terre. Composé de 722g/l Propamocarb (**figure 03**).

2. PROPLANT

D'après l'avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation : est un fongicide composé de 722g/l de Propamocarb-HCL (pureté minimale 93%), se présentant sous forme d'un concentré soluble. Appliqué en pulvérisation.

* Les propriétés physico-chimiques du Proplant

N'est pas hautement inflammable, ni auto inflammable à température ambiante

Le PH d'une dilution aqueuse de la préparation a concentration de 1% est de 5.3 à 20°C.

2. Les maladies traitées par le fongicide Procure

- **Le Pythium**

Les Pythium sont des champignons du sol, parasites de nombreuses plantes potagères et de grandes cultures. Leur présence sur les semences vient essentiellement de semences récoltées dans de mauvaises conditions, de plantes versées ou déjà parasitées par d'autres organismes (**champion, 1991**).

Les Pythium sont surtout connus pour s'attaquer précocement à la tomate dans les pépinières ou à la suite de semis en plein champ, affectant les semences ou les jeunes plantules avant ou après la germination (**Blancard, 2009**).

Les attaques de Pythium se manifestent au niveau du collet et des racines ; ce qui a pour conséquence un amincissement de la jeune plantule, qui prend une teinte brun clair avant de se faner et de tomber sur le sol. Passant d'une plantule à l'autre, la destruction peut être extrêmement rapide sur la ligne de semis. Les plantes attaquées plus tardivement sont moins vigoureuses, jaunissent ou se dessèchent (**champion, 1991**).

- **Le Phytophthora**

Les Phytophthora sont des champignons attaquant les racines fines et entraînant leur nécrose (**Drenou, 2006**). L'armillaire se distingue très nettement du phytophthora par son mycélium blanc « en peau de chamois » observable entre le bois et l'écorce, au niveau des racines et du collet (**Bourgeois, 2004**).

Lorsque la destruction des fines racines est lente et peu intense, l'arbre arrive à compenser par la régénération de nouvelles racines. D'autres Phytophthora sont responsables de la maladie de l'encre se manifestant par des lésions chancreuses suintantes au niveau du collet (écoulement visqueux noirâtre produit en réaction contre le parasite). Ces symptômes peuvent être accompagnés d'un dépérissement des arbres comme chez le Châtaignier ou chez les aulnes (glutineux et à feuilles en cœur). La maladie se reconnaît alors typiquement par des houppiers clairs du fait de feuilles jaunissantes et de taille

anormalement petite. Les Phytophthora sont des pathogènes primaires d'origine exotique (**Drenou, 2006**).

- **Le Mildiou :**

Les Américains désignent sous le nom de Mildew, une maladie de la vigne, occasionnée par une sorte de moisissure dont la caractéristique est d'envahir particulièrement les feuilles de cet arbuste, de les dessécher et d'amener leur chute prématurée. Le mildiou est constitué par un champignon microscopique le *Peronospora viticola* (**Ptrigeon, 1887**).

Le mildiou se développe sur tous les organes verts de la vigne : les rameaux herbacés, les fruits et les feuilles, on ne le voit jamais sur le bois aouté et il n'existe que dans des cas spéciaux sur les raisins à maturité (**Viala, 1893**).

*Matériels et
méthodes*

1. Traitement du sol

Le 07 Mars 2018, une zone du sol 1 m^2 située à l'université des frères Mentouri Constantine 1, a été traitée superficiellement par le fongicide Procure (722 g/l Propamocarb) à la dose recommandée (1 ml/L).



Figure 03 : Le fongicide Procure.

2. Echantillonnage

Après 1 mois et demi de traitement du sol par le fongicide procure, les 5 premiers centimètres du sol sont écartés, puis à l'aide d'une spatule stérile, 420g du sol est prélevée et récupérée dans un flacon stérile (pochon et tradieux, 1962).

3. Milieux et réactifs

Le fongicide Procure (722g/l Propamocarb) a été obtenue a partir d'un magasin des produits phytosanitaires à Didouche Mourad, Constantine.

Le milieu Minimal Salt Medium (MSM) (**annexe 1**), additionnée du fongicide procure est utilisé pour tester la capacité des isolats à utiliser ce même fongicide comme SSCE.

Le milieu minéralISP9 (**annexe 1**), additionné de fongicide procure comme une source de carbone et d'énergie, est utilisé pour tester la capacité de quelques souches d'actinomycètes précédemment isolées par Mme Zermane.F (Laboratoire de biotechnologie microbienne), à dégrader ce fongicide.

Matériels et méthodes

Un milieu GN (gélose nutritive), est utilisé pour le repiquage des souches isolées.

Le milieu ISP2 (**annexe 1**) est utilisé pour la purification des actinomycètes.

4. Isolement de microorganismes dégradants le fongicide procure

4.1. Enrichissement

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, contenant 90ml du milieu MSM et le fongicide procure à la dose recommandée (1ml/l), 10g du sol contaminé par le fongicide Procure sont ajoutés stérilement.

Cette expérience est réalisée en triple, les cultures sont ensuite incubées à 30°C, sous agitation à 150 tours/min pendant 7 jours.

Après incubation, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} sont effectuées, à partir de chaque erlenmeyer.

1ml de chaque dilution estensemencé en masse sur milieu MSM solide, additionné de fongicide Procure à une concentration équivalente à 1ml/l, puis Incuber à 30°C pendant 10jours (**vijay, 2013**).

4.2. Sélection des souches dégradantes de Procure

Puisque, aucune colonie n'a poussé sur milieu MSM solide plus fongicide, des ensemencement sur milieu GN supplémenté du fongicide procure, sont effectués à partir des dilutions décimales réalisées, puis Incubées à 30° pendant 24 à 48heures.

5. Purification de quelques souches d'actinomycètes

Des souches d'actinomycètes précédemment isolées par madame Zermane.F (MAAUMC1) sont purifiées sur milieu ISP2 et incubées à 30°C pendant 21 jours, dans le but de tester leur capacité à tolérer et dégrader le fongicide procure.

6. Teste de tolérance des bactéries isolées et dessouches d'actinomycètes purifiées vis-à-vis du fongicide Procure

Les souches bactériennes isolées, sont ensemencées en surface sur milieu GN additionné du fongicide Procure, à différentes concentrations.

*La dose recommandée (DR)(1ml/l)

*La DRfois 2

*La DR fois 5

*La DR fois 10

La tolérance des souches d'actinomycètes purifiées vis-à-vis à Procure, est testéesur milieu ISP2 avec les mêmes concentrations précédentes.

7. Mise en évidence de la biodégradation de fongicide Procure par les souches d'actinomycètes

Pour chaque souche d'actinomycète, un erlenmeyer de 250 ml contenant 90ml du milieu MSM et additionnée du fongicide procure (1ml/l), est ensemencée, puis incubéeà30°C sous agitation (150tours/min) en obscurité.

Des prélèvements périodiques, sont effectués chaque 24 heures pendant 10 jours.

La capacité des actinomycètes à dégrader le procure est estimée par mesure de leur croissance (DO) à 600nm (Deepti et Abhinav, 2015).

8. Identification présomptive des souches actives

Dans cette étape, les bactéries tolérant de fortes concentrations du fongicide Procure, et capables de l'utiliser comme SSCE, sont caractérisées par des examens macroscopique, microscopique et quelques testes biochimiques.

8.1. Examen macroscopique

C'est l'observation visible à l'œil nu de l'aspect des colonies :

- La forme des colonies (punctiforme, circulaire, filamenteuse, irrégulière, fusiforme.).
- La taille (grande, moyenne, petite).
- La couleur (blanche, jaune ...etc.).
- La pigmentation : certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donne un aspect bien caractéristique à la colonie. Tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu.
- L'élévation (plane, élevée, convexe, bombée, bossue).
- Le bord ou le contour (régulier, ondule, lobe, dentelé, filamenteux, boucle).
- L'opacité (opaque, translucide, transparente).

8.2. Examen microscopique

Cette observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend l'examen à l'état frais, l'examen après coloration, le plus souvent sur frottis séchés et fixés.

8.2.1. Examen à l'état frais

Une observation microscopique entre lame et lamelle des bactéries vivante en milieu liquide.

8.2.2. L'examen après coloration de Gram :

La méthode de coloration du Gram permet de séparer le monde bactérien en deux :

- Bactéries ayant réagi à cette méthode de coloration : Gram +
- Bactéries n'ayant pas réagi à cette méthode de coloration : Gram - (**Stora, 2013**).

En suivant les principales étapes de protocole classique :

- La réalisation d'un frottis sur lame de verre :

Étalement d'une colonie bactérienne avec une goutte d'eau distillé, puis séchage à l'air libre et fixez à la flamme du bec benzène.

Matériels et méthodes

- La coloration de frottis :
- ❖ Par le violet de gentiane pendant 30 secondes, puis rinçage.
- ❖ Mordançage ou la fixation au lugol pendant 20 secondes, puis rinçage.
- ❖ Décoloration rapide à l'alcool (ou alcool + acétone) pendant 10 secondes.
- ❖ Recoloration à la safranine ou à la fushine pendant 30 secondes à 1 minute, puis rinçage et séchage (**clos , 2012**).

Observation à immersion X 100.

- Un test avec le KOH est réalisé pour assurer les résultats :

Sur une lame : une colonie bactérienne est déposée + une goutte de KOH, à l'aide de l'anse de platine on vérifie la formation d'un filament :

- Formation de filament : Gram négatif.
- Pas de filament : Gram positif.

8.2.3. La technique des lamelles

Pour l'observation microscopique des actinomycètes une culture sur milieu ISP2 solide est nécessaire selon la méthode suivante :

A l'aide d'une pince ; des lamelles stériles sont plantées au milieu ISP2 à 45°.

Les gouttes des suspensions bactériennes sont déposées aux fontes entre les lamelles et le milieu. Incubation pendant 10 jours à 30°C. la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des fragments des mycéliums de substrat aérien non dénaturés, elle est ensuite déposée sur une lame puis examinée à émergence, au microscope optique (**Oskay et al., 2009**).



Figure 04 : Technique des lamelles sur milieu ISP2

8.3. Les tests biochimiques

8.3.1. La recherche de l'oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes.

Ce test est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. Sur une lame, on dépose un disque d'oxydase ; une goutte d'eau distillée est ajoutée, puis la colonie bactérienne à tester.

En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet c'est l'indophénol (**Delarras, 2014**).

8.3.2. La recherche du catalase

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène. Sur une lame, une colonie bactérienne est déposée, puis une goutte d' H_2O_2 , le résultat est dit positif, s'il y a une observation des bulles d'air (**Clontz, 2008**).

8.3.3. La recherche de la mobilité

L'appréciation de la mobilité est réalisée sur milieu mannitol mobilité nitrates. L'ensemencement est fait par une pique centrale au tube (**Delarras, 2010**).

L'incubation se fait pendant 24h à 30° C.

8.3.4. Utilisation du citrate de Simmons comme source de carbone

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate. Seules les bactéries capables d'utiliser le citrate peuvent pousser sur ce milieu.

L'incubation se fait pendant 24h à 30°C.

8.3.5. Utilisation du Glucose, Lactose et saccharose et la production de l'H₂S

Le milieu Triple Sugar Iron proposé par (**Hajana, 1945**), principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des *Entérobactéries* et des *Salmonella*. Il permet de mettre en évidence en 24 h l'attaque du glucose, du lactose et/ou saccharose ainsi que la production de sulfure d'hydrogène et du gaz (**Delarras, 2010**).

L'incubation se fait pendant 24h à 30°C

9. Conservation des souches

Pour la conservation des actinomycètes, des tubes du milieu ISP2 inclinés, sont ensemencés et incubés à 30°C pendant 21 jours, puis conservés à 4°C.

Les souches bactériennes autres que les actinomycètes, sont ensemencées sur milieu GN inclinée puis incubées à 30°C pendant 24h à 48h et conservées à 4°C.

Résultats et discussions

I. Recherche de microorganismes dégradants le fongicide procure

1. Isolement des microorganismes capables d'utiliser le fongicide Procure comme SSCE

Après enrichissement et ensemencement des dilutions sur milieu MSM solide additionné du fongicide procure comme SSCE, aucune colonie n'est apparue sur ce milieu, ce qui indique que notre échantillon ne contient aucune souche capable d'utiliser le fongicide procure comme seule source de carbone et d'énergie. (Mei-Hsing et al., 2010) ont montré que le Propamocarb peut être dégradé par *Mycosphaerell pinodes* en présence d'une autre source de carbone par Co métabolisme.

Le Co-métabolisme est un phénomène important qui influence la dégradation des polluants, Les enzymes catalysant la dégradation des polluants sont exprimées en présence d'un inducteur qui est généralement le substrat à dégrader ou l'un de ses métabolites, la croissance microbienne nécessite l'apport d'un substrat organique qui sert de source de carbone et d'énergie, il arrive que les voies cataboliques microbienne puissent transformer des analogues de leur substrat naturel (Peter et al., 2004).

2. Purification de souches d'actinomycètes

Trois souches d'actinomycètes (A1, A6 et A12), précédemment isolées par Mme Zermane.F (Maitre Assistantes « A » attachée au laboratoire de microbiologie appliquée) sont purifiées sur milieu ISP2, dans le but de tester leur capacité à tolérer le fongicide Procure et de l'utiliser comme SSCE.

3. Sélection des souches résistantes au fongicide Procure à différentes concentrations

La dilution 10^{-6} de chaque culture est ensemencée sur milieu GN additionné du fongicide Procure à différentes concentrations (dose recommandée (DR), DR×2, DR×5, DR×10).

Les souches d'actinomycètes purifiées, sont ensemencées sur milieu ISP2 additionné de fongicide Procure avec les mêmes concentrations précédentes.

Résultats et discussion

Après incubation, 12 souches bactériennes ont poussé sur GN à la DR du procure et sur la DR×2 alors que seulement 2 souches notées X2 et X6, croissent sur la concentration DR×10.

Les actinomycètes tolèrent toutes les concentrations (DR, DR×2, DR×5, DR×10). On note que la croissance microbienne est inversement proportionnelle avec l'augmentation des concentrations. L'aspect macroscopique des souches isolées est représenté sur **(les figures : 5 ,6, 7, 8, 9, et 10)**.

Les 12 souches isolées sur GN, présentent une bonne croissance sur la concentration recommandée du fongicide, ceci est due à une ex-adaptation dans leur milieu original qui est le sol déjà contaminé par ce fongicide.

Une fois la concentration augmente (DR× 2 et DR×5), le nombre de souches tolérantes diminue ce qui indique qu'il ya une inhibition de ces souches par le fongicide Procure.

Lors d'une forte concentration (DR×10), seulement 2 souches peuvent tolérer cette concentration, ce qui indique que les autres souches sont inhibées et ne peuvent pas se développer. Donc le Propamocarb a un effet toxique sur ces microorganismes.

Nos résultats sont en corrélation avec plusieurs travaux qui affirme la toxicité des pesticides sur les microorganismes du sol. En effet Selon **(Columa, 1977)**, les pesticides peuvent être toxiques pour les microorganismes du sol.

Une bonne croissance remarquable pour toutes les trois souches (A1, A6 et A12) à la dose recommandée et à la double dose.

La souche A1 présente une culture meilleure que celle des souches A6 et A12, à la dose DR×10.

Selon **(De Schrijver et De Mot, 1999)**, les actinomycètes sont capables de dégrader complètement ou partiellement les différentes structure chimique des pesticides incluant le Organochlorines, s-triazines, triazinones, carbamates, organophosphates, organophosphonates, acétanilides et sulfonyleureas.

Résultats et discussion



Figure 5 : souche A1 sur DR de Procure

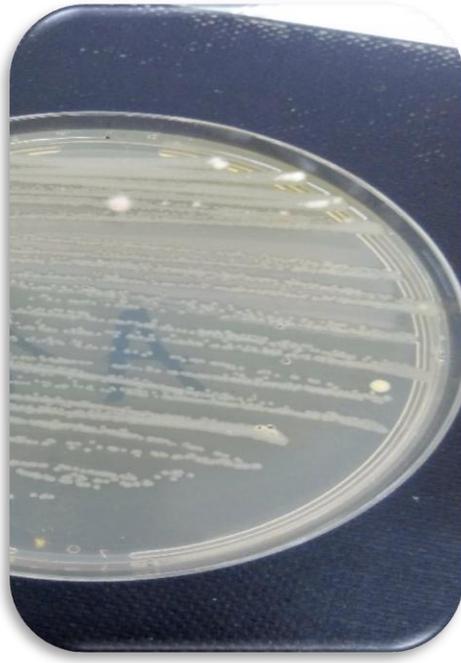


Figure 6 : souche A1 sur DRx2 de Procure



Figure 7 : souche A1, DRx5de Procure

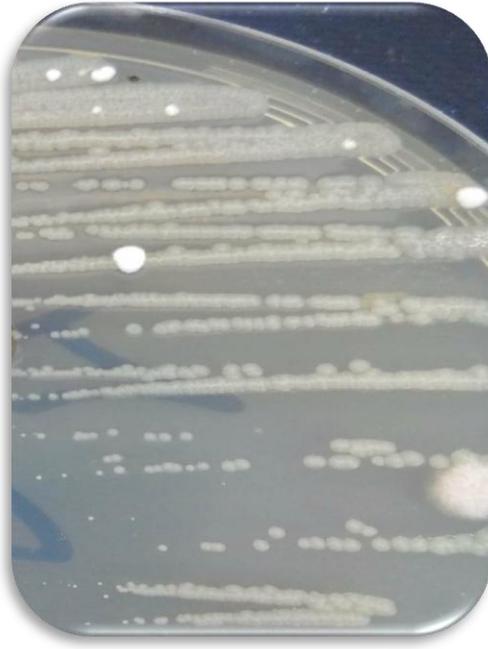


Figure 8 : souche A1 sur DR x10 DC de Procure

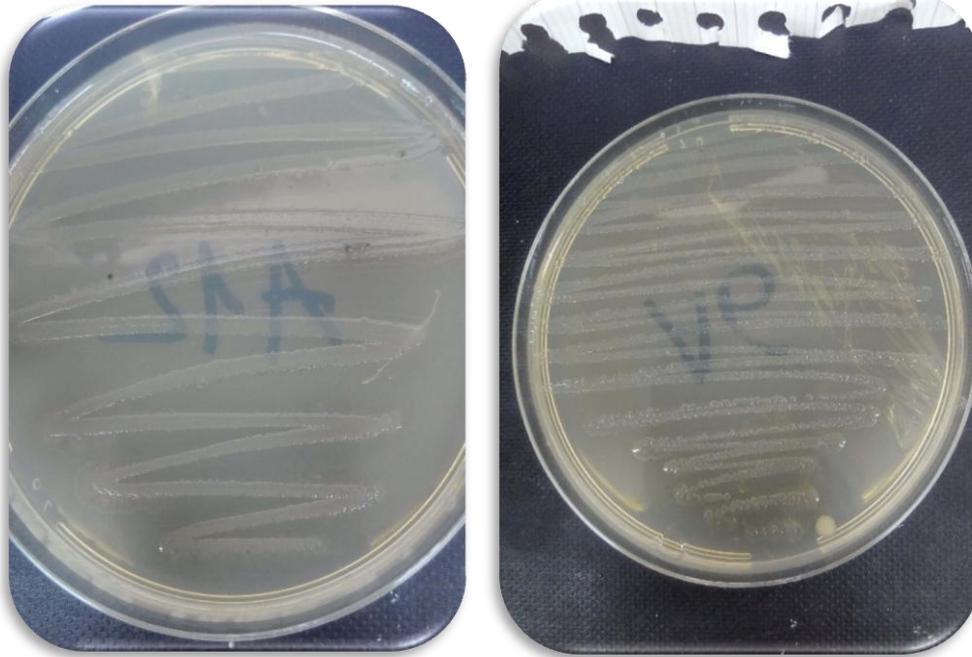


Figure 9 : souche A12 sur DR×10 de Procure **Figure10** : souche A6 sur DR×10 DE Procure

4. Mise en évidence de la dégradation du fongicide Procure par les souches d'actinomycètes

La tolérance d'une souche microbienne à un pesticide, n'est pas toujours un indice de sa capacité de le dégrader, en effet (**singh et al., 1999**) ont rapportés que le champignon blanc *Trametes hirsutus* accumule l'herbicide Lindane sans le dégrader.

Dans ce but, la dégradation du fongicide procure par les trois souches d'actinomycètes (A1, A6, A12), est étudiée, par la mesure de leur croissance (DO) à 600nm sur milieu ISP9 additionné du fongicide procure comme SSCE (**tableau 4 et les figures 12, 13 et14**).

Tableau 4 : variation de la densité optique des souches A1, A6, A12 au cours des 10 jours d'incubation sur milieu ISP9 additionnées de fongicide Procure.

Résultats et discussion

Temps	A1	A6	A12
29/05/2018	0.140	0.218	0.176
30/05/2018	0.237	0.311	0.159
31/05/2018	0.814	0.327	0.230
03/06/2018	0.481	0.209	0.174
04/06/2018	0.286	0.225	0.534
05/06/2018	0.016	0.060	0.179
06/06/2018	0.331	0.226	0.176
07/06/2018	0.334	0.348	0.167
08/06/2018	0.254	0.137	0.127

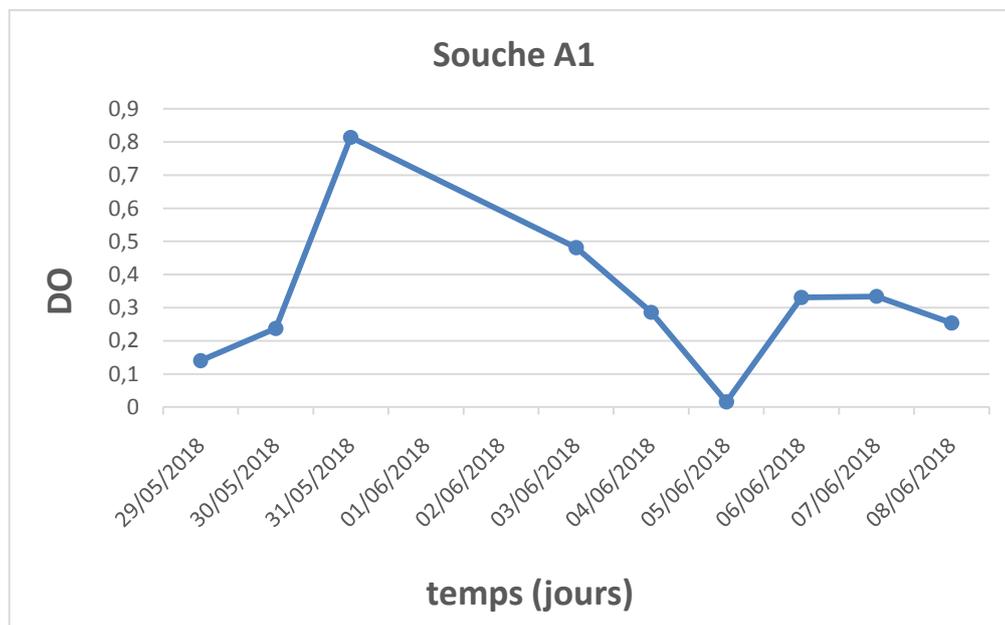


Figure 11 : variation de la densité optique de la souche A1 au cours du temps en présence du fongicide Procure comme SSCE.

Résultats et discussion

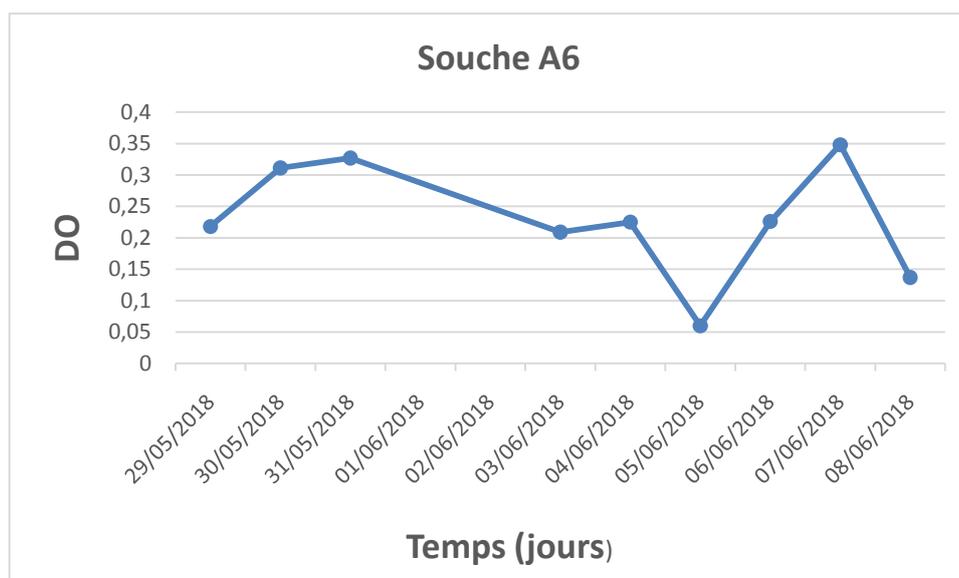


Figure 12 : variation de la densité optique de la souche A6 au cours du temps en présence du fongicide Procure comme SSCE.

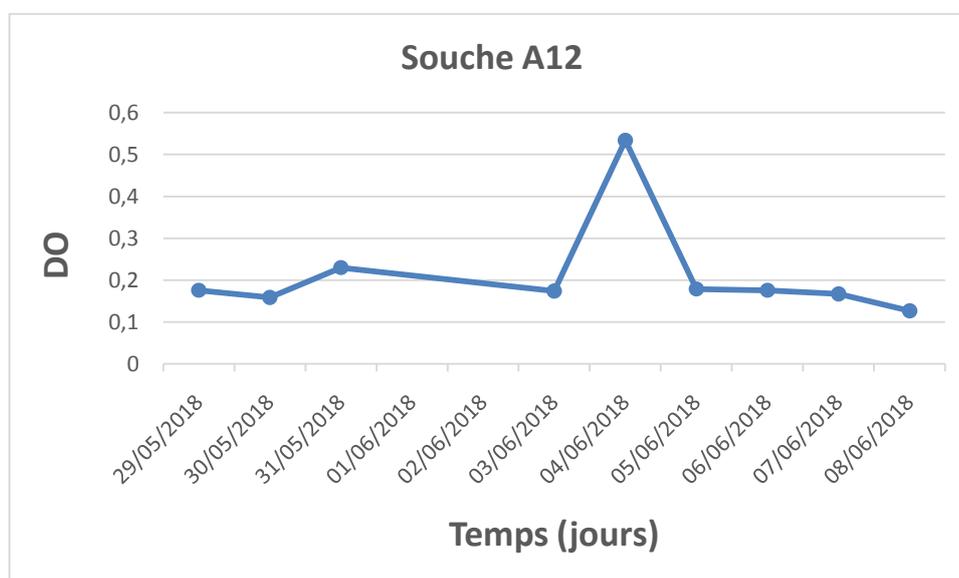


Figure 13: variation de la densité optique de la souche A12 cours du temps en présence du fongicide Procure comme SSCE.

D'après les résultats obtenus, la densité microbienne des souches A1 et A6 augmente au début du 3^{ème} jours, et atteint une valeur presque maximale (0.327) pour la souche A6 et maximale (0.814) pour la souche A1. Alors que, la densité microbienne de la souche A12 se croit graduellement et n'atteint sa valeur maximale (0.534) qu'au 7^{ème} jour

Résultats et discussion

d'incubation. Donc, il y a une dégradation variable du propamocarb par ces trois souches. On note que, la souche A1 est la souche la plus performante.

Selon (**De schrijver et De mot, 1999**), les actinomycètes ont un potentiel considérable pour la biotransformation et la biodégradation des pesticides. Ces bactéries Gram positif dégradent les pesticides avec des structures chimiques différentes, y compris les carbamates

La densité microbienne des souches A1 et A6 se décroît progressivement et atteint une valeur minimale au 8^{ème} jour, puis elle augmente une autre fois jusqu'au 10^{ème} jours. Cette variation de densité peut être due à l'apparition de métabolites de propamocarb, ce qui demande un temps d'adaptation des souches vis-à-vis de ces nouvelles molécules et la synthèse d'enzymes nécessaires à leur dégradation. Selon (**Wolternick et Tasheva, 2005**), le mono diméthyl carbonyle propamocarb, carbonyle propamocarb, carboxy propamocarb, propamocarb_N_oxide et d'autres sont les métabolites obtenus après l'oxydation de Propamocarb.

II. Identification présumptive des souches actives

1. Identification des bactéries

Les deux souches bactérienne qui tolèrent la (DR×10), ont subi des tests d'identification (macroscopique, microscopique et biochimique).

1.1. Aspect macroscopique

La description morphologique des bactéries isolées est représentée dans le **tableau 5** et les **figures 14, 15**.

Résultats et discussion

Tableau 5 : Aspect macroscopique des souches X2, X6.

Souche	X2	X6
Pigmentation	Beige	Blanche
Taille	Petite	Moyenne
Forme	Circulaire	Circulaire
Aspect	Lisse	Lisse
Opacité	Translucide	Opaque
Élévation	Bombée	Bombée
Consistance	muqueuse	Muqueuse
bord	Régulier	Régulier



Figure 14 : souche X6 isolée sur GN



Figure 15 : souche X2 isolée sur GN

Résultats et discussion

1.2. Observation microscopique

- **Etat frais**

L'observation microscopique de l'état frais est représentée dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Aspect microscopique des souches bactériennes isolées, tolérantes (DR×10).

Souches	Forme	Regroupement	Mobilité
X2	Cocci	En amas	immobile
X6	Cocci	En amas	Mobile

- **Coloration de gram**

Les résultats de la coloration de gram des souches isolées sont représentés dans **la figure 17 et le tableau 7**.

Tableau 7 : résultats de la coloration de gram des souches bactériennes isolées, tolérantes (DRx10).

Souches	Gram	Forme
X2	-	Cocci
X6	+	Cocci

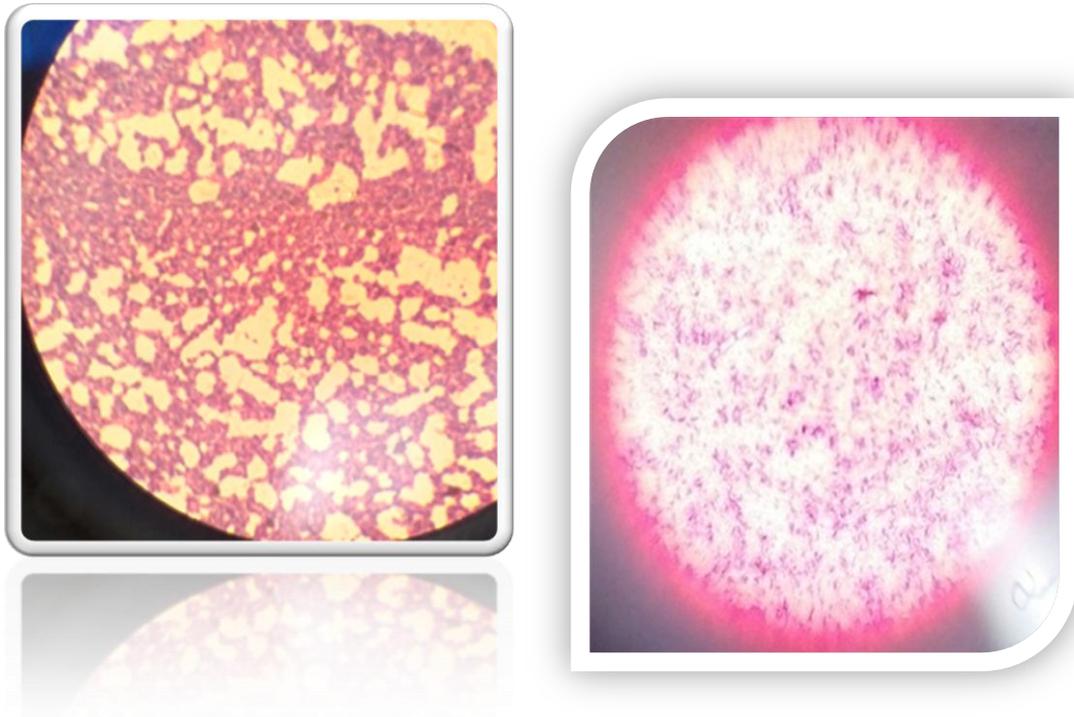


Figure 17 : Aspect microscopique des souches bactériennes isolées après la coloration de gram (G×100).

1.3. Caractérisation biochimique :

Les résultats des tests biochimiques des colonies bactériennes X2 et X6 sont représentées dans le (**tableau 8**) et les (**figures 17, 18, 19, 20, 21, 22**).

Résultats et discussion

Tableau 8 : caractères biochimiques des bactéries X2, X6.

Souches / Test	X2	X6
Oxydase	-	+
Catalase	+	+
Mannitol	+	+
Mobilité	-	+
Lactose	-	+
Glucose	-	+
Saccharose	-	+
Gaz	-	-
H ₂ S	-	+
Citrate	+	-



Figure 18: souche 2 sur mannitol mobilité

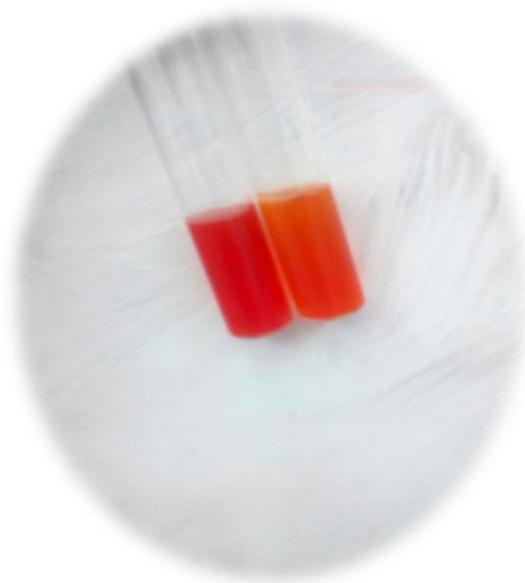


Figure 19: souche 6 sur mannitol mobilité

Résultats et discussion



Figure 19 : souche x 2 sur citrate de Simmons



Figure 20 : souche x6 sur citrate de Simmons

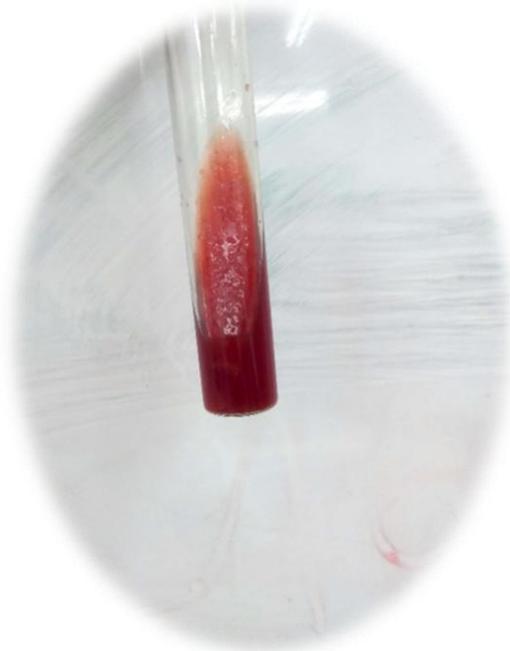


Figure 21 : souche x 2 sur TSI



Figure 22 : souche x 6 sur TSI

Résultats et discussion

Les différents caractères collectés à partir des souches isolées, sont comparés avec celles décrites dans la neuvième édition du *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*. L'identification reste présomptive et non confirmative.

Pour la souche X6 : selon les résultats obtenus, il s'agit d'une bactérie Gram positive, sous forme d'une Cocci, regroupée en amas, oxydase positive, catalase positive ; Donc, cette souche peut être classé dans la famille des Micrococcaceae, ces caractères nous oriente vers le genre *Micrococcus*.

(Zheng et al., 2009), ont montré que *Micrococcus luteus* est capable de tolérer la concentration 100mg/l jusqu'à 250mg/l de nitrobenzène et l'utiliser comme SSCE.

Pour la souche X2 : les résultats de la coloration de Gram, Gram négatif, sous forme de Cocci, regroupée en amas, catalase positive, oxydase négative ; nous oriente vers le genre *Acinetobacter*.

Selon (Subramaniam et al., 2012), *Acinetobacter tandoii* tolère des différentes concentrations des fongicides complexes à base de carbamates tel que le Benlate, le Captane, le Bavistin et le Thiram.

2. Identification des actinomycètes

2.2.1. Observation macroscopique des actinomycètes

L'aspect macroscopique des actinomycètes purifiés est représenté dans (tableau 9) et la (figure 23, 24, 25).

Tableau 9 : les caractères macroscopiques des actinomycètes purifiés.

Souches	Forme	Taille	Chromogénèse	Elévation	Opacité	Surface
A1	Ronde	Petite	Blanche	Plat	Opaque	Sèche
A6	Ronde	Petite	Gris clair	Plat	Opaque	Sèche
A12	Ronde	Petite	Gris	Plat	Opaque	Sèche



Figure 23: souche A1 sur ISP2



Figure 24: souche A6 sur ISP 2

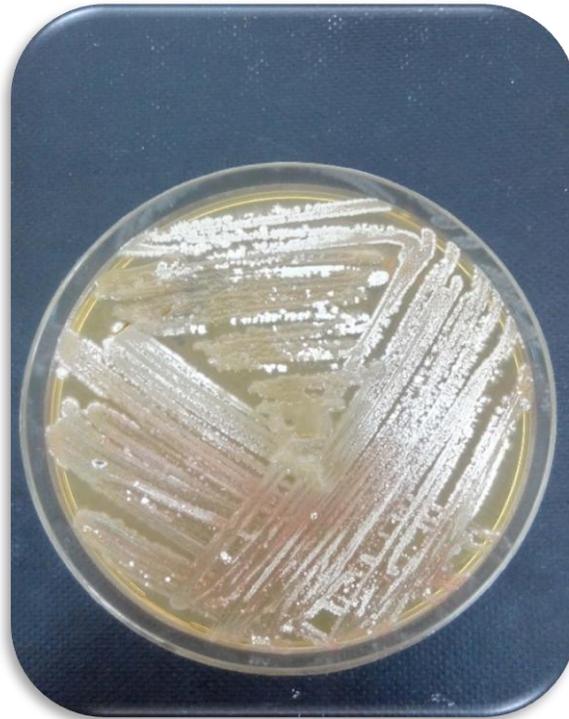


Figure 25 : souche A12 sur ISP2

Résultats et discussion

2.2. Observation microscopique des actinomycètes

Les lamelles sont retirées de la gélose et déposées sur une lame puis observées au microscope optique (G×100). (Les figures 26, 27).

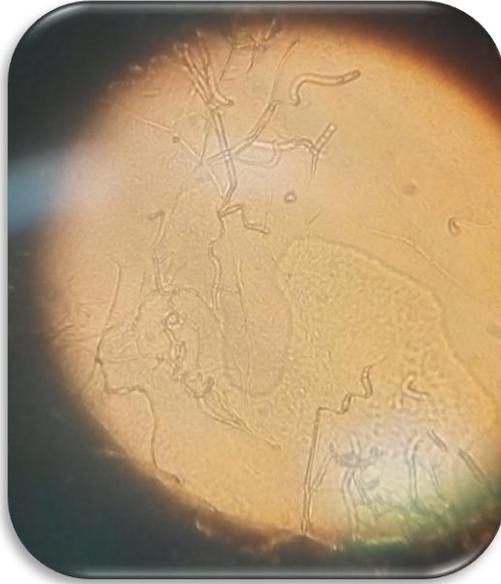


Figure 1: mycélium aérien d'A1

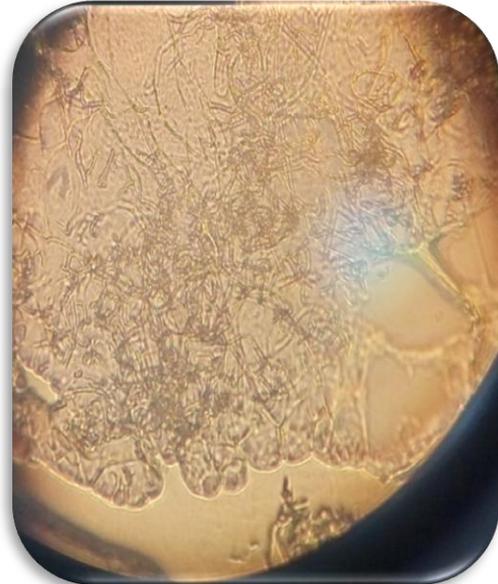


Figure 28 : mycélium de substrat d'A1

Pour la souche la plus performante A1, les hyphes du mycélium de substrat sont fins, ramifiées, non sporulés et non fragmentés. Il pénètre dans la gélose, pour ensuite donner naissance à un mycélium aérien long, ramifié et porte de longue chaîne de spores. Les chaînes de spores sont formées par fragmentation du mycélium aérien, ces caractères nous orientent vers le genre *Streptomyces*

(Gauger, 1986), ont montré que les *Streptomyces* sont capables de se développer sur plusieurs insecticides commerciaux à base de carbamates.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Notre objectif de travail est la recherche de microorganismes tolérants le fongicide Procure (722g/l Propamocarb) et capables de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie.

Dans ce but, un sol forestier situé à UMC1 et traité par le fongicide Procure est utilisé pour l'isolement par enrichissement sur milieu MSM additionné du fongicide procure à la dose recommandée (1ml/l) comme seule source de carbone et d'énergie.

Aucune croissance n'a été détectée sur le fongicide procure comme seule source de carbone et d'énergie.

L'isolement de souches tolérantes de fongicide est effectué sur milieu GN solide plus le procure à différentes concentrations (dose recommandée (DR), DR fois 2, DR fois 5, DR fois 10).

12 souches bactériennes sont isolées, parmi celles-ci, deux seulement sont capables de tolérer la dose recommandée fois 10.

Dans le même but des souches d'actinomycètes (A1, A6, A12), précédemment isolées par Mme Zermane (MA à UMC1), sont purifiées sur milieu ISP2. et montrent tous une résistance au fongicide procure à fortes concentrations.

La dégradation du fongicide procure par les trois souches d'actinomycètes (A1, A6, A12) est estimée sur milieu ISP9 minéral liquide additionné du Procure comme seule source de carbone et d'énergie, par mesure de la croissance (DO) à 600 nm au cours de 10 jours, les résultats obtenus montrent qu'il y a une dégradation du Propamocarb traduite par l'augmentation de la densité microbienne au cours du temps, pour les trois souches, et elle est maximale pour la souche A1.

Les deux souches tolérantes du procure à forte concentration sont identifiées d'après leurs caractères culturels, macroscopiques, microscopiques et biochimiques, qui permettent de les rapprocher aux deux genres : *Acinetobacter* et *Micrococcus*.

L'ensemble des caractères microscopiques et macroscopiques permet de rapprocher la souche A1, au genre *Streptomyces*.

Conclusion

Perspectives

- Confirmation de la biodégradation du fongicide Procure par la technique d'Hplc.
- Identification des métabolites de biodégradation du fongicide Propamocarb par spectrométrie de masse .
- Identification biomoléculaire des souches actives.
- Utilisation de ces souches dans la dépollution des sols contaminée par le même fongicide.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Agroneo. (2014). Fongicides, traitements contre les champignons. [En ligne] (Page consultée le 04/2018).

<https://agroneo.com/techniques/intrants/intrants-chimiques/fongicides>.

Aisalbie et lloyed,J. (1995). A review of bacterial- degradation of pesticides. Australian. Journal of soil research 33(6)925_42. cisiro.

Amiard, J. (2001). Les risques chimiques environnementaux : méthodes d'évolution et impacts sur les organismes. France. Lavoisier.562p.

Atelier Sorcier asbl. (2008). Dans l'air : la science infuse ...l'art. Presses Agronomiques de Gembloux. 22p.

Barriusso ., calvet ., shiavon et soulas. (1994). Les pesticides et les polluant organique : transformation et dissipation. quae .speciale .

Barriuso. E. (2004). Estimation des risques environnementaux des pesticides. Quae .france.16p.

Berrah, A. (2011). Etude sur les pesticides. Mémoire master. Recherche en toxicologie appliquée.Tbessa. universite de Tebessa.

Blancard, D ., Laterooti, H ., Marchoux, G et Candresse, Th. (2009). Les maladies de la tomate : identifier connaitre et maitriser. Paris. Quae. 236_237p.

Bourgeois, C. (2004). Le châtaignier : un arbre_ un bois. Paris. Foret privée française. 59p.

Calvet, R ., Barriuso, E ., Bedos, C ., Benoit, P et Charnary, M_P ., Coquet, Y. (2005). Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. France. France agricole. 65p.

Cemagref. (2011). Pesticides agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. France. Quae. 34_35p.

Champion, R. (1991). Identifier les champignons transmis par les semences. Quae. 303p.

Cheng et lehman, 1985 : Esther,S. (1991). Utilisation d'indicateurs biologiques pour prédire la persistance d'herbicides en sol agricole. Université du Québec l'institut national de la recherche scientifique. 2p.

Clos,J. (2012). immunité chez les animaux et les végétaux . France .lavoisier. 14p.

Columa. (1977). Les herbicides et le sol. ACTA. 14p.

Clontz. (2008). Microbial limit and bioburden tests: validation approaches and global requirements, illustrée.15p.

Darriet, F. (2007). Moustiquaire imprégnés et résistance des moustiques aux insecticides. Paris. IRD.30p.

Références bibliographiques

Davet, P et Raouzel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Paris. Quae 1997. 201p.

De Mot,R et De Schrijver, A.(1999). Degradation of Pesticides by Actinomycetes. 25(2):85-119.

De Schrijver,A et De Mot, R (2008). Degradation of Pesticides by Actinomycetes. Critical Reviews in Microbiology, 25:2, 85-119, DOI: 10.1080/10408419991299194.

Delarras, C. (2010). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux .france. lavoisier. 29p.

Delarras, C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche des bacteries de levure-moisissures. Lavoisier.113p.

Denis,F., Martin,C., Quentin,R., Bingen,E., Cecile., poly,M. (2007). biologie medicale. Elsevier.

Stora, D. (2013). Pharmacologie et therapeutique. Initiative santé.

Depti, G et Abhinav,M .(2015). Isolation and characterization of sulfosulfuron utilizing bacteria from weat cultivated soil. International journal of current microbiology and applied sciences. 4(8), 1049-1056.

Djabali, N et khelili, K. (2009). Contribution à l'étude de l'impact d'un fongicide (Dithiocarbamate de manganèse : Manèbe) sur quelques paramètres de la fertilité masculine chez le lapin : *Oryctolagus cuniculus*. volume 5. Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie.

Drenou, Ch. (2006). Les racines : face cachée des arbres. Paris. Foret privée française. 117p

FAO .(2005). Rendements par culture selon l'utilisation ou non de produits phytopharmaceutiques par rapport au rendement maximal.mentioné dans OGM et pesticide. [En ligne] (Page consultée le 04/2018). Sur <http://ogm-pesticides-tpe.e-monsite.com/pages/les-pesticides/les-avantages-et-les-inconvenients-des-pesticides.html>.

France ministère des affaires étrangères. (2002). Mémento de l'agronome. France. Quae. 705p.

Freneau, M. (2015). Etude de la degradatioe de photodegradation photochimique de matieres actives agrochimiques et de l'inhibition de ce phenomen. *these de doctorat en chimie-physique* . institut de chimie , clermont- ferrand.

Gauger,W. (1985). Characterisation of streptomycete growing on organophosphate and carbamate insecticides [en ligne], 15(137_141), (page consultée le 24/06/2018).

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF0159962>.

Références bibliographiques

Joffin, J. N et Leyral, G. (2001). Microbiologie .dictionnaire des technique .collection de biologie techniques. CRD bordeaux.105P.

Karant.N.G.K. (2002). Challenges of limiting pesticide residues in fresh vegetables. In : Food safety management in developing countries. France. Scientific Editors: food safety management in developing countries. 13p.

La data base de propamocarb . universite hertfordshire . [en ligne] (page consultée le 04/2018). sur <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1546.htm>.

Lachuer, E ., Gooya, R., Venard, M., Olivier, D ., Pinson, Ch. (2011). Les produits phytosanitaires : distribution et application les différentes méthodes de lutte et le choix d'un produit en lutte chimique 3^{ème} édition. Paris. Educagri. 172p.

L'édition du conseil de l'Europe. (1992). 7th pesticides : conseil et recommandation à l'usage des autorités nationales et autres ainsi qu'aux fabricants concernés par l'homologation des pesticides agricoles et non-agricoles.Allemagne- ISBN 92-871-1958

Libbey, J. (2002). progres en dertmato- allergologie. Volume 8 de progres en dermato-allergologie.118 p.-9.

Liu fang- yao. (2007). Biodegradation of methyl parathion by Acinetobacter radioresistens USTB-04. environmantal sciences, volume 19, 1257_1260.

Mager stellman, J0 (2002). Encyclopedie de securité et de santé au travail. Volume 2. Edition international labour organization. 29p.

Mathieu,C et Lozet,J. (2011). Dctionnaire encyclopédique de science du sol: avec index anglais-français.Paris,Newyork. Lavoisier. 457p.

Matsumura, F et Murti, K C.R. (2012). Biodegradation of pesticides. New York. Springer science and business media. 67p.

Mei-hsing .Chen et Wen-Chuan. (2010). Development of a semiselective medium for detection of Mycosphaerella pinodes in soil,plant debris and seed. Canadian journal of plant pathology. 32. Issue3.

Multigner, L. (2005). Effets retardés des pesticides sur la santé humaine environnement : risque et santé [en ligne], 4(3) (page consultée le 10/05/2018)

http://www.jle.com/fr/revues/ers/e_docs/effets_retardes_des_pesticides_sur_la_sante_humaine_265428_article_phtml.

Oecd. (2008). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques / Section 3: Dégradation et Accumulation Essai n° 316 : Phototransformation de produits chimiques dans l'eau – Photolyse directe . Oecd publishing. 22P.

Oskay, M., tamer, A.U et Azrei,C. (2004).antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils in Turkey. african journal of biotechnology. Volume 3 (9).pp 441-446.

Références bibliographiques

Patrigeon, G. (1887). Le mildiou (*peronospora viticola*) : son histoire naturelle son traitement suivi d'une description de l'erinose de la vigne (phytoctopes epidermi). Librairie agricole de la maison rustique. 37p.

Pesticide et agricole. Qu'est-ce qu'un fongicide ? [en ligne] (page consultée le 16/04/2018) sur <https://pesticidesetagriculture.wordpress.com/fongicides/>

Peter. (2004). Ecotoxicologie moleculaire : principes fondamentaux et perspectives de developpement. edition PUQ.115p.

Perkin, D. (2002). Neurologie manuel et atlas. Bruxelle. De Boeck Supérieur. 142p.

Pochon et tradieux. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol .Saint Mandé : la tour tourelle.

Pousset, J. (2003). Agricultures sans herbicides. France.France agricole.121P.

Ray,M et Harrison. (2001). pollution. causes. effects and control. Edition 04. The university of Brimingham.UK . 82p.

Regnault Roger, C. (2014). Produits de protection des plantes : innovation et sécurité pour une agriculture durable. France. Lavoisier. 136_137p.

Scribd. Pollution du sol par les pesticides et les engrais [en ligne] (page consultée le 18/02/2018)

[https://www.scribd.com/doc/...pollution_du_sol_par_les_pesticides_et_les_engrais.](https://www.scribd.com/doc/...pollution_du_sol_par_les_pesticides_et_les_engrais)

Sobhi, K. carbamates et pyrethrinoides. Cours toxicologie_5éme année pharmacie. Alger. 7_10_11p.

Subremaniam,G., Upadhyaya,H., Vadlamudi,S. (2012). Plant growth-promoting traits of biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere[en ligne], 1(71), (page consultée le 21/06/2018).

[http://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-1-71.](http://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-1-71)

Tofaza, I. (2017). Bacilli and Agrobiotechnology: *Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting*. Springer. 41p.

Valade, M. (1985). Le pou de l'homme : *pediculus humanus* Linné 1758 : observation biologique : évaluation de l'activité de différents insecticides. Paris sud. IRD. 197p.

Viala, P. (1893). Les maladies de la vigne 3éme édition. Paris. Librairie de l'école nationale d'agriculture.62p.

Vijay,D. (2013). Influence of physical parameters, such as pH and temperature on biodegradation of dimethoate by actinomycetes sp isolated from pesticide contaminated grape field soil from nashik, Maharashtra, India. international journal of scientific & engineering, volume 4 issue 11 november 2013.

Références bibliographiques

Wolternick, G et Tasheva, M. (2005). Centre for Substances and Integrated Risk Assessment, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands; and
2 National Center of Public Health Protections, Sofia, Bulgaria.420p.

Zengh ,C., Qu, B., Wang, J., Zhou,J et Lu,H. (2008). Isolation and characterisachion of a novel nitrobenzene-degrading bacterium with high salinity tolerance: *Micrococcus luteus*. Journal of hazardous materials. 165. 1_3p.

Annexes

Annexes

Annexe 1

Les milieux

Milieu Gélose Nutritive

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5g

Chlorure de sodium 5g

Agar 15g

Eau distillée 1000ml

Ph= 7.4 ± 2

Milieu Mineral Medium Salt

ZnSO₄ 0.01mg

MgSO₄.7H₂O 0.5g

CaCl₂.2H₂O 10mg

K₂HPO₄ 0.05g

(NH₄)SO₄ 0.5g

FeCl₃.H₂O 10 mg

Eau distillée 1000 ml

Ph = 7

Milieu ISP2

Extrait de levure 4g

Extrait de malt 10g

Glucose 4g

Eau distillée 1000ml

Ph =7.3

Annexes

Milieu isp9

(NH₄)SO₄ 2.64 g

K₂HPO₄. 2.38 g

K₂HPO₄.3H₂O 5.65 g

MgSO₄.2H₂O 1g

Solution Saline 1 ml

Eau distillée 1000ml

Ph=6.8 - 7.0

La Solution saline

CuSO₄.5H₂O 0.64g

FeSO₄.7H₂O 0.11g

MnCl₂.4H₂O 0.79g

ZnSO₄.7H₂O 0.15g

Eau distillée 100 ml

Les milieux des testes biochimique utilises

Milieu mannitol mobilité

Peptone 20 g

Nitrate de potassium 1g

Mannitol 2g

Rouge de phénol 40 mg

Agar 4 g

Eau distillée 1000 ml

Annexes

Ph = 8.1

Milieu citrate de Simmons

Citrate de sodium 1 g

Chlorure de sodium 5 g

Sulfate de magnesium 200mg

Dihydrogenophosphate d'ammonium 1 g

Monohydrogenophosphate de potassium 1g

Bleu de bromotymol 80 mg

Agar 13 g

Eau distillée 1000 ml

Ph = 6.8

Milieu triple sugariron bio-rad

Extrait de viande 3g

Extrait de levure 3g

Peptone 20 g

Chlorure de sodium 5 g

Lactose 10 g

Saccharose 10 g

Glucose 1 g

Sulfate ferreux ammoniacal 300 mg

Rouge de phénol 24 mg

Thiosulfate sodium anhydre 300 mg

Agar 11 g

Annexes

Eau distillée 1000 ml

Ph = 7.4

Annexe 2

Lecture des tests biochimiques

Test TSI :

- Pente jaune : fermentation du lactose et/ou du saccharose.
- Pente rouge : non fermentation du lactose et du saccharose.
- Culot jaune : fermentation du glucose.
- Culot rouge : pas de fermentation du glucose.
- Décollement de la gélose ou présence de poches gaz : production du CO₂.
- Couleur noire : production d'H₂S.

Utilisation de Citrate comme seule de carbone :

- Virage de l'indicateur au bleu cela correspond à l'alcalinisation du milieu, la souche est citrate positif.

Test mannitol mobilité :

- Pour le caractère mobilité :
 - Culture dans tout le milieu : souche mobile.
 - Culture le long de la pique : souche immobile.
- Pour l'utilisation de mannitol :
 - Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune ca veut dire qu'il ya une acidification du milieu, donc, mannitol positif.

Résumé

Résumé

Dans le but de rechercher des microorganismes tolérants le fongicide procure (72% propamocarb) et capables de l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie, un sol forestier (université des frères Mentouri, constantine1), traité par ce fongicide est utilisé pour l'isolement par enrichissement sur milieu Minimum Salt Medium (MSM) additionné du fongicide procure à la dose recommandée (1ml/l) comme seule source de carbone et d'énergie.

Aucune souche n'est capable d'utiliser ce fongicide comme seule source de carbone et d'énergie, mais deux souches peuvent tolérer sa présence à fortes concentrations (10 fois la dose recommandée) sur milieu GN. Les deux souches tolérantes du procure sont identifiées d'après leurs caractères cultureux, macroscopiques, microscopiques et biochimiques, qui permettent de les rapprochées aux deux genres : *Acinetobacter* et *Micrococcus*.

Dans le même but trois souches d'actinomycètes (A1, A6, A12) précédemment isolées par Mme ZERMANE.F (enseignante attachée de recherche) sont purifiées sur milieu ISP2 et approuvent une capacité à tolérer de forte concentration du fongicide étudié.

La dégradation du fongicide procure par les actinomycètes purifiées est estimée par mesure de leur croissance (DO) à 600 nm sur milieu ISP9 liquide additionné du fongicide procure comme seule source de carbone et d'énergie. Parmi les trois souches, la souche A1 présente une très bonne croissance sur ce fongicide par apport aux deux autres souches, qui est un indice de son potentiel élevé dans la dégradation du propamocarb et qui peut être de ce fait utilisée dans la bioremédiation des sols pollués par ce fongicide.

L'ensemble des caractères microscopiques et macroscopiques permet de rapprocher la souche A1, au genre *Streptomyces*.

Mots clés : pollution, procure, propamocarb, carbamates, fongicide biodégradation, tolérance

Abstract:

In order to search for microorganisms that are tolerant to the fungicide procures (72% Propamocarb) and able to use it as a single source of carbon and energy, a forest floor (University of the Mentouri brothers, constantine1) treated with this fungicide is used. For enrichment isolation on Minimum Salt Medium (MSM) supplemented with the fungicide provides the recommended dose (1ml / l) as the single source of carbon and energy.

No strain is able to use this fungicide as the single source of carbon and energy, but two strains can tolerate its presence in high concentrations (10 times the recommended rate) on GN medium. The two tolerant strains of the proces are identified according to their cultural, macroscopic, microscopic and biochemical characteristics, which allow the approximations to the two genera :*Acinetobacter* and *Micrococcus*.

For the same purpose, three strains of actinomycetes (A1, A6, A12) previously isolated by Mrs. ZERMANE.F (research associate professor) are purified on ISP2 medium and approve of a capacity to tolerate high concentration of the fungicide studied.

The degradation of the fungicide obtained by the purified actinomycetes is estimated by measurement of their growth (OD) at 600 nm on ISP9 liquid medium supplemented with the fungicide provides as single source of carbon and energy. Among the three strains, the strain A1 shows a very good growth on this fungicide by contribution to the two other strains, which is an index of its high potential in the degradation of propamocarb and which can be used for the bioremediation of polluted soils by this fungicide.

The set of microscopic and macroscopic characters makes it possible to compare the strain A1, to the genus *Streptomyces*.

Key words : pollution, procure, propamocarb, carbamates, biodegradation, fungicide, tolerance.

لهدف البحث عن كائنات مجهرية تتحمل المبيد الفطري بروكيور (72% برورباموكارب) و قادرة على استعماله كمصدر وحيد للكربون و الطاقة . التربة الغابية (جامعة منتوري – قسنطينة -) عولجت بالمبيد الفطري . للعزل عن طريق الاثراء في الوسط MSM باضافة المبيد الفطري وفق الجرعة الموصى بها كمصدر وحيد للكربون و الطاقة .

كل السلالات غير قادرة على استعمال المبيد الفطري كمصدر وحيد للكربون و الطاقة لكن سلالتين قادرتين على تحمل وجوده بتراكيز عالية (10 اضعاف الجرعة الموصى بها) على وسط السلالتين المتحملتين للبروكيور تم التعرف عليهما من خلال مميزاتهما الزراعية العيانية الميكروسوكيية و البيوكيميائية التي سمحت بتقريبهما الى نوعين : *Acinitobacter* و *Micrococcus*

لنفس الهدف السابق 3 سلالات من الاكتينومييسات (A1.A6.A12) تم عزلها مسبقا من طرف الاستاذة زرمان و تنقيتهم على الوسط ISP2 اثبتوا قدرتهم على تحمل التراكيز العالية من هذا المبيد الفطري .

تحليل المبيد الفطري من قبل الاكتينومييسات النقية مقدر بقياس نموهم على الوسط السائل مضافا بالمبيد الفطري بروكيور كمصدر وحيد للكربون و الطاقة . من بين هذه السلالات السلالة A1 التي تظهر نموا جيدا على هذا المبيد مقارنة بالاكينومييسات الاخرتين و هو مؤشر على قدرتها العالية في تحليل البروباموكارب و ربما بذلك استعماله في تطهير الاتربة الملوثة بهذا المبيد

مجموع المميزات المجهرية و العيانية سمحت بتقريب السلالة A6 من النوع *Streptomyces*

الكلمات المفتاحية : التلوث, البروباموكارب, بروكيور, كاربامات , التحليل البيولوجي , التحمل

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE MICROORGANISMES RÉSISTANTS
AU FONGICIDE PROCURE (72% PROPAMOCARB) ET CAPABLES DE
L'UTILISER COMME SEULE SOURCE DE CARBONE ET D'ÉNERGIE**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en microbiologie.

Résumé

Dans le but de rechercher des microorganismes tolérants le fongicide procure (72% Propamocarb) et capables de l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie, un sol forestier (université des frères Mentouri, Constantine1), traité par ce fongicide est utilisé pour l'isolement par enrichissement sur milieu Minimum Salt Medium (MSM) additionné du fongicide procure à la dose recommandée (1ml/l) comme seule source de carbone et d'énergie.

12 souches bactériennes sont isolées, parmi celles-ci, deux seulement sont capables de tolérer de fortes concentrations du fongicide étudié (la dose recommandée fois 10). Aucune souche n'est capable d'utiliser ce fongicide comme seule source de carbone et d'énergie. Les deux souches tolérantes du procure à forte concentration sont identifiées d'après leurs caractères culturels, macroscopiques, microscopiques et biochimiques, qui permettent de les rapprocher aux deux genres : *Acinetobacter* et *Micrococcus*.

Dans le même but trois souches d'actinomycètes (A1, A6, A12) précédemment isolées par Mme ZERMANE.F (enseignante attachée de recherche) sont purifiées sur milieu ISP2 et approuvent une capacité à tolérer de forte concentration du fongicide étudié.

La dégradation du fongicide procure par les actinomycètes purifiés est estimée par mesure de leur croissance (DO) à 600 nm sur milieu ISP9 liquide additionné du fongicide procure comme seule source de carbone et d'énergie. Parmi les trois souches, la souche A1 présente une très bonne croissance sur ce fongicide par rapport aux deux autres souches, qui est un indice de son potentiel élevé dans la dégradation du Propamocarb et qui peut être de ce fait utilisée dans la bioremédiation des sols pollués par ce fongicide.

L'ensemble des caractères microscopiques et macroscopiques permet de rapprocher la souche A1, au genre *Streptomyces*.

Mots clés : Pollution, Procure, Propamocarb, carbamates, fongicide, biodégradation, tolérance

Laboratoire de recherche : laboratoire 14

Jury d'évaluation :

Président du jury : *RIAH Nassira* (MC UFM Constantine1),
Rapporteur : *ZERMANE Feriel* (MA « A » - UFM Constantine1),
Examineur : *MERGOUD Lilia* (MA « A » - UFM Constantine1).

Date de soutenance : 01/07/2018