

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
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

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude comparative de la biodégradation de l'herbicide sulfosulfuron
(Apyros 75WG) par des souches d'actinomycètes sous forme libre et
immobilisée**

Présenté par : GHEDJATI Roufida
MAALEM Nour el houda
KRIBA Rayenne Amina

Le 27/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : ZERMANE F. (Maître Assistante « A » - UFM Constantine1)

Examineur 1 : BOUDMAGH A. (Professeur- UFM Constantine1)

Examineur 2 : DAFRI A. (Maître de conférences « A » - UFM Constantine1)

**Année universitaire
2021 – 2022**

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme ZERMANE Férial (MAA, UMC1), on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos remerciement s'adresse au Docteur SERINE AMOKRANE pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

Nous remercions Mr Boudmagh A(Professeur, UMC1) et Melle Dafri A (MCA, UMC1) pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leur proposition.

Nos remerciements s'adresse également à tout nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Enfin, notre respect aux membres de jury pour avoir examiné et critiqué la contenu de notre mémoire.

Dédicace

Je dédie ce travail A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

A ma mère Roukia ASSIFER qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau.

A mon cher papa Abderraouf qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A mes sœurs Alla, Tesnime et mon frère Taha que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.

A tous mes chères amis Amina, Houda, Yousra , je leur souhaite tout le succès , tout le bonheur.

A ma grand-mère et grand-père Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Roufida

Dédicace

Je tiens avec grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A mon très chère papa, que dieu lui fasse miséricorde qui m'a toujours guidé vers le chemin de la réussite.

A ma très chère maman qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A mes sœurs Nadia, Abla pour toute la tendresse qu'elles m'ont témoignée.

A tout mes chères amis Roufida, Houda, Nesrin, roufaida je leur souhaite tout le succès , tout le bonheur.

A mon petit prince Islem.

A toute ma famille pour l'amour et le respect qu'ils m'ont toujours accordé.

Sans oublier tout les professeurs que ce soit du primaire, de moyen de secondaire ou de l'enseignement Supérieur.

Amina

Dédicace

Je dédie ce projet

A ma chère mère,

A mon cher père,

Qui non j'aimais cesser, de formuler des prières a mon égard, de me soutenir et de m'épaulé pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes Frères, et mes chères sœurs,

Pour ces soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études

A tous mes chères amies,

Qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

*Sans oublié ma **famille**, mes **proches** pour leurs amours et leurs encouragements, et A tout ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité*

Nour

TABLE DES MATIÈRES	
Introduction générale	1
Première partie : Revue Bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes	
1. Généralités	4
2. Morphologie	4
3. Cycle de développement	5
4. Physiologie et écologie	6
5. Taxonomie des actinomycètes	6
6. Rôle écologique des actinomycètes	7
7. Applications des actinobactéries	7
Chapitre II : Les actinomycètes agents de biodégradation dans la nature	
1. Généralités sur les pesticides	9
2. Les herbicides	9
2.1. L'herbicide APYROS	9
2.1.1. Définition	9
2.1.2. Description et caractéristiques	10
3. La pollution par les herbicides	10
4. La Biodégradation	11
4.1. Généralité	11
4.2. Biodégradation des pesticides par les actinomycètes	11
Chapitre III : Immobilisation des cellules microbiennes	
1. Généralités	14
2. Définition des cellules immobilisées	14
3. Les avantages et les inconvénients d'immobilisation des cellules microbiennes	14
3.1. Avantages	14
3.2. Inconvénients	15
4. Les techniques d'immobilisation cellulaire	15
4.1. Adsorption	15
4.2. Par liaison covalente	16
4.3. Le piégeage	17
4.4. Encapsulation	18
5. Facteurs affectant l'immobilisation des cellules microbiennes	18
6. Applications environnementales de la technologie des cellules immobilisées	19
Deuxième partie : Matériel et Méthodes	
1. Milieu et réactifs	22
2. Purification et revivification des souches d'Actinomycètes	22
3. Conservation des souches d'Actinomycètes	22
3.1. Sur gélose incliné	22
3.2. Sur milieu liquide	22
4. Sélection des souches d'actinomycètes	23
5. Préparation des l'inoculas des souches sélectionnés	23
5.1. Préparation de l'inoculum général	23
5.2. Préparation de l'inoculum lavé	23
6. Etude comparative de la biodégradation du sulfosulfuron (Apyros 75 WG) par les souches d'actinomycètes sélectionnées libres et immobilisées	23
6.1. Méthodes d'immobilisation	

6.1.1. Immobilisation dans l'agar	23
6.1.2. Immobilisation dans l'alginate de calcium	24
6.2. Essais en batch	24
6.3. Analyse par Chromatographie Liquide à haute performance	25
7. Identifications présomptives des souches actives	25
7.1. Technique de culture sur lame	25
7.2. Technique de culture sur lamelle	25
Troisième partie : Résultats et Discussion	
1. Repiquage et revivification des souches d'Actinomycètes sp.	27
2. Caractéristiques morphologiques des souches	27
3. Sélection des souches d'actinomycètes	28
4. Etude comparative de la biodégradation du sulfosulfuron (Apyros 75 WG) par les souches d'actinomycètes sélectionnées libres et immobilisées	31
4.1. Méthodes d'immobilisation	31
4.2. Analyse par Chromatographie Liquide à haute performance	32
4.3. Cinétique de dégradation du sulfosulfuron au cours du temps d'incubation	33
5. Évaluation de la croissance microbienne en fonction du temps	39
6. Identification présomptive des souches actives	41
Conclusion et perspectives	45
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des abréviations

°C : température en degré Celsius.

CaCl₂·2H₂O : calcium chloride dihydrate.

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide.

g : gramme.

G : grossissement.

g/l : Gramme par litre.

GA : le glutaraldéhyde .

h : Heure.

ISP : International Streptomyces Project.

J : Jours

mg/ml : milligramme/millilitre.

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

nm : nanomètres.

P/V : Poids/volume

pH : potentiel d'hydrogène.

POP: polluants organiques persistants

PVA : Polyvinylique alcool.

PVA-alginate : poly (alcool vinylique)-alginate.

RT : temps de rétention.

SSCE : seule source de carbone et d'énergie.

Tpm : tours par minutes

UFC : unité formant colonie .

ω -TAs : ω -transaminase .

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de souches d'Actinomycètes pures sur milieu de culture ISP2(Annexe1).	28
Figure 2: Aspect microscopique des souches d'Actinomycètes capable de croître sur le milieu ISP9 + Apyros (1g/l) observées au microscope optique (G x 10).	30
Figure 3: les cellules de la souche S15 immobilisées sur le support des cubes	31
Figure 4: les cellules de la souche S15 immobilisées sur le support des cubes billes d'alginate de calcium	32
Figure 5: chromatogramme de témoin de l'apyros (0.1g/l), la molécule active de sulfosulfuron correspond au pic N°2, RT=2,5	32
Figure 6: chromatogramme de témoin Apyros (0.1g/l) pour le support des cubes d'agar, le sulfosulfuron correspond au pic N°2, RT=2,5	33
Figure 7: chromatogramme de témoin Apyros (0.1g/l) pour le support des billes d'alginate de calcium, le sulfosulfuron correspond au pic N°2, RT=2,5 min	33
Figure 8 : cinétique de dégradation du sulfosulfuron par les souches A2 et S15 libre en fonction du temps	35
Figure 9: cinétique de dégradation du sulfosulfuron par les souches A2 et S15 immobile sur le support des cubes d'agar en fonction du temps	35
Figure 10: cinétique de dégradation du sulfosulfuron par les souches A2 et S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium en fonction du temps	36
Figure 11 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 libre après 4 jours (pic N°2, air= 16,52%).	36
Figure 12 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar après 4 jours (pic N°1, air= 5,35%)	37

Figure 13 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium après 4 jours (pic N°3, air= 40,89%).	37
Figure 14 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 libre après 4 jours (pic N°4, air= 33,74%).	38
Figure 15 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar après 4 jours (pic N°1, air= 57,09%).	39
Figure 16 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium après 4 jours (pic N°4, air= 11,46%).	39
Figure 17 : Aspect macroscopique des souches actives	42
Figure 18 : Aspect microscopique des souches actives (G×100)	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description et les caractéristiques de l'herbicide Apyros	10
Tableau 2 : exemples et caractéristiques des pesticides dégradés par les actinomycètes	12
Tableau 3 : Les souches d'actinomycètes repiquées sur le milieu de culture ISP2	27
Tableau 4: capacité des souches de croître sur le milieu ISP9 contenant l'herbicide APYROS comme seule source de carbone et d'énergie.	29
Tableau 5: variation de la concentration d'apyros (sulfosulfuron) au cour du temps d'incubation par les souches A2, S15.	34
Tableau 6: Nombre de colonies des souches A2 et S15 sur le milieu ISP2 après 24h d'incubation	40
Tableau 7: Nombre de colonies des souches A2 et S15 sur le milieu ISP2 après 3 jours d'incubation.	41
Tableau 8: Nombre de colonies des souches A2 et S15 sur le milieu ISP2 après 4 jours d'incubation	41
Tableau 9: Caractérisations macroscopiques des souches actives.	43

Introduction

Introduction

La pollution est souvent un sous-produit de l'activité humaine et affecte l'atmosphère, le sol ou l'eau. Elle affecte la santé humaine, l'eau potable, les eaux de baignade, la production agricole, les espèces animales et végétales, l'esthétique du paysage, etc. Par extension, pour l'homme, la pollution peut être le résultat de certains produits chimiques qui nous empoisonnent progressivement.

Les produits agrochimiques tels que les herbicides et les pesticides ont été utilisés pour contrôler, éliminer ou détruire les nuisibles afin de protéger l'alimentation humaine (**Rashid et al .,2010**). Ils ont été largement étudiés pour leur potentiel toxique sur les systèmes biologiques. Les herbicides et les pesticides sont de plus en plus solubles dans l'eau, polaires et stables à la chaleur, il est donc difficile de réduire leur létalité et de les faire disparaître de l'atmosphère. Ils sont très sélectifs et se révèlent toxiques pour un certain nombre de personnes sur les lieux de travail de l'industrie, de l'agriculture et de la santé publique. Ils ont des effets nocifs directs ou indirects sur le sol, l'environnement, la flore et la faune naturelles des eaux de surface et des eaux souterraines, la vie aquatique, ce qui, en fin de compte, aura une influence négative sur les êtres humains et le bétail (**Rashid et al ., 2010**).

La dégradation microbienne des pesticides et des herbicides appliqués sur le sol est le principal mécanisme qui empêche l'accumulation de ces produits chimiques dans l'environnement (**Arbeli et al., 2007**). Les microorganismes présents dans la nature pouvaient dégrader les résidus de pesticides, à faible coût, sans danger pour l'environnement et sans causer de pollution secondaire. Par conséquent, les chercheurs ont mené des études fines sur les bactéries et ont eu une compréhension claire du mécanisme de dégradation des pesticides organiques. Parmi eux, un certain nombre de bactéries capables de dégrader et de transformer les pesticides ont été isolées (**Huang et al., 2018**). En outre, les principaux modes et mécanismes de dégradation des pesticides ont été clairement décrits (**Huang et al., 2018**) . D'après les recherches, les études actuelles sur les pesticides biodégradables se concentrent principalement sur les micro-organismes du sol, tels que les champignons, les bactéries et les actinomycètes (**Huang et al., 2018**).

La fonction écologique des Actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques. Les Actinomycètes, fort nombreux dans les sols, se joignent aux autres

Bactéries et aux Champignons comme nettoyeurs de la nature et formateurs d'humus **(Anonyme 1)**.

Pour la plupart de ces microorganismes, il existe un seuil d'inhibition au-dessus duquel la vitesse de réaction et le rendement de bioconversion deviennent faibles. Pour rendre le processus plus efficace, il est nécessaire d'envisager un traitement en continu et d'augmenter la concentration en biomasse afin de garantir un taux de conversion élevé; ceci est rendu possible grâce à l'immobilisation des bactéries sur des supports poreux naturels ou synthétiques, qui seront utilisées dans différentes configurations de bioréacteurs continus agités, et d'autre part limite l'exposition des microorganismes piégés dans les pores aux concentrations élevées en substrat susceptibles d'être inhibitrice ou toxiques **(Calegarri et Francotte, 1986; Webb et al. 1986; Willaert et al., 1996)**. Plusieurs méthodes pour l'immobilisation des bactéries sont rapportées **(Klein et Wagner, 1986)** ; l'inclusion dans les gels de polymères durant la polymérisation est la plus pratiquée. Les polymères naturels tels que les polysaccharides et l'alginate de calcium en particulier représentent plusieurs avantages (la porosité élevée, une méthode d'immobilisation assez simple et rapide, une bonne stabilité chimique et mécanique, et un faible coût **(Fukui et Tanaka, 1982)**).

Concrètement, notre étude a fait l'objet de deux Parties. Dans un premier temps, une étude bibliographique est présentée faisant le point sur les connaissances relatives aux éléments de base de notre étude (généralités sur les Actinomycètes et leur rôle dans la biodégradation des pesticides ainsi que l'application environnementales de la technologie des cellules immobilisées).

La deuxième partie, principalement expérimentale, porte sur la biodégradation d'un pesticide qui appartient à la famille des herbicides les plus utilisés au monde qui est le sulfosulfuron sous sa forme commerciale (Apyros 75 WG), par des cellules libres et immobilisées de deux souches bactériennes appartenant à la famille des Actinomycètes préalablement isolées par Mme Zermane F (enseignante attachée de recherche, au sein du laboratoire de génie microbiologie et application).

Revue
Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes

1. Généralités

Les Actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradiant, par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance. Cela explique leur dénomination. Le mot « Actinomycètes » provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants », expression utilisée pour les désigner en anglais (*Ray fungi*) et aussi en allemand et en russe. Les formes les plus évoluées des Actinomycètes rivalisent en complexité morphologique avec les moisissures (Champignons imparfaits) mais en diffèrent radicalement puisque, comme toutes les autres Bactéries, ce sont des Procaryotes (cellules sans enveloppes autour du matériel génétique). Un corollaire de leur structure cytologique est le diamètre de leurs hyphes qui est de l'ordre de 0,5 µm, soit approximativement un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques.

D'après S. A. Waksman (1959), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un Actinomycète en 1875, et C. O. Harz, en 1878, nomma *Actinomyces bovis* un organisme parasite trouvé dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les Actinomycètes, dont la plupart sont des Saprophytes, ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux et, en général, de presque tous les habitats où la vie est possible. Notons que ce ne sont pas des organismes marins et qu'ils deviennent de plus en plus rares dans les mers au fur et à mesure qu'on s'éloigne des côtes (**Anonyme1**).

Les actinomycètes, l'un des groupes les plus diversifiés de bactéries filamenteuses, sont bien connus pour leur polyvalence métabolique. Le potentiel bioactif de ces bactéries facilite leur survie même en cas de détresse et de conditions écologiques défavorables. (**Neelu et al.,2013**).

2. Morphologie

Morphologiquement, le groupe des Actinomycètes inclut à la fois des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace (certaines *Nocardia*), et enfin des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. Parmi les formes mycéliennes, on distingue celles qui ne forment qu'un mycélium « de base » poussant à la surface et dans le

milieu de culture et celles qui élaborent en outre un mycélium aérien issu du mycélium de base. De plus, il existe une curiosité biologique représentée par le genre *Sporichthya*, qui produit seulement un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au substratum par des crampons.

Les différents groupes d'Actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistantes à la chaleur et autres adversités. Les endospores sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des *Bacillus*, et les Actinomycètes (*Thermoactinomyces*), qui les produisent sur leurs hyphes, semblent être proches parents de ce groupe bactérien.

Les conidies peuvent, suivant les groupes, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales (**Anonyme1**).

3. Cycle de développement

La reproduction des actinomycètes peut s'opérer suivant trois modes : Fragmentation pseudo bactérienne, production de conidies, production de sporange.

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptés et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées.

Il a été estimé qu'environ 60 % des *Streptomyces* produisent, pendant la phase de limitations nutritionnelles, une famille de protéines du type γ -butyrolactone. Ces protéines constituent des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques.

La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains produisent des spores flagellées, appelées zoospores, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques (**Anonyme1**).

4. Physiologie et écologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**). En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air (**Reponen et al., 1998**). Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance (**Mincer et al., 2002; Zaitlin et al., 2003**). Certains genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts (**lacey, 1997; Song et al., 2001**). Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Sardi et al., 1992; Thirupl et al., 2001**).

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces*, dont la température optimale est comprise entre 50 et 60 °C. En ce qui concerne le pH la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles leurs croissance est comprise entre pH 5 et 9. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent a des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides (**Alexander, 1977**).

5. Taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobatéries contenant l'ordre des actinomycétales, ce dernier est divisé en 10 sous ordres Actinomycineae, Micrococcineae, Corynebacterineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae, Streptosporangineae, Frankineae et Glycomycineae. (**Larpent, 2000**).

En se basant sur les caractéristiques de la paroi : le type de l'acide diaminopimélique, la présence de glycine dans les ponts interpeptidiques et le contenu en sucres du peptidoglycane (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**). Les extraits cellulaires des actinomycètes munis d'une paroi des types 1, 3 et 5 contiennent également des sucres caractéristiques, utiles pour l'identification (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**). La morphologie et la couleur des

mycéliums et des sporanges, les caractères de surface et la disposition des conidiospores, le pourcentage en GC de l'ADN, la composition phospholipidique des membranes cellulaires et la résistance des spores à la chaleur représentent également des propriétés précieuses dans la taxonomie des actinomycètes (Prescott *et al.*, 2003).

6. Rôle écologique des actinomycètes

La fonction écologique des Actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques. Les Actinomycètes, sont nombreux dans les sols, se joignent aux autres Bactéries et aux Champignons comme nettoyeurs de la nature et formateurs d'humus. Ils prolifèrent surtout quand l'action des Bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action. De plus, les Actinomycètes du genre *Frankia* vivent en association avec de nombreux arbres et arbrisseaux, tels que les aulnes, sur les racines desquels ils forment des nodules où l'azote gazeux est fixé. Le système *Frankia*-plantes ligneuses fixe, globalement, dans la biosphère presque autant d'azote que le système *Rhizobium*-légumineuses. Les *Frankia* fixent aussi l'azote *in vitro*, tandis que les *Rhizobium* ne le font qu'*in planta*. Les *Frankia* pénètrent les cellules des racines, qu'ils déforment, et y produisent des vésicules où l'azote est fixé grâce à une nitrogénase.

Tout le monde connaît l'odeur de la terre fraîchement labourée. Cette odeur est due surtout à une huile neutre de bas poids moléculaire, la géosmine, produite par les Actinomycètes présents dans le sol. Du sol, la géosmine et autres métabolites odoriférants se répandent dans les eaux, les rendant indésirables comme boisson à cause de l'odeur, ce qui pose un problème dans la purification des eaux potables (Anonyme1).

7. Applications des actinobactéries

Les actinobactéries sont reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires. Qui ont des applications importantes dans divers domaines. Elles sont également une source prometteuse d'une large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle. Une grande partie des antibiotiques sur le marché est obtenue à partir des Actinobactéries. Elles produisent des inhibiteurs d'enzymes utiles pour le traitement du cancer et des modificateurs de la réponse immunitaire qui améliorent la réponse immunitaire. Elles ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aliphatiques et aromatiques. Ils effectuent des transformations microbiennes de composés organiques, un domaine d'une grande valeur commerciale. Les membres de

nombreux genres d'Actinobacteries peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion de déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques. Les actinobactéries sont également importantes dans le domaine de la biotechnologie végétale contre les agents pathogènes des plantes et sont utiles pour le biocontrôle. Leur potentiel métabolique offre un domaine de recherche important (**Anandan *et al* .,2016**).

Chapitre II : Les actinomycètes agent de biodégradation dans la nature

1. Généralités sur les pesticides

Ces dernières années, les gens ont été exposés à plusieurs types de substances à large spectre en raison de l'évolution rapide de la technologie. L'un de ces groupes de substances chimiques est les pesticides. Les pesticides constituent un élément essentiel de l'agriculture pour protéger les cultures et le bétail contre les infestations parasitaires et la réduction des rendements depuis de nombreuses décennies (**Ozkara, 2016**).

Malgré leur utilité, les pesticides peuvent présenter des risques potentiels pour la sécurité alimentaire, l'environnement et tous les êtres vivants. Les préoccupations concernant l'impact environnemental de l'utilisation répétée des pesticides a donné lieu à des recherches sur le devenir environnemental de ces agents, qui peuvent migrer des champs traités vers le sol, l'air, d'autres terres et des masses d'eau (**Ozkara, 2016**).

2. Les herbicides

Les herbicides ou désherbants appartiennent à une classe de pesticides utilisés dans la gestion des plantes indésirables dans les domaines de l'agriculture, de l'aménagement paysager, de la sylviculture, du jardinage et de l'industrie. Les mauvaises herbes coûtent chaque année des milliards de dollars de dégâts aux cultures, en particulier le maïs et soja aux États-Unis et au Canada, auquel la quantité maximale d'herbicides est appliquée. Des pertes économiques et environnementales similaires ont été associées à des espèces végétales indigènes en Asie du Sud-Est. Le contrôle des mauvaises herbes et autres plantes indésirables d'une manière rentable est très important pour l'agriculture et les autres industries connexes. (**Sherwani et al .,2013**)

2.1. L'herbicide APYROS

2.1.1. Définition

APYROS est un herbicide systémique qui permet de lutter contre les adventices graminées et dicotylédones du blé dont essentiellement les espèces du brome. Doté d'une formulation innovante, il permet le traitement à des doses réduites de matière active (**Anonyme2**).

2.1.2. Description et caractéristiques

Tableau 1 : Description et caractéristiques de l'herbicide Apyros (**Anonyme2**).

Non commercial	Apyros
Catégorie(s):	Herbicide
Matière(s) Active (s)	75 %Sulfosulfuron
Classification toxicologique	C
Numéro d'homologation	D11-9-001
Fournisseur	Monsanto Europe
Formulation	Granulés dispersibles (WG)
Famille Chimique	Sulfonylurées
Mode d'action	Systémique, absorbé par les feuilles et les racines

3. La pollution par les herbicides

Les herbicides sont des produits chimiques de lutte contre les mauvaises herbes, qui représentent une révolution dans la technologie de la sélection végétale. Leur utilisation excessive peut causer de graves dommages à l'environnement, ainsi qu'aux personnes exposées à leurs actions. La manipulation et l'utilisation des herbicides doivent respecter toutes les procédures de précaution appropriées, car il existe une corrélation étroite entre les maladies, notamment le cancer, et l'exposition professionnelle à ces composés chimiques (**Rosculete et al, 2018**).

La contamination par les herbicides peut être causée par l'inhalation, l'ingestion ou contact avec la peau, la recherche scientifique montre, exposition à certains herbicides affaiblit le système immunitaire, hormonal et nerveux, il peut aussi avoir un effet agents cancérigènes (y compris les cancers du poumon, du cerveau, de l'intestin et de la prostate) (**Fdil., 2004**).

Les herbicides ont un coefficient de partage octanol/eau de un (1) dans le tissu adipeux des poissons lorsqu'il est ingéré ; les humains après cela contaminé indirectement par la consommation de ces poissons, qui est bioamplification (**Olivier, 2007**). Une autre voie de

contamination humaine est éventuellement en buvant de l'eau potable. En effet, le processus de traitement de l'eau la consommation humaine n'élimine pas complètement les herbicides dissous dans l'eau (**Bernier, 2002**).

Les herbicides à base de sulfonilurées sont largement utilisés dans le monde pour protéger les cultures céréalières. Ils peuvent constituer un danger à long terme pour l'environnement, voire un risque de contamination des eaux souterraines et de surface, en raison des processus de lixiviation. En outre, ils sont considérés comme des perturbateurs du microbiote du sol (**Rachedi et al, 2017**).

4. La Biodégradation

4.1. Généralité

La biodégradation est un processus naturel qui se manifeste au sein de la nature. Elle est nécessaire pour la réalisation des cycles biogéochimiques (**Dommergues et Mangenot, 1972**). Un cycle biogéochimique correspond à l'ensemble des échanges et transformations des différents éléments (carbone, azote, oxygène, soufre, phosphore, eau) entre les différents réservoirs d'une planète (hydrosphère, atmosphère, lithosphère et biosphère).

La matière organique constitue une source de nutriments (C, H, O, N, P, S, oligoéléments) utilisés par les micro-organismes pour leur développement (croissance, reproduction, métabolisme secondaire). Ainsi, toute matière carbonée semble potentiellement décomposable par une flore microbienne adaptée. Toutefois, la nature du substrat (hydrophobe/hydrophile), sa structure chimique (nature des liaisons, ramifications), et physique (masse moléculaire, cristallinité), les conditions environnementales (humidité, pH, température, oxygène, oligoéléments, facteurs de croissance) peuvent avoir une influence sur le comportement de cette flore (**Lucas, 2007**).

4.2. Biodégradation des pesticides par les actinomycètes

Les actinomycètes ont un potentiel considérable de biotransformation et de biodégradation des pesticides. Les membres de ce groupe de bactéries Gram-positives se sont avérés dégrader les pesticides avec des structures chimiques très différentes, y compris les organochlorés, les s-triazines, les triazinones, les carbamates, les organophosphates, les organophosphonates, les acétanilides et les sulfonilurées. Un nombre limité de ces pesticides xénobiotiques peuvent être minéralisés par des isolats uniques, mais souvent des consortiums de bactéries sont

nécessaires pour une dégradation complète. Le cométabolisme des pesticides est fréquemment observé au sein de ce groupe de bactéries. Par rapport à la dégradation des pesticides par les bactéries Gram-négatives, beaucoup moins d'informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les biotransformations des pesticides par les actinomycètes sont disponibles. Les progrès dans ce domaine ont été sérieusement entravés par un manque d'outils génétiques moléculaires appropriés pour la plupart des représentants de ce groupe majeur de bactéries du sol. Surmonter cette contrainte permettrait une meilleure exploitation des capacités de biodégradation et de biotransformation des actinomycètes pour des applications telles que la bioremédiation et la construction de cultures transgéniques résistantes aux herbicides (De Schrijver, 1999).

Tableau 2 : exemples et caractéristiques des pesticides dégradés par les actinomycètes (Saez *et al.*, 2012, De Schrijver, 1999, Klementova & Keltnerova, 2015).

Pesticides	Caractéristiques	Exemples
Organochlorés	Solubles dans les lipides, ils s'accumulent dans les tissus adipeux des animaux, sont transférés à travers la chaîne alimentaire ; toxique pour divers animaux, persistant à long terme.	<ul style="list-style-type: none"> •Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) •lindane •Endosulfan •pentachlorophenol • Dieldrine
Organophosphorés	Soluble dans les solvants organiques mais aussi dans l'eau. Ils s'infiltrent jusqu'aux nappes phréatiques, moins persistants que les hydrocarbures chlorés ; certains affectent le système nerveux central. Ils sont absorbés par les plantes, transférés aux feuilles et aux	<ul style="list-style-type: none"> •Le Monocrotophos (MCP), • Chlorfenvinfos, •Chlorpyrifos (chlorpyrifos - ethyl

	tiges, qui sont la source d'insectes phyllophages ou se nourrissent de sages.	
Les sulfonylurées	herbicides inhibiteurs de l'acétolactate -synthase (début année 1980) sont actifs en traitement de céréales à très faibles doses, 5 à 35 g/ha contre 1500 g/ha pour le 2,4-D	<ul style="list-style-type: none"> • Apyros
Les s-triazines	Desherbants sélectifs, faible solubilité dans l'eau à 20 °C, (respectivement 33 et 5 mg/l). On était convaincu qu'elles ne pénétraient pas dans les sols au-delà de 5 cm.	<ul style="list-style-type: none"> • L'Atrazine (2 chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-s-triazine , • Simazines

Chapitre III : Immobilisation des cellules microbiennes

1. Généralités

L'immobilisation des cellules microbiennes est une stratégie importante pour l'utilisation efficace des catalyseurs à cellules entières car elle simplifie la séparation des produits, permet d'augmenter la concentration cellulaire, stabilise l'activité enzymatique et permet une utilisation répétée ou continue des biocatalyseurs. Cependant, les méthodes d'immobilisation conventionnelles ont des limites pratiques, telles qu'un transfert de masse limité dans la partie interne d'un gel, une fragilité du gel, une fuite cellulaire de la matrice de support et des effets néfastes sur la viabilité cellulaire et l'activité catalytique (Yoshimoto *et al.*, 2017).

2. Définition des cellules immobilisées

L'immobilisation des cellules est une technique prometteuse qui a fait l'objet d'une attention particulière au cours des dernières années. Cette méthode restreint la mobilité des cellules dans un espace défini, ce qui permet de conserver l'activité catalytique et d'améliorer la stabilité biologique et physique des micro-organismes. Elle peut être réalisée en utilisant une variété de matrices naturelles et synthétiques, qui peuvent atténuer les défis physicochimiques, tels que le pH et la température (Siripattanakul *et al.*, 2008 ; Yáñez-Ocampo *et al.*, 2009 , Saez *et al.*, 2012).

3. Les avantages et les inconvénients d'immobilisation des cellules microbiennes

3.1. Avantages

Au plan de la théorie, on attend de l'immobilisation des cellules microbiennes les avantages suivants :

- Accroître la vitesse de réaction en augmentant le nombre de cellules présentes dans le réacteur.
- Viabilité étendue des cellules en phase stationnaire ce qui permet une augmentation des métabolites secondaires (maintien de la biomasse).
- Eviter la perte du micro-organismes en fin du réaction et donc avoir la possibilité de la réutiliser

-Faciliter la séparation cellules/liquide, ce qui permet de mettre fin à la réaction au temps voulu, soit de faciliter les opérations de clarification en fin de réaction

-Améliorer la stabilité biologique et physique à long terme des microorganismes en raison de la protection par le support et réduit leur sensibilité aux substances toxiques (**Ferdjellah et al ., 2008**).

3.2. Inconvénients

Cette technique comporte de nombreux inconvénients, comparés à des procédés utilisant des cellules libres :

Les conditions de culture en immobilisant les cellules peuvent représenter un désavantage car le métabolisme pourrait être modifié de façon non voulue, ou il y a apparition d'autres problèmes au cours de la production tel que :

-Cellules peuvent se séparer du support et ainsi contaminer le produit

-Prolifération cellulaire peut détruire la matrice du support et les cellules se libèrent par la suite

-les techniques d'immobilisation des cellules peuvent être trop chères pour une utilisation à grande échelle

-le métabolisme des microorganismes utilisés peut être modifié par l'immobilisation. (**Ferdjellah et al ., 2008**).

4. Les techniques d'immobilisation cellulaire

Différentes méthodes d'immobilisation des cellules ont été appliquées pour lier les microorganismes sur des supports par des moyens artificiels ; ces méthodes comprennent l'adsorption, la liaison covalente, le piégeage et l'encapsulation (**Bouabidi et al ., 2019**).

4.1. Adsorption

L'adsorption est considérée comme la technique d'immobilisation des cellules physiques la plus ancienne et la plus couramment utilisée, en raison des facteurs suivants sa simplicité et sa réversibilité (**Wang et al., 2008**). L'immobilisation par adsorption s'accompagne d'un contact direct entre les nutriments et les cellules. L'immobilisation des cellules par adsorption s'effectue d'abord par le transfert des cellules à immobiliser de la masse à la surface du

support. Ensuite, l'adhésion des cellules et la colonisation ultérieure du support ont lieu (**Kilonzo et al. 2011**). Le principe de cette méthode est la liaison physique entre la surface d'un support insoluble dans l'eau et le micro-organisme immobilisé (**Bayat et al., 2015 ; Martins et al., 2013**). Les interactions physiques générées comprennent les interactions de van der Waals, les forces ioniques et la liaison hydrogène (**Jesionowski et al., 2014**). Les forces mentionnées représentent des forces moléculaires faibles, qui empêchent la modification de la structure original des cellules immobilisées (**Jesionowski et al. 2014**). L'adsorption présente une multitude d'avantages ; elle est douce, rapide, simple, peu coûteuse, efficace, et elle ne nécessite pas d'additifs chimiques, avec la possibilité de recharger le support (**Bayat et al. 2015**). En revanche, l'immobilisation par adsorption présente l'inconvénient que la faible force de liaison entre le microorganisme et la cellule entraîne un taux de fuite élevé de la cellule adsorbée du support pendant son utilisation (**Bayat et al. 2015**). Pour empêcher la désorption des micro-organismes de la matrice, une forte adsorption entre les cellules et le support doit être créée, ce qui peut être réalisé en utilisant des adsorbants appropriés (**Wang et al. 2008**). Une matrice d'adsorption appropriée permet de protéger les cellules des agents défavorables et de préserver leur activité physiologique (**Martins et al. 2013**). L'immobilisation par adsorption est affectée par différents facteurs, tels que le support matériel, le milieu environnant et la surface des cellules (**Bouabidi et al ., 2019**).

4.2.Par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente est considérée comme l'une des stratégies les plus couramment utilisées dans le domaine de l'immobilisation des cellules, et un bon nombre de systèmes immobilisés par liaison covalente ont déjà été développés et employés. Il s'agit d'une technique d'immobilisation économique, qui repose sur la formation d'une liaison covalente entre les cellules à immobiliser et la matrice de support en présence d'un agent de liaison. En d'autres termes, les cellules sont liées de manière covalente au matériau de support par un ou plusieurs groupes fonctionnels des cellules. Des exemples d'agents de couplage qui sont souvent utilisés pour l'immobilisation sont le glutaraldéhyde (GA) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Contrairement à l'adsorption, la liaison covalente est une méthode d'immobilisation irréversible. Les agents de liaison ou de réticulation sont généralement cytotoxiques et entraînent une perte de viabilité cellulaire, tandis qu'il est difficile de prévenir les dommages cellulaires pendant l'immobilisation ; par

conséquent, la méthode de liaison covalente est principalement appliquée pour l'immobilisation d'enzymes plutôt que pour l'immobilisation de cellules entières (**Bouabidi et al ., 2019**).

La liaison covalente offre plusieurs avantages, notamment la capacité d'améliorer l'activité catalytique par la stabilisation de la conformation active, la capacité de former une liaison forte entre l'enzyme immobilisée et le support. D'autre part, le principal inconvénient de la méthode d'immobilisation par liaison covalente est que, dans la plupart des cas, les conditions d'immobilisation compliquées entraînent une perte remarquable de l'activité enzymatique par altération de la structure de la protéine. Un certain nombre de recherches ont été menées dans le domaine de l'immobilisation par liaison covalente. Par exemple, les poudres de silice et de zirconium ont été utilisées pour l'immobilisation de *Candida rugosa* par liaison covalente. En outre, grâce à la liaison covalente avec le chitosan, la ω -transaminase (ω -TAs) immobilisée de *Vibrio fluvial* a conservé une activité plus élevée et une stabilité importante par rapport à l'enzyme libre (**Bouabidi et al ., 2019**).

4.3. Le piégeage

Le piégeage cellulaire est une technique d'immobilisation irréversible dans laquelle des particules ou des cellules sont capturées dans une matrice de support (**Bayat et al. 2015**), ce qui offre une protection des cellules contre les agressions extérieures (**Yoetz-Kopelman et al. 2016**). Le piégeage des cellules est largement utilisé dans le domaine de l'immobilisation des cellules et présente une multitude d'avantages, notamment celui de fournir des conditions peu coûteuses et douces pour le processus de réaction. D'un autre côté, le piégeage de la biomasse s'accompagne de la soumission des micro-organismes à une température inférieure à la congélation pendant l'étape de réticulation, ce qui affecte la viabilité des cellules (**Al-Zuhair et El-Naas., 2011**), sans compter que le piégeage des cellules peut limiter l'accessibilité du substrat et réduire le transport des électrons (**Yoetz-Kopelman et al., 2016**). Différents polymères naturels et synthétiques sont utilisés comme supports pour l'immobilisation de la biomasse, tels que les alginates, l'agar, l'agarose, le kappa-carraghénane, le polyacrylamide, la cellulose, le polysulfure, (PVA), le polyacrylamide et le sel sodique de carboxyméthylcellulose (**Bai et al., 2015 ; El-Naas et al., 2017 ; Erkaya et al., 2014 ; Ullah et al, 2013 ; Verma et al, 2013**). Généralement, les matrices polymères utilisées pour l'immobilisation ont une structure poreuse, ce qui permet la diffusion des polluants et des

produits métaboliques dans la matrice facilement (**Bayat et al., 2015**). Le piégeage de la biomasse dans le PVA et les matériaux cellulosiques s'est avéré efficace, offrant des caractéristiques de biosorption supérieures (**Bouabidi et al., 2019**).

4.4. Encapsulation

L'encapsulation est un cas particulier de piégeage, où le biocatalyseur (cellule ou enzyme) est piégé dans une membrane semi-perméable, tandis que les cellules immobilisées peuvent flotter librement dans l'espace central. L'encapsulation est considérée comme un processus physico-chimique ou mécanique consistant à enfermer la substance encapsulée, appelée matériau central, dans une enveloppe ou un revêtement, produisant ainsi une capsule d'un diamètre de quelques millimètres (**Bouabidi et al., 2019**). La semi-perméabilité de la membrane permet le flux de substrats et de nutriments libres tout en restreignant le biocatalyseur par les parois de la membrane. Cette méthode limite l'accès à l'intérieur de la capsule, ce qui permet de protéger le biocatalyseur des conditions environnementales et d'éviter les fuites de biocatalyseur. Le principal avantage de cette technique est qu'aucune modification chimique du matériau central n'est nécessaire, ce qui implique que l'activité du micro-organisme immobilisé reste intacte (**Bouabidi et al., 2019**).

5. Facteurs affectant l'immobilisation des cellules microbiennes

L'immobilisation des cellules microbiennes et l'adhésion des cellules aux surfaces solides sont affectées par de nombreux facteurs, tels que l'âge et l'état physiologique des cellules, la structure de surface des cellules bactériennes, les charges superficielles et l'hydrophobie. Les conditions environnementales, la composition du milieu et son pH ont la capacité de modifier la potentielle électrocinétique des cellules, qui à son tour influence considérablement l'adsorption des cellules. L'immobilisation des cellules est également affectée par les propriétés de surface des adsorbants. Un autre facteur important qui affecte l'immobilisation est la nature de l'absorbant. Les adsorbants inorganiques peuvent être facilement régénérés, sont résistants à la dégradation biologique et sont abordables. Le seul inconvénient est que les adsorbants inorganiques sont solubles dans les solutions alcalines. En revanche, les adsorbants organiques sont chimiquement stables et présentent une grande variété de propriétés de surface et de structures de pores. L'activité métabolique des cellules bactériennes sur les surfaces est affectée par plusieurs facteurs, notamment les changements de pH, la présence et

la concentration d'inhibiteurs, la concentration de substrats et d'ions, et la libération de métabolites par les cellules (cité par Bouabidi *et al.*, 2019).

6. Applications environnementales de la technologie des cellules immobilisées

L'utilisation des cellules immobilisées dans les processus industriels est actuellement une tendance dans le domaine de la biotechnologie appliquée à l'environnement, notamment dans la bioremediation, le traitement des effluents ou la production de métabolites à usage environnemental (Willaert, 1996 ; Cheetham, 1980 ; Brodelius, 1987). En sélectionnant des cellules bactériennes prises à différents stades de croissance et dont le métabolisme utilise plus efficacement certains polluants, il sera possible de les immobiliser avec succès sur différentes matrices (Trevors *et al.* 1992) afin d'être utilisées en bioremediation de milieux pollués ou d'effluents contenant des composés xénobiotiques tels que le phénol (Bettmann 1984), le chlorophenol (O'Reilly, 1989), l'acétonitrile (Chapatwala, 1993), les hydrocarbures polyaromatiques (Manohar *et al.*, 2001) ainsi que pour le processus de dénitrification (Tal, 2003).

Les procédés à cellules immobilisées permettent l'élimination des polluants avec un rendement élevé, même au-delà des concentrations pouvant être inhibitrices ou toxiques aux bactéries. Le traitement de volumes importants dans un volume limité du réacteur à cellules immobilisées sans nécessité d'une étape de séparation est aussi un avantage à reconnaître. (Willaert *et al.*, 1996).

Les cellules immobilisées présentent plusieurs avantages par rapport aux cellules en suspension libre, comme une plus grande rétention des micro-organismes dans le réacteur, viabilité cellulaire améliorée (semaines ou mois), protection des cellules contre la toxicité, réutilisation des cellules et facilité de séparation solide-liquide. Selon, l'immobilisation des cellules microbiennes et des enzymes est appliqué dans les procédés biotechnologiques en chimie conversion et bioremédiation, obtenant une biodégradation plus élevée, taux de dilution plus élevé sans lessivage dans les processus continus et tolérance aux fortes concentrations de composés toxiques. La biodégradation avec des cellules immobilisées est étudié pour plusieurs pesticides, tels que le diuron, l'atrazine, le méthyl-para thion et le tétrachlorvinphos et pentachlorophénol (Saez *et al.*, 2012).

L'utilisation des actinobactéries indigènes immobilisées est une alternative prometteuse à la bioremédiation des sites pollués (**Saez et al., 2012**).

Fuentes et al., 2013, ont rapporté que *Streptomyces* sp pourraient être utilisées dans des cultures mixtes et dans des systèmes immobilisés comme outil potentiel pour l'assainissement d'environnements contaminés par de multiples xénobiotiques.

Saez et al., 2012, on testé la capacité de quatre souches de *Streptomyces* sp libres et immobilisées dans quatre type de matrice, à dégrader le Lindane, ils ont trouvé que le Lindane dégradé par les souches immobilisées est significativement plus élevé que celui dégradé par les même souches libres.

Matériels et Méthodes

Tous les équipements et les matériaux utilisés sont préalablement stérilisés et les opérations sont réalisées dans des conditions stériles.

1. Milieu et réactifs

-L'herbicide utilisé au cours de cette étude est un pesticide qui appartient à la famille des sulfonylurées qui est le sulfosulfuron sous sa forme commerciale (Apyros 75 WG). C'est un herbicide systémique qui permet de lutter contre les adventices graminées et dicotylédones du blé dont essentiellement les espèces de brome, il est largement utilisé au monde et en Algérie.

-Le milieu ISP2 (Annexe) est utilisé pour le repiquage et la purification des souches d'Actinomycètes.

Le milieu ISP9 (Annexe) est un milieu minéral utilisé pour tester la capacité des actinomycètes à utiliser certains substrats comme source de carbone et d'énergie

2. Purification et revivification des souches d'Actinomycètes

Les souches d'actinomycètes utilisées dans cette étude, ont été précédemment isolées par Madame Zermane F. (enseignante attachée de recherche, au sein du laboratoire de génie microbiologie et applications).

Afin d'obtenir des souches pures, Les isolats d'actinomycètes sont purifiés sur milieu ISP2, Puis incubées à 30 °C pendant 7-21 jours. Il est recommandé d'effectuer le moins de repiquage possible pour maintenir la stabilité génétique de ces souches.

3. Conservation des souches d'Actinomycètes

Les souches purifiées appartenant aux actinomycètes sont conservées selon deux méthodes :

3.1. Sur gélose inclinée

Les souches sont ensemencées sur milieu ISP2 en gélose inclinée, après incubation à une température de 28-30 °C pendant 21 jours, les souches sont conservées à 4°C. Un repiquage est réalisé tous les deux mois

3.2. Sur milieu liquide

Concernant la conservation à long terme, les souches sont conservées dans le milieu liquide ISP2 contenant 15-20 % de glycérol (**Belabed, 2014**).

4. Sélection des souches d'actinomycètes

Les souches d'Actinomycètes sont ensemencées sur milieu ISP9 additionné de 1g/l de sulfosulfuron (Apyros 75 WG), puis incubées à 30°C pendant 7-21 jours.

5. Préparation des l'inoculas des souches sélectionnés

5.1. Préparation de l'inoculum général

Les souches d'actinomycètes testées sont ensemencées en stries serrées, sur ISP2 et incubées à 28 ± 2 °C pendant 7-21 jours. Après croissance, 20 ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque boîte de Pétri, les colonies sont raclées à l'aide d'un râteau puis récupérées par pipette Pasteur dans un tube stérile. L'inoculum ainsi récupéré, contenant des fragments de mycélium et de spores constitue l'inoculum général (Shirling et Gottlieb, 1966).

5.2. Préparation de l'inoculum lavé

100 ml du milieu liquide ISP2 sont inoculés par 10 millilitres de l'inoculum général, et incubés sous agitation (180 tpm) à 28 ± 2 °C pendant 48 heures (Shirling et Gottlieb, 1966).

Après l'incubation, la culture est centrifugée à 5000 tpm pendant 30 minutes. Le surnageant est écarté et le culot est lavé deux fois à l'eau distillée stérile puis repris dans 50 ml d'eau distillée stérile, cette suspension constitue l'inoculum lavé, qui sera utilisé dans les essais d'immobilisation subséquentes (Amirat et Menikher, 2014).

6. Etude comparative de la biodégradation du sulfosulfuron (Apyros 75 WG) par les souches d'actinomycètes sélectionnées libres et immobilisées

6.1. Méthodes d'immobilisation

Les deux souches sélectionnées sont immobilisées individuellement dans deux matrices : cubes d'agar et billes d'alginate.

6.1.1. Immobilisation dans l'agar

5 mL de gélose fluide (3 %) stérile contenant la souche étudiée à une concentration finale de 7,5 % (poids humide/volume) sont versés dans des boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre. Les plaques de gélose sont conservées à température ambiante jusqu'à solidification, ensuite des blocs d'agar sont découpés en cubes de 0,5 à 0,5 cm à l'aide d'un bistouri stérile (Saez *et al.*, 2012).

6.1.2. Immobilisation dans l'alginate de calcium

Une solution d'alginate (3%) stérile et 7.5 % (poids humide/volume) de la souche correspondante sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une seringue à une solution de CaCl_2 (2%) où des particules sphériques d'alginate de calcium de diamètre moyen (2 mm) sont instantanément formées. Les billes sont laissées au repos pendant 1 heure, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée (pour éliminer l'excès de calcium) (**Abouseoud, 2007**).

6.2. Essais en batch

Pour les deux types de préparations (cellules libres ou immobilisées) l'étude en batch est conduite dans des erlenmeyers de 250 ml sous agitation (200 tours/min) à température constante (30 °C). Les erlenmeyers contenant 100 ml de milieu minéral ISP9 additionné de l'herbicide sulfosulfuron (Apyros 75WG) à une concentration finale de 0.1g/l (**Abouseoud, 2007**).

Dans le cas de cellules libres, l'inoculum servant à l'ensemencement des cultures est l'inoculum lavé à une concentration finale de 7.5% (poids humide/volume).

Pour les cellules immobilisées dans l'alginate, 25 g de billes sont placées dans 100 ml de milieu ISP9 liquide contenant l'herbicide Apyros à une concentration de 0.1g/L.

Pour les cellules immobilisées dans la gélose fluide, les cubes d'agar obtenu à partir d'une boîte de Petrie servent à ensemercer le milieu de culture.

Toutes les cultures sont incubées à 30°C sous agitation (200 tpm) pendant 4 jours.

Des prélèvements périodiques sont effectués pendant quatre jours pour suivre la dégradation de l'herbicide sulfosulfuron (Apyros 75 WG), chaque échantillon est centrifugé à 5000 tpm, pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est conservé en absence de lumière à -20 °C°, pour une analyse chromatographique ultérieure.

Pour estimer la croissance bactérienne, à chaque prélèvement, 1g du culot de chaque culture est ensemencé sur milieu ISP2 et incubé à 30°C pendant 7 à 15 jours. Le taux de croissance est évalué par la détermination du nombre des colonies.

Des témoins négatifs (sans culture) sont réalisés en parallèle afin de quantifier la dégradation non biologique (abiotique) (**Abouseoud, 2007, Saez et al., 2012**).

6.3. Analyse par Chromatographie Liquide à haute performance

La détermination quantitative du sulfosulfuron (Apyros 75 WG) au cours du temps d'incubation est réalisée par injection des sumageants filtrés sur membrane millipores (0.22 µm) dans le système HPLC dont les caractéristiques sont les suivantes :

-La phase mobile est un mélange, acétonitrile : eau ultra pure (50: 50 v / v).

-La colonne d'analyse est une Colonne 180 DS avec une longueur de 25 × 0,46 cm et un diamètre de 5µm.

-Le débit utilisé dans la colonne est de 1mL / mn.

-La détection est réalisée au moyen d'un détecteurs UV-visible : UV-2075 couplé d'un ordinateur menés d'un logiciel pour visualisé les signaux enregistrée par le détecteur (**Anjana et al., 2006**).

7. Identifications présomptives des souches actives

7.1. Technique de culture sur lame

Les souches actives sontensemencées, à raison d'une goutte de l'inoculum sur une portion rectangulaire d'Agar de 1cm x 1cm x 2mm d'un milieu solide ISP2. Ce rectangle est déposé sur une lame puis recouvert avec une lamelle. La culture sous forme de sandwich est incubée à 30 °C pendant 21 jours. L'observation se fait au microscope optique (G x 100) (**Zaitlin et al., 2003**).

7.2. Technique de culture sur lamelle

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé ISP2, de telle sorte qu'elle forme un angle de 45 °C avec la surface de celui-ci. Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu. Après 14 jours d'incubation à 30 °C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des fragments du mycélium du substrat et aérien, elle est ensuite déposée sur une lame puis examinée au microscope optique (G x 100) (**Abouseoud, 2007**).

Résultats et discussion

1. Repiquage et revivification des souches d'Actinomycètes *sp.*

Les isolats de 56 souches d'actinomycètes sont repiqués sur milieu de culture ISP2 (Annexe1). Puis incubées à 30 °C pendant 7-21 jours. Afin d'obtenir des souches pures (Tableau 3).

Tableau 3 : Les souches d'actinomycètes repiquées sur le milieu de culture ISP2

Souches actinomycétales « S »	Souches actinomycétales « N »	Souches actinomycétales « A »	Souches actinomycétales « K »	Souches actinomycétales « G »
S1	N1	A1	K2	G2
S2	N2	A2	K5	G3
S3	N3	A4	K8	G4
S4	N4	A5	K10	G5
S5	N5	A6	K12	G7
S13	N6	A8	K14	G8
S15	N7	A10	K20	G9
S30	N8	A11	K24	GX
S44	N9	A12	K25	
S66	N10	A17		
S101	N11			
S102	N12			
S105	N13			
SX1				
SX2				
SX3				

2. Caractéristiques morphologiques des souches purifiées

Les souches d'actinomycètes purifiées ont un aspect morphologique très typique, les colonies sont sèches, rugueuses, avec des mycéliums aériens et végétatifs, et certaines uniquement avec du mycélium de substrat.

Généralement les colonies sont poudreuses de taille moyenne, régulières ou irrégulières, plates ou rondes, à l'odeur terreuse caractéristique des actinomycètes à croissance lente (Figure1).

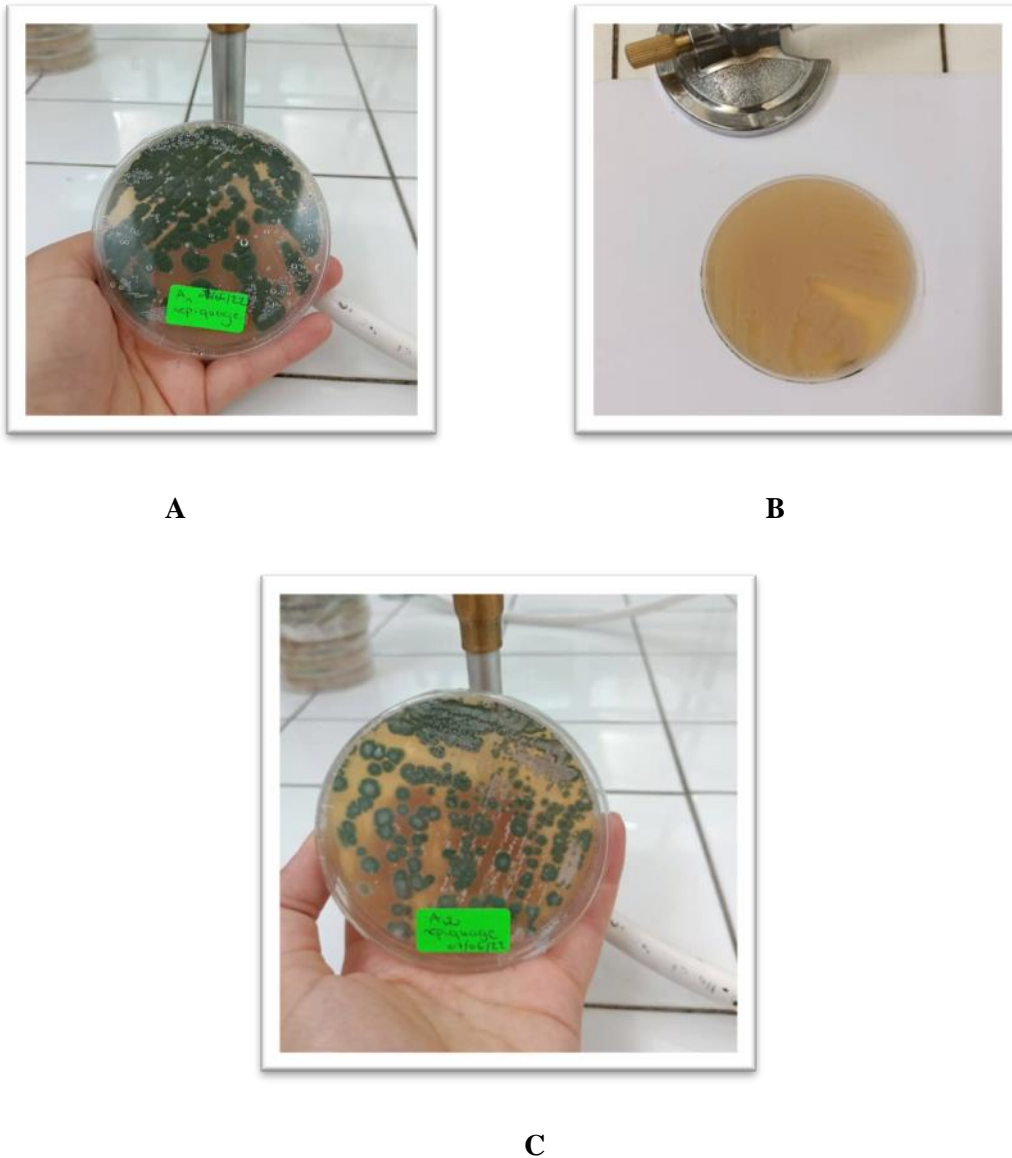


Figure 1 : Exemples de souches d'Actinomycètes pures sur milieu de culture ISP2

A : souche A1 ; B : souche S44 ; C : souche A2

3. Sélection des souches d'actinomycètes

Les souches d'actinomycètes purifiées sont inoculées sur milieu ISP9 contenant l'herbicide sulfosulfuron (Apyros 75 wg) à une concentration dix fois la dose recommandée (1g/l) comme seule source de carbone et d'énergie, la dégradation du sulfosulfuron est évaluée en comparant la croissance des souches à celle obtenue sur milieu ISP2.

Parmi les souches testées, six souches (S15, S105, N13, A2, A8 et K10) présentent une bonne croissance sur le milieu ISP9 contenant l'herbicide comme seule source de carbone et

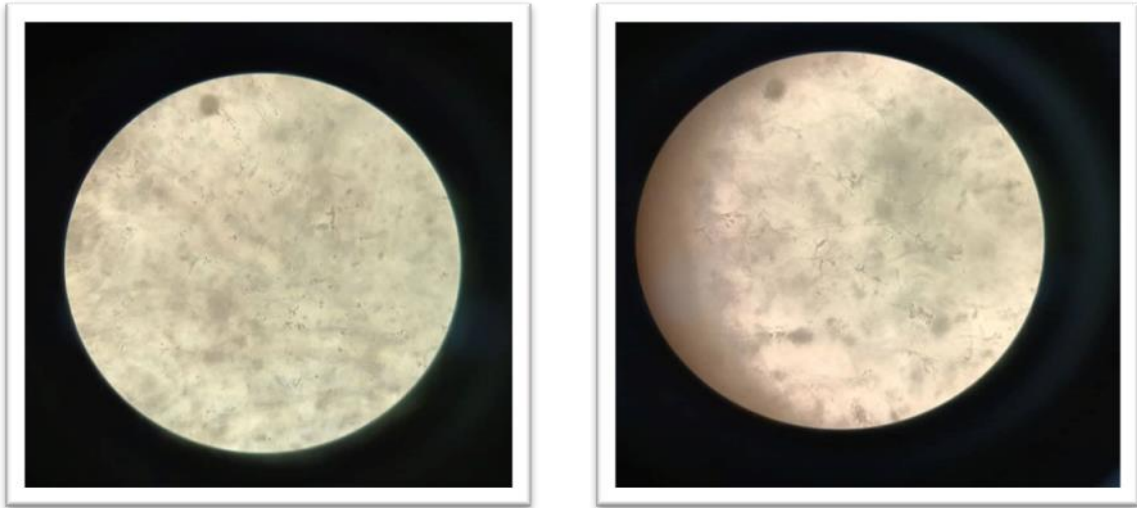
d'énergie alors que les souches (S3, S44, N6, A4) présentent une faible croissance, le reste des souches ont une croissance nul (**Tableau 4**).

Les souches ayant une bonne croissance dans ces conditions sont sélectionnées pour les tests de biodégradation du pesticide étudié

Tableau 4: capacité des souches de croître sur le milieu ISP9 contenant l'herbicide APYROS comme seule source de carbone et d'énergie.

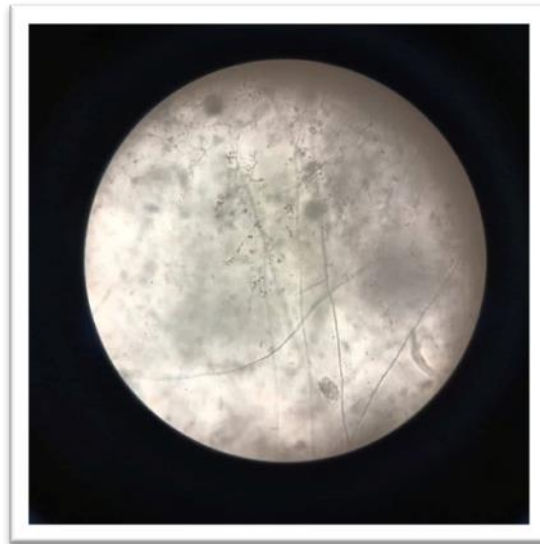
Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu ISP9+ Apyros(SSCE)	Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu ISP9+ Apyros(SSCE)	Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu ISP9+ Apyros(SSCE)
S1	-	N4	-	A17	-
S2	-	N5	-	K2	-
S3	+	N6	+	K5	-
S4	-	N7	-	K8	-
S5	-	N8	-	K10	+++
S13	-	N9	-	K12	-
S15	+++	N10	-	K14	-
S30	-	N11	-	K20	-
S44	+	N12	-	K24	-
S66	-	N13	+++	K25	-
S101	-	A1	-	G2	-
S102	-	A2	+++	G3	-
S105	+++	A4	+	G4	-
SX1	-	A5	-	G5	-
SX2	-	A6	-	G7	-
SX3	-	A8	+++	G8	-
N1	-	A10	-	G9	-
N2	-	A11	-	GX	-
N3	-	A12	-		

(+++): Bonne croissance, (+): croissance faible à modérée, (-): pas de croissance.



A

B



C

Figure 2: Aspect microscopique des souches d'Actinomycètes capable de croître sur le milieu ISP9 + Apyros (1g/l) observées au microscope optique (G x 10).

A : souche N13 ; B : souche A8 ; C : souche S105

4. Etude comparative de la biodégradation du sulfosulfuron (Apyros 75 WG) par les souches d'actinomycètes sélectionnées libres et immobilisées

4.1. Méthodes d'immobilisation

Les deux souches sélectionnées sont immobilisées individuellement dans deux matrices : cubes d'agar et billes d'alginate (Figure 3 et 4).

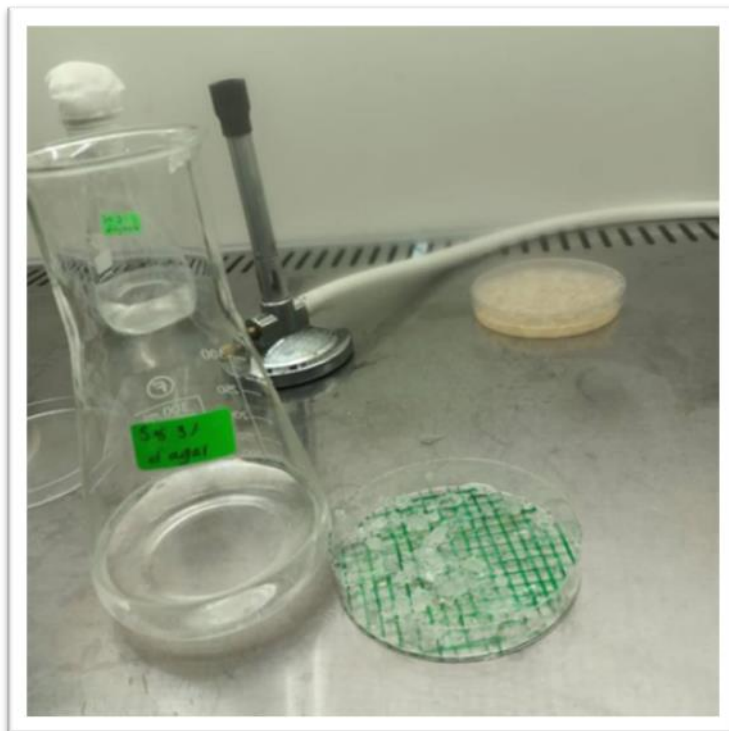


Figure 3: les cellules de la souche S15 immobilisées dans le support des cubes d'agar

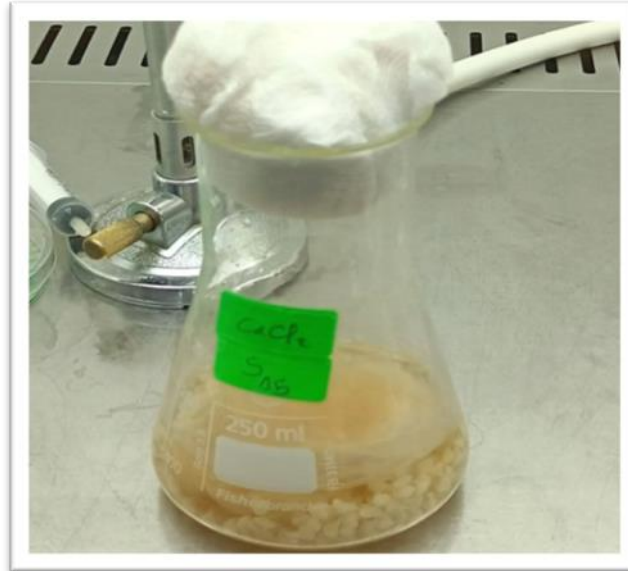


Figure 4: les cellules de la souche S15 immobilisées sur le support des billes d'alginate de calcium

4.2. Analyse par Chromatographie Liquide à haute performance

Dans nos conditions expérimentales, le temps de rétention de l'herbicide sulfosulfuron est 2.5 minute (Figure 5,6 et 7).

L'analyse par chromatographie à haute performance en phase liquide a permis aussi de détecter plusieurs pics, dont les temps de rétention sont différents à celui du sulfosulfuron , ces pics correspondent aux métabolites qui résultent de la dégradation de l'herbicide étudié.

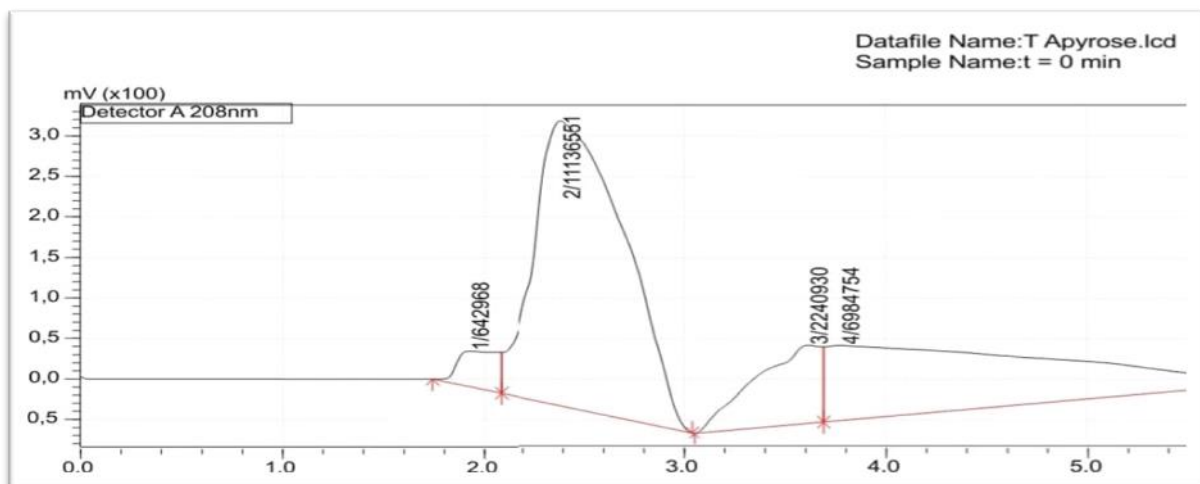


Figure 5 : chromatogramme de standard de l'apyros (1g/l), le sulfosulfuron correspond au pic N°2, RT=2,5 min

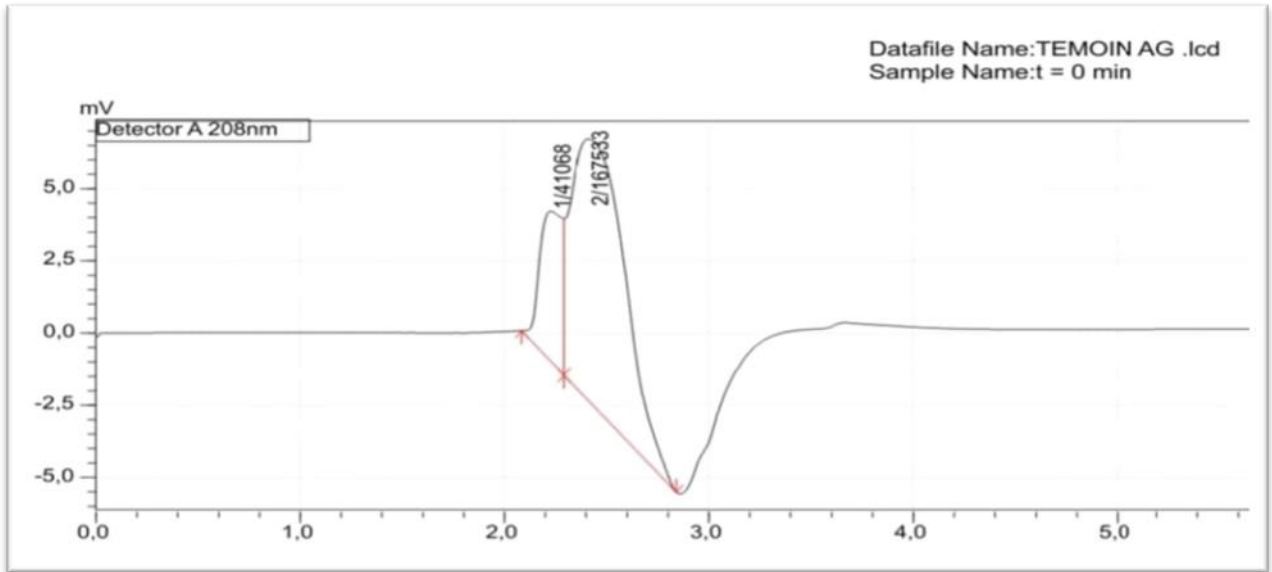


Figure 6: chromatogramme de témoin Apyros (1g/l) pour le support des cubes d'agar, le sulfosulfuron correspond au pic N°2, RT=2,5

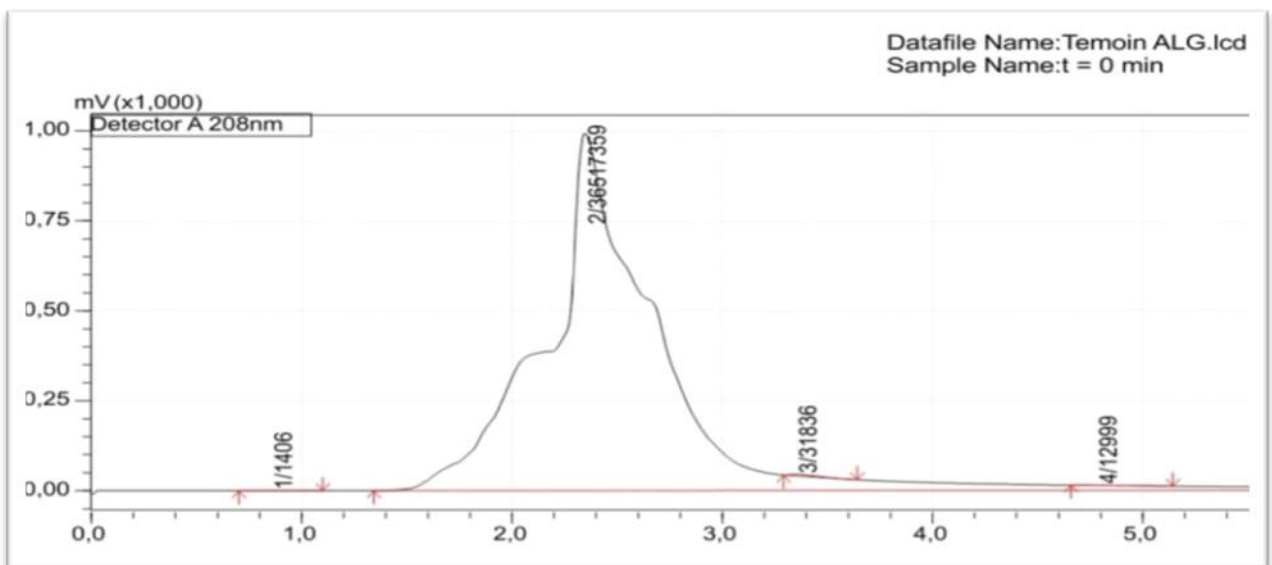


Figure 7: chromatogramme de témoin Apyros (1g/l) pour le support des billes d'alginate de calcium, le sulfosulfuron correspond au pic N°2, RT=2,5 min

4.3. Cinétique de dégradation du sulfosulfuron au cours du temps d'incubation

L'évaluation de la dégradation de l'herbicide sulfosulfuron (Apyros 75 wg) dans les surnagants des deux souches sélectionnées est estimée par la variation des aires des pics

obtenues par HPLC (RT : 2.5min) qui sont proportionnels à la concentration du sulfosulfuron au cours du temps (Tableau 5).

Tableau 5: variation de la concentration d'apyros (sulfosulfuron) au cour du temps d'incubation par les souches A2, S15.

Type de support/souche	Aires (%) des pics correspondant au sulfosulfuron (souche A2)	Aires (%) des pics correspondant au sulfosulfuron (souche S15)
Souche libre : 24h	93,49%	98,90%
Souche libre : 3^{eme} jour	58,01%	55,40%
Souche libre : 4^{eme} jour	33,74%	16,52%
support des cubes d'agar : 24h	76,15%	43,23%
support des cubes d'agar : 3^{eme} jour	58,50%	29,54%
support des cubes d'agar : 4^{eme} jour	57,09%	5,35%
support des cubes billes d'alginate de calcium : 24h	48,43%	47,19%
support des cubes billes d'alginate de calcium : 3^{eme} jour	46,79%	44,31%
support des cubes billes d'alginate de calcium : 4^{eme} jour	11,46%	40,89%

Les résultats obtenus par HPLC révèlent une dégradation progressive de l'herbicide par les deux souches d'actionomycètes.

Selon les aires des pics (Tableau 5). La concentration du sulfosulfuron diminue progressivement au cours du temps d'incubation pour les deux souches S15 et A2 dans les deux supports : les cubes d'agar et les bille d'alginate de calcium et ainsi pour les souches libres

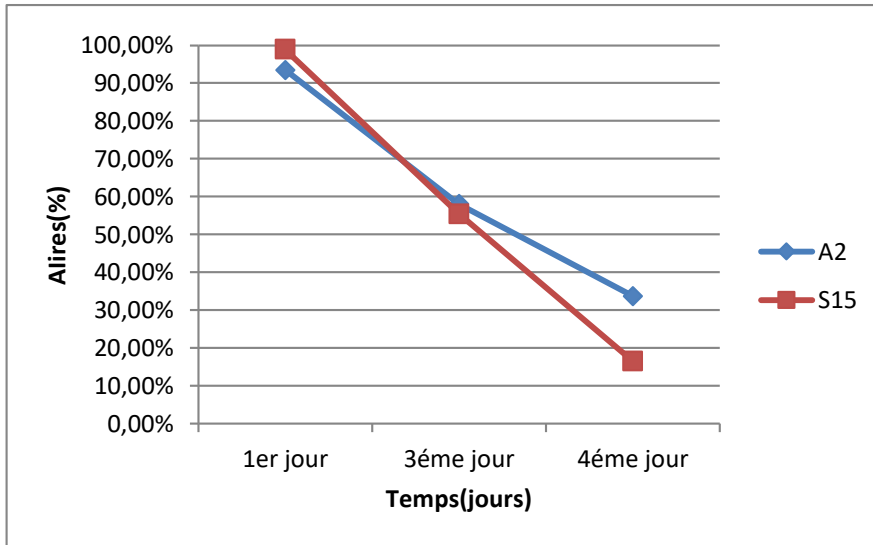


Figure 8 : cinétique de dégradation du sulfosulfuron par les souches A2 et S15 libre en fonction du temps

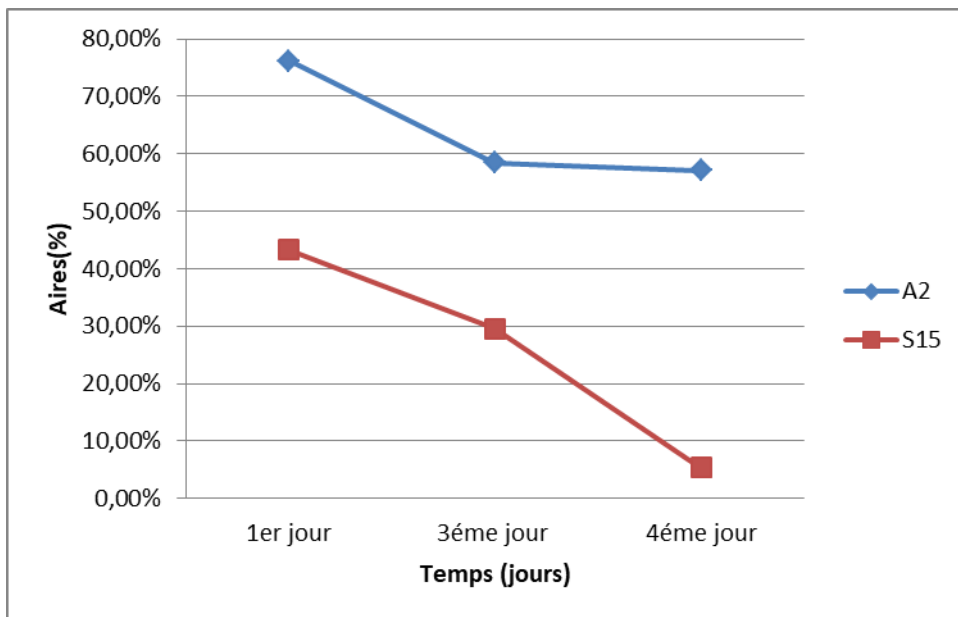


Figure 9: cinétique de dégradation du sulfosulfuron par les souches A2 et S15 immobile sur le support des cubes d'agar en fonction du temps

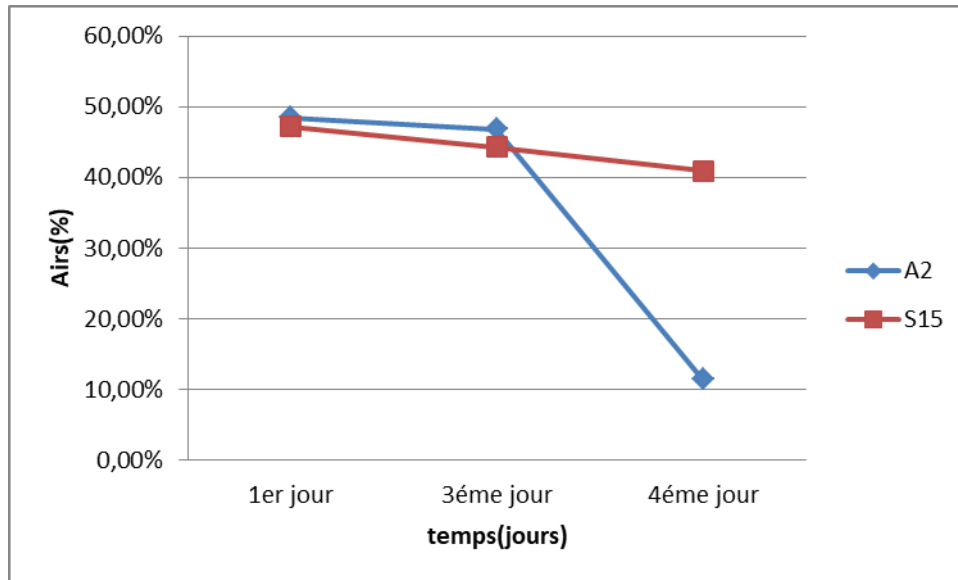


Figure 10: cinétique de dégradation du sulfosulfuron par les souches A2 et S15 immobile sur le support des billes d’alginate de calcium en fonction du temps

Pour la souche S15, après quatre jours d’incubation 83.52% du sulfosulfuron est dégradé par la souche sous forme libre, 59.11% est dégradé par la souche immobilisée dans les billes d’alginate et 94.65% du sulfosulfuron est dégradé par rapport au standart, par la même souche immobilisée dans les cubes d’agar (**Figure 11,12 et 13**) (les chromatogrammes de 1^{er} jour et 3^{ème} jours sont indiquer dans **Annexe2**)

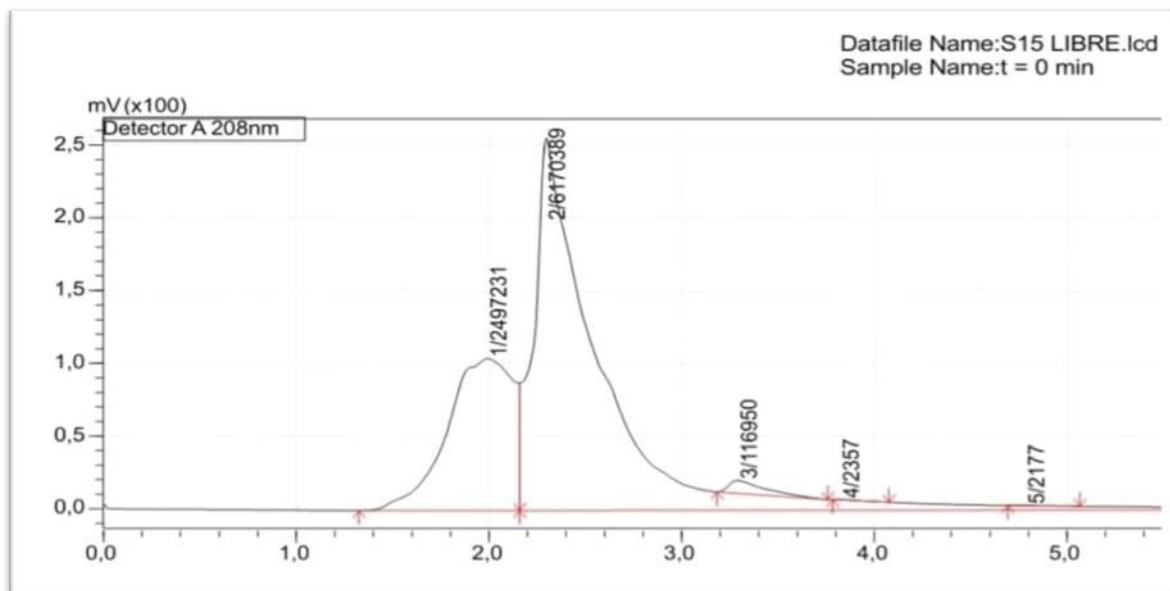


Figure 11 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 libre après 4 jours (pic N°2, air= 16,52%).

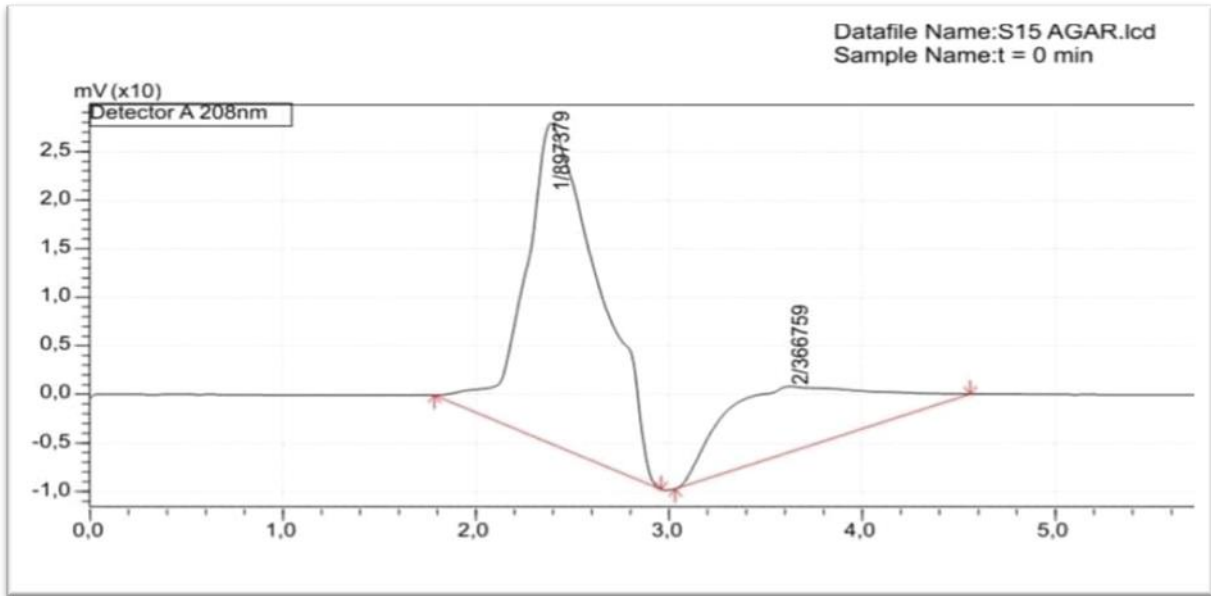


Figure 12 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar après 4 jours (pic N°1, air= 5,35%).

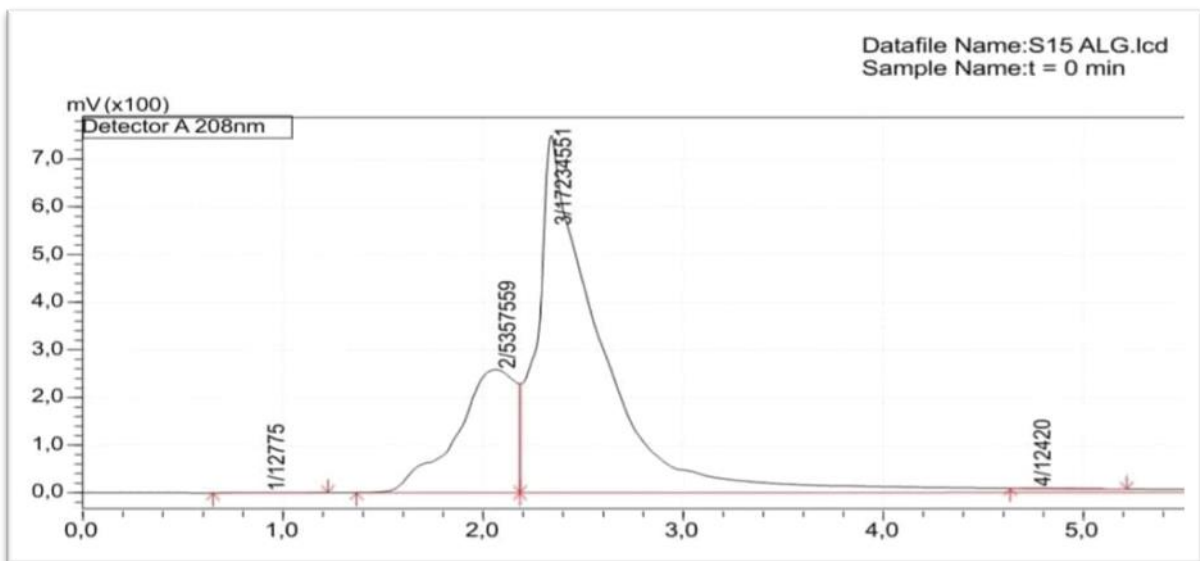
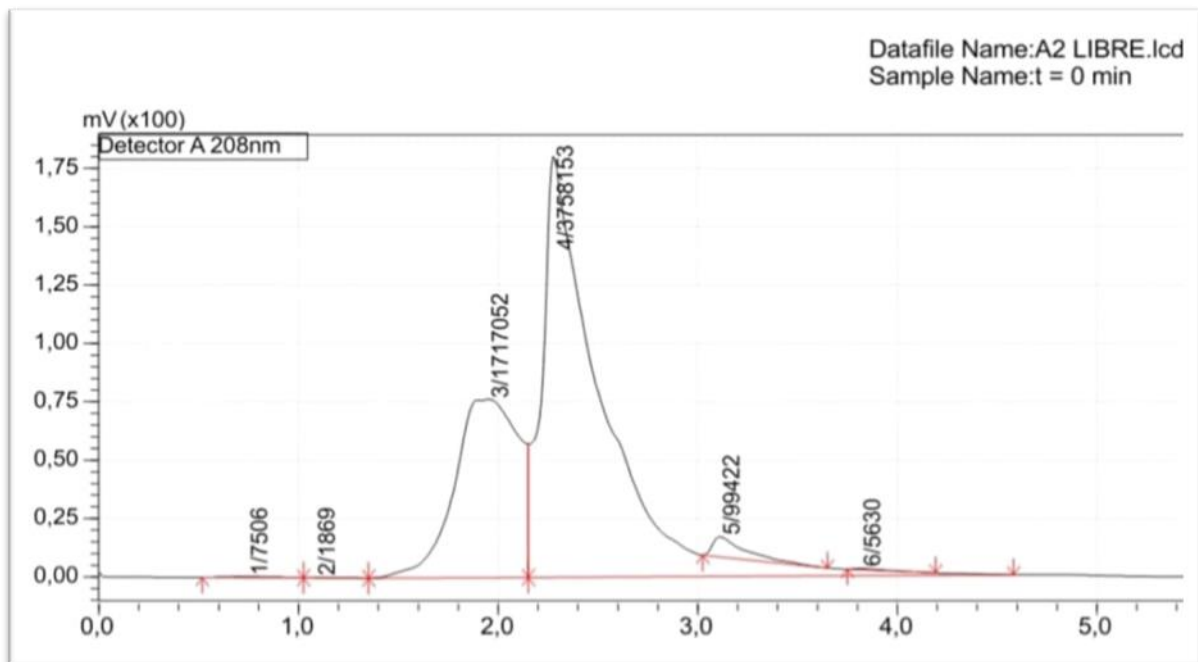


Figure 13 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium après 4 jours (pic N°3, air= 40,89%).

Pour la souche A2, après quatre jour d'incubation, 66.26% du sulfosulfuron est dégradé par la souche sous sa forme libre, 42.09% est dégradé par la même souche immobilisée dans les cubes d'agar et 88.54% du pesticide est dégradé par cette souche immobilisées dans les billes d'alginate (**Figure 14, 15 et 16**) (les chromatogrammes de 1^{er} jour et 3^{eme} jours sont indiquer dans **Annexe2**)

Nos résultats sont en accord avec **Saez et al., 2012**, qui ont testé la capacité de quatre souches de *Streptomyces* sp libres et immobilisées dans quatre type de matrice, à dégrader le Lindane, ils ont trouvé que le Lindane dégradé par les souches immobilisées est significativement plus élevé que celui dégradé par les mêmes souches libres.



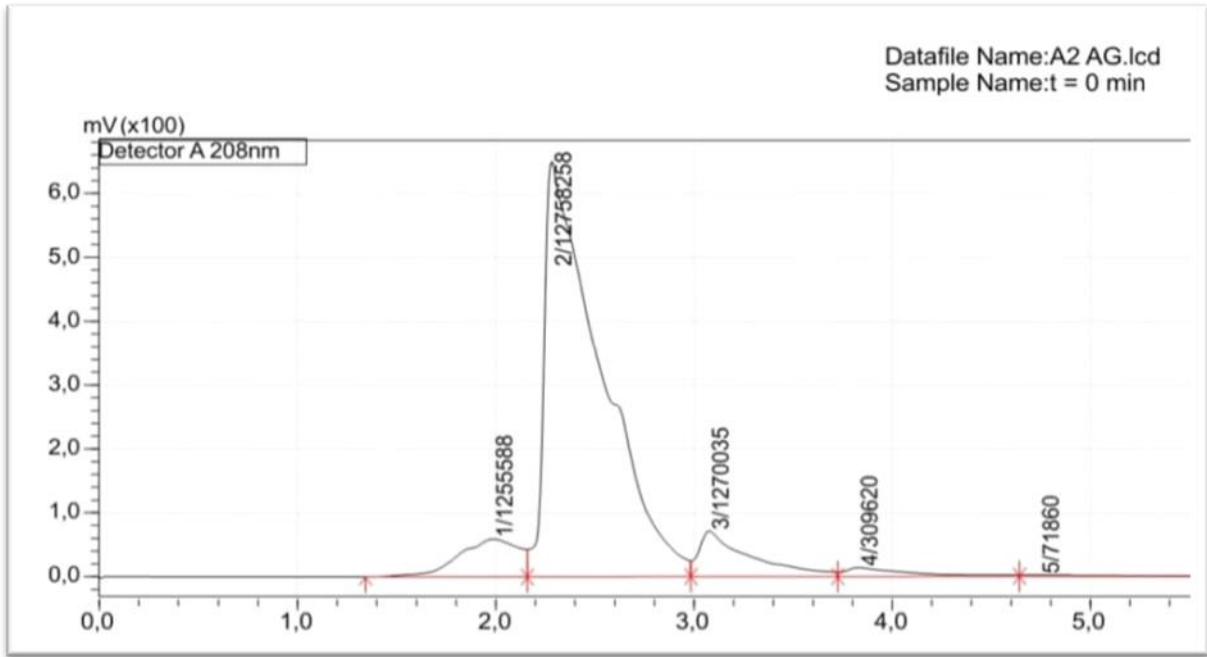


Figure 15 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar après 4 jours (pic N°1, air= 57,09%).

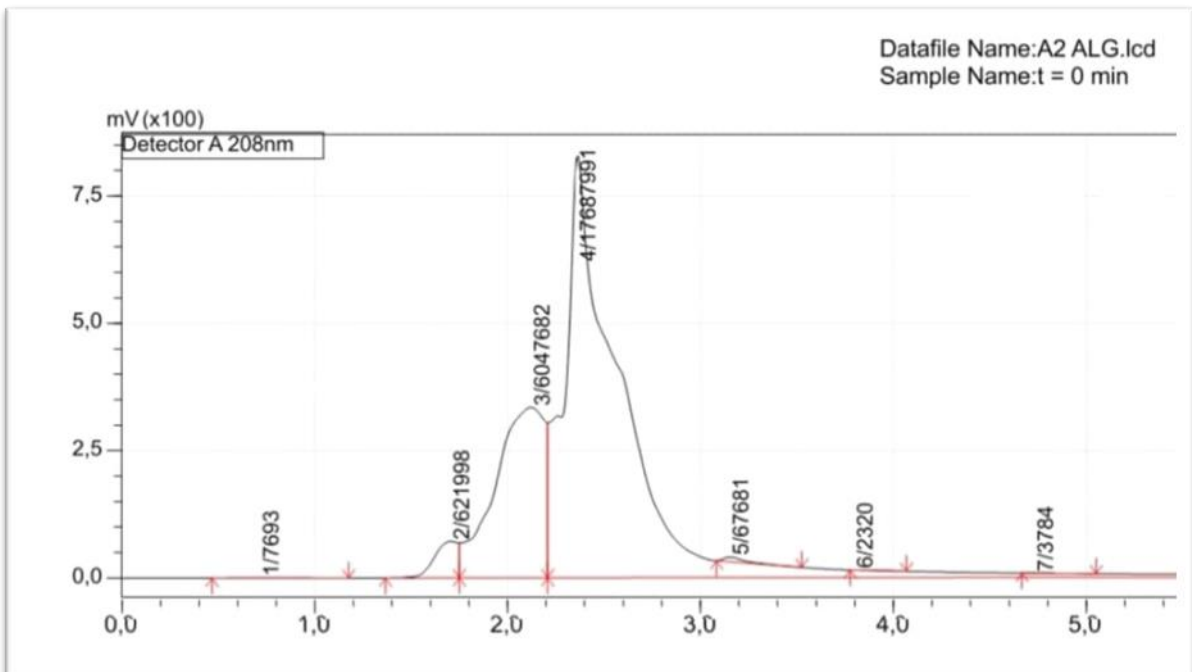


Figure 16 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium après 4 jours (pic N°4, air= 11,46%).

5. évaluation de la croissance microbienne en fonction du temps

1g du culot contenant des cellules piégées sont recueillies pour évaluer la croissance microbienne par la détermination le nombre de colonies par gramme de support sur le milieu de culture ISP2 incubées à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. Les mêmes essais ont été effectués avec des cellules libres et pour les différentes matrices d'immobilisation sans microorganismes utilisés comme témoin.

Toutes les colonies sont dénombrées, sauf pour les boîtes contenant 15 et 300 colonies.

Le nombre des colonies généralement a diminué au 3^{ème} jours d'incubation pour les deux souches A2 et S15, cela peut-être expliqué par la diminution de la concentration de l'herbicide Apyros qui est la seule source de carbone et d'énergie dans le milieu de culture. Au 4^{ème} jours d'incubation le nombre des colonies est variables pour les deux souches d'une part et selon le support utilisé d'autres part, ce qui peu être expliqué par la capacité variable des deux souches à utiliser les métabolites produits à partir de la dégradation du pesticides (Tableau 6,7 et 8).

Tableau 6: Nombre de colonies des souches A2 et S15 sur le milieu ISP2 après 24h d'incubation

Échantillons	Nombre de colonies
la souche A2 libre	≥ 300
la souche A2 immobile sur le support des cubes d'agar	80
La souche A2 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium	≥ 300
la souche S15 libre	≥ 300
la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar	≥ 300
La souche S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium	27

Tableau 7 : Nombre de colonies des souches A2 et S15 sur le milieu ISP2 après 3 jours d'incubation.

Échantillons	Nombre de colonies
la souche A2 libre	54
la souche A2 immobile sur le support des cubes d'agar	22
La souche A2 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium	≥300
la souche S15 libre	20
la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar	01
La souche S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium	29

Tableau 8: Nombre de colonies des souches A2 et S15 sur le milieu ISP2 après 4 jours d'incubation

Échantillons	Nombre de colonies
la souche A2 libre	≥300
la souche A2 immobile sur le support des cubes d'agar	20
La souche A2 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium	45
la souche S15 libre	25
la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar	6
La souche S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium	32

6. Identification présumptive des souches actives

Les deux souches A2 et S15 sont préidentifiées selon leur aspect macroscopique et microscopique.

Les deux souches présentent des colonies poudreuses de couleur grisâtre au centre, blanche aux bords pour la souche S15 et verdâtre avec des taches blanches au centre pour la souche A2 (Figure17).

Pour les deux souches les hyphes du mycélium végétatif sont fins, très ramifiés, non fragmentés, non sporulés. Le mycélium aérien est très ramifié et porte de longues chaînes de spores de forme droites pour la souche S15 et des spores individuelles pour la souche A2 (Figure 18, Tableau 9).

Selon le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9, L'ensemble des caractères macroscopiques et microscopiques étudiés permis de rapprocher la souche S15 au genre *Streptomyces* et la souche A2 au genre *Micromonospora*.



A

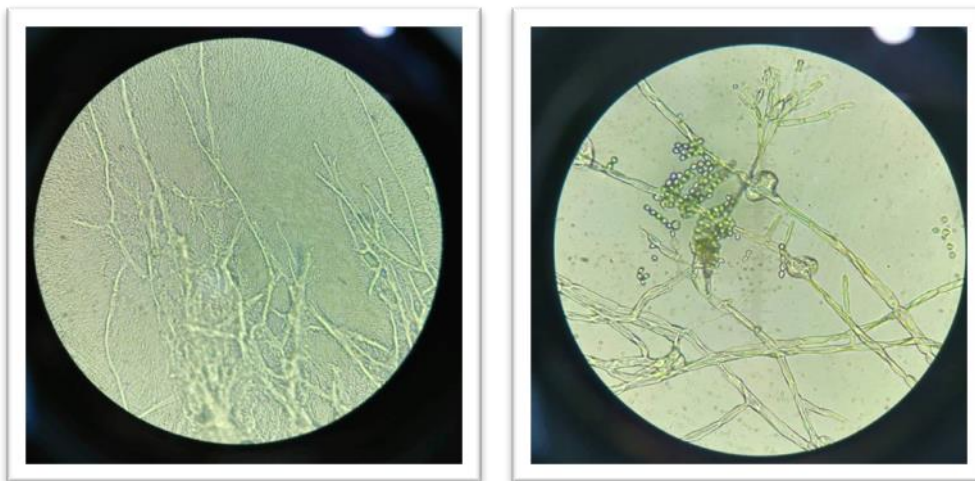
B

Figure 17 : Aspect macroscopique des souches actives

A : souche S15 ; B : souche A2.

Tableau 9: Caractérisations macroscopiques des souches actives.

Souches	Milieu de culture	Aspect de la colonie	Couleur de mycélium aérien	Couleur de mycélium du substrat
A2	ISP2	Poudreuse	Vert Crème	Beige
S15	ISP2	Ridée Crayeuse	Vert Gris	Beige Brun



A

B

Figure 18 : Aspect microscopique des souches actives (G×100)

A : souche A2 ; B : souche S15.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les pesticides sont des polluants organiques persistants (POP) à caractère toxique, bioaccumulable et très répandus dans l'environnement. Les études de la biodégradation des pesticides sont considérablement développées et la plupart des souches microbiennes dégradant les pesticides sont également identifiées. L'application restreinte de la bioremédiation des pesticides dans l'environnement est due à une efficacité de dégradation réduite et à un état de l'environnement très récalcitrant.

Notre travail est réalisé dans le laboratoire de biophysique de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 et les laboratoires de biotechnologie animal, du chimie et control de qualité et des analyses environnementales du Centre de Recherche en Biotechnologie .Ce travail est basé sur cinq objectifs primordiaux, **le premier** est la revivification et la purification des souches d'*Actinomycètes sp.*, déjà isolées d'un sol contaminé par l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) , **le deuxième** est la présélection des souches possédant l'aptitude de se développer sur cet herbicide comme seule source de carbone et d'énergie, **le troisième** objectifs consiste à établir des essais d'immobilisation des souches actives sur deux types de supports : en gélose fluide et en des billes d'alginate de calcium . **Le quatrième** est le suivie de la cinétique de biodégradation de cet herbicide par les souches performantes par HPLC et la comparaison entre les souches immobilisées et les souches libre, **le cinquième** et le dernier objectif est l'identification présomptive des genres bactériens les plus actives.

En fait, 56 souches ont été purifiées sur milieu ISP2. La capacité de ces dernières à utiliser l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie a été évaluée sur un milieu gélosé ISP9 contenant la dose de (1 g/l) d'Apyros. Par conséquent, seules cinq souches ont montré une bonne croissance sur ce milieu, tandis que cinq autres souches ont montré une faible croissance. Deux souches actives (S15, A2) capables d'utiliser l'Apyros comme seule source de carbone et d'énergie sont sélectionnées pour le test d'immobilisation et le suivie de la cinétique de dégradation. Elles ont été cultivées sur le milieu ISP9 liquide additionné de l'Apyros (0.1g/l), puis immobilisées sur deux supports cités en ci-dessus. Le suivie de la dégradation de cet herbicide est réalisé par chromatographie à haute performance (HPLC) pour les deux supports et pour les cellules libres.

Via les résultats obtenus, il s'est avéré que le système microbien immobilisé sur les billes d'alginate offre des résultats plus avantageux comparativement au système libre ou immobilisé dans les cubes d'agar, pour la souche A2, alors que la souche S15 immobilisée dans les cubes d'agar, présente une capacité de dégrader l'Apyros mieux que la souche libre ou immobilisée sur les billes d'alginate. De ce fait, il paraît que l'utilisation de la technologie d'immobilisation pour réduire la pollution de l'environnement en biodégradant de nombreux composés nocifs est cruciale et d'importance majeure. L'application de cette filière dans le domaine de la bioremédiation environnementale est prometteuse et nécessite l'implication d'autres domaines de recherche plus avancés, telle que les techniques génomiques pour l'identification exhaustive des souches bioremediatrice jugées performantes.

L'ensemble des caractères macroscopiques et microscopiques étudiés permis de rapprocher la souche S15 au genre *Streptomyces* et la souches A2 au genre *Micromonospora*.

Perspectives

- Identification de ces souches d'actinomycètes par des tests chimiotaxonomiques et des analyses phylogénétique.
- Identification de métabolite de biodégradation de cet herbicide.
- Utilisation de ces souches actives en biotechnologie.

Références bibliographiques

1. Abouseoud, M. (2007). Contribution à l'étude de la biodégradation du naphthalène par Cellules libres et immobilisées de *Pseudomonas sp.* Doctorat d'état : Génie des Procédés. Alger : Université des sciences et de la technologie HOUARI Boumedienne USTHB, 112 p.
2. Amirat, A. et Menikher, S. (2014). Isolement et caractérisation morphologique de souches d'actinomycètes capable de tolérer et utiliser l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie. Mémoire Master Recherche : microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes. Constantine : université Constantine, 158p.
3. Anandan, R., Dharumadurai, D., et Manogaran, G. (2016). An Introduction to Actinobacteria: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. 8(12), 1846-1853.
4. Arbeli, Z. et Fuentes, C. (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*. 142(1), 1734-1742.
5. Belabed, B. (2014). Recherche des activités anti-pathogènes chez les espèces du genre *Streptomyces* isolées de différents biotopes : biologie moléculaire et génétique des microorganismes. Oran: Université d'Oran, 118p.
6. Bergey, D.H. et Holt, J.G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore : Williams & Wilkins. 976 p. – (Ninth edition)
7. Bettmann, H. et Rehm, H. J. (1984) Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 285-290.
8. Bouabidi, Z.B., El-Naas, M.H. et Zhang, Z. (2019). Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: A review. *Environ Chem Lett*, 17(1), 241–257. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0795-7>
9. Kanasawud, P., Hjørleifsdottir, S., Holst, O., et Mattiasson, B. (2004). Studies on immobilization of the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* YT-1 by entrapment in various matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 228-233.

10. Callegari J.P. et Francotte C. (1986). Physiological behavior of alginate immobilized cells
In : Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems,1-29.
11. Chapatwala, K.D.; Babu, G. R. V.; Dudley, C.; Williams, R. et Aremu, K. (1993).
Degradative capability of *Pseudomonas putida* on acetonitrile. *Applied Biochemistry and
Biotechnology*, 39(40), 655-665.
12. Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder, U., Jeppsson, U., Larsson,
P.O., Mosbach, K., & Brodelius, P.E. (2004). A general method for the immobilization of
cells with preserved viability. *European journal of applied microbiology and
biotechnology*, 17(1), 319-326.
13. Crawford D. L., Lynch J. M. and Ousley M.A. (1993). Isolation and characterisation of
actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11),
3899- 3905.
14. De Schrijver, A., & De Mot, R. (1999). Degradation of pesticides by actinomycetes.
Critical reviews in microbiology [en ligne], 25(2), 85–119.
<https://doi.org/10.1080/10408419991299194>
15. Esposito, E., Paulillo, S. M., & Manfio, G. P. (1998). Biodegradation of the herbicide
Diuron in soil by indigenous actinomycetes. *Chemosphere* [en ligne], 37(3), 541–548.
[https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(98\)00069-1](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(98)00069-1)
16. Ferdjellah ,M. Boudjelida ,H. Terki ,N. Bellal, C. Techniques d’immobilisation des
cellules et leur applications [en ligne]. (page consultée le 12/05/2022).
[https://fr.scribd.com/doc/77957817/Techniques-d-immobilisation-des-cellules-et-leur-
application](https://fr.scribd.com/doc/77957817/Techniques-d-immobilisation-des-cellules-et-leur-application)
17. Fuentes, M. S., Briceño, G. E., Saez, J. M., Benimeli, C. S., Diez, M. C., et Amoroso, M.
J. (2013). Enhanced removal of a pesticides mixture by single cultures and consortia of
free and immobilized *Streptomyces* strains [en ligne], 392573.
<https://doi.org/10.1155/2013/392573>
18. Fukui, S. et Tanaka, A. (1982). Immobilized microbial cells. *Annual Review of
Microbiology*. 36(1), 145-172.
19. Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial
Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin
and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)* [en ligne],
23(9), 2313. <https://doi.org/10.3390/molecules23092313>

20. Klein, J. et Wagner F. (1983). Methods for the immobilization of microbial cells. *Applied Biochemistry and Bioengineering*. 4(1), 11-51.
21. Klementova, S., & Keltnerova, L. (2015). Triazine Herbicides in the Environment. In A. Price, J. Kelton, & L. Sarunaite (Eds.), *Herbicides, Physiology of Action, and Safety*. [en ligne], <https://doi.org/10.5772/60858>
22. Larpent, J. P., (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux Groupes bactériens. France : Lavoisier. 212p.
23. Lechevalier, M. P., et Lechevalier, H. A., (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In : *microbiology thayer. Actinomycete taxonomy*. 80(1), 225-291.
24. Lucas, N., (2007). Etude et mise au point d'une nouvelle méthode d'évaluation de la bioassimilation : utilisation des isotopes stables du carbone pour le marquage de la biomasse microbienne. Thèse: Sciences des agro-ressources. France : École doctorale TRANSFERTS, DYNAMIQUE DES FLUIDES, ENERGETIQUE ET PROCÉDES (TYFEP), 228p.
25. Manohar, S., Kim, C. K., & Karegoudar, T. B. (2001). Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(3), 311–316. <https://doi.org/10.1007/s002530000488>
26. Martins, S., Martins, C., Fiúza, L., Santaella, S. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Microbial Biotechnology*, 55(3), 311-316.
27. Nawani, N., Aigle, B., Mandal, A., Bodas, M., Ghorbel, S., & Prakash, D. (2013). Actinomycetes: role in biotechnology and medicine. *BioMed research international*. [en ligne], 687190 .<https://doi.org/10.1155/2013/687190>
28. O'Reilly, K.T. et Crawford, R.L. (1989). Kinetics of p-cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4), 866– 870.
29. Ozkara, A., Akyıl, D. et Konuk, M., (2016). Pesticides, Environmental Pollution, and Health. [en ligne], 10,5772-63094,(page consultée le 11/05/2022) https://www.researchgate.net/publication/304137383_Pesticides_Environmental_Pollution_and_Health/citation/download
30. Prescott L. M., Harley J. P. et Klein. D. A. (2003). *Microbiologie*. France : De Boeck et Larcier. 1120p. – (5e édition)

31. Rachedi, K., Zermane, F., Tir, R., Ayache, F., Duran, R., Lauga, B., Karama, S., Simon, M., et Boulahrouf, A. (2018). Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil Actinobacteria growth and characterization of resistant strains. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, [en ligne], 49(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.004>
32. Rashid, B., Husnain, T., Riazuddin, S. (2010). *Herbicides and Pesticides as Potential Pollutants: Plant Adaptation and Phytoremediation*. Pakistan: Springer. 481p.
33. Rosculete, C. A., Bonciu, E., Rosculete, E., et Olaru, L. A. (2018). Determination of the Environmental Pollution Potential of Some Herbicides by the Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects on *Allium cepa*. *International journal of environmental research and public health*. [en ligne], 16(1), 75. (page consultée le 17/06/2022) <https://doi.org/10.3390/ijerph16010075>
34. Saez, J. M., Benimeli, C. S., & Amoroso, M. J. (2012). Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria. *Chemosphere*, 89(8), 982–987. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.057>
35. Sherwani, S. I. , Arif, I. A. , et Khan, H. A. (2015). *Herbicides, Physiology of Action, and Safety: Modes of Action of Different Classes of Herbicides*. London : IntechOpen, 10(1) ,5772-61779.
36. Shirling ,E.B.,et Gottlieb ,D., (1966). Methods of characterization of Streptomyces species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 16 (3): 313-340. (Page consultée le 12/05/2022). <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
37. Tal, Y. , Nussinovitch, A., et van Rijn, J. (2003). Nitrate Removal in Aquariums by Immobilized Pseudomonas. *Biotechnology Progress*, 19(3): 1019 – 1021.
38. Trevor J.T. ; Elsas J.D. (1992). Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells .*Microbial Release* .1(1),61-69.
39. Webb, C., Black, G.M., et Atkinson, B. (1986). *Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems* The IchemE (Pergamon) ,8(1), 102-149.
40. Willaert R., Baron G. (1996) Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. *Reviews in Chemical Engineering*, 12(1), 5-205
41. Williams S.T. and Wellington E.M.H. (1982). Principales and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London. 9-26.

42. Yoshimoto, S., Ohara, Y., Nakatani, H. *et al.* (2017). Reversible bacterial immobilization based on the salt-dependent adhesion of the bacterionanofiber protein AtaA. *Microb Cell Fact* .16(1),79-123 .
43. Zaitlin ,B., Watson ,S.b., Ridal, J., Satchwill ,T., and Parkinson, D., (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* 95 (2), 113-118.
44. Zermane, F., (2008). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse: Biotechnologies microbiennes. Constantine: Université Mentouri Constantine, 126p.

1. Anonyme1 : Hubert, A., LECHEVALIER, « **ACTINOMYCÈTES** », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], page (consulté le11/05/2022).URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/actinomycetes/>
2. Anonyme2 : ONSSA. APYROS [en ligne]. (page consultée le13/05/2022). URL : https://groupesaoas.com/uploads/media/document_produit/0001/01/227_apyroshomologation.pdf

Annexes

Annexe 1

ISP 2

Extrait de levure 4 g

Extrait de malt 10 g

Glucose 4 g

Eau distillée 1000 ml

Agar 20 g

pH = 7,3

ISP 9

(NH₄)₂SO₄ 2,64 g

KH₂PO₄ 2,38 g

K₂HPO₄ 3H₂O 5,65 g

MgSO₄ 2H₂O 1 g

Solution saline 1 ml

Eau distillée 1000 ml

Agar 20 g

pH = 6,8-7,0

Solution saline

CuSO₄ 5H₂O 0,64 g

FeSO₄ 7H₂O 0,11 g

MnCl₂ 4H₂O 0,79 g

ZnSO₄ 7H₂O 0,15 g

Eau distillée 100 ml

N.B :l'ajustement des pH des milieux de culture à l'aide d'une solution de KAOH 1N ou solution de HCL 1N selon le cas.

Annexe 2

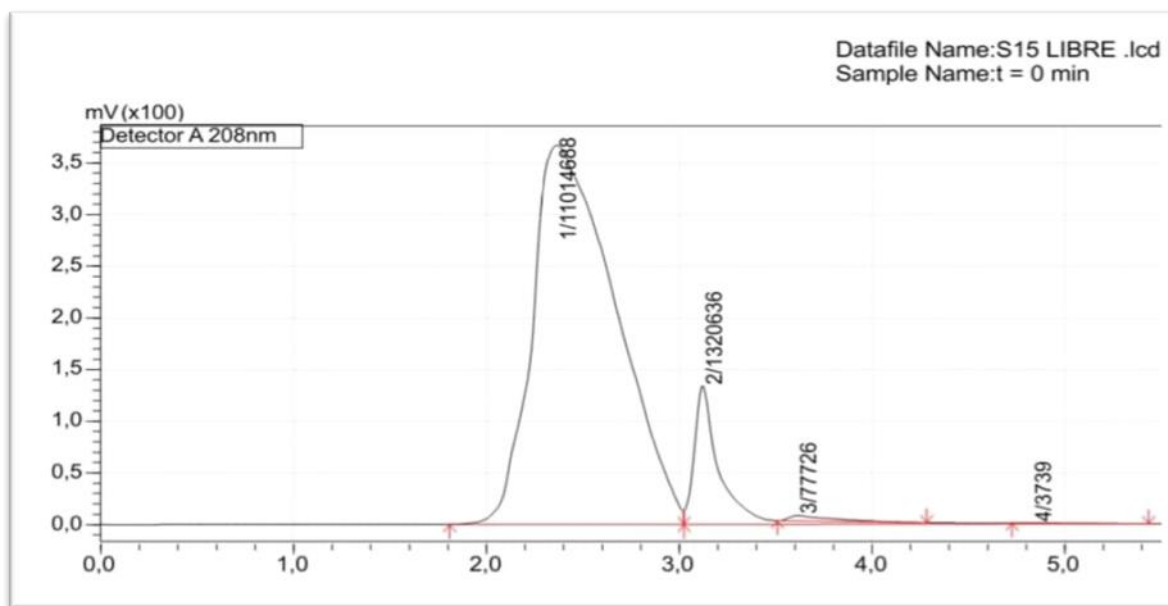


Figure 1 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 libre après 24 heures (pic N°1, air= 98,90%).

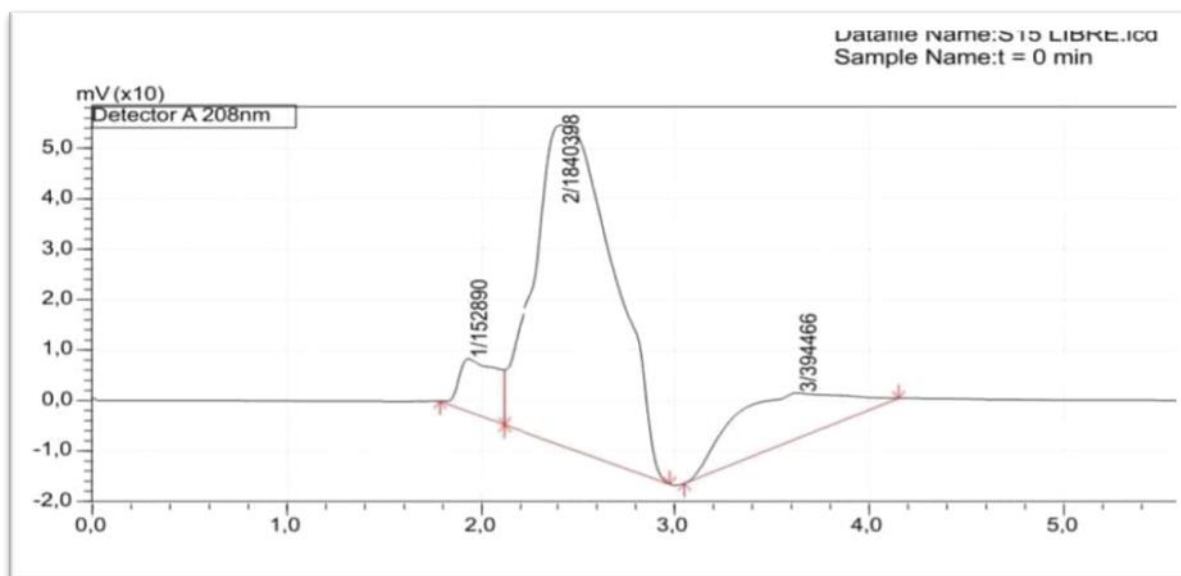


Figure 2 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 libre après 3 jours (pic N°2, air= 55,40%).

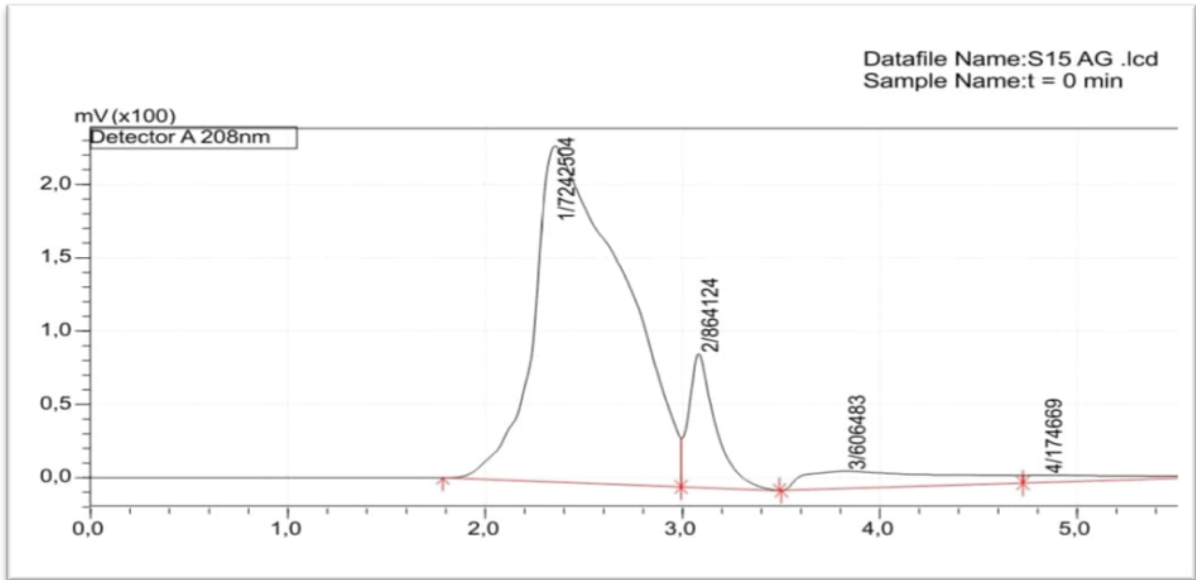


Figure 3: chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar après 24 heures (pic N°1, air= 43,23%).

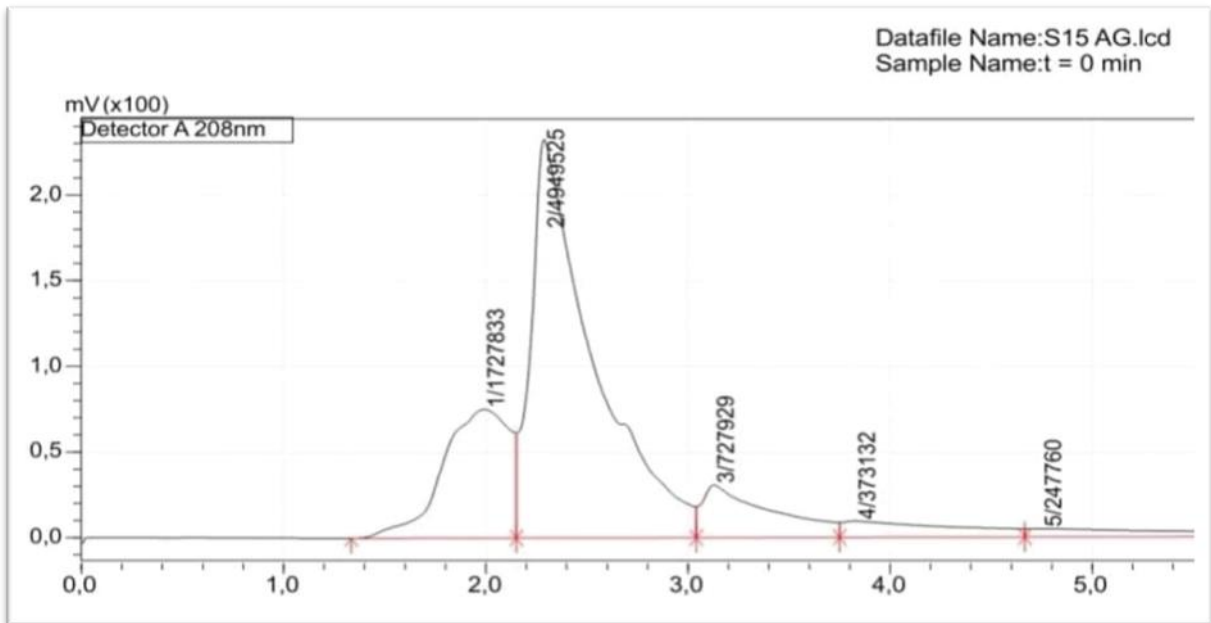


Figure 4 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes d'agar après 3 jours (pic N°2, air= 29,54%).

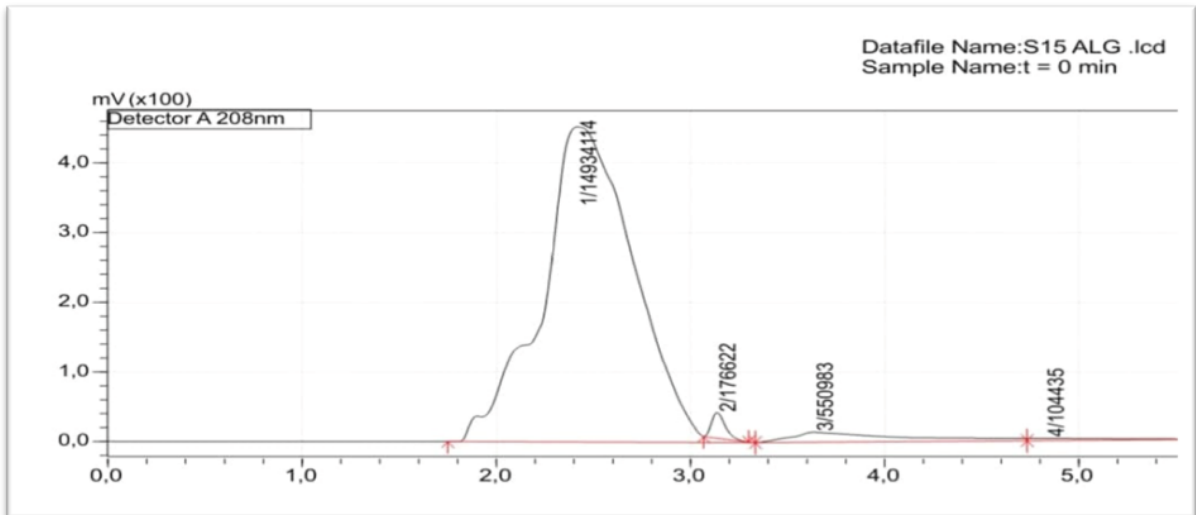


Figure 5: chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des cubes billes d'alginate de calcium après 24 heures (pic N°1, air= 47,19%).

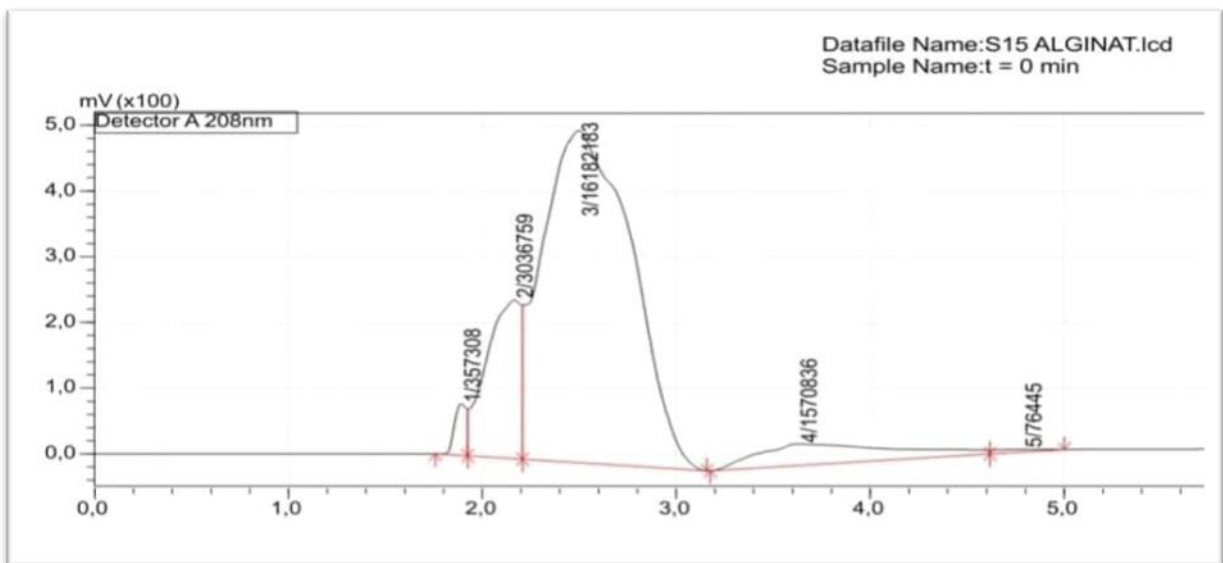


Figure 6: chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche S15 immobile sur le support des billes d'alginate de calcium après 3 jours (pic N°3, air= 44,31%)

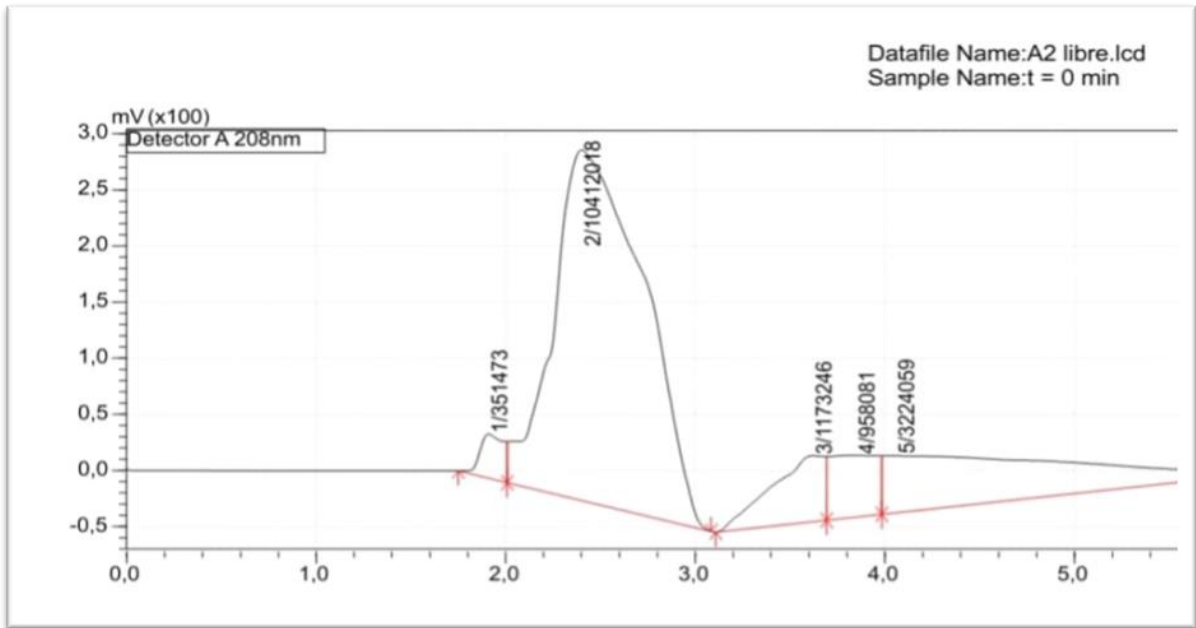


Figure 7 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 libre après 24 heures (pic N°2, air= 93,49%).

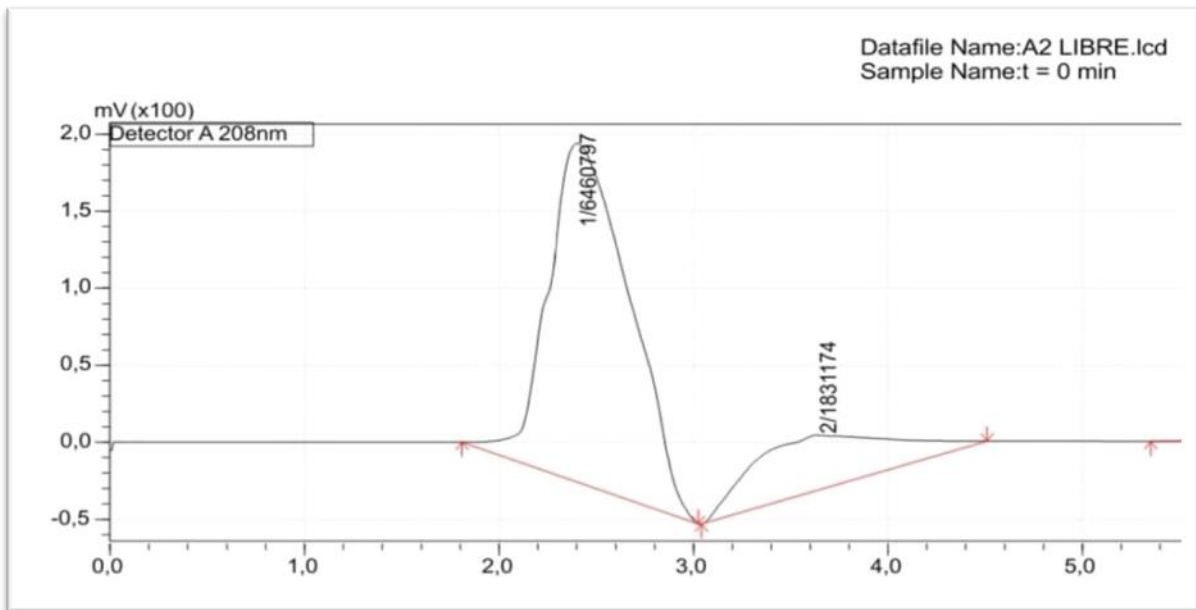


Figure 8 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 libre après 3 jours (pic N°1, air= 58,01%).

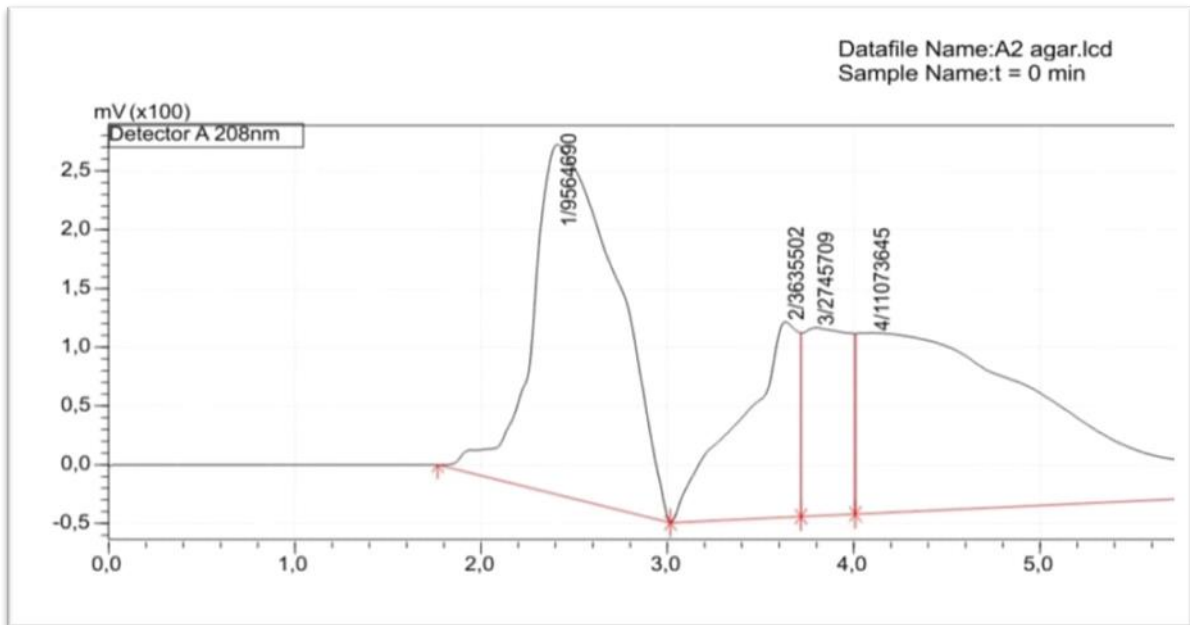


Figure 9 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 immobile sur le support des cubes d'agar après 24 heures (pic N°1, air= 76,15%).

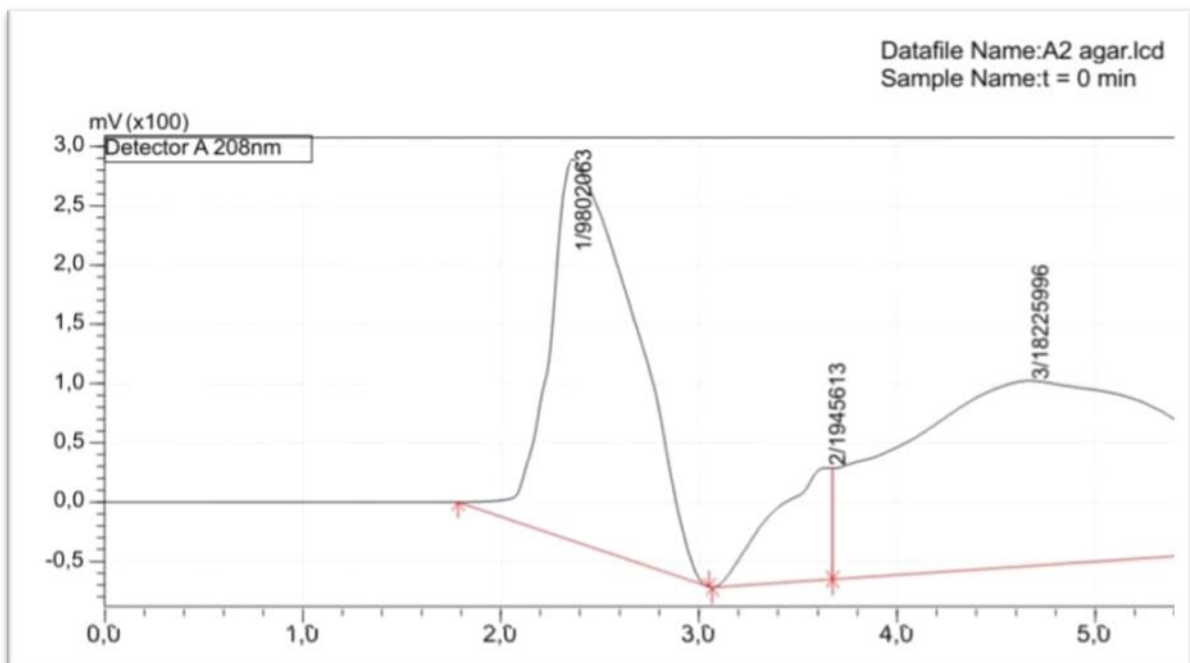


Figure 10: chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 immobile sur le support des cubes d'agar après 3 jours (pic N°1, air= 58,09%).

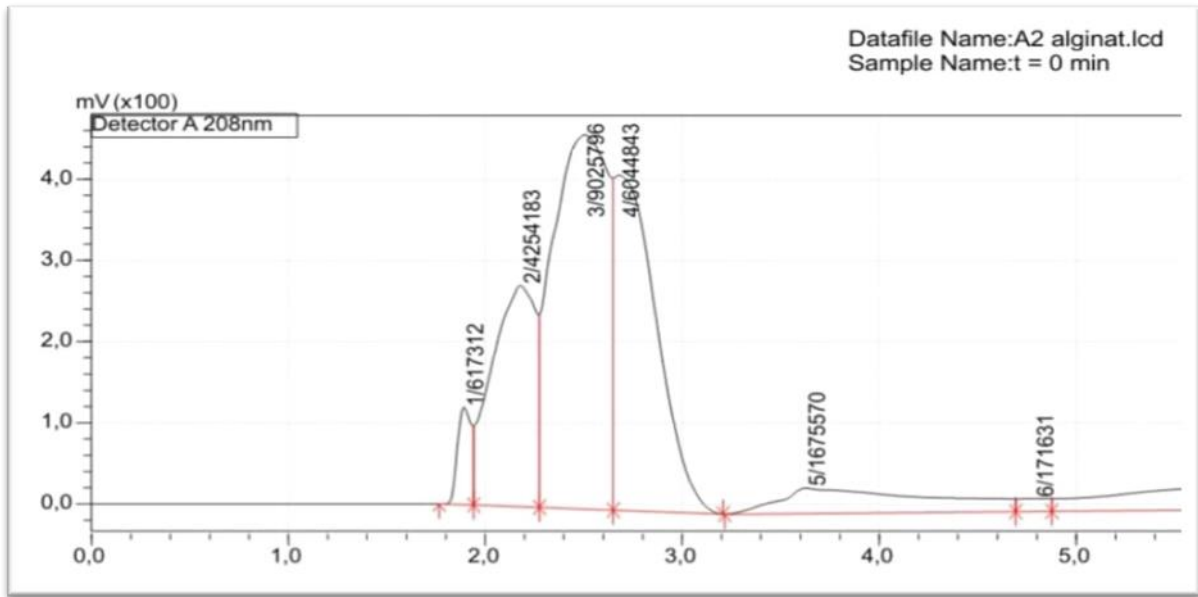


Figure 11 : chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 immobile sur le support des cubes billes d'alginate de calcium après 24 heures (pic N°3, air= 48,43%).

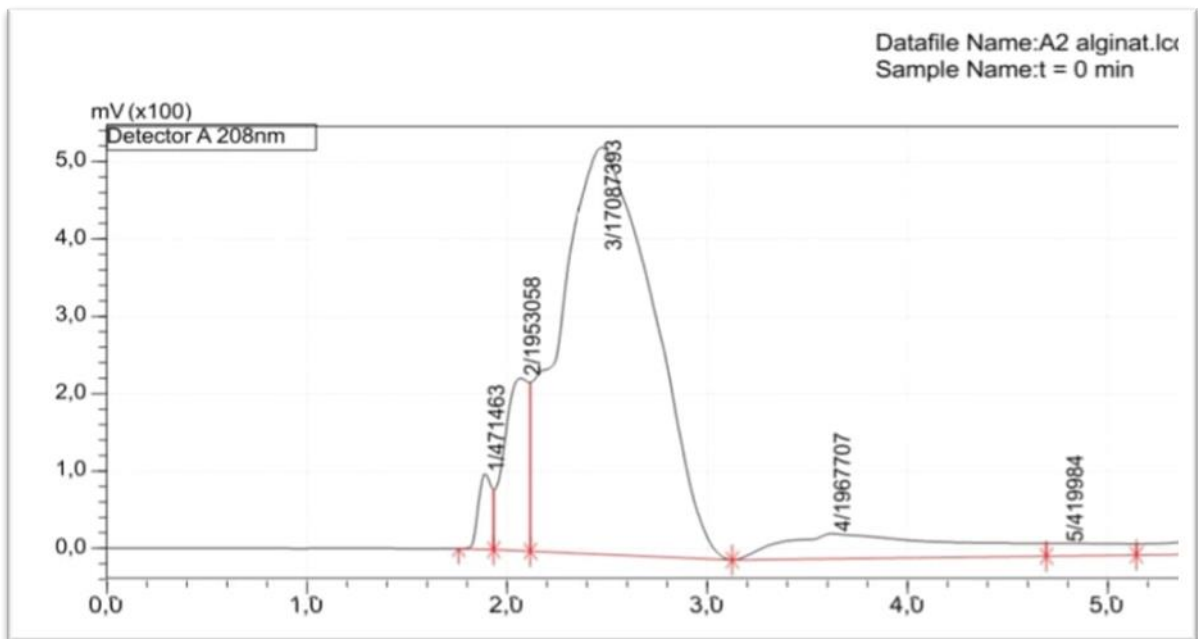


Figure 12: chromatogramme montrant la dégradation du sulfosulfuron par la souche A2 immobile sur le support des cubes billes d'alginate de calcium après 3 jours (pic N°3, air= 46,79%).

Résumé

Cinquante-six souches d'actinomycètes préalablement isolées par Mme Zermane F(MAA et attachée de recherche à UMC1) à partir des sols agricoles et forestiers, sont purifiées et testées pour leur capacité de croître en présence d'un herbicide très répandu au monde qui est le sulfosulfuron, sous sa forme commerciale (Apyros 75WG). Parmi ces souches, deux souches (S15 et A2) capables d'utiliser cet herbicide comme seule source de carbone et d'énergie sur le milieu ISP9, sont sélectionnées pour des tests de biodégradation du même pesticide, sous trois formes (libre, immobilisées dans des cubes d'agar et dans des billes d'alginate). Les résultats de chromatographie à haute performance montrent que les souches sous forme immobilisées sont plus performantes que la forme libre. 94.65% du sulfosulfuron est dégradé par la souche S15 immobilisée dans les cubes d'agar contre 83.52% dégradé par la même souche sous sa forme libre. Pour la souche A2, 88.54% du pesticide est dégradé par la souche immobilisée dans les billes d'alginate contre 66.26% seulement dégradé par la même souche libre. L'ensemble des caractères macroscopiques et microscopiques étudiés permis de rapprocher la souche S15 au genre *Streptomyces* et la souches A2 au genre *Micromonospora*.

Mots clés

Actinomycètes, Herbicides, Apyros, Sulfosulfuron, Biodégradation, Immobilisation.

Abstract

Fifty-six strains of actinomycetes previously isolated by Mrs. Zermane F (MAA and research associate at UMC1) from agricultural and forest soils were purified and tested for their ability to grow in the presence of a widely used herbicide, sulfosulfuron, in its commercial form (Apyros 75WG). Among these strains, two strains (S15 and A2) capable of using this herbicide as the only source of carbon and energy on the ISP9 medium, were selected for biodegradation tests of the same pesticide, in three forms (free, immobilised in agar cubes and in alginate beads). The results of the high performance chromatography show that the strains in the immobilised form perform better than the free form. 94.65% of the sulfosulfuron is degraded by the strain S15 immobilised in the agar cubes against 83.52% degraded by the same strain in its free form. For strain A2, 88.54% of the pesticide was degraded by the strain immobilised in the alginate beads against 66.26% degraded by the same strain in its free form. All the macroscopic and microscopic characteristics studied made it possible to link strain S15 to the genus *Streptomyces* and strain A2 to the genus *Micromonospora*.

Key words

Actinomycetes, Herbicides, Apyros, Sulfosulfuron, Biodegradation, Immobilization.

ملخص

تم تنقية ستة وخمسين سلالة من الفطريات الشعاعية التي عزلتها سابقاً السيدة زيرمان ف (MAA) وباحث مشارك في UMC1) من التربة الزراعية والغابات ، واختبار قدرتها على النمو في وجود مبيد أعشاب واسع الانتشار في العالم وهو السلفوسلفورون ، في شكله التجاري (Apyros 75WG). من بين هذه السلالات ، تم اختيار سلالتين (A2 و S15) القادرة على استخدام مبيد الأعشاب هذا كمصدر وحيد للكربون والطاقة في وسط ISP9 ، للاختبارات التحلل البيولوجي لنفس المبيد ، في ثلاثة أشكال (حررة ، مثبتة في مكعبات أجار و في حبات الجينات). تظهر نتائج الكروماتوغرافيا عالية الأداء أن السلالات في حالة عدم الحركة تعمل بشكل أفضل من الشكل الحر. 94.65% من سلفوسلفورون يتحلل بفعل سلالة S15 المثبتة في مكعبات أجار مقابل 83.52% يتحلل بنفس السلالة في شكله الحر. بالنسبة لسلالة A2 ، يتحلل 88.54% من مبيد الآفات بفعل الإجهاد المثبت في حبيبات الألبينات مقابل 66.26% فقط من السلالة الحررة نفسها. جعلت جميع الشخصيات المجهرية والميكروسكوبية التي تمت دراستها من الممكن تقريب سلالة S15 من جنس *Streptomyces* وسلالات A2 إلى جنس *Micromonospora*.

الكلمات الدالة

الفطريات الشعاعية ، مبيدات الأعشاب ، أبروس ، سلفوسلفورون ، التحلل البيولوجي ، التثبيت.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : GHEDJATI Roufida
MAALEM Nour el houda
KRIBA Rayenne Amina

**Etude comparative de la biodégradation de l'herbicide sulfosulfuron (Apyros 75WG)
par des souches d'actinomycètes sous forme libre et immobilisée**

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé

Cinquante-six souches d'actinomycètes préalablement isolées par Mme Zermane F(MAA et attachée de recherche à UMC1) à partir des sols agricoles et forestiers, sont purifiées et testées pour leur capacité de croître en présence d'un herbicide très répandu au monde qui est le sulfosulfuron, sous sa forme commerciale (Apyros 75WG). Parmi ces souches, deux souches (S15 et A2) capables d'utiliser cet herbicide comme seule source de carbone et d'énergie sur le milieu ISP9, sont sélectionnées pour des tests de biodégradation du même pesticide, sous trois formes (libre, immobilisées dans des cubes d'agar et dans des billes d'alginate). Les résultats de chromatographie à haute performance montrent que les souches sous forme immobilisées sont plus performantes que la forme libre. 94.65% du sulfosulfuron est dégradé par la souche S15 immobilisée dans les cubes d'agar contre 83.52% dégradé par la même souche sous sa forme libre. Pour la souche A2, 88.54% du pesticide est dégradé par la souche immobilisée dans les billes d'alginate contre 66.26% seulement dégradé par la même souche libre. L'ensemble des caractères macroscopiques et microscopiques étudiés permis de rapprocher la souche S15 au genre *Streptomyces* et la souches A2 au genre *Micromonospora*.

Mots-clefs : Actinomycètes, Herbicides, Apyros, Sulfosulfuron, Biodégradation, Immobilisation.

Laboratoires de recherche : Laboratoire de le laboratoire de biophysique (Université Frères Mentouri, Constantine 1). les laboratoires de biotechnologie animal, du chimie et control de qualité et des analyses environnementales (Centre de Recherche en Biotechnologie).

Encadreur : ZERMANE F. (Maître Assistante « A » - UFM Constantine1)

Examineur 1 : BOUDMAGH A. (Professeur- UFM Constantine1)

Examineur 2 : DAFRI A. (Maître de conférences « A » - UFM Constantine1)

