



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 a l'insecticide Actellic 50 EC (pyrimiphos-méthyl) et capables de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie

Présenté et soutenu par : *BEZZI Dounyazed*
BENSACI Chaima

Le : 18/07/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury : *ABDALAZZIZ Wided* (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : *ZERMANE Ferial* (MAA - UFM Constantine).

Examineurs : *MERGOUD Lilia* (MAA- UFM Constantine)

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné 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* *S* maitre assistante à l'université frères Mentouri, pour l'orientation, la confiance, la patience, ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.*

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

*Abdelaziz. *W* 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* *L* Maitre assistante à l'université Mentouri de Constantine d'avoir accepté d'examiner ce travail et faire partie du jury.*

*Merci à *Shebati* *S* l'ingénieur principale de laboratoire et pour tous 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 parents : kheireddine et chafika

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon 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.

À mon cher frère et ma chère sœur que j'aime profondément

Anfel

Mouhamedsouhaibcharafeddine

À mon Cher fiancé que J'aime

fares

*Et bien sur mes chères copines et mon agréable binôme *Doumyazed, sara , raniashouda**

Et souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréable que nous avons passé ensemble

Bensacichaima

Dédicace

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

Mes chers parents : Hourcine et Warda

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon 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.

À mes chères sœurs Najet, Nadia, Mimi, Lamia, Imen, Basma et Sarsenet ces enfants surtout ma princesse Joyjou

À mon frère Hassine

À mon Cher mari Boubakeur

Et bien sur mes chères copines et mes proches Phaima, Sara, Phaima, Fatima

Et souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréable que nous avons passé ensemble

Bessy Dounyazed

Table des matières

Liste des tableaux et des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Revue bibliographique.....3

I. Les organophosphorées.....3

- 1. Définition.....3
- 2. Classification.....3
- 3. Structure chimique.....3
- 4. Propriétés physicochimiques.....4
 - 4.1 Pyrimiphos-méthyl.....4
 - 4.2 Le chlorpyrifos (CPF).....5
 - 4.3 Le malathion.....7
 - 4.4 Le parathion.....8
- 5. Mode d'action.....10
 - 5.1 Activation.....10
 - 5.2 Action sur la synapse cholinergique : inhibition des cholinestérases.....10
 - 5.3 Mécanismes d'action associés.....11
 - 5.3.1 Effet sur d'autres systèmes enzymatiques.....11
- 6. Voie d'exposition.....11
 - 6.1 La voie digestive.....12
 - 6.2 Le contact cutané.....12
- 7. Devenir des pesticides organophosphorés dans l'environnement.....12
- 8. Biodégradation des pesticides organophosphorés.....13

II. Les insecticides organophosphorés les plus utilisés en Algérie.....14

III. ACTELLIC 50 EC (Pyrimiphos-méthyl).....16

- 1. Généralité.....16
- 2. Substance active : le Pyrimiphos-méthyl.....17
- 3. Caractéristiques physicochimiques.....18
- 4. Conditionnement.....18
- 5. Mécanisme d'action.....18

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6. | Toxicité..... | 18 |
| | Matériels et méthodes..... | 19 |
| I. | Isolement de microorganismes impliqués dans la biodégradation de l'insecticide Actellic 50 EC..... | 19 |
| 1. | Traitement du sol..... | 19 |
| 2. | Échantillonnage..... | 19 |
| 3. | Milieus et réactifs..... | 19 |
| 4. | Isolement des microorganismes de l'échantillon de sol..... | 20 |
| 5. | Purification des souches..... | 20 |
| 6. | Teste de tolérance des microorganismes isolées et purifiées vis-à-vis du l'insecticide Actellic 50 EC..... | 21 |
| 7. | Mise en évidence de la capacité des microorganismes tolérants à utiliser l'insecticide Actellic 50 EC comme seule source de carbone et d'énergie..... | 21 |
| 8. | Mise en évidence de la biodégradation de l'insecticide Actellic 50 EC par les souches capables de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie..... | 21 |
| 9. | Conservation des souches..... | 22 |
| II. | Identification présomptive des souches actives..... | 22 |
| 1. | Examen macroscopique..... | 22 |
| 2. | Examen microscopique..... | 22 |
| 2.1 | Examen à l'état frais..... | 22 |
| 2.2 | Examen après coloration du Gram..... | 22 |
| 2.3 | Technique de scotch..... | 23 |
| 2.4 | Examen après coloration au Lactophénol..... | 23 |
| 3. | Les tests biochimiques..... | 23 |
| 3.1 | La recherche de l'oxydase..... | 23 |
| 3.2 | La recherche de catalase..... | 24 |
| 3.3 | La recherche de la mobilité..... | 24 |
| 3.4 | Utilisation du citrate de Simmons comme source de carbone..... | 24 |
| 3.5 | Utilisation du Glucose, Lactose, Saccharose et la production de l'H ₂ S..... | 24 |
| 3.6 | Test de Clark et Lubs..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| Résultats et discussion..... | 26 |
| I. Recherche des microorganismes dégradants l'insecticide Actellic 50 EC | 26 |
| | 26 |
| 1. Isolements de microorganismes d'un sol contaminé par Actellic 50 EC..... | 26 |
| 2. Test de tolérance des microorganismes isolés vis-à-vis à l'insecticide Actellic 50 EC à différentes concentrations..... | 28 |
| 3. Etude de la capacité des microorganismes isolés à utiliser l'insecticide Actellic 50 EC comme seule source de carbone et d'énergie..... | 31 |
| 4. Mise en évidence de la dégradation du l'insecticide Actellic 50 EC par les souches actives..... | 33 |
| II. Identification présumptive des souches actives..... | 37 |
| 1. Aspect macroscopique..... | 38 |
| 2. Observation microscopique..... | 38 |
| - Etat frais..... | 38 |
| - Coloration de Gram..... | 39 |
| - Technique de coloration au Lactophenol et test de scotch..... | 40 |
| 3. Caractérisation biochimique..... | 41 |
| Conclusion..... | 46 |
| Référence bibliographiques..... | 47 |
| Annexes | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| التلخيص | |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Les insecticides organophosphorés disponible en Algérie..... | 15 |
| Tableau 2 : variation de la densité optique des souches B6 et B8 isolées sur milieu MSM additionnées de l'insecticides Actellic 50 EC..... | 33 |
| Tableau 3 : variation de densité optique du surnageant de la souche B6 au cour du temps | 35 |
| Tableau 4 : variation de densité optique du surnageant de la souche B8 au cour du temps | 36 |
| Tableau 5 : Aspect macroscopique des souches B6, B8..... | 38 |
| Tableau 6 : Aspect macroscopique de champignon C..... | 38 |
| Tableau 7 : Aspect microscopique des souches bactériennes isolées B6 et B8..... | 39 |
| Tableau 8 : Résultats de la coloration de Gram des souches bactériennes isolées, tolérantes (DR×10)..... | 39 |
| Tableau 9: Caractéristiques biochimiques des bactéries 6 et B8..... | 42 |
| Tableau 10 : Les principaux genres de la famille des entérobactéries..... | 44 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : structure commune aux esters organophosphorés..... | 4 |
| Figure 2 : structure chimique du chlorpyrifos..... | 6 |
| Figure 3 : structure chimique du malathion..... | 7 |
| Figure 4 : structure chimique du parathion..... | 9 |
| Figure 5 : mode d'action des organophosphorés..... | 11 |
| Figure 6 : insecticide Actellic 50 EC..... | 17 |
| Figure 7 : structure chimique du Pyrimiphos-méthyl..... | 17 |
| Figure 8 : l'insecticide Actellic 50 EC..... | 19 |
| Figure 9 : la dilution décimale..... | 20 |
| Figure 10 : la méthode d'étalement..... | 20 |
| Figure 11 : souche B1 isolée sur GN..... | 26 |
| Figure 12 : souche B1 isolée sur GN..... | 26 |
| Figure 13 : souche B2 isolée sur GN..... | 26 |
| Figure 14 : souche B3 isolée sur GN..... | 26 |
| Figure 15 : souche B4 isolée sur GN..... | 25 |
| Figure 16 : souche B5 isolée sur GN..... | 25 |
| Figure 15 : souche B6 isolée sur GN..... | 25 |
| Figure 17 : souche B7 isolée sur GN..... | 25 |
| Figure 18 : souche B8 isolée sur GN..... | 25 |
| Figure 19 : souche B9 isolée sur GN..... | 25 |
| Figure 20 : champignon C isolée sur Sabouraud..... | 25 |
| Figure 21 : souche B6 sur DR×2 d'Actellic..... | 29 |
| Figure 22 : souche B6 sur DR×5 d'Actellic..... | 29 |
| Figure 23 : souche B6 sur DR×10 d'Actellic..... | 29 |
| Figure 24 : souche B8 sur DR×2 d'Actellic..... | 30 |
| Figure 25 : souche B8 sur DR×5 d'Actellic..... | 30 |
| Figure 26 : souche B8 sur DR×10 d'Actellic..... | 30 |
| Figure 27 : champignon C sur DR×2 d'Actellic..... | 30 |
| Figure 28 : souche B1ensemencée sur MSM..... | 31 |
| Figure 29 : souche B6ensemencée sur MSM..... | 31 |
| Figure 30 : souche B7ensemencée sur MSM..... | 32 |
| Figure 31 : souche B8ensemencée sur MSM..... | 32 |
| Figure 32 : souche B9ensemencée sur MSM..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figure 33 : variation de la densité optique de la souche B6 au cours du temps en présence du l'insecticide Actellic 50 EC comme SSCE..... | 34 |
| Figure 34 : variation de la densité optique de la souche B8 au cours du temps en présence du l'insecticide Actellic 50 EC comme SSCE..... | 34 |
| Figure 35 : variation de la densité optique du surnageant de la souche B6 au cour du temps | 36 |
| Figure 36 : variation de la densité optique du surnageant de la souche B8 au cour du temps | 37 |
| Figure 37 : aspect microscopique des souches B6 et B8 après la coloration de Gram (G×100) | 39 |
| Figure 38 : aspect microscopique du champignon C..... | 40 |
| Figure 39 : observation microscopique du champignon C après coloration par Lactophénol | 40 |
| Figure 40 : observation microscopique du champignon <i>Aspergillus niger</i> | 41 |
| Figure 41 : B6 sur citrate de Simmons..... | 42 |
| Figure 42 : B8 sur citrate de Simmons..... | 42 |
| Figure 43 : B6 sur milieu mannitol mobilité..... | 43 |
| Figure 44 : B8 sur milieu mannitol mobilité..... | 43 |
| Figure 45 : B6 sur milieu TSI..... | 43 |
| Figure 46 : B8 sur milieu TSI..... | 43 |
| Figure 47 : test VP de B6..... | 43 |
| Figure 48 : test VP de B8..... | 43 |
| Figure 49 : test RM de B6..... | 44 |
| Figure 50 : test RM de B8..... | 44 |

Liste des abréviations

Ach : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérases

C : Composé

CL50 : Concentration létale pour 50% des individus

CPF : Chlorpyrifos

DL50 : Dose létale pour 50% des individus

DO : La densité optique

DR : La dose recommandée

EC : Concentré émulsifiable

FAO : organisation pour l'alimentation et l'agriculture

GN : Gélose nutritive

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée

MSM : Minimal Salt Medium

NTE : Neuropathy target esterase

OMS : Organisation mondial de santé

OP : Organophosphoré

PNS : Périphérique système nerveux

SNC : Système nerveux central

SSCE : Une seule source de carbone et d'énergie

Introduction

L'intensification de l'agriculture a engendré une utilisation croissante des fertilisants et des produits phytosanitaires due au progrès dans le domaine de la chimie organique de synthèse. Ces produits, qu'ils soient de synthèse ou naturels, sont destinés à limiter la prolifération des parasites tels que les mauvaises herbes, les insectes, les champignons, les rongeurs, les acariens... dans le but d'améliorer les rendements agricoles. **(Agoussar, 2017)**.

L'utilisation des pesticides (insecticides, herbicides, fongicides) en quantités de plus en plus importantes afin de surmonter les nécessités de nourriture réclamées par l'explosion démographique a entraîné l'augmentation de la pollution de l'environnement, notamment avec des insecticides organophosphorés. Ces substances toxiques possèdent un effet nocif contre les insectes et les mammifères, mais aussi présentent un danger important pour l'être humain, puisqu'elles agissent au niveau du système nerveux. **(Graziella, 2002)**.

Le code de conduite international sur la gestion des pesticides adopté par les états membres de la FAO dont l'Algérie, stipule la possibilité d'interdire l'importation, la distribution, la vente et l'achat de pesticides très dangereux, si les mesures de réduction des risques s'avèrent insuffisants pour garantir une manipulation du produit qui n'engendre aucun risque inacceptable pour l'homme et pour l'environnement. Partant de ce principe Il est donc impératif d'instaurer un débat sur l'utilisation des produits phytosanitaires en Algérie, bien au contraire on enregistre une utilisation quasi anarchique de ces produits par nos agriculteurs, ceci ne peut qu'engendrer des effets néfastes sur les produits eux-mêmes et sur la santé publique. **(Manseur, 2018)**.

Les pesticides organophosphorés sont des composés organiques contenant du phosphore et utilisés comme insecticide. Les insecticides organophosphorés se décomposent rapidement à la lumière du soleil et au contact de l'air et du sol, bien que l'on puisse en détecter des petites quantités dans les aliments et l'eau potable. **(Copyright, 2019)**. Le Pyrimiphos-méthyle est un pesticide organophosphoré peu coûteux largement utilisé dans le monde et en particulier en Afrique pour la protection des cultures et des produits alimentaires, Par conséquent, il est possible que ce composé affecte la santé reproductive de l'homme et de la faune dans leurs habitats naturels. **(African health science, 2007)**.

De ce fait, il est indispensable de mettre en place toutes les mesures nécessaires permettant de réduire ces transferts dans l'environnement en instaurant les bonnes pratiques agricoles et en

développant des techniques de traitement adaptées pour éliminer les résidus phytosanitaires dans des conditions contrôlées. (Agoussar, 2017).

Les traitements biologiques, qui sont souvent utilisés pour remédier à ce genre de problèmes se basent sur des organismes vivants pour dégrader un polluant donnée. Toutefois, l'efficacité des technologies connues pour ces traitements n'est pas satisfaisante pour tout type de pollution. (Agoussar, 2017).

Le but essentiel de notre travail est la recherche et l'isolement des microorganismes, qui tolèrent et utilisent l'insecticide Actellic50 EC (Pyrimiphos-méthyl) comme seul source de carbone et d'énergie, un pesticide organophosphoré, largement utilisé en Algérie et très peu étudié.

La partie bibliographique, comporte des informations sur les organophosphorés, ainsi que l'insecticide Actellic 50 EC.

La partie matériels et méthodes est basé sur :

- Isolement et la recherche des microorganismes capable de tolérer de fortes concentrations de l'insecticide Actellic 50 EC.
- La mise en évidence la capacité des microorganismes isolés, à dégrader et utiliser l'insecticide Actellic 50 EC comme seul source de carbone et d'énergie.
- Identification présomptive des souches actives.

Revue
bibliographique

I. Les organophosphorés

1. Définition

Les organophosphorés (OP) sont des pesticides utilisés en milieu agricole comme insecticides. Ils appartiennent à la famille chimique des anticholinestérasiques.

Ce sont des esters de l'acide phosphorique dont les noms de substances actives sont le plus souvent identifiables par leur terminaison en "phos" ou en "thion". (Aprifel, 2004)

Ce sont parmi les insecticides les plus toxiques utilisés aujourd'hui, ne sont pas persistants et ne bioaccumulent pas (Adam Olivier Brown, 2017)

Ce sont très toxiques pour les vertébrés et la plupart des substances actives sont chimiquement instables. (Merghid *et al.*, 2017)

2. Classification

A / selon le groupement phosphate

-Les organophosphorés aliphatiques : hautement toxique et peu stable tel que le formothion et le malathion.

-Les organophosphorés aromatiques : parmi les insecticides organophosphorés les plus toxiques et le plus stables tel que le bromophos et le parathion

-Les organophosphorés hétérocycliques : tel que le phosmet et l'isoxation.

B /selon la présence de l'atome de soufre

-les organophosphorés : absence de l'atome de soufre tel que le dichlorvos.

-les thio-organonophosphorés : présence d'un seul atome de soufre tel que le diazinon.

-les dithio-organonophosphorés : présence de deux atomes de soufre tel que le malathion.

(Ailgon *et al.*, 2010)

3. Structure chimique

Les insecticides organophosphorés sont du point de vue chimique, des esters ou des amides de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4). Leur formule générale a été défini par Schrader (figure.1) (Souley, 1987) qui est un chimiste allemand, spécialisé dans la découverte de nouveaux insecticides, mais il est surtout connu pour sa découverte accidentelle d'agents neurotoxiques et est parfois appelé «le père des agents neurotoxiques». (Copyright, 2019)

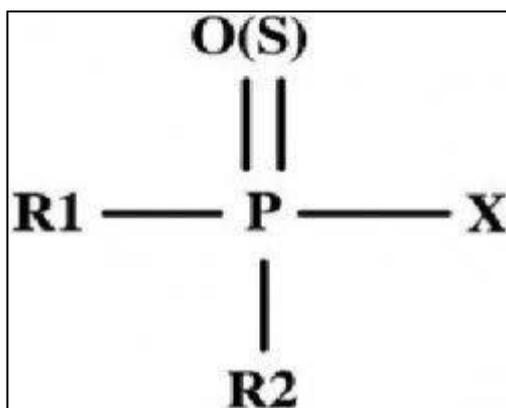


Figure 1 :Structure commune aux esters organophosphorés (Thabet *et al.*,2009)

R1 et R2 sont des groupements basiques, X est un groupement acide.

Une ou deux molécules d'oxygène peuvent être remplacées par le soufre pour donner des pyrothiophosphates, des phosphorothioates, des phosphorodithioates.

4. Propriété physicochimique

Les propriétés physico-chimiques (volatilité, stabilité, solubilité ...), la toxicité et le devenir dans l'environnement des OP sont très variables et dépendent de la nature des substituants (atomes de soufre, oxygène, chaînes latérales ...) liés à l'atome de phosphore et du type de liaisons (covalente ou double liaison) liant le ou les substituants à l'atome de phosphore (Hilaire, 2001).

Nous avons choisi de décrire les propriétés physico-chimiques et quelques propriétés de toxicité aiguë de quelques OP : Pyrimiphos-méthyl, le chlorpyrifos (CPF), le malathion et le parathion.

4.1 Pyrimiphos-méthyl

- **Utilisation** : Pyrimiphos-Méthyl 50 EC est un insecticide organophosphoré à large spectre possédant une action à la fois de contact et fumigante. Il est largement utilisé pour la protection des entrepôts et des cultures. Il inhibe la croissance des champignons, stérilise les bactéries et présente une activité contre un large spectre d'insectes ravageurs, y compris les fourmis, les pucerons, les coléoptères, les chenilles, les cafards, les puces, les mouches, les acariens, les moustiques et papillons de nuit. Il assure un contrôle durable des insectes ravageurs sur les surfaces inertes tels que le bois, les tapis et la maçonnerie et conserve son activité biologique lorsqu'il est appliqué aux produits agricoles stockés. (Darbouco, 2017)

- **Nom pour l'utilisation professionnelle :** Actellic 50 ec

- **Propriété physicochimique**

Masse moléculaire : 305.3

Solubilité dans l'eau : 5mg/l

Point de fusion : 20.8°C

La pression de vapeur dû à 30 °C est 1.333×10^{-2} PA

Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau à pH 7 et température 20 °C : 4.2 (élevé)
(Hertfordshire, 2018)

- **Persictanse :** la solubilité dans l'eau : 5 mg/l et peut être la même solubilité dans la plupart des solvants organiques. Il est facile de s'hydrolyser dans des milieux acides et alcalin forts. Il est instable à la lumière. La demi-vie est de trois jours dans le sol. (Copyright, 2019)

- **Toxicité :** Aiguë, DL₅₀ par voie orale chez les souris est 2050 mg/kg, chez le rat 1180 mg/kg, et pour les lapins 1150 ~ 2300 mg/kg .

DL₅₀ par voie cutanée aiguë chez les lapins est 2000 mg/kg min. Non irritant pour la peau et les yeux.

CL₅₀ à la carpe est 1.6 mg/L pendant 24h, 1.4 mg/L pendant 48h.

(Copyright, 2019)

4.2 Le chlorpyrifos

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

- **Noms pour l'utilisation professionnelle :** Dursban

Empire, Eradex, Lorsban, Paqeant, Piridane, Scout, et Stipend.

- **Structure chimique (figure .2)**

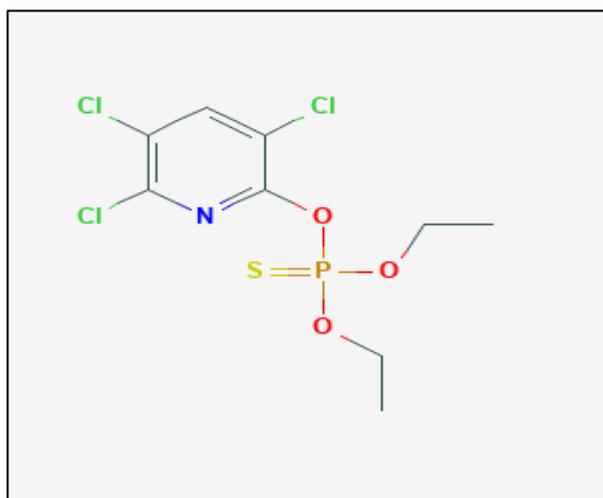


Figure 2 : structure chimique du chlorpyrifos (Braquenier,2009)

- **Formule moléculaire brute** : $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

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

- **Propriétés physiques** :

Masse moléculaire : 350,59.

Solubilité dans l'eau : 0,002 g/l à 20 °C.

Point de fusion : 41,5 °C.

La pression de vapeur du CPF est de $2,49 \times 10^{-3}$ Pa à 25°C

Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau : 4,82 à 5,11 (Élevé).

- **Persistence** : le CPF est fortement absorbé par le sol et sa persistance dans le sol va de deux semaines à un an en fonction du type de sol, de son pH et du climat (Wauchope *et al.*, 1992).

La vitesse d'hydrolyse du CPF dans l'eau augmente en fonction du pH et de la température ainsi qu'en présence de cuivre. Le temps de demi-vie dans l'eau à 25°C est de 35 à 48 jours (Howard *et al.*, 1995).

- **Limite de toxicité chez les animaux** : chez les mammifères, la toxicité aiguë est considérée comme modérée. En effet, chez les rongeurs, en fonction des sources, la DL_{50} (dose létale pour 50 % des individus) par voie orale chez le rat va de 82 à 270 mg/kg et de 60 mg/kg chez la souris. Chez les mammifères plus grands, la toxicité est plus modérée encore : chez le lapin, DL_{50} = 1000 mg/kg et chez le mouton 800 mg/kg (Gallow and Lawryk, 1991 ; Kidd and James, 1991).

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

DL₅₀ orale chez le canard 76 mg/kg, mais très toxique chez les oiseaux de petite taille:

DL₅₀ oral chez le pigeon : 10 mg/kg (Kidd and James, 1991 ; U.S. Environmental Protection Agency ,1991 ; Registration Standard, 1989). Par contre, la toxicité chez les organismes aquatiques est très élevée, tant chez les poissons que chez les invertébrés. Par exemple, après 48 heures d'exposition, la toxicité (CL₅₀;concentration létale pour 50% des individus) survient à des doses inférieures à 1µg/L (après48 heures). Pour les Daphnies (*Daphnia magna*) et de 0,009 mg/L (après 96heures). Pour la truite arc-en-ciel une accumulation du produit a été constatée dans les sédiments de rivières et dans les tissusdes organismes aquatiques (Racke, 1991 ; Schimmel, 1983). (Braquenier, 2009).

4.3 Le malathion

- **Utilisation** :le malathion est un pesticide organophosphoré largement utilisé dans le monde, il est employé comme insecticide en agriculture et en usage vétérinaire (Flessel *et al.*,1993) et appliqué pour l'extermination des poux chez l'homme. En tant qu'insecticide, le malathion est utilisé pour contrôler les pucerons, les mouches , les sauterelles , les poux , les fourmis , les araignées et les moustiques. Il est appliqué sur la luzerne, la trèfle, les pâturages, les récoltes, céréalières, le coton , le soja, les bettraves à sucre, le maïs, les haricots , les myrtilles et les myrtilles et la graines stockés à l'intérieur des maison (Roberts, 2002).
- **Nom pour utilisation professionnelle** :Riddex Cythion (Kemsan),Malathion 500 (United Agri Products), Gardex (Gardex Chemicals), Fyfanon®ULV (Cheminova).
- **Structure chimique (figure. 3)**

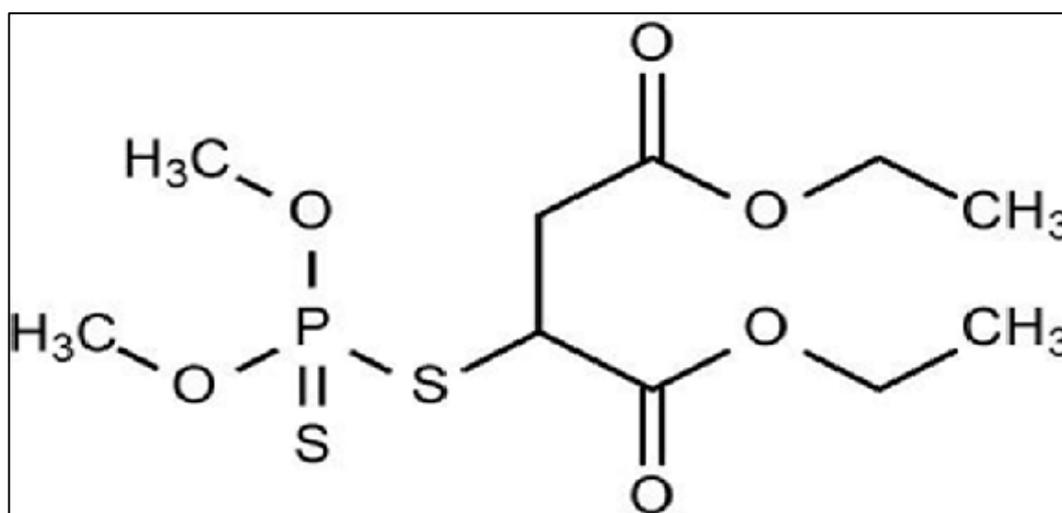


Figure :3 structure chimique du malathion (Ganash *et al.*,2016)

- **Formule moléculaire brute** : $C_{10}H_{19}O_6PS_2$
- **Nom chimique** : phosphorodithioate de S-5[1,2-bis(éthoxycarbonyl) éthyle] et de O,O-diméthyle
- **Groupe chimique** : organophosphoré
- **Type de pesticide** : acaricide et insecticide
-

- **Propriétés physiques**

Masse moléculaire : 330,36

Solubilité dans l'eau : 146,16 mg/l

Point de fusion : 2.43 °C

La pression de vapeur du malathion est de $1,2 \times 10^{-3}$ Pa

Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau : 2.84

- **Persistance** : la vitesse d'hydrolyse du malathion varie en fonction du pH, de la température et de la nature de l'eau (Zheng and Hwang, 2006 ; Druzina and Stegu, 2007) et de l'activité microbienne (Olevra-hernandez *et al.*, 2004). Sa demi-vie varie de 0.2 semaine (pH 8) à 21 semaine (pH 6), (Medina *et al.*, 1999).

- **Toxicité humaine** : la méthode spécifique dicarboxylé du malathion a été mise en évidence dans près de $\frac{3}{4}$ d'urines de la population générale (concentration maximale : 107 μ g/l). A la suite d'expositions professionnelles, les concentrations urinaires du métabolite également spécifique monocarboxylé étaient comprises entre 3 et plus de 20 mg/l. Dans d'autres cas mortels, le malathion a été mis en évidence à des concentrations pouvant atteindre plus de 500 mg/l de sang et près de 200 mg/l d'urine.

4.4 Le parathion

- **Utilisation** : le parathion est un insecticide organophosphoré non systématique. Il est largement utilisé dans l'agriculture pour contrôler les insectes de fruit, vignes, le houblon, le coton et cultures.
- **Nom pour utilisation professionnelle** : ethylparathion, DNTP, parathion-méthyle, A-Gro, Azofos, Azaophos, bladon-M, Dalf, Devithion, dimrthylparathion.

- **Formule moléculaire brute** : $C_{10}H_{14}NO_5PS$
- **Structure chimique (figure .4)**

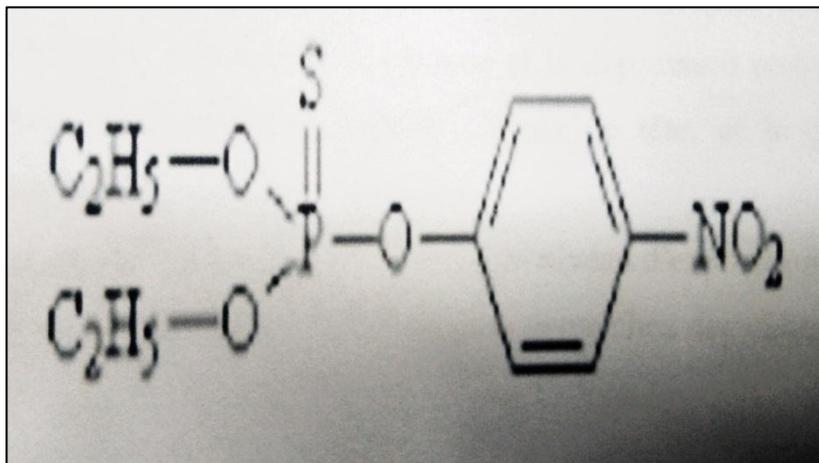


Figure 4 : structure chimique du parathion (Merrouche *et al.*,2016)

- **Nom chimiques** :O,O-diethyl-o(4-nitrophenyl)phosphorothioate

- **Propriétés physiques**

Masse moléculaire : 291,27 mg

Solubilité dans l'eau : Solubilité dans l'eau : 55 – 60 mg/l (20°C) ; soluble dans la plupart des Solvants organiques ; légèrement solubles dans le pétrole et les huiles minérales

Point de fusion : 35 – 36 °C

La pression de vapeur : 0,41 mPa (25°C)

Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau : 3 – 3,43

- **Persistance**

Les taux d'évaporation du parathion-méthyl à partir des champs de coton traités ont été mesurés après une opération de pulvérisation pendant 12 heures (12,6 mg/litre) et 24 heures (0,2 mg/litre).

- **Toxicité humaine**

le parathion est l'un des organophosphorés le plus toxique, la dose excessive humaine fatale est survenue par ingestion , inhalation ,contacte oculaire et dermique. Des doses orale dans la gamme de 120-900 mg ont été mortels ; toutefois les individus ont survécus beaucoup plus élevé rapporté des doses dans la plage de 20 à 40 g. La dose létale minimale pour un être humain était 0.171

mg/kg par voie orale. La dose orale létale minimale estimée varie de moins de 10 mg à 120 mg. Les concentrations plasmatiques de parathion dans ces mortelles ont été dans la gamme de 0.5-34 mg/l.

Le parathion déprime l'activité soit pseudo-cholinestérase plasma (AChE) ou rouge sang acétylcholinestérase cellulaire (AChE). Niveau ChE plasma semble être un sensible indice de l'exposition et peut être mieux corrélée avec les effets cliniques que les concentrations de sang. Parmi les symptômes d'empoisonnement, le système nerveux central (SNC) et périphérique système nerveux (PNS), la dépression cardiaque et la dépression respiratoire, dyspnée, fourmillements, faiblesse, nausées, vomissements, myosis, maux de tête, et le coma ont été signalés. Les symptômes peuvent être retardés jusqu'à 12h. Dans les lieux de travail, un niveau acceptable lors d'un niveau d'exposition de l'opérateur (NAEO), établi à partir de la courte étude à long terme chez des volontaires humains est de 0,006 mg/kg. (Merrouche *et al.*, 2016)

5. Mode d'action

Les organophosphorés (OP) sont des toxiques létaux, à action symétrique prédominante, dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition irréversible des cholinestérases (Sidell *et al.*, 1992). Cliniquement, l'accumulation d'acétylcholine provoque une réponse exagérée des récepteurs cholinergiques, qui peut conduire à des convulsions ou des troubles respiratoires.

5.1 Activation

Après absorption, de nombreux OP doivent être activés par des oxydases, des hydrolases et des transférases au niveau hépatique avant d'être toxiques pour l'homme (Hayes, 1982), la connaissance de ces mécanismes permettant de déterminer le délai d'apparition des manifestations toxiques.

5.2 Action sur la synapse cholinergique : inhibition des cholinestérases

Les OP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérases que ce soient les acétylcholinestérases du système nerveux central, des muscles et des globules rouges ou les pseudo-cholinestérases du système nerveux central et plasmatiques. Même si une faible quantité franchit la barrière hématoencéphalique, elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité cholinestérasique (Blanchet *et al.*, 1991). Les OP viennent occuper en phosphorylant le site estérasique de l'enzyme, s'opposant

ainsi à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et en acide acétique. L'enzyme, ne pouvant plus être hydrolysée, vieillit et devient non fonctionnelle et non réactivable : à ce moment-là, le processus est irréversible. Seule la synthèse de nouvelles cholinestérases permettra le retour à une activité fonctionnelle normale. Cette difficulté, voire impossibilité de réactivation des cholinestérases différencie les intoxications par OP de celles par les carbamates au cours desquelles les cholinestérases sont spontanément et rapidement réactivées.

Voilà pourquoi les OP présentent une haute toxicité lors d'accidents ou l'exposition à lieu à hautes doses (**figure .5**) (Aligon *et al.*, 2010).

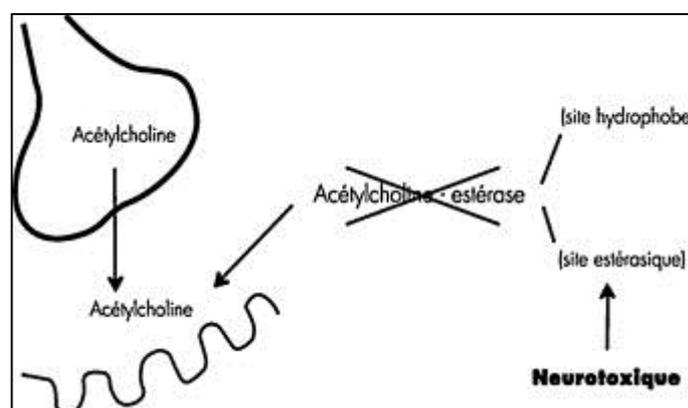


Figure 5 : Mode d'action des organophosphorés (Jalady *et al.*.,2013)

5.3 Mécanismes d'action associés

5.3.1 Effet sur d'autres systèmes enzymatiques

Certains OP peuvent phosphoryler une protéine du système nerveux central, la neuropathy target esterase (NTE) encore dénommée estérase neurotoxique en raison de ses propriétés neurotoxiques. Cette enzyme se retrouve également dans les leucocytes et les plaquettes. (Saïssy *et al.*, 1999).

6. Les voies d'exposition

Les insecticides organophosphorés pénètrent aisément l'organisme par toutes les voies d'absorption : digestive, pulmonaire ou cutanée, l'absorption pulmonaire est possible, notamment chez l'homme dans le cas des organophosphorés volatiles. Chez les animaux, que ce soit en thérapeutique ou en toxicologie, nous pouvons limiter le problème à deux principales voies d'absorption : la voie digestive et la voie cutanée . (Souley, 1987).

6.1 La voie digestive

Les insecticides organophosphorés sont rapidement résorbés et sont décelables dans le sang moins d'une demi heure après . Lors de l'absorption intestinale le pH du milieu joue un grand rôle. Suivant sa valeur, il se produit une hydrolyse plus ou moins grande. La vitesse d'hydrolyse, mais aussi la nature des alcools et phénols libérés est donc variable , et ce phénomène peut avoir des conséquences toxicologiques importantes. **(Souley, 1987).**

6.2 Le contact cutané

Le contact cutané est important aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Chez l'homme des intoxications ont été fréquemment observées chez les ouvriers manipulant des insecticides agricoles. Le passage transcutané de ces produits est utilisé pour le traitement de certaines parasitoses internes par application externe. La vitesse et l'intensité de la pénétration transcutanée augmentent de façon notable avec la température ambiante , qui constitue de ce fait un facteur favorisant des intoxications. De la même manière les insecticides organophosphorés traversent facilement la cuticule des insectes et autres parasites. **(Souley, 1987).**

7. Devenir des pesticides organophosphorés dans l'environnement

La dégradation des pesticides peut se faire de manière abiotique ou par les êtres vivants tels que les mammifères, les insectes, les plantes et les microorganismes **(Savadogo,2001)**

Un composé OP peut, dans l'environnement, être éliminé ou au contraire être concentré ou accumulé. L'élimination peut être due à un ou plusieurs facteurs tels l'adsorption (Tsezos et Wornj, 1991), la volatilisation, l'évaporation, la photooxydation, la dégradation chimique (Anderson, 1989; Schwarzenbach *et al.*, 1993), la dégradation biologique (Ahmad *et al.*,1979) indiquent que la dégradation de trois composés OP pesticides (fonofos, phorate et terbufos) est influencée par plusieurs facteurs : pH , composition du milieu réactionnel, taux d'humidité, luminosité, température.(Lydy *et al.*,1990) ont étudié l'effet de trois paramètres (pH, température, sédiments) sur la dégradation et la toxicité (chez la larve *Chironomus riparius*) du parathion en milieux aqueux, ils concluent que la température est le facteur le plus influent sur la dégradation du parathion dont le taux de transformation en paraoxon augmente avec la température (valeurs testées 10, 20 et 30°C). En contrepartie, le pH (valeurs testées 4, 6 et 8) a peu d'influence sur la dégradation. (Chapman et Harris, 1980) constatent lors de l'étude de la persistance de trois composés OP (terbufos, terbufos sulfoxyde et terbufos sulfone) dans le sol que la volatilisation serait le facteur majeur d'élimination du terbufos. Le rôle de la volatilisation est très variable selon les composés OP. **(Hilaire,2001).**

8. Biodégradation des pesticides organophosphorés

La dégradation par les microorganismes est le phénomène le plus important dans l'élimination des pesticides du sol.

La dégradation des pesticides organophosphorés dans le sol est souvent due à l'action des microorganismes (Alasdair *et al.*, 1978). Une bactérie isolée des effluents industriels est classée dans le genre *Pseudomonas* a été capable de dégrader le malathion. (Savado, 2001).

Les travaux relatifs à la dégradation biologique des composés OP pesticides s'attachent principalement à déterminer la durée de vie du composé OP dans l'environnement, d'identifier les paramètres physico-chimiques et les micro-organismes qui influent sur le devenir du produit dans l'environnement. Ces travaux présentent à la fois des intérêts économiques (Forrest *et al.*, 1981) et scientifiques :

Economiques dans la mesure où un composé OP pesticide biodégradé très rapidement devient inefficace et ne remplit plus son rôle protecteur des récoltes, ce qui implique des surcoûts dus à l'augmentation des doses ou à l'application d'un traitement avec un nouveau pesticide. (Forrest *et al.*, 1981) ont décrit la perte d'efficacité du diazinon contre le puceron des salades. Après avoir suspecté dans un premier temps la résistance du puceron au diazinon (pesticides OP), ils ont mis en évidence que l'utilisation répétée de cet insecticide pendant trois ans avait sélectionné une population microbienne capable de le dégrader.

Scientifiques car il est important de déterminer les mécanismes de dégradation des composés OP par les micro-organismes, d'identifier les sites d'attaque, les voies métaboliques impliquées et les produits de dégradation. Toutes ces données sont nécessaires pour évaluer la durée de vie des composés OP et leur incidence sur l'environnement. Elles peuvent également aider à la recherche de nouvelles formulations mieux adaptées à l'environnement. (Savado, 2001).

II. Les insecticides organophosphorés les plus utilisés en Algérie

liste des produits insecticides organophosphorés disponibles en Algérie. (Tableau 1)

Tableau 1 : Les insecticides organophosphorés disponibles en Algérie

| Application commerciale | Description | Substance active | Teneur en substance |
|-------------------------|--|-----------------------|---------------------|
| Actellic 50 EC | ACTELIC appartenant à la famille des organophosphorés, il détruit tout insecte nuisible et possède une action de contact et de vapeur. A large spectre d'ACTELIC 50 EC lutte efficacement contre une variété d'insectes volants et rampants. il est inhibiteur de la Cholinestérase. utilisé pour la protection des denrées stockées et la désinfection des locaux de stockage | PYRIMIPHOS – METHYL | 50 g/l |
| PHOSAL 500 | PHOSAL appartenant à la famille des organophosphorés, agit par contact et par vapeurs sur un grand nombre d'insectes nuisibles des grains entreposés. il est inhibiteur de la Cholinestérase. Assure la protection des grains stockés | PYRIMIPHOS – METHYL | 500 g/l |
| ZOLONE 4% | ZOLONE 4% fait partie de la famille des organophosphorés, c'est un insecticide polyvalent, spécifique au palmier dattier, agissant sur un nombre assez large de ravageurs, il agit par contact et ingestion sur les insectes, dont il inhibe la Cholinestérase | PHOSALONE | 4% |
| DURSBAN 5% P | le DURSBAN 5% P est un insecticide appartenant à la famille des organophosphorés, il se présente sous la forme d'une poudre p, il est utilisé aussi bien en agriculture. Le DURSBAN 5% P inhibe la Cholinestérase | CHLORPYRIPH OSE-ETHYL | 5% |

| | | | |
|-------------------------|--|------------------------------|--|
| FENI-TOX-AERO | <p>Le FENO-TOX-AERO est un insecticide de la famille des organophosphorés, il est composé de l'association de deux matière actives complémentaires, le fenitrothion et le dichlorovos, d'où une plus grande efficacité.</p> <p>C'est un prouduit utilisé en hygiène publique pour la désinsectisation</p> | Fenitrothion + Dichlorvos | 15 g/l de fenitrothion + 5g/l de dichlorvos |
| PIRIGRAIN 50 | <p>PIRIGRAIN 50 est un insecticide organophosphoré prêt à l'emploi, à utiliser en nébulisation pour la désinsectisation des denrées entreposées.</p> <p>Produit phytopharmaceutique.</p> <p>Assure une protection à longue durée des céréales (blé tendre, sorgho, orge, blé dur, avoine, orge de brasserie...)</p> <p>PIRIGRAIN 50 inhibe la Cholinestérase</p> | PYRIMIPHOS – METHYL | 50 g/l |
| Pirimiphos-Méthyl 50 EC | <p>Pirimiphos-Méthyl 50 EC est un insecticide organophosphoré à large spectre.il agit par contact et d'inhalation sur les insectes, dont il inhibe la Cholinestérase. Il inhibe la croissance des champignons, stérilise les bactéries et présente une activité contre un large spectre d'insectes ravageurs</p> | PYRIMIPHOS – METHYL | 500 g/l |

III. ACTELLIC 50 EC (Pyrimiphos-méthyl)

1. Généralité

Pyrimiphos-méthyl est un adulticide/larvicide. Il peut être appliqué soit avec de l'eau, soit avec du gasoil. L'Actellic est un composé organophosphoré utilisé pour combattre les insectes nuisibles y compris les moustiques, les mouches, les cafards, les puces, les fourmis, les poux et les scarabées. Les insectes sont tués par contact, par ingestion ou par fumigation. C'est également efficace contre les insectes qui résistent à l'organochlorine et aux organophosphates chimiques tel que le Malathion. L'Actellic a une faible toxicité pour les mammifères et peut être utilisé pour la désinfection des locaux domestiques, industriels et des établissements de restauration, des magasins de nourriture et des établissements d'éducation. Quant il est utilisé dans les bâtiments et les locaux domestiques, Actellic persiste sur les murs, les sols et d'autres surfaces inertes pour donner une protection résiduelle à long terme. L'Actellic peut aussi être utilisé pour désinfecter les plages, les décharges d'ordures et le bois nouveau ou chevronné.

De plus Actellic a été évalué avec succès par l'OMS comme un larvicide de moustique et comme un pulvérisateur résiduel pour lutter contre le vecteur de paludisme. Son mode d'action se fait par inhibition de la cholinestérase. Actellic est disponible, facile à utiliser sous forme de formulations émulsifiables concentrées contenant soit 500 g par litre (50 EC) soit 250 g par litre (25 EC). (Diallo, 2006)

ACTELLIC 50 EC est un insecticide destiné à la lutte contre les parasites des cultures de plein champ, des cultures fourragères et des cultures en entrepôt. Les insectes sont détruits par contact, ingestion ou fumigation (**figure. 6**).



Figure 6 : l'insecticide ACTELLIC 50 EC

2. Substance active : le Pyrimiphos-méthyl

Formule générale $C_{11}H_{21}N_3O_3P$

Pyrimiphos-méthyl est un OP portant deux atomes d'azote dans le noyau (diazine), une amine secondaire, et un groupement phosphosulfuré. (**figure.7**)

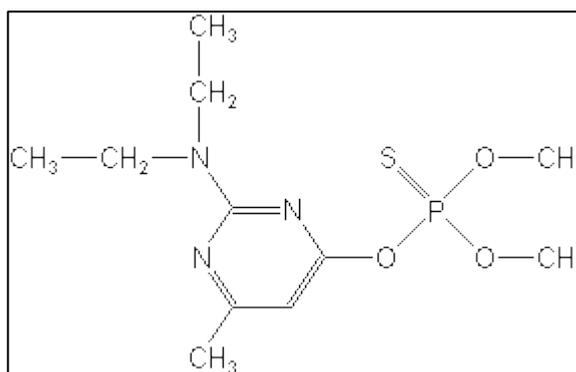


Figure 7 : structure chimique du Pyrimiphos-méthyl

(O-2 diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl O, O dimethylphosphorothioate) (Nouryon, 2018).

3. Caractéristiques physicochimiques

Le produit se présente sous forme liquide, de couleur blanche, Sa densité est de 1,03 g/ml.

- **Pression de vapeur**

1.2 X 10⁴ Torr à 25 °C

5.1 X 10⁴ Torr à 40 °C

- **Solubilité dans l'eau**

Environ, 5 ppm à 30 °C

- **Formulation**

EC : Concentré émulsifiable

- **Mixibilité**

Miscible dans les solvants organiques comme (alcool, cétone, ester, isoparaffine, hydrocarbure aromatique). (Diallo, 2006).

- **Stabilité**

Stable à la température ambiante, la demi-vie est environ 3 mois à 50 °C. La décomposition se fait à une température supérieure à 100 °C. Hydrolysé par les acides forts et les Alkalis (bases), l'hydrolyse est accélérée par les rayons solaires. (Diallo, 2006).

4. Conditionnement

Actellic ® 50 EC : existe en carton de 12×1 litre, et 4×5 litres. Un litre d'Actellic 50 EC contient 500 g de Pyrimiphos-méthyl. (Diallo, 2006).

5. Mécanisme d'action

Perturbation des canaux sodiques entraînant le blocage de la transmission de l'influx nerveux. Il agit par contact, par ingestion, et par inhalation. (Diallo, 2006)

6. Toxicité

Toxicité orale précise DL50 rat mâle = 1522 mg/kg ; DL50 rat femelle = 1532 mg/kg.

Toxicité dermique aiguë, DL50 > 2000 mg/kg de rat.

Toxicité inhalation aiguë, légèrement irritant pour la peau, modérément irritant pour les yeux, non sensibilisant. Pour une exposition à long terme, il n'y a pas de risque pour l'homme sous condition de manipulation et d'utilisation normale. (Diallo, 2006)

Matériels et méthodes

I. Isolement de microorganismes impliqués dans la biodégradation de l'insecticide Actellic 50 EC

1. Milieux et réactifs

Milieu GN (gélose nutritive) pour l'isolement des bactéries (annexe 1).

Milieu Sabouraud pour l'isolement des champignons (annexe 1).

L'insecticide Actellic 50 EC (500 g/l pyrimiphos-méthyl) a été obtenue à partir d'un magasin des produits phytosanitaires à Harouch, Skikda.

Le milieu Minimal Salt Medium (MSM) (annexe 1), additionné de l'insecticide Actellic 50 EC est utilisé pour tester la capacité des isolats à utiliser cet insecticide comme seule source de carbone et d'énergie.

2. Traitement du sol

Le 21 avril, trois zones différentes de 50cm² situées à l'université des frères Mentouri Constantine 1, ont été traitées superficiellement par l'insecticide Actellic 50 EC (500 g/l Pyrimiphos-méthyl) à la dose recommandée (10 ml/l).



Figure 08 : L'insecticide Actellic 50EC

3. Échantillonnage

Après un mois de traitement du sol par l'insecticide Actellic 50 EC, les dix premiers centimètres du sol sont écartés, puis à l'aide d'une spatule stérile, 200 g du sol est prélevé et récupéré dans un flacon stérile (Ortiz-Hernández et Sánchez-Salinas, 2010).

4. Méthode d'isolement

Un gramme de sol est ajouté stérilement à 10 ml d'eau distillée stérile, puis agitée vigoureusement. À partir de cette solution mère, une série de dilutions décimales jusqu'à la dilution 10^{-5} est effectuée (figure.9) (Adawiah, 2008).

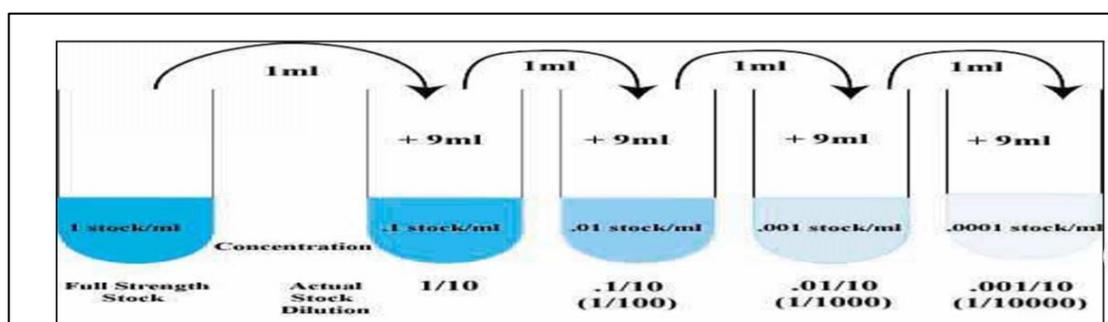


Figure 09 : Dilutions décimales

Ensuite, 0.1 ml de chaque dilution ont été étalés sur des milieux solides (GN et Sabouraud), puis incubé à 35 °C jusqu'à l'apparition des colonies.(figure.10) (Adawiah, 2008).

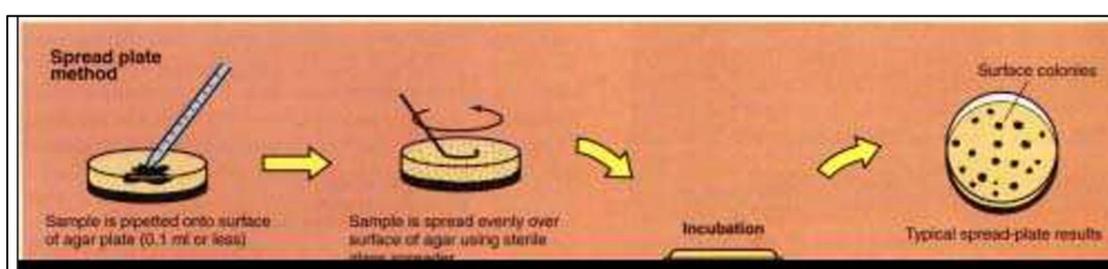


Figure 10 : Méthode d'ensemencement

5. Purification des souches

Les colonies ayant poussées sur milieu GN et Sabouraud sont repiquées plusieurs fois sur les mêmes milieux jusqu'à la purification.

6. Test de tolérance des microorganismes isolés vis-à-vis à l'insecticide Actellic 50 EC à différentes concentrations

Les microorganismes isolés, sont ensemencés en surface sur milieu GN pour les bactéries et sur milieu Sabouraud pour les champignons, additionnés de l'insecticide Actellic 50 EC, à différentes doses :

A la dose recommandée (DR) (10 ml/l) :

- 1) A la DR fois 2
- 2) A la DR fois 5
- 3) A la DR fois 10

L'incubation est faite à 35°C pendant 24-48 heures pour les bactéries et à 28°C pendant 5 jours pour le champignon.

7. Etude de la capacité des microorganismes isolés à utiliser l'insecticide Actellic 50 EC comme seule source de carbone et d'énergie

Les microorganismes sont ensemencés sur milieu MSM solide additionné du même insecticide comme seule source de carbone et d'énergie puis incubés à 35 °C pendant 24-48 heures.

8. Mise en évidence de la biodégradation de l'insecticide Actellic 50EC par les souches capables de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie

Pour chaque souches, un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu MSM et additionnée de l'insecticide Actellic 50 EC (10 ml/L) est ensemencée à raison de 10% (v/v), puis incubée à 35°C sous agitation (150 tours/min) en obscurité.

Des prélèvements périodiques, sont effectués après 2h, 6h, 18h, 24h, 72h, 84h, 96h, 120h, 144h, 168h et 192h.

La capacité des isolats à dégrader l'insecticide Actellic 50 EC est estimée d'une part par la mesure de leur croissance (DO) à 600 nm. (**Munazza et al., 2005**) et d'autres part par la mesure de la DO des surnageants (centrifugation des cultures à 5000 tpm pendant 30 min) à 254 nm. (**Tamilselvan et al., 2014**).

9. Conservation des souches

Les souches actives sontensemencées sur milieu GN incliné, puis incubées à 35°C pendant 24 à 48 heures et conservées à 4 °C.

II. Identification présumptive des souches actives

Dans cette étape, les microorganismes qui sont capable d'utiliser l'insecticide Actellic 50 EC comme SSCE, sont caractérisés par des examens macroscopique, microscopique et quelques testes biochimiques.

1. Examen macroscopique

- Pour les bactéries, la forme des colonies, la taille, la couleur, la pigmentation, l'élévation, le contour, l'opacité sont déterminés par observation directe à l'œil nu.
- Pour les champignons, l'observation macroscopique permet de déterminer l'aspect des colonies, la couleur, la forme, la taille, le revers, le relief et la diffusion des pigments.

2. Examen microscopique

Cette observation 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 (bactéries), technique de scotch et coloration au Lactophénol (champignon).

2.1. Examen à l'état frais

Une observation microscopique des bactéries vivantes est effectuée à l'objectif X 40.

2.2. Examen après coloration de Gram

Il est réalisé selon le protocole classique :

- La préparation d'un frottis : étalement d'une colonie bactérienne avec une goutte d'eau distillé, puis séchage à l'air libre et fixation à la flamme du bec benzène.

- La coloration de frottis :
 - Par le violet de gentiane pendant 30 secondes, puis rinçage.
 - La fixation au lugol pendant 20 secondes, puis rinçage.
 - Décoloration rapide à l'alcool 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 plus une goutte de KOH, à l'aide d'une anse de platine la formation d'un filament est vérifiée :
 - Formation de filament : Gram négatif.
 - Pas de filament : Gram positif.

2.3. Technique de scotch

Un morceau de scotch est fixé sur une colonie du champignon, puis déposé sur une lame et observé à l'objectif X 40.

2.4. Examen après coloration au Lactophénol

Sur une lame, une goutte de Lactophénol est déposée plus un morceau de la colonie du champignon, puis recouverte par une lamelle et observé à l'objectif X40.

3. Tests biochimiques

3.1. Recherche de l'oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente chez certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Ce test est basé sur la capacité d'une bactérie de produire une enzyme oxydase intercellulaire.

Sur une lame, un disque d'oxydase est déposée, puis une goutte d'eau distillée est ajoutée en plus de la colonie bactérienne à tester qui est parfaitement isolée.

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

3.2. Recherche de catalase

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène.

Sur une lame, une colonie bactérienne est déposée, plus une goutte de H₂O₂, le résultat est positif s'il y'a une observation des bulles d'airs (**Clontz, 2008**).

3.3. Recherche de la mobilité

La mobilité des bactéries est réalisée sur milieu mannitol mobilité nitrates. L'ensemencement est fait par une piqure centrale au tube. L'incubation se fait pendant 24 heures à 35 °C (**Delarras, 2010**).

3.4. Utilisation du citrate de Simmons comme source de carbone

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate. Les bactéries qui poussent sur ce milieu, sont seules qui ont la capacité de dégrader le citrate.

L'incubation se fait pendant 24 heures à 35 °C.

3.5. Utilisation du Glucose, Lactose, Saccharose et la production de l'H₂S

Le milieu Triple Sugar Iron (TSI) proposé par (**Hajana, 1945**), principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des *Entérobactéries* et des *Salmonella*. Il permet de mettre en évidence en 24 heures l'attaque du glucose, du lactose et/ou saccharose ainsi que la production de sulfure d'hydrogène et du gaz. L'incubation se fait pendant 24 heures à 35 °C (**Delarras, 2010**).

3.6. Test RM et VP

Le milieu Clark et Lubs est un milieu liquide. Il permet d'étudier une voie de fermentation du glucose : la voie du butane diol. L'étude de cette voie permet de différencier les bactéries de la famille des Entérobactérie (bacilles Gram négative, oxydase négative). L'ensemencement est effectué par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne au milieu, puis incubé à 35°C pendant 24 heures.

Après vérification de la culture (milieu trouble) :

- Transverse la moitié de milieu Clark et Lubs (souche B6 et B8) dans un tube stérile, et Ajouter 1 goutte de rouge de méthyle (test RM).

- Transverse la moitié de milieu Clark et Lubs (souche B6 et B8) dans un tube stérile et ajouter les réactifs VPI et VPII agiter et incliner le tube pour favoriser l'aération du milieu.

Attendre **10 min** avant de conclure que le résultat est négatif.

Résultats et discussion

I. Recherche des microorganismes dégradants l'insecticide Actellic 50 EC

1. Isolements et purification des microorganismes d'un sol contaminé par Actellic 50 EC

Après incubation, neuf colonies bactériennes (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 et B9) sont isolées et purifiées sur le milieu GN (**figure 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19**) et une seule colonie de champignon (C) est isolée et purifiée sur le milieu Sabouraud. (**Figure. 20**).

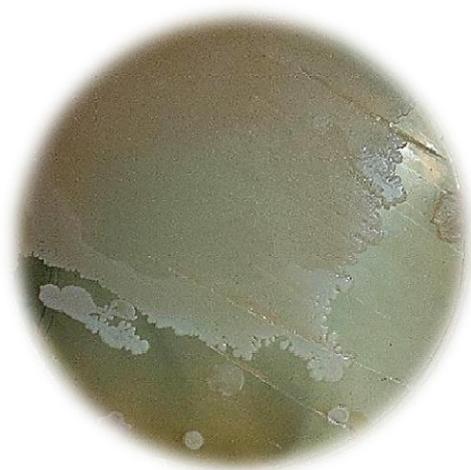


Figure 11 : souche B1 isolée sur GN



Figure 12 : souche B2 isolée sur GN



Figure 13 : souche B3 isolée sur GN



Figure 14 : souche B4 isolée sur GN



Figure 15 : souche B5 isolée sur GN



Figure 16 : souche B6 isolée sur GN

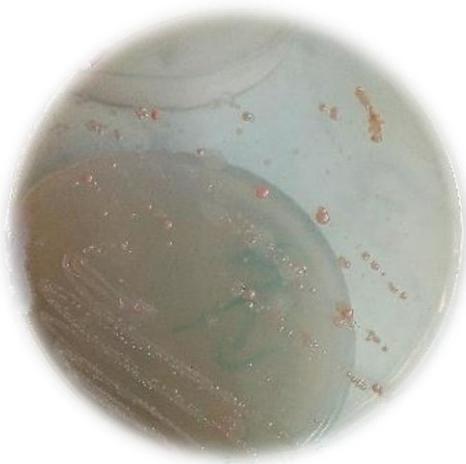


Figure 17 : souche B7 isolée sur GN



Figure 18 : souche B8 isolée sur GN

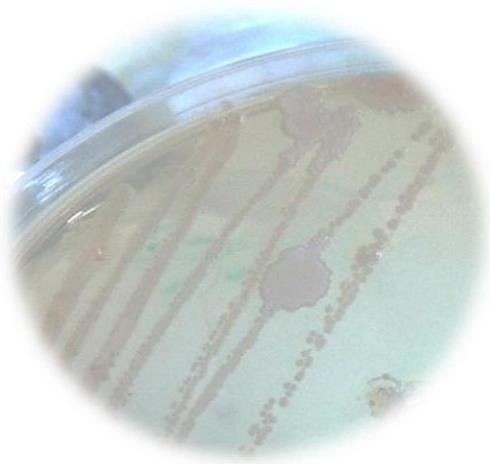


Figure 19 : souche B9 isolée sur GN



Figure 20 : champignon C isolée sur Sabouraud

2. Test de tolérance des microorganismes isolés vis-à-vis l'insecticide Actellic 50 EC à différentes concentrations

Parmi les microorganismes isolés, deux souches bactériennes (B6 et B8) ont pu pousser sur GN à différentes concentrations d'Actellic 50 EC (DR×2, DR×5 et DR×10), le champignon C a pu pousser seulement sur la DR×2. (**Figures : 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27**).

La souche B6 présente une bonne croissance sur les trois concentrations de l'insecticide, ceci est dû peu être à une ex-adaptation dans le sol déjà contaminé par cet insecticide.

Pour la souche B8, on note que la croissance est inversement proportionnelle avec l'augmentation des concentrations, ce qui indique qu'il y'a une inhibition de cette souche par l'insecticide Actellic 50 EC.

Le champignon C ne tolère que les faibles concentrations (DR et DR× 2), ce qui indique que l'augmentation de la concentration est toxique pour le développement de ce microorganisme.

Nos résultats sont en corrélation avec plusieurs travaux qui affirme la toxicité des pesticides vis-à-vis des microorganismes du sol. En effet selon **Columa, 1977**, les pesticides sont toxiques pour les microorganismes du sol, d'après **Research, 1978**, les concentrations minimales inhibitrices de plusieurs pesticides sont déterminés pour différentes microorganismes (des bactéries, des actinomycètes, des levures, des champignons et des algues). (**Research, 1981**) a rapporté que des concentrations très élevées des pesticides détruisent les bactéries et provoquant une inhibition complète de leur métabolisme.



Figure 21: souche B6 sur DR×2 d'Actellic



Figure 22 : souche B6 sur DR×5 d'Actellic



Figure 23 : souche B6 sur DR×10 d'Actellic



Figure 24 : souche B8 sur DR×2 d'Actellic



Figure 25 : souche B8 sur DR×5 d'Actellic



Figure 26 : souche B8 sur DR×10 d'Actellic



Figure 27 : champignon C sur DR×2 d'Actellic

3. Etude de la capacité des microorganismes isolés à utiliser

l'insecticide Actellic 50 EC comme seule source de carbone et d'énergie

Après ensemencement des microorganismes isolés sur milieu MSM solide additionné de l'insecticide Actellic 50 EC (10 ml/l) comme SSCE, cinq souches bactériennes (B1, B6, B7, B8 et B9) ont pu pousser sur ce milieu (**figure 28, 29, 30, 31, 32**), ce qui indique leur capacité à utiliser l'insecticide Actellic 50 EC (Pyrimiphos-méthyl) comme seule source de carbone et d'énergie et sont donc éventuellement capable de le dégrader.

On note d'autre part, que certaines souches (B1, B7 et B9) poussent sur milieu MSM additionné d'Actellic 50EC comme SSCE, mais ne poussent pas sur des milieux GN additionnés de l'insecticide même à faible concentration DR×2, donc elles sont capables d'utiliser ce pesticide comme SSCE mais le tolère seulement à très faible dose.



Figure 28: souche B1 ensemencée sur MSM **Figure 29:** souche B6 ensemencée sur MSM

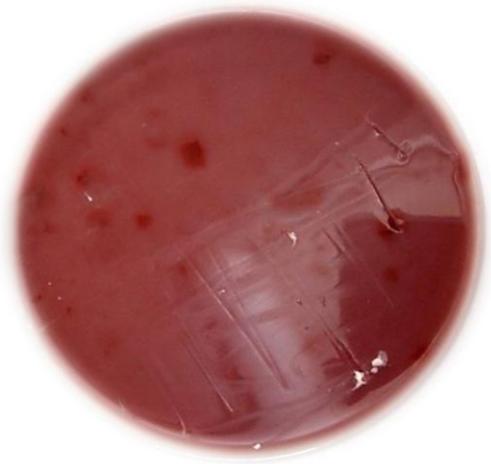


Figure 30 : souche B7 ensemencée sur MSM **Figure 31** : souche B8 ensemencée sur MSM



Figure 32 : souche B9 ensemencée sur MSM

4. Mise en évidence de la dégradation de l'insecticide Actellic 50 EC par les souches actives

La tolérance d'une souche bactérienne à un pesticide, n'est pas toujours un indice de sa capacité à le dégrader.

Les souches B6 et B8 tolérantes de fortes concentrations d'Actellic 50EC et capables de l'utiliser comme SSCE, sont testées pour leur aptitude à le dégrader par des méthodes spectrophotométriques.

La dégradation de l'insecticide Actellic 50 EC est estimée d'un coté par la mesure de la croissance bactérienne (DO) à 600 nm sur milieu MSM liquide additionné de cet insecticide comme SSCE (**Tableau 2, figures 33 et 34**), et d'un autre coté, par la mesure de la DO des surnageants à 254 nm (longueur d'onde d'absorbtion maximal pour le pyrimiphos methyl) pendant 192 heures (**tableau 3 et 4, figure 35 et 36**).

Tableau 2 : variation de la densité optique des souches B6 et B8 isolées sur milieu MSM aditionnées de l'insecticides Actellic 50 EC.

| Temps (heures) | B6 | B8 |
|----------------|-------|-------|
| 2 | 0.307 | 0.340 |
| 6 | 0.289 | 0.223 |
| 12 | 0.570 | 0.405 |
| 18 | 0.840 | 0.684 |
| 24 | 0.801 | 0.599 |
| 72 | 0.511 | 0.300 |
| 84 | 0.471 | 0.232 |
| 96 | 0.590 | 0.589 |
| 120 | 0.301 | 0.250 |
| 144 | 0.150 | 0.186 |
| 168 | 0.384 | 0.453 |
| 192 | 0.188 | 0.497 |

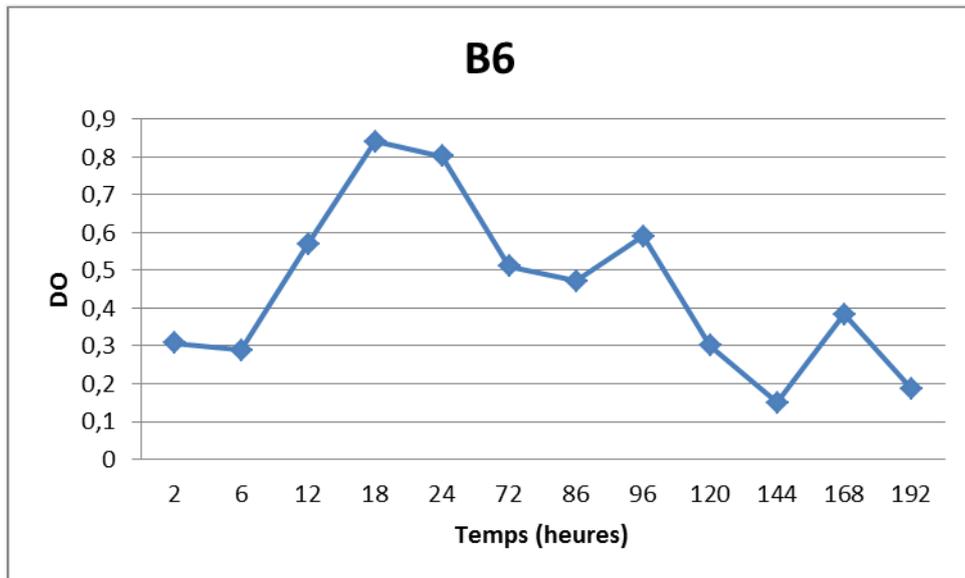


Figure 33 : variation de la densité optique de la souche B6 au cours du temps en présence du l'insecticide Actellic 50 EC comme SSCE.

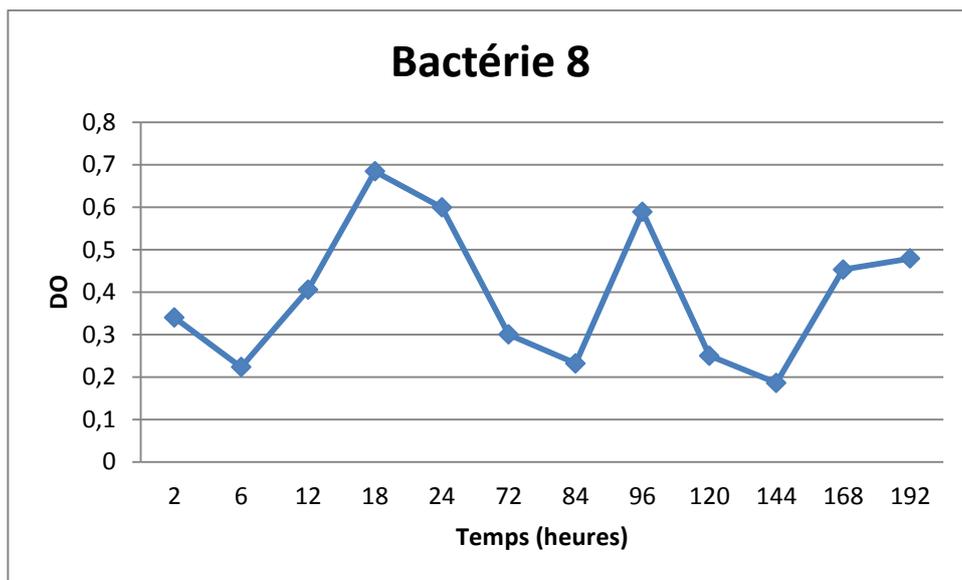


Figure 34 : variation de la densité optique de la souche B8 au cours du temps en présence du l'insecticide Actellic 50 EC comme SSCE.

D'après les résultats obtenus, la croissance des souches B6 et B8 diminue dans les premières 6 heures, ce qui est expliqué par le temp d'adaptation et la synthèse des enzymes nécessaire pour la dégradation de l' insecticide Actellic 50EC, après 18 heures la croissance bactérienne atteint une valeur maximal (0.684) pour la souche B8 et (0.840) pour la souche B6 , ce qui confirme la dégradation du pyrimiphos-méthyle et son

utilisation comme SSCE dans le milieu. On note que, la souche B6 est la souche la plus performante vue sa DO (0.804).

La densité microbienne des souches B6 et B8 décroît progressivement et atteint une valeur minimal à 84 heures, puis elle augmente une autre fois à 96 heures d'incubation, et décroît pour la deuxième fois à 144 heures suivie d'une augmentation à 168 heures pour la souche B6 et à 192 heures pour la souche B8. Ces variations périodique dans la croissance sont du à l'épuisement du milieu dans certain temps et l'apparition de nouveaux métabolites de pyrimiphos-méthyle et leur utilisations par les souches test dans d'autres temps. D'après (Youness, 2013) la présence des nouveaux pics correspondant à l'apparition de nouveaux métabolites suite à la dégradation de pesticide.

Des résultats très proches sont obtenus par (Ortiz-hernández et Sánchez-salinas, 2010), qui ont détecté la dégradation d'un pesticide organophosphoré, le Tetrachlorvinphos par des bactéries isolées d'un sol agricole au Mexic : pour *Serratia ficaria*, une valeur maximal (DO=1.60) est observée après 36 heures d'incubation, par contre chez *Vibrio metschinkouii* la valeur maximal (DO=0.50) est observée après 12 heures d'incubation, alors que chez *Yersinia enterocolitica* et *Stenotrophomonas malthophilia*, les valeurs maximales, respectivement(DO =0.70 et 0.60) sont observées après 48 heures.d'incubation.

Tableau 3 : variation de densité optique du surnageant de la souche B6 au cour du temps

| Temps (heures) | DO |
|----------------|-------|
| 84 | 0.273 |
| 96 | 0.230 |
| 120 | 0.145 |
| 144 | 0.112 |
| 168 | 0.09 |
| 192 | 0.053 |

| Temps (heures) | DO |
|----------------|-------|
| 48 | 0.420 |
| 96 | 0.301 |
| 120 | 0.15 |
| 144 | 0.084 |
| 168 | 0.027 |
| 192 | 0.019 |

Tableau 4 :
 variatio
 n de
 densité
 optique
 du
 surnage
 ant de

souche B8 au cour du temps

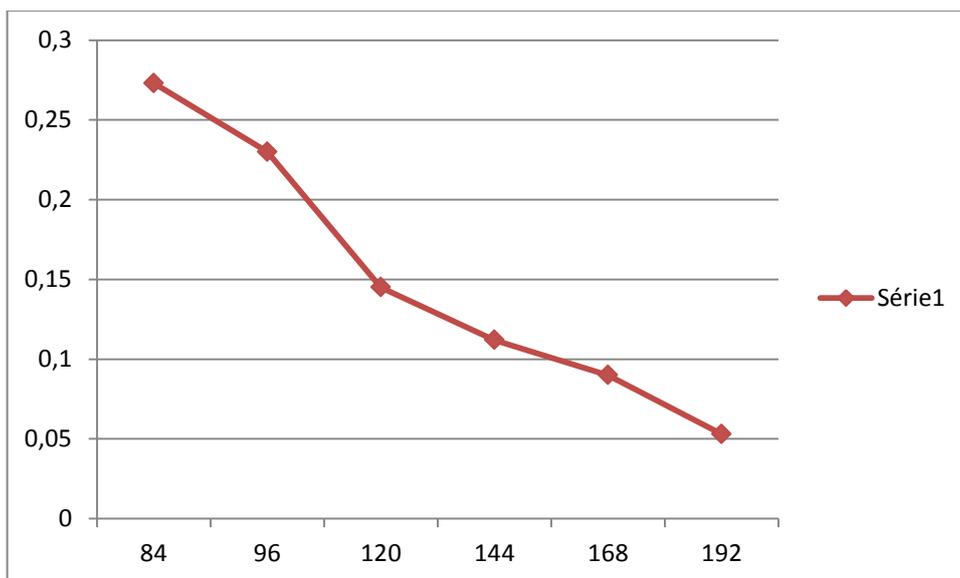


Figure 35 : variation de la densité optique du surnagent de la souche B6 au cour du temps

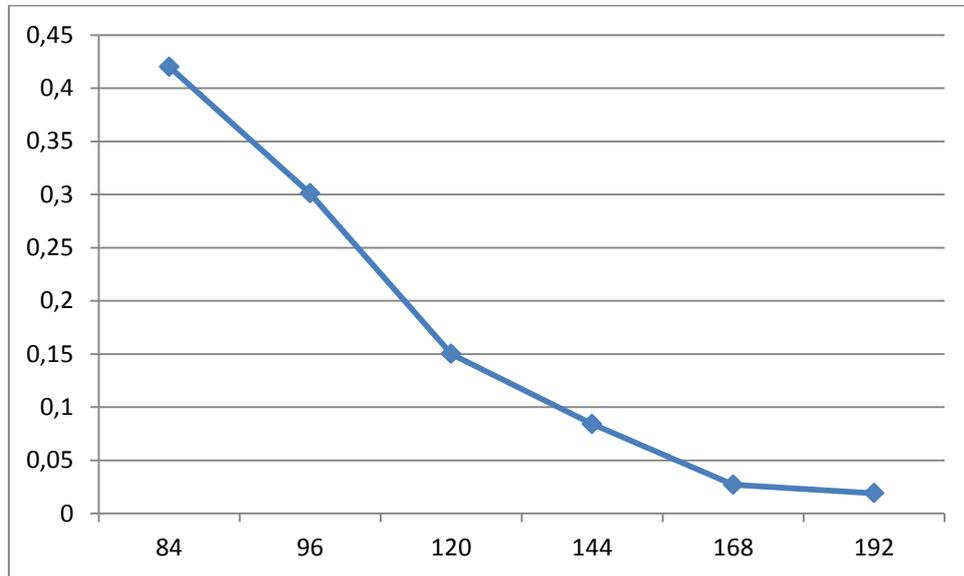


Figure 36 : variation de la densité optique du surnageant de souche B8 au cour du temps

D'après les résultats obtenus, on distingue que la DO des surnageants des deux souches B6 et B8 diminue progressivement au cour du temps, ce qui confirme la diminution de la concentration de l'Actellic 50EC (pyrimiphos-methyl) et la dégradation progressive par les souches testées.

Le dosage des pesticides organophosphorés par les méthodes spectrophotométriques est rapporté par plusieurs auteurs : **Tamilselvan *et al.*, 2014** ont scanné plusieurs solutions test de pyrimiphos-méthyl à différentes longueur d'onde (200-1100 nm) et ont trouvé que l'absorption maximal se fait à 254 nm. **Abd El-Aziz.B *et al.*, (2016)** ont pu doser la concentration de plusieurs pesticides organophosphorés (chlorpyriphos, temephos et diazinon) en se basant sur des méthodes spectrophotométriques. Toutefois les résultats obtenus par HPLC restent plus précis.

II. Identification présumptive des souches actives

Les deux souches bactériennes (B6 et B8) qui dégradent et tolèrent de fortes concentrations d'Actellic 50 EC et le champignon C qui tolère la DR×2, sont caractérisées par des études morphologiques et biochimiques.

1. Aspect macroscopique

La description morphologique des bactéries actives est représentée dans le **tableau 5** :

Tableau 5 : Aspect macroscopique des souches B6 et B8 sur GN

| Souches | B6 | B8 |
|-------------|-------------|-------------|
| couleur | Beige | Beige |
| Taille | Moyenne | Petite |
| Forme | Circulaire | Circulaire |
| Aspect | Lisse | lisse |
| Opacité | Translucide | Translucide |
| Élévation | Bombée | Plane |
| Consistance | Muqueuse | Muqueuse |
| Bord | Régulier | Régulier |

La description morphologique de champignon C est représentée dans le **tableau 6** :

Tableau 6 : Aspect macroscopique de champignon C sur milieu Sabouraud

| Couleur | Taille | Forme | Aspect | Revers | Relief | Diffusion des pigments |
|---|--------|------------|-----------|--------|----------|------------------------|
| Centre jaune et vert avec une extrémité blanche | 4 cm | circulaire | Cotonneux | blanc | Surélevé | Pas de diffusion |

2. Observation microscopique

- Etat frais

L'observation microscopique à l'état frais des souches B6 et B8 est représentée dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Aspect microscopique des souches bactériennes actives B6 et B8.

| Souches | Forme | Mobilité |
|-----------|--------------|----------|
| B6 | Coccobacille | Immobile |
| B8 | Bacille | Immobile |

- **Coloration de Gram**

Les résultats de la coloration de Gram des souches B6 et B8 sont représentés dans le **tableau 7 et la figure 37.**

Tableau 8 : Résultats de la coloration de Gram des souches bactériennes actives.

| Souches | Gram | Forme |
|-----------|------|--------------|
| B6 | - | Coccobacille |
| B8 | - | Bacille |

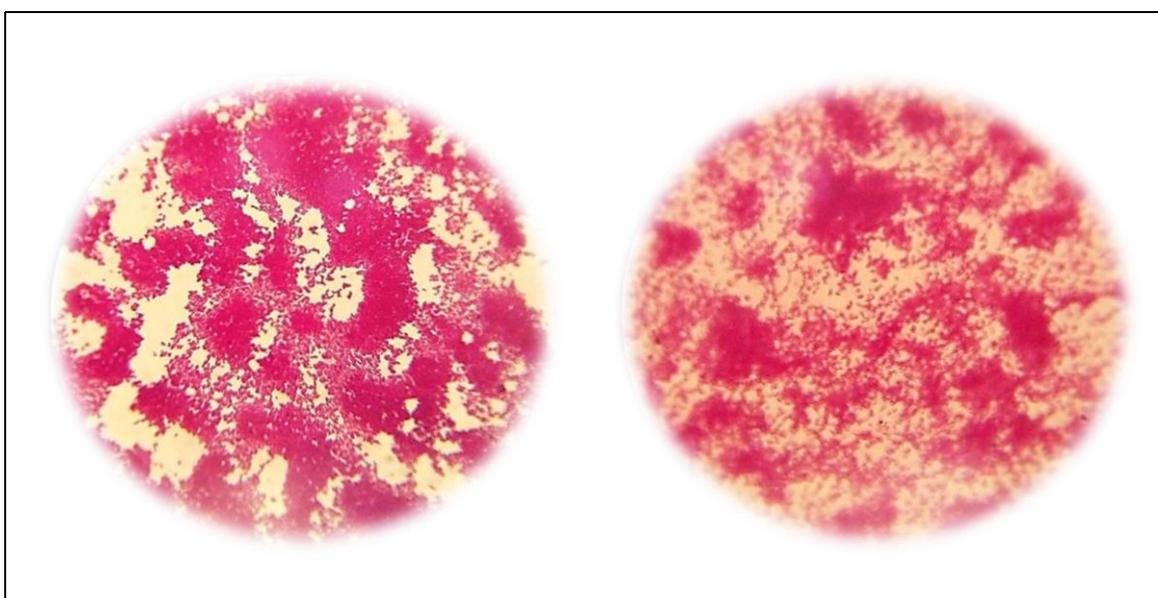


Figure 37: aspect microscopique des souches B6 et B8 après la coloration de Gram (G×100).

- **Technique de coloration au Lactophenol et test de scotch**

l'observation microscopique du champignon C par les deux techniques est représentée dans les **figure 38 et 39**.

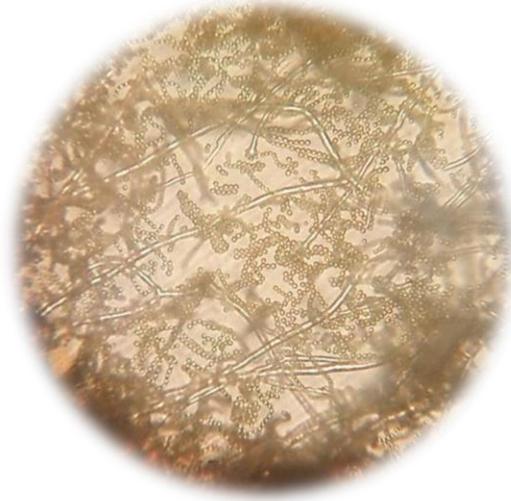


Figure 38 : aspect microscopique du champignon C par test de scotch



Figure 39 : observation microscopique du champignon C après coloration par
Lactophénol

L'aspect microscopique du champignon C se caractérise par des hyphes longs avec la présence de conidiophores dressés, qui se terminent par une vésicule supporte une rangée des phialides et une rangée des cellules sous-jacentes appelées métules, les conidies produites en grand nombre par les phialides.

L'aspect macroscopique et microscopique du champignon C permet de le rapprocher au genre *Aspergillus* qui est un champignon à croissance rapide et d'un aspect poudreux ou duveteux de couleur variable : blanc, vert, brun à noir. (Bioforma ,2002).

L'*Aspergillus* a des hyphes longs avec plusieurs conidiophores qui se terminent dans une grande vésicule à plusieurs spores (Wordpress.2016). (figure.40)

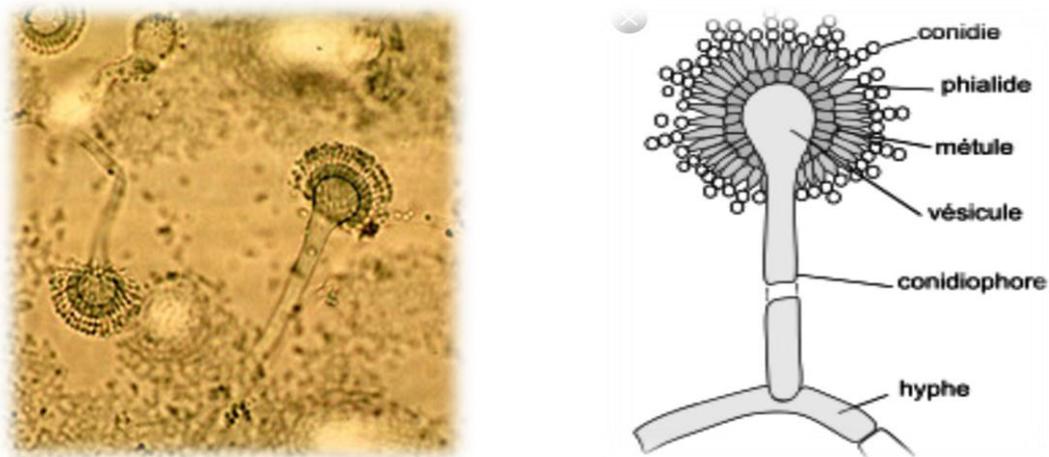


Figure 40 : observation microscopique du champignon *Aspergillus niger* (Wordpress.2016).

D'après nos résultats le champignon C tolère la présence de l'insecticides Actellic 50 EC à une faible concentration (DR×2), mais il ne l'utilise pas comme SSCE. Par contre selon **Tian et al., 2016**, le pesticide organophosphorée Trichlorfon a été toléré et utilisé comme SSCE par un *Aspergillus sydowii*, isolé d'un sol traité par ce pesticide. La dégradation des pesticides organophosphorés par le genre *Aspergillus* a été étudié également par **Parin et al., 2017**, qui ont rapporté qu'une enzyme appelée la phétase est produite par *Aspergillus niger* pour la biodégradation des pesticides organophosphorés.

3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées :

Les résultats des tests biochimiques des souches bactériennes B6 et B8 sont représentées dans le **tableau 9** et les **figures 41, 42,43, 44, 45, 46**.

Tableau 9 : Caractéristiques biochimiques des bactéries B6 et B8.

| Souches | B6 | B8 |
|------------------|----|----|
| Oxydase | - | - |
| Catalase | + | + |
| Mannitol | - | + |
| Mobilité | - | - |
| Lactose | - | + |
| Glucose | - | + |
| Saccharose | - | + |
| Gaz | - | - |
| H ₂ S | + | + |
| Citrate | + | + |
| VP | - | + |
| RM | + | + |



Figure 41 : B6 sur citrate de Simmons



Figure 42 : B8 sur citrate de Simmons



Figure 43 : B6 sur milieu mannitol mobilité



Figure 44 : B8 sur milieu mannitol mobilité



Figure 45 : B6 sur milieu TSI



Figure 46 : B8 sur milieu TSI



Figure 47 : test VP de B6



Figure 48 : test VP de B8



Figure 49 : test RM de B6



Figure 50 : test RM de B6

Les résultats obtenus sont comparées avec celles décrites dans la neuvième édition du *Bergey's manual of determinative bacteriology, 2007*. Les deux souches étudiées sont probablement des entérobactéries, la souche B6 est rapprochée au genre *Serratia* ou *Yersinia* et la souche B8 au genre *Serratia*. Le tableau 10 représente les principaux genres de la famille des entérobactéries.

Tableau 10 : Les principaux genres de la famille des entérobactéries (*Bergey's manual of determinative bactériologie, 2007*)

| Genre | <i>Salmonella</i> <i>Citrobacter</i> | <i>Escherichia</i> <i>Schigella</i> | <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> | <i>Proteus</i> <i>Morgenella</i> <i>Providencia</i> | <i>Yersinia</i> |
|------------|---|--|--|---|---|
| caractères | Oxydase – Catalase + Lactose – Mannitol + Mobilité + H ₂ S +/- Citrate +/- VP – RM + | Oxydase – Catalase + Lactose +/- Mannitol + Mobilité + H ₂ S – Citrate – VP- RM + | Oxydase – Catalase + Lactose – Mannitol + Mobilité +/- H ₂ S – Citrate + VP+ RM + | Oxydase – Catalase + Lactose – Mannitol +/- Mobilité + H ₂ S +/- Citrate +/- VP - RM + | Oxydase – Catalase + Lactose – Mannitol + Mobilité – H ₂ S – Citrate – VP – RM + |

Plusieurs recherches confirment le rôle majeur des entérobactéries dans la dégradation des polluants et la décontamination du sol. **Abo-Amer, 2010**, a montré que parmi les entérobactéries, l'espèce *Serratia marcescens* peut dégrader complètement 50 mg de diazinon /L, dans un milieu minimum pendant 11 jours. **Brajesh et al., 2004**, ont rapportés que la souche *Enterobacter* B-14 a un grand potentiel à être utilisée dans le nettoyage des environnements contaminés par les pesticides.

Conclusion

Conclusion

Notre objectif de travail est la recherche des microorganismes qui tolèrent l'insecticide Actellic 50 EC (Pyrimiphos-méthyle) et qui sont capables de l'utiliser comme SSCE.

Pour cela, un sol forestier situé à l'université des frères Menoutri Constantine 1 est traité par l'insecticide étudié

Les milieux GN et Sabouraud sont utilisés pour l'isolement et le test de tolérance vis-à-vis à cet insecticide. Le milieu Minimum Salt Medium (MSM) additionné de l'insecticide Actellic 50 EC à la dose recommandée (10 ml/l) comme seule source de carbone et d'énergie (SSCE) est utilisé pour les tests de biodégradation.

Ainsi, neuf souches bactériennes et un champignon ont été isolés. Parmi ces derniers, Cinq souches sont capables d'utiliser cet insecticide comme SSCE et seulement deux souches bactériennes tolèrent les trois différentes concentrations (DR×2, DR×5, DR×10) par contre le champignon tolère que la concentration DR×2.

La dégradation du l'insecticide Actellic 50 EC par les deux souches bactériennes actives est estimée sur un milieu MSM liquide additionné de l'insecticide comme SSCE, par mesure de la DO à 600 nm au cours de 196 heures, cette dégradation est confirmé par la diminution de la DO des surnageants à une longueur d'onde de 254 nm. Ces résultats obtenus confirment la dégradation de l'insecticide au cours de temps par les deux souches microbiennes.

Les deux souches tolérantes de l'insecticides Actellic 50 EC à forte concentration (B6 et B8) et le champignon C sont identifiés d'après leurs caractères cultureux, macroscopiques, microscopiques et biochimiques qui permettent de rapprocher la souche B6 au genre *Serratia* ou *Yersinia*, la souche B8 au genre *Serratia*, et le champignon C au genre *Aspergillus*.

Perspective

- Confirmation de la biodégradation de l'insecticide Actellic 50 EC par HPLC.
- Identification biomoléculaire des souches actives.
- Utilisation de ces souches dans la dépollution des sols contaminés par l'insecticide pyrimiphos-méthyl.

Références bibliographique

Abo-Amer. (2010). Biodegradation of Diazinon by Serratia marcescens DI101 and its use in bioremediation of Contaminated Environment. microbiology and biotechnology: 71-80 p.

Abd El-Aziz.B., Abd El-Aleem., Mamdouh R. R., Shaban M. Kh., Omneya K. El-Naggar. (2016). Spectrophotometric determination of some organophosphorus pesticides based on reaction with cerium (IV) sulfate. 2 (6), 2395-6011 p

Adam Olivier Brown. Insecticides 2017 [En ligne]. (Page consulté le 10/4/2019)

http://adamoliverbrown.com/wp-content/uploads/2017/02/5-Insecticides-2017_3slides.pdf

Agoussar, A (2017). Effet des pesticides sur la diversité bactérienne des champs agricoles et la capacité des bactéries à les dégrader. Mémoire : Microbiologie Immunologie et Infectiologie Faculté de médecine. Montréal : Université de Montréal, 92 p.

https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/20519/Agoussar_Asmaa_2017_memoire.pdf?sequence=4

Aligon, D., Bonneau, G., Garcia, J., Gomez, D., Le Goff, D. (2010). Estimation des expositions de la population générale aux insecticides : les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthriinoïdes. Mémoire : Santé publique. École des hautes études en santé publique, 78 p. Disponible sur :

https://documentation.ehesp.fr/memoires/2010/persan_igs/insecticides.pdf

Aprifel. Pesticides, risques et sécurité alimentaire [En ligne]. (Page consulté le 9/4/2019)

http://www.aprifel.com/userfiles/file/pesticides_risques_securite_a.pdf

Arias-Estévez, M., Periago, E.L., Martinez, C.E., Simal, G.J., Carlos, M.J., Garcia, R.L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, Ecosystems and Environment [En ligne], 123 (4). 247–260 p. (Page consultée le 09/07/2019)

https://www.researchgate.net/publication/236008837_The_Mobility_and_Degradation_of_Pesticides_in_Soils_and_the_Pollution_of_Groundwater_Resources

Binti ismail, A (2008). Isolation, characterization and identification of microorganisms from soil contaminated with pesticide. Thèse de doctorat : Génie chimique. Malaisie : Université Malaisie Pahang.

Bioforma. Les moisissures d'intérêt médical – 2002, Les aspergillus.

Brajesh, K.S., Allan, W., Denis, J. W. (2004). Biodegradation of Chlorpyrifos by Enterobacter Strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. 70 (8). 4855-4863 p.

Braquenier.J., (2009). Etude de la toxicité développementale d'insecticide organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1. Thèse de doctorat : Sciences et Gestion de l'Environnement. Université de Liege, 200 p. Disponible sur : https://www.researchgate.net/profile/Ionel_Popescu/publication/237383242_Biocapteurs_amperometriques_a_cholinesterases_pour_la_determination_des_pesticides_organophosphores/links/02e7e53218b1c5a5d2000000/Biocapteurs-amperometriques-a-cholinesterases-pour-la-determination-des-pesticides-organophosphores.pdf

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

Clos, J. (2012). Immunité chez les animaux et les végétaux. France. Lavoisier. 14 p

Columa, 1977. Les herbicides et le sol. ACTA, 143 p

Copyright. Gerhard Schrader: le père des agents nerveux [en ligne] (Page consulté le 10/04/2019)

<https://www.healthandenvironment.org/environmental-health/social-context/history/gerhard-schrader-father-of-the-nerve-agents>

Darbouco. Au service de l'agriculture Haïtienne [En ligne] (Page consultée le 13/05/2019)

<http://www.darboucosa.net/j25/index.php/fr/produits/insecticides/pyrimiphos-methyl-50-ec-detail>

Delarras, C. (2010). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. France. Lavoisier. 29p.

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

Diallo, B., (2006). Evaluation de l'efficacité de trois insecticides de synthèse sur les vecteurs du paludisme au Mali et leur rémanence sur les supports imprègnes. Thèse de doctorat : Médecine de pharmacie et d'odontostomatologie. Mali : Université de Bamako, 128 p.

Disponible sur :

<http://www.keneva.net/fmpos/theses/2006/pharma/pdf/06P28.pdf>

Jalady, A.M., Dorandeu, F. (2013). Intérêt du dosage des cholinestérases dans le cadre des intoxications aux organophosphorés. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation [En ligne], 32 (12). 856–862 p. page disponible sur :

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0750765813011490>

Hertfordshire. Pesticide properties database [En ligne]. (Page consultée le 04/05/2019)

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/532.htm>

Hilaire, D. (2001). Biodégradation de composés organophosphorés à liaison P-S (VX, TETRISO ET DEMETON-S-METHYL). Thèse de doctorat : Mention Chimie et Microbiologie de l'eau. Nancy : Université Henri Poincaré - Nancy 1, 147 p. Disponible sur :

http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2001_0291_HILAIRE.pdf

Ganash, M.A., Abdel Ghany T.M., Reyad A.M. (2016). Pleurotus ostreatus as a biodegradator for organophosphorus insecticide Malathion [En ligne], 6 (3). Page disponible sur :

<https://www.omicsonline.org/open-access/pleurotus-ostreatus-as-a-biodegradator-for-organophosphorus-insecticidomalathion-2161-0525-1000369.php?aid=73835&view=mobile>

Graziella, T (2002). Biocapteurs ampérométriques à cholinestérasés pour la détermination des pesticides organophosphorés [En ligne] ,80 (2) (Page consultée le 28/06/2019)

https://www.academia.edu/6128730/Biocapteurs_amp%C3%A9rom%C3%A9triques_%C3%A0_cholinest%C3%A9rases_pour_la_d%C3%A9termination_des_pesticides_organophosphor%C3%A9s

Manseur. Algérie : utilisation des pesticides, un meilleur contrôle s'impose (contribution) 2018 [En ligne] (Page consultée le 28/06/2019).

<https://maghrebemergent.info/algerie-utilisation-pesticides-meilleur-controle-simpose-contribution/>

Marouk, S., (2018). Isolement et caractérisation des microorganismes résistants au fongicide procure (72% propamocarb) et capables de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie. Mémoire : Biologie moléculaire des microorganismes. Constantine : Université des frères Mentouri Constantine, 47 p.

Merghid, M., debbache, M., foughal, I (2017). Impacts des pesticides utilisés dans la plasticulture sur la santé humaine En Algérie étude de cas la wilaya de Constantine. Mémoire : Toxicologie. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine, 101 p.
Disponible sur :

<http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2017/Impacts%20des%20pesticides%20ut>

Merrouche, N., Maazi.H., Benkara.A. (2016). Etude de la toxicité d'insecticides organophosphorés. Mémoire : Toxicité et Santé. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine, 55 p.

Munazza, A., Nusrat, J., Shahida, A. (2005). Chlorpyrifos resistant bacteria from pakistani soils: isolation, identification, resistance profile and growth kinetics, 37 (2) 281-288.

Ortiz-hernández, L., Sánchez-salinas, E. (2010). Biodegradation of the organophosphate pesticide Tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. 26 (1) 27-38 p.

Parin, C.S., Ravi Kumar, V., Dastager, Syed G., Khire, Jayant. M. (2017). Phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 for a novel application to degrade organophosphorus pesticides [En ligne], 7 (66). (Page consultée le 10/07/2019).

<https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-017-0370-9>

Research, W., (1978). Miniaturized methods for testing the toxicity of pesticides to microorganisms. 18, 105-107 p.

Research, W., (1981). Modélisation de l'évolution du Parathion dans le milieu naturel sur un pilote de laboratoire. 15, 599-607 p.

Saïssy, J., Rüttimann, M. (1999). Intoxications par les organophosphorés [En ligne], 1. (Page consultée le 29/04/2019).

<https://urgences-serveur.fr/IMG/pdf/organophosphore.pdf>

Savadogo, W., (2001). Etude de la biodégradation anaérobie des pesticides utilisés en agriculture au Burkina Faso : Cas particuliers du décis, de l'ultracide et du sumithion. Thèse de doctorat : Sciences biologiques appliquées. Ouagadougou : université de Ouagadougou, 107 p. Disponible sur :

<http://www.beep.ird.fr/collect/uouaga/index/assoc/M08541.dir/M08541.pdf>

Souley, S., (1987). Mesure de l'activité cholinestérasique chez la ruminante application au diagnostic de l'intoxication par les insecticides organophosphorés. Thèse de doctorat : médecine vétérinaire. Dakar : Université Cheikh Anta Diop Dakar, 89 p. Disponible sur :

<http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/TD87-8.dir/TD87-8.pdf>

Tamilselvan.T., John Joseph, S., Mugunthan, G., Syed Musthaq Ahamed, S. (2014).

Validation of HPLC method for quantitative determination of Pirimiphos methyl, 28, 93-102 p.

Thabet, H., Brahmib.N., Kouraïchi, N., Elghordb, H., Amamoub, M. (2009). Réanimation. Intoxications par les pesticides organophosphorés [en ligne], 18 (7) (Page consultée le 29/04/2019)

www.em-consulte.com/article/228489/article/intoxications-par-les-pesticides-organophosphorés-

Tian, J., Dong, Q., Yu, C., Zhao, R., Wang, J., Chen, L. (2016). Biodegradation of the Organophosphate Trichlorfon and Its Major Degradation Products by a Novel *Aspergillus sydowii* PA F-2. [En ligne], 64 (21), 4280-4287.

Wordpres. Isolement et identification des microorganismes [En ligne]. (Page consulté le 02/07/2019)

<https://tpeluttebiologiquepardeschampignons.wordpress.com/2016/02/04/les-micro-champignons/>

Youness, M. (2013). Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (Mésortione et Tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. Thèse de doctorat : Chimie Organique Biologique. France : Université Blaise Pascal, 308 p.

Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00926895>

Annexes

Annexe 1

Les milieux de culture

Milieu Gélose Nutritive

Extrait de viande 1 g

Extrait de levure 2 g

Peptone 5 g

Chlorure de sodium 5 g

Agar 15 g

Eau distillé 1000 ml

pH = 7.4

Milieu Mineral Medium Salt

ZnSO₄ 0.01 mg

MgSO₄.7H₂O 0.5 g

CaCl₂.2H₂O 10 mg

K₂HPO₄ 0.05g

(NH₄)SO₄ 0.5g

FeCl₃.H₂O 10 mg

Eau distillé 1000 ml

pH = 7

Milieu Sabouraud

Peptone 10 g

Glucose 20 g

Agar 15 g

Eau distillé 1000 ml

pH = 6

Milieu mannitol mobilité

Peptone 20 g
Nitrate de potassium 1 g
Mannitol 2 g
Rouge de phénol 40 g
Agar 4 g
Eau distillé 1000 ml
pH= 8.1

Milieu citrate de Simmons

Citrate de sodium 1 g
Chlorure de sodium 5 g
Sulfate de magnésium 200 mg
Dihydrogenophosphate d'ammonium 1 g
Monohydrogenophosphate de potassium 1 g
Bleu de bromotymol 80 mg
Agar 13 g
Eau distillé 1000 ml
pH= 6.8

Milieu triple sugar iron bio-rad

Extrait de viande 3 g
Extrait de levure 3 g
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
Eau distillé 1000 ml

pH=7.4

Milieu Clark et Lubs

Peptone 5g

Glucose 5g

Hydrogénophosphate de potassium 5g

Eau distillée 1L

pH =7.5

Annexe 2

Lecture des tests biochimiques

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.

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.
- Décollement de la gélose ou présence de poches gaz : production du CO₂.
- Couleur noir : production d'H₂S.

Utilisation de citrate comme seul source de carbone

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

Test de Clark et Lub

Annexe

- Test VP + : Virage au rouge cerise après l'ajout des réactifs VP I et VP II.
- Test RM+ : Coloration rouge après l'ajout du réactif RM.

Résumé

Dans le but de rechercher des microorganismes tolérants l'insecticide Actellic 50 EC (pyrimiphos-méthyl) et capables de l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie, un sol forestier (université des frères Mentouri, Constantine 1), traité par cet insecticide est utilisé.

Les milieux GN et Sabouraud sont utilisés pour l'isolement et le test de tolérance vis-à-vis à cet insecticide. Le milieu Minimum Salt Medium (MSM) additionné de l'insecticide Actellic 50 EC à la dose recommandée (10 ml/l) comme seule source de carbone et d'énergie (SSCE) est utilisé pour les tests de biodégradation.

Ainsi neuf souches bactériennes et un champignon ont été isolés, Parmi ces derniers, Cinq souches sont capables d'utiliser cet insecticide comme SSCE et seulement deux souches bactériennes (B6 et B8) et un champignon C tolèrent sa présence à des fortes concentrations.

La dégradation de l'insecticide Actellic 50 EC par les deux souches bactériennes actives est estimée d'une part, par mesure de leur croissance (DO) à 600 nm sur milieu MSM liquide additionné de cet insecticide comme SSCE et d'autre part par mesure de la DO des surnageants à 254 nm.

Les deux souches bactériennes B6 et B8 présentent une très bonne croissance sur cet insecticide qui est un indice de leurs potentiels élevés dans la dégradation du pyrimiphos-méthyle, la diminution de la DO des surnageants confirme la dégradation d'Actellic 50 EC (pyrimiphos-méthyle) au cours du temps.

L'ensemble des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques permet de rapprocher la souche B6 au genre *Serratia* ou *Yersinia*, la souche B8 au genre *Serratia*, et le champignon C au genre *Aspergillus*.

Mots clés : Insecticide organophosphoré, Actellic 50 EC, Pyrimiphos-méthyle, biodégradation, Tolérance .

Abstract

In order to search for microorganisms tolerant of the insecticide Actellic 50 EC (pyrimiphos-methyl) and capable of using it as the only source of carbon and energy, a forest soil (University of the Mentouri brothers, Constantine 1), treated with this insecticide is used. GN and Sabouraud media are used for isolation and tolerance testing of this insecticide. The Minimum Salt Medium Medium (MSM) medium with Actellic 50 EC insecticide added at the recommended dose (10ml/l) as the only carbon and energy source (SSCE) is used for biodegradation tests.

Nine bacterial strains and one fungus have been isolated, five of which are capable of using this insecticide as an SSCE and two other bacterial strains and the only fungus tolerating its presence at high concentrations

The degradation of Actellic 50 EC insecticide by the two active bacterial strains is estimated by measuring their growth (OD) at 600 nm on liquid MSM medium with Actellic insecticide added as SSCE and by measuring the OD of the supernatant at 254 nm.

Both bacterial strains B6 and B8 show very good growth on this insecticide which is an index of their high potential in the degradation of Pirimiphos-methyl, the decrease in supernatant OD confirms the degradation of Actellic 50 EC (Pirimiphos-methyl) over time.

All microscopic and macroscopic characters make it possible to compare strain B6 to the genus *Serratia* or *Yersinia* and strain B8 to the genus *Serratia*, and the fungus to the genus *Aspergillus*.

Keywords: Insecticide organophosphate, Actellic, , Pirimiphos-methyl, Biodegradation, Tolerance.

التلخيص

من أجل البحث عن كائنات مجهرية تتحمل المبيد الحشري Actellic 50 EC والقادرة على استخدامه كمصدر وحيد للكربون والطاقة، يتم معالجة أرضية الغابات (جامعة الإخوة منتوري ، قسنطينة 1) بهذا المبيد الحشري للعزل عن طريق الاثراء في الوسط الصلب (MSM) المكمل بالمبيد الحشري Actellic 50 EC وفق الجرعة الموصى بها (10 مل / لتر) كمصدر وحيد للكربون والطاقة (SSCE) .

على وسط GN و Sabouraud تم اختبار تحمل الكائنات المجهرية للمبيد الحشري بالجرعة الموصى بها وفق تراكيز مختلفة (DR × 2 ، DR × 5 ، DR × 10) .

تم عزل تسعة سلالات بكتيرية وفطر واحد ، خمس سلالات منها قادرة على استخدام هذا المبيد الحشري ك SSCE واثنين منها والفطر تتسامح مع وجودها في تراكيز عالية.

يتم تقدير التحليل البيولوجي للمبيد الحشري Actellic 50 EC بواسطة السلالتين البكتيرية النشطتين من ناحية بقياس نموها (OD) عند 600 نانومتر على الوسط السائل MSM المضاف اليه المبيد الحشري Actellic ك SSCE وثانياً عن طريق قياس OD من طافي في 254 nm.

تظهر السلالتان البكتيريتان B6 و B8 نموًا جيدًا جدًا على هذا المبيد الحشري الذي يعد مؤشراً محتملاً على التحلل البيولوجي pyrimiphos-méthyl ، ويؤكد النقصان في OD للطافي على تحليل Actellic 50 EC (pyrimiphos-méthyl) مع مرور الوقت.

تسمح مجموع الخصائص المجهرية والعيانية بمقاربة السلالة B6 الى نوع *Serratia* أو *Yersinia* والسلالة B8 الى نوع *Serratia* ، والفطر الى نوع *Aspergillus*.

الكلمات المفتاحية : مبيد حشري اوغافانوفوسفوري ، اكتليك ، بيريميفوس ميثيل، التحليل البيولوجي، التحمل،

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES MICROORGANISMES RÉSISTANTS À L'INSECTICIDE ACTELIC 50 EC (PYRIMIPHOS-METHYL) 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 biologie moléculaire des microorganismes

Dans le but de rechercher des microorganismes tolérants l'insecticide Actellic 50 EC (pyrimiphos-méthyl) et capables de l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie, un sol forestier (université des frères Mentouri, Constantine 1), traité par cet insecticide est utilisé.

Les milieux GN et Sabouraud sont utilisés pour l'isolement et le test de tolérance vis-à-vis à cet insecticide. Le milieu Minimum Salt Medium (MSM) additionné de l'insecticide Actellic 50 EC à la dose recommandée (10 ml/l) comme seule source de carbone et d'énergie (SSCE) est utilisé pour les tests de biodégradation.

Ainsi neuf souches bactériennes et un champignon ont été isolés, Parmi ces derniers, Cinq souches sont capables d'utiliser cet insecticide comme SSCE et seulement deux souches bactériennes (B6 et B8) et un champignon C tolèrent sa présence à des fortes concentrations.

La dégradation de l'insecticide Actellic 50 EC par les deux souches bactériennes actives est estimée d'une part, par mesure de leur croissance (DO) à 600 nm sur milieu MSM liquide additionné de cet insecticide comme SSCE et d'autre part par mesure de la DO des surnageants à 254 nm.

Les deux souches bactériennes B6 et B8 présentent une très bonne croissance sur cet insecticide qui est un indice de leurs potentiels élevés dans la dégradation du pyrimiphos-méthyle, la diminution de la DO des surnageants confirme la dégradation d'Actellic 50 EC (pyrimiphos-méthyle) au cour du temps.

L'ensemble des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques permet de rapprocher la souche B6 au genre *Serratia* ou *Yersinia*, la souche B8 au genre *Serratia*, et le champignon C au genre *Aspergillus*.

Mots clés : Insecticide, Actellic 50 EC, organophosphoré, pyrimiphos-méthyle, biodégradation, tolérance

Mots clés : Insecticide, Actellic 50 EC, organophosphoré, pyrimiphos-méthyle, biodégradation, tolérance

Laboratoire de recherche : Laboratoire 12

Jury d'évaluation :

Président du jury : ABDELAZIZ Wided (MCB - UFM Constantine1),

Rapporteur : ZERMANE férial (MAA - UFM Constantine1),

Examineur : MERGOUD Lilia (MAA- UFM Constantine1).

Date de soutenance : 18/07/2019