



République Algérienne démocratique et populaire



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique

Université *ABBES LAGHROUR* Khenchela

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie générale et Biologie moléculaire

Titre :

**Contribution à l'étude de la biodégradation de
certains pesticides par des actinomycètes isolés à
partir des boues activées de la station d'épuration
des eaux usées de Khenchela**

Réalisé par :

Rekkab Aicha & Saidane Rekaia

Soutenu le : 25 /06/2013

Devant le jury :

Président : M^{me} Bouakkaz A.

M A A Université de Khenchela

Encadreur : M^{me} Bensouici K.

M A A Université de Khenchela

Examineur : M^{me} Hallassi I.

M A A Université de Khenchela

Année universitaire : 2012/2013

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*À mes très chers parents « Chaffai & Djemaa » que
j'aime plus que tous au monde et à lesquelles je dois
toute ma vie et toutes mes réussites.*

À mon frère salim

*À mes sœurs Hadjer, Sara, Kawther, Naïma, Rayenne
et ma très chère sœur Marwa.*

À ma copine dans notre parcours de recherche AICHA

À mes amies : Amel, Samira, Lila, Houda, Halima,

À toute ma famille,

*À mes adorables copines de chambres
et mes collègues.*

*À tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et
m'ont*

souhaité du bien de près ou de loin.

En témoignage de ma profonde affection

REKAIA

Remerciements

Nous adressons d'abord un grand remerciement à M^{me} Bensouici K, pour toute l'énergie qu'elle a dépensé pour l'encadrement au quotidien de nos travaux de mémoire et la confiance qu'elle a eu en nous tout au long de ce projet de recherche, à commencer par son accueil au niveau de la salle des enseignants jusqu'à la correction du manuscrit.

Nous ne voulons pas oublier les agréables moments passés durant ces 2 mois et qui ont été certainement les plus enrichissants dans notre jeune carrière scientifique avec tout le personnel du laboratoire de Biologie au niveau de l'université ABBES LAGHROUR-Khenchela, commençant par M^{me} Rafika, M^{me} Samia, M^{me} Rim, Bahia et Karima responsables du LABO 5.

Nous tenons à remercier ensuite M^r Boughanem M^{ed} El Moncef pour ses précieux conseils qui nous ont accompagnés durant nos travaux,

Nous remercions madame Bouakkaz A. pour avoir accepté de présider le jury de soutenance, ainsi que M^{elle} Hallassi I. pour avoir examiné ce mémoire

N'oublions pas d'adresser nos remerciements à Mr Hicham et toute l'équipe de l'ONA pour leur accueil au sein de la station.

Nous remercions également M^r Ziouche R, de nous avoir trouvé un encadreur.

Nous remercions profondément M^r Marir Walid de la maison d'agriculture d'Ain Touila pour son support physique et moral.

Au cours des dernières années, l'utilisation intensive des produits phytosanitaires est progressivement devenue un sujet de préoccupation environnementale. En particulier à cause des effets néfastes de ces produits chimiques sur la qualité des différentes ressources en eau. L'usage de ces pesticides a permis d'améliorer les rendements et la diversité des cultures afin de satisfaire la demande nutritionnelle liée à l'accroissement de la population mondiale. Néanmoins, la mauvaise gestion des pesticides dans les zones agricoles a modifié les conditions environnementales, non seulement la vie sauvage et aquatique est en danger mais les risques existent également pour les humains. Ainsi des études ont montré la présence de résidus de pesticides dans les aliments, les eaux souterraines, les eaux de surface et même dans les eaux de consommation (**Cunnif P, 1995**). Selon leur cible (insecticide, herbicide ou fongicide) les pesticides sont des molécules de natures diverses : composés organophosphorés (TEPP), organochlorés (DDT, 2,4-D, alachlore), dérivés de carbamate (carbofurane), de triazine (atrazine, simazine), d'acide barbiturique... Ces composés présentent des propriétés cancérigènes, mutagènes, tératogènes et allergènes (**Monard, 2008**).

Dans les stations d'épuration des eaux usées domestiques, si la dégradation des polluants comme les pesticides n'est pas réalisée, les dégâts sur les milieux aquatiques et même les écosystèmes telluriques seront catastrophiques. Ces stations seront considérées comme une des principales sources émettrices de ces xénobiotiques. Les différentes lois européennes réglementent les émissions et incitent, à la réduction de ces pollutions soit en aval ou en amont des STEP. Ainsi une liste de substances dites « prioritaires » (dont les rejets sont à réduire) ou « prioritaires dangereuses » (dont les rejets sont à supprimer) a été publiée en 2001, et mise à jour en 2008 et actuellement en cours de révision. Cette liste comporte entre autres une partie importante de pesticides.

Sur le plan technique, la principale voie permettant de réduire ces polluants est le traitement des eaux usées mettant au point une stratégie de l'élimination de ces substances. La meilleure technique qui présente des coûts économiquement avantageux est sûrement la dépollution biologique. Les autres moyens physico-

chimiques comme oxydation chimique, adsorption ou osmose inverse sont très coûteuses.

Les moyens biologiques actuels utilisés dans les boues activées sont incomplets et nécessitent des corrections au niveau de la coposante microbienne. Il est plus judicieux d'après certains chercheurs soit de stimuler les activités de biodégradation de la flore microbienne pré-existante, ou d'ajouter une flore exogène possédant un pouvoir de dégradation de ces polluants et capable de s'adapter à son nouveau écosystème aquatique. Cette méthode est dite bioremédiation (**Perry *et al.*, 2004**).

Divers microorganismes, notamment les actinomycètes sont dotés de capacités de biodégradation des molécules organiques les plus variées et même celles dites récalcitrantes (non biodégradables) (**Mc Carthy *et al.*, 1992**). Cette fonction de biodégradation des actinomycètes est due à la variété d'enzymes qu'elles peuvent synthétiser. En effet, les enzymes sont après les antibiotiques les plus importants métabolites secondaires des actinomycètes (**Lopes *et al.*, 1999**). Elles sont utilisées dans la dégradation des biomasses végétales et animales, dans l'industrie alimentaire et en écologie microbienne et même en biologie moléculaire (**William *et al.*, 1993**). D'autres recherches ont montré que certaines espèces d'actinomycètes dégradent des composés organiques de synthèse qui sont en principe non biodégradables, tel que les pesticides.

L'objectif de notre travail consiste en l'isolement de souches d'actinomycètes à partir des boues activées, et la mise en évidence de leur capacité de biodégradation de certains pesticides. Le choix des molécules xénobiotiques a porté sur la cyperméthrine et le mythomyl (deux insecticides très utilisés dans les grandes cultures, les arbres fruitiers et les cultures maraichères en Algérie), ainsi que l'ortiva (un fongicide utilisé d'une manière abusive dans plusieurs cultures) et le glyphosate (un herbicide parmi les plus employés dans notre pays).

Chapitre I : Les pesticides

1. Définition et composition d'un pesticide

Un pesticide est en général défini comme étant un produit conçu pour détruire des organismes considérés indésirables ou nuisibles. On distingue des pesticides utilisés pour la protection des végétaux, appelés produits phytosanitaires ou phytopharmaceutiques, de ceux utilisés pour préserver la santé humaine et animale, appelés biocides. Les produits retrouvés sur le marché renferment un ou plusieurs ingrédients actifs et des produits de formulation.

- **Ingrédient actif** : constituant d'un produit auquel l'effet pesticide est attribué. Le nom commun de l'ingrédient actif est inscrit sur l'étiquette du produit sous le vocable « garantie ».

- **Produit de formulation** : substance ou groupe de substances autres que l'ingrédient actif ajoutés intentionnellement à celui-ci afin d'améliorer ses propriétés physiques (par exemple, indice de pulvérisation, solubilité, pouvoir d'étalement et stabilité). Contrairement aux ingrédients actifs, les produits de formulation qui entrent dans la composition d'un produit commercial ne sont pas inscrits sur son étiquette.

Un pesticide est désigné par son nom commun, par son nom chimique ou par son nom commercial. Le nom commun fait référence à l'ingrédient actif. Le nom chimique désigne le nom de la structure chimique de l'ingrédient actif. Le nom commercial est le nom donné par le fabricant. Par exemple, le Roundup, un produit retrouvé sur le marché, renferme un ingrédient actif et des produits de formulation. L'ingrédient actif qui compose le Roundup est connu sous le nom commun de glyphosate et sous le nom chimique de N-(phosphonométhyl) glycine (**Miquel G et al ., 2003**).

2. Catégories de pesticides

Il est courant de désigner les pesticides selon des regroupements qui tiennent compte de la cible visée par le pesticide, de l'origine du produit, de sa structure chimique, de la forme sous laquelle le pesticide est commercialisé ainsi que de sa façon d'agir sur la cible et de son lieu d'action.

Un pesticide peut donc être regroupé selon :

- sa catégorie d'usage;
- son origine;
- son groupe chimique;
- son type de formulation;
- son type d'activité;
- son site ou mode d'action.

2.1. Catégorie d'usage

La plupart des pesticides peuvent être regroupés selon la cible qu'ils visent (tableau N°1).

Tableau N°1 : Différents pesticide selon les cibles visées

Catégorie d'usage	Cibles visées	Exemples de cibles
Acaricide	Acariens	- Acarien des poussières - Phytote de l'érable - Tétranyque à deux points
Avicide	Oiseaux	Pigeon
Insecticide	Insectes	- Blatte - Doryphore de la pomme de terre - Punaise velue - Tordeuse des bourgeons de l'épinette
Herbicide	Plantes indésirables	- Chénopode - Chiendent - Herbe à la puce - Plantain
Fongicide	Champignons microscopiques causant des maladies des plantes	- <i>Diplocarpon rosae</i> causant la tâche noire du rosier - <i>Pucciniastrum epilobii</i> causant la rouille des aiguilles du sapin - <i>Venturia inaequalis</i> causant la tavelure du pommier
Piscicide	Poissons	Meunier noir
Rodenticide	Rongeurs	- Rat - Souris
Molluscicide	Mollusques terrestres	- Escargot - Limace
Nématocide	Nématodes causant des maladies des plantes	- <i>Meloidogyne hapla</i> causant la nodosité des racines chez la carotte

De plus, certains pesticides ont un nom se terminant par le suffixe « *fuge* » signifiant « faire fuir », comme c'est le cas pour les insectifuges qui sont des répulsifs à insectes. D'autres pesticides, dont le nom comporte le suffixe « *cide* », par exemple les ovicides, les larvicides ou les adulticides, sont des produits ayant respectivement comme cibles l'œuf, la larve ou l'adulte d'un insecte.

Il existe d'autres catégories d'usage énumérées ci-dessous :

- agent de préservation du bois;
- médicament ou produit topique pour usage externe sur les animaux;

- peinture à émondage;
- peinture antisalissure;
- phéromone;
- régulateur de croissance des plantes;
- répulsif pour animaux (**DUCHEMIN J., 2006**).

2.2. Origine

Les pesticides peuvent être regroupés en pesticides organiques ou inorganiques. Les pesticides organiques contiennent du carbone, alors que les inorganiques ne contiennent du carbone que sous forme de carbonate ou de cyanure. Ces derniers sont des dérivés à base d'arsenic, de mercure, de fluor, de soufre et de cuivre, ainsi que des dérivés du cyanure.

Les pesticides organiques peuvent être divisés en 3 groupes : pesticides de synthèse (développés en laboratoire et produits en usine), pesticides naturels (d'origine animale, microbienne ou végétale) et micro-organismes. Les pesticides inorganiques sont dérivés essentiellement de minéraux.

2.3. Groupe chimique

Un groupe chimique est constitué de pesticides qui possèdent une structure chimique semblable. Par exemple, la structure chimique de l'atrazine, représentée ici de deux façons, permet de classer ce pesticide dans le groupe des *triazines* et *tétrazines*.



Figure N°1 : Représentation de la structure chimique de l'atrazine

2.4. Formulation

Les pesticides sont disponibles en différentes formulations (tableau N°2). Ils peuvent se présenter sous forme solide, liquide ou gazeuse. Certains produits sont mis en marché prêts à l'emploi, c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent aucune préparation avant l'application. Au contraire, d'autres exigent une préparation. Par exemple, un produit peut nécessiter d'être mélangé avec de

l'eau dans des proportions précises avant d'être utilisé. Ce mélange, communément appelé bouillie, est ensuite appliqué sur l'organisme indésirable. Dans ce cas précis, la préparation consiste à diluer un produit concentré (**Fayomi, E.B., 1999**).

Tableau N°2 : Différentes formulations de pesticides

Exemples de formulations	Prêt à l'emploi ou non préparé
Forme solide	
Appât	Prêt à l'emploi
Poudre	Prêt à l'emploi
Poudre mouillable	Non préparé
Forme liquide	
Aérosol	Prêt à l'emploi
Concentré émulsifiable	Non préparé
Solution	Non préparé
Forme gazeuse	
Fumigeant	Prêt à l'emploi

2.5. Type d'activité

Les herbicides, les fongicides et les insecticides peuvent être désignés selon leur façon d'agir sur les organismes indésirables comme le montre le tableau N°3.

Tableau N°3 : Action des différents pesticides

Herbicide	
De contact	Agit sur les parties de la plante avec lesquelles il entre en contact.
Systémique	Absorbé par la plante, se déplace à l'intérieur de celle-ci.
Sélectif	Ne contrôle que certaines plantes parmi celles qui sont traitées.
Non-sélectif	Contrôle toutes les plantes traitées.
Résiduaire	Se dégrade lentement et contrôle les plantes pour une longue période.
Non-résiduaire	Est rapidement inactif après son application et ne contrôle les plantes

	que sur une courte période.
Fongicide	
Préventif	Protège la plante en empêchant que la maladie se développe.
Curatif	Réprime une maladie qui est déjà développée.
Insecticide	
De contact	Agit lorsque l'insecte entre en contact avec le produit.
D'inhalation	Agit lorsque l'insecte respire le produit.
D'ingestion	Agit lorsque l'insecte se nourrit du produit.

2.6. Site ou mode d'action

Les pesticides peuvent être regroupés selon le site ou le mode d'action de l'organisme indésirable sur lequel ils agissent. Plusieurs sites ou modes d'action sont connus pour les herbicides, les insecticides ainsi que les fongicides. En voici quelques exemples :

- Les insecticides contrôlent les insectes :
 - en interférant sur leur système nerveux, ou
 - en empêchant leur mue.
- Les herbicides contrôlent les plantes :
 - en inhibant leur photosynthèse, ou
 - en reproduisant les effets des régulateurs de croissance produits naturellement par celles-ci.
- Les fongicides contrôlent les champignons :
 - en inhibant la synthèse de leurs acides aminés, ou
 - en interférant sur leur division cellulaire.

3. Les pesticides sources de pollution

L'utilisation systématique des pesticides en agriculture va de paire avec la prise de conscience croissante des risques qu'ils peuvent générer pour l'environnement, voire pour la santé de l'homme et de l'animal. De ce fait, ces molécules s'infiltreront dans la nature lors de leur vaporisation sur les

cultures à traiter. Ainsi, la nature se retrouve infectée par ces molécules chimiques qui ne tardent de toucher l'organisme humain et animal.

3.1. Les pesticides dans le sol

Au moment de la pulvérisation des pesticides, plus de 90 % des quantités utilisées de pesticides n'atteignent pas le ravageur visé. Bien au contraire, la part primitive de ce traitement aboutit dans les sols où elle subit plusieurs altérations. Elle est soit, dégradée par les microorganismes ; ou par hydrolyse, ou adsorbée par les sédiments ou bien absorbée par les racines des plantes. Cependant, le sol est formé d'éléments minéraux et organiques ainsi que des organismes vivants et sa microflore est essentielle au maintien de sa fertilité mais les effets nocifs de ces produits la mettent en danger. C'est le cas du vers de terre, acteur majeur et agent actif dans la structuration des sols et dont le rôle écologique capital est d'aérer et de micro-drainer ce milieu, néanmoins ces produits l'atteignent essentiellement à travers l'eau contaminée qui s'infiltré dans le sol et vont jusqu'à sa suppression totale et par conséquent la privation de son rôle primordial. Ces pesticides sont exposés à trois étapes majoritaires lors de leur long voyage dans le sol : tout d'abord ils sont entraînés en profondeur, ce qui peut aussi porter le nom de transfert ou encore le phénomène de lixiviation ; puis ils sont immobilisés dans le sol, c'est le mécanisme de la stabilisation aussi appelée rétention ; et enfin ils sont dégradés.

3.1.1. La lixiviation

Premièrement, la lixiviation désigne l'entraînement de sels solubles vers la profondeur. On pourrait alors admettre qu'une forte pluie, juste après un traitement, est dangereuse menaçante pour le sol car une bonne partie des pesticides utilisés va être lessivée à travers le sol, c'est-à-dire transportée sous l'effet de l'écoulement des eaux d'infiltration. En effet ces pesticides sont entraînés par l'eau de pluie et s'y déplacent selon la circulation de l'eau soit à l'état dissout ou retenu sur des particules de terre elles-mêmes entraînées. Pourtant plusieurs facteurs entrent en jeu, et notamment : le régime hydrique, la perméabilité des sols, la nature du produit.

3.1.2. La stabilisation

Ensuite, comme on l'a signalé auparavant, une part primordiale des pesticides pulvérisée séjourne au sein du sol où ils sont partiellement dégradés et se lient de façon plus ou moins forte à

certaines constituants du sol, principalement la matière organique. Ce phénomène est dû à l'adsorption, qui, en d'autres termes est la rétention de molécules et d'ions en phase gazeuse ou liquide dans la phase liquide du sol par les surfaces des constituants du sol et surtout par les matières humiques (colloïdes minéraux et organiques). Toutefois, de nombreux facteurs influencent sur la faculté d'absorption d'un sol, et sont soit liés aux caractéristiques de la molécule, soit à celles du sol (composants minéraux et organiques, pH, quantité d'eau). Cependant, ces pesticides adsorbés engendrent la suppression de leurs effets biologiques et donc ne sont plus dégradés par les micro-organismes du sol ce qui accroît leur persistance et donc leur accumulation néfaste dans les sols.

3.1.3. La dégradation

Finalement, une part de ces pesticides finit par subir le phénomène de la dégradation naturelle. C'est-à-dire sa mutation engendrant des altérations de la structure moléculaire avec apparition de métabolites. Ces transformations contribuent à restreindre la quantité de matière active dans le sol, faisant de ce processus un facteur de dépollution majeur des compartiments environnementaux contaminés par les pesticides. Pourtant ce n'est le cas que lorsque la minéralisation est totale, autrement dit l'obtention de molécules minérales telles que H₂O, CO₂, NH₃. . Inversement, lorsque ce n'est pas le cas, une pollution peut être causée par les métabolites issus de la dégradation. Ce phénomène est assuré particulièrement par les organismes biologiques de la microflore du sol (bactéries, actinomycètes, champignons, algues, levures) essentiellement dans les premiers centimètres du sol. Mais d'autres acteurs entrent en jeu et notamment les rayonnements ultraviolets lors de la dégradation d'ordre physique (abiotique) aussi appelée la photo-décomposition. Seulement, ce processus de la dégradation dépend de la stabilité chimique de la molécule et de facteurs abiotiques (température, humidité) et biologiques (microflore). En outre la cinétique de dégradation d'une molécule donnée est déterminée en estimant la persistance du produit et peut varier avec la température, le type de sol, l'ensoleillement,...En fin rétention et dégradation ne sont pas des phénomènes indépendants : la rétention conditionne la disponibilité des produits pour leur dégradation. En définitive un exemple illustrera l'ampleur des dangers amenés par l'utilisation des pesticides, dès lors, nous citerons le cas de l'oxychlorure de cuivre qui s'accumule dans les sols et qui a entraîné la stérilisation de 50000 ha de certains sols de bananeraies (**Référence électronique 3**).

3.2. Les pesticides dans l'air

Bien que la plupart des pesticides soient peu volatils, certains, disséminés dans l'atmosphère sur de grandes surfaces et pendant de longues périodes, peuvent être retrouvés à grande distance de leurs points d'application. En effet ces produits phytosanitaires peuvent se répandre dans l'air ambiant suivant trois phénomènes de diffusions :

3.2.1. La dérivée : Dès l'épandage des produits, ils peuvent se répandre dans l'atmosphère : c'est la dérivée. En effet, lors de la pulvérisation des produits, leurs trajectoires peut-être modifiée selon les conditions climatiques (vents, températures, pression...) mais aussi selon la distance entre le produit pulvérisé et la cible visée

3.2.2. Volatilisation : La volatilisation est le phénomène par lequel on fait évaporer un corps liquide en gaz. Ce dernier peut présenter une voie majeure de transfert vers l'atmosphère car il peut durer plusieurs jours voire plusieurs semaines. De ce fait plus de 90% des produits peuvent être transférés de la plante vers l'atmosphère

3.2.3. L'érosion : De nombreux pesticides sont absorbés par le sol compte tenu de leurs propriétés physico-chimique. Dès lors ces pesticides sont arrachés du sol par les vents transférés par l'atmosphère. Du fait que ce phénomène est présent dans les régions ventées ou sur les sol laissées a nue durant une très longue période, il est considérée comme une voie de transfert non significative. Finalement plus de 25% a 75% des pesticides initialement destinées aux cultures se retrouvent dans l'air que nous respirons et ce par le biais de plusieurs procédés. Les sols, les surfaces hydrauliques, mais surtout l'atmosphère sont ainsi contaminés par les pesticides. Dès lors, La pollution des ces espaces engendrent des conséquences sur la santé des animaux mais surtout sur celles des Hommes (Cellier P, 2004).

3.3. Les pesticides dans les eaux

Lors de leur pulvérisation, les particules de pesticides se déposent sur le sol, puis s'infiltrant dans les eaux souterraines par ruissellement et s'y dissolvent auxquelles s'ajoute l'eau de pluie qui est à l'origine des nappes phréatiques et contenant des particules de pesticides qui étaient en suspension dans l'air. Ensuite, une partie de cette eau passe à travers les pores du sol pour se déverser dans des cours d'eau et des rivières, les contaminants ainsi: C'est le phénomène de la lixiviation. De plus, les techniques d'épandage de ces produits comme l'épandage aérien, favorisent la volatilisation des jets de pesticides. En effet, les surfaces traitées se situent souvent à proximité de sources hydrauliques ce qui engendre une contamination de ces eaux de surface directement. Mais encore, les eaux

continentales, comme les rivières, finissent leur course dans la mer et s'y déversent entraînant avec elles les résidus de pesticides dilués dans celles-ci. L'eau potable ainsi que l'eau de mer se retrouvent alors infectées par les pesticides causant une bioaccumulation dans les organismes maritimes.

3.4. Les pesticides dans la chaîne alimentaire

La culture de produits alimentaires sur des sols contaminés ou à proximité, et l'utilisation d'eau contaminée pour arroser les champs constituent des risques d'exposition particulière pour la population générale. Les nourrissons et les jeunes enfants constituent un groupe particulièrement à risque. En Europe, plus de 350 résidus de substances à usage phytopharmaceutique sont ainsi retrouvés à des concentrations très faibles, dans les produits d'origine végétale ou animale composant l'alimentation quotidienne. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits, *etc.* sont parfois mis en évidence. Certains produits français sont refusés à l'exportation par nos voisins qui ont des exigences plus sévères qu'en France. La France figure en mauvaise position dans le palmarès établi par l'Union Européenne pour les teneurs de pesticides mesurées dans les aliments **(Référence électronique 4)**.

4. Impacts des pesticides sur l'environnement

Lorsqu'ils se retrouvent dans les milieux naturels (rivières, *etc.*), les pesticides peuvent avoir différents impacts sur la biodiversité. Ceux-ci peuvent être directs ou indirects. Les impacts des pesticides sur l'environnement et la biodiversité sont cependant difficiles à circonscrire vu le nombre élevé d'organismes vivants, leur sensibilité différente aux pesticides, la grande diversité des milieux et des pesticides employés, ainsi que la difficulté de recenser les effets engendrés. Les risques attribuables aux pesticides sont donc encore incertains et relativement méconnus. Certains cas liés aux effets de ces produits sur les communautés benthiques, les amphibiens, les poissons, les oiseaux et les mammifères ont cependant été étudiés en milieu naturel au Québec et au Canada. Plusieurs études ont aussi porté sur des pesticides bioaccumulables comme ses métabolites, la dieldrine, le chlordane et le mirex. Certains de ces pesticides ont été détectés au Québec et au Canada dans les tissus de chevaliers cuivrés **(DELafontaine *et al.*, 2002)**, d'amphibiens, de loutres **(Harding *et al.*, 1999)** et d'ours blancs.

Il est cependant à noter que ces pesticides ne sont plus homologués au Canada. De plus, la *Convention de Stockholm* entrée en vigueur en 2004 vise l'élimination ou la restriction de 12 polluants organiques persistants (POP), dont plusieurs sont des pesticides organochlorés qui ne sont

plus en usage au Canada (aldrine, chlordane, dieldrine, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène, mirex, toxaphène). Les pesticides utilisés de nos jours sont moins bioaccumulables que ces anciens pesticides, mais certains ingrédients comme l'atrazine, la cyanazine et le métolachlore peuvent présenter une légère propension à s'accumuler dans la chair des organismes aquatiques (**Giroux et al., 2006**).

5. Effets des pesticides sur la santé humaine

L'exposition de l'homme aux pesticides relève de trois types de voies : orale (alimentation), respiratoire (air) et cutanée. Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent 90 % de l'exposition à l'alimentation contre 10 % à l'eau et une part moindre à l'air. La voie cutanée n'est pas observée en population générale. Les insecticides sont préoccupants car leurs mécanismes d'action, dirigés contre les insectes, peuvent également perturber le métabolisme humain. Ils peuvent entraîner des effets neurologiques graves suivis de séquelles voire la mort (**Gérin M et al., 2003**). Les risques liés à l'exposition par voie respiratoire sont comparables à ceux liés à la consommation d'eau de boisson : il y a autant de pesticides dans 2 litres d'eau de boisson (consommation quotidienne) contenant 0,1 µg/l (norme de potabilité) que dans 20 m³ d'air (volume respiré quotidiennement) à 10 ng/m³ (valeur observée en moyenne mensuelle, voire annuelle pour certains pesticides) (**Cellier P, 2004**). Quand il s'agit de la chaîne alimentaire, l'exposition se fait par voie digestive, essentiellement à partir des résidus présents dans les eaux de consommation et l'alimentation. Quant à l'exposition aux produits d'usage domestique, les données actuelles ne permettent pas de la quantifier mais il n'est pas sûr que celle-ci soit négligeable.

Une fois dans l'organisme, les pesticides s'accumulent dans le tissu adipeux pour ne plus s'en déloger. La toxicité diffère selon les substances actives qui les composent. S'ils sont désormais rares aujourd'hui en France, les organochlorés représentaient il y a quelques décennies un risque important de par leur persistance dans l'environnement Leur accumulation chez l'homme est très importante dans le tissu adipeux mais aussi dans le foie et dans les muscles. Les organophosphorés ont une toxicité aiguë plus importante mais ils sont moins persistants. Ils s'accumulent principalement dans les graisses et le foie mais seraient non cancérigènes. Les carbamates ont une toxicité similaire à celle des organophosphorés et sont extrêmement toxiques de façon aiguë. Les herbicides sont beaucoup moins toxiques envers les mammifères car leurs mécanismes d'action sont conçus pour

perturber le métabolisme des végétaux. Quant aux fongicides, leur toxicité envers les mammifères est variable, se situant habituellement entre celle des insecticides et celle des herbicides¹³.

Les intoxications aiguës sont généralement rares, de caractère accidentel et souvent liées à des erreurs de manipulation, à des fraudes ou à l'utilisation de pesticides non indiqués pour certaines cultures. (**Gérin M et al., 2003**). Les intoxications chroniques par contre constituent un véritable facteur de risque sanitaire. Il s'agit d'un risque à long terme, difficile à estimer car lié à la consommation répétée de doses très faibles, avec des synergies possibles entre les différents pesticides. Si les effets des intoxications aiguës sont assez bien connus, les conséquences à long terme suite à des expositions chroniques le sont beaucoup moins (hormis en circonstances professionnelles) (**Multigner L , 2005**). Peu d'études épidémiologiques renseignent aujourd'hui sur les effets sanitaires des pesticides en population générale ; le nombre de produits et la variabilité des modes d'utilisation rendant difficiles les études. Des effets sont cependant décrits : mutagènes, cancérigènes, foetotoxiques et tératogènes. L'exposition chronique serait la cause de l'augmentation de certains cancers (leucémies, lymphomes non Hodgkinien, sarcomes et tumeurs cérébrales), de troubles de la reproduction (avortement, stérilité, infertilité masculine, malformation congénitale de l'appareil génital masculin, *etc.*), de troubles du système nerveux et du comportement (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, sclérose latérale amyotrophique) et d'effets endocriniens (perturbations du système hormonal, *etc.*) (**Momas I et al., 2004 ; Tron I et al., 2001**). Certains pesticides entraîneraient aussi des troubles de l'humeur et représenteraient un facteur de risque des suicides.

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a répertorié les pulvérisations et applications d'insecticides ne contenant pas d'arsenic en exposition professionnelle comme probablement cancérigènes pour l'homme (groupe 2A) (**Goldgewicht C, 2006**). Quant à l'hypothèse selon laquelle l'exposition aux pesticides domestiques pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de la leucémie aiguë de l'enfant (suggérée dans la littérature), elle se trouve confortée par les résultats d'une étude française qui montre une association avec l'exposition aux insecticides utilisés à domicile, au jardin et pour lutter contre les poux. Des travaux complémentaires s'avèrent nécessaires.

6. La biodégradation des pesticides

Les actinomycètes ont un potentiel considérable pour la biotransformation et la biodégradation des pesticides. Le principal mécanisme enzymatique pour l'assimilation et/ou la détoxification de substrats organiques peu dégradables est l'oxydation enzymatique par les monoxygénases ou dioxygénases: il y a formation de groupes polaires qui permettent d'augmenter la

solubilité de nombreux pesticides peu soluble dans l'eau et de faciliter ainsi leur assimilation (Cerniglia, 1992 ; Pelmont, 1993 ; Bossert et Kosson, 1997). C'est également, le mécanisme de biodégradation des composés nitroaromatiques (Nishino and Spain, 1997) et des substrats organochlorés tels que les chlorobiphényles (PCB) (Focht, 1997). Pour ces derniers, la déchloration bactérienne a été démontrée en condition anaérobie avec formation de métabolites facilement biodégradables en aérobiose. Les bactéries actinomycétales sont capables de dégrader les pesticides avec des structures chimiques très différentes, y compris les composés organochlorés, s-triazines, triazinones, les carbamates, les organophosphates, organophosphonates, acétanilides, et les sulfonilurées. Pour la dégradation complète des pesticides, des consortiums de bactéries sont souvent nécessaires, à l'exception de quelques uns qui peuvent être minéralisés par un seul isolat. En comparaison avec la dégradation des pesticides par les bactéries Gram négatif, beaucoup moins d'informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les biotransformations des pesticides par les actinomycètes sont disponibles. Les espèces d'Actinomycètes comme les *Streptomyces alanosinicus*, *Streptoverticillium album*, *Nocardia farcinia*, *Streptomyces atratus*, *Nocardia vaccini*, *Nocardia namarae* et *Micromonospora chalybeata* isolées à partir des sols salés ont montré une capacité de dégradation de carbofuran .

Les progrès dans ce domaine ont été sérieusement entravés par un manque d'outils de génétique moléculaire appropriée pour la plupart des représentants de ce grand groupe 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 biorestauration et la construction des cultures transgéniques résistantes par exemples aux herbicides.

Chapitre II : Les actinomycètes

1. Caractères généraux

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires constituées d'hyphes (Williams *et al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997). C'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Cela explique leur dénomination: le mot « actinomycètes » provient de deux substantifs grecs « Actino » et « Mycete » et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ». La morphologie générale des actinomycètes ressemble fortement aux mycètes (Prescott *et al.*, 1995). Cependant, leur organisation cellulaire procaryotique ; le diamètre de ces hyphes, qui est habituellement inférieur à 1,5 microns chez les actinomycètes, toujours égal ou supérieur au double chez les champignons ; la structure chimique de leur paroi, qui ne contient ni cellulose ni chitine, leur métabolisme azoté et leur sensibilité aux antibiotiques et aux phages, montrent bien que les actinomycètes sont en effet des bactéries (Hawker and Linton, 1971). La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains types produisent des spores flagellées permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (Lacey, 1973 ; Porter, 1971 ; Waksman, 1959 ; Williams *et al.*, 1984). Beaucoup d'entre eux sont connus pour avoir la capacité de synthétiser des métabolites secondaires bioactifs qui comprennent les enzymes, les herbicides, les pesticides, les antibiotiques, etc. Très peu d'actinomycètes sont pathogènes pour l'homme, les animaux et certains végétaux.

2. Ecologie

Les actinomycètes sont très répandus dans la nature. Ils sont plus fréquents dans le sol et dans le compost végétal, et se retrouvent également dans les fumiers, au fond des lacs et des rivières, dans les produits alimentaires, où ils peuvent causer leur détérioration, et dans l'air. Les actinomycètes ont été isolés de l'eau de mer et de la boue du fond de la mer, bien que la mer ne semble pas être un habitat favorable pour eux. Certains genres d'actinomycètes comme *Actinomyces* et *Nocardia*, sont des parasites des animaux. Et des plantes. Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres, quelques exemples sont représentés dans le **tableau N°4**.

Tableau N°4 : Habitats de certains actinomycètes.

Actinomycètes	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	L'eau douce, la litière végétale, le sol.
<i>Frankia</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses.
<i>Micromonospora</i>	L'eau douce, les sédiments, les sols humides.
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Les déjections animales, l'eau, le sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	Le sol, la litière végétale, l'eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	Le compost.

2.1. Les actinomycètes dans le sol

Le sol héberge différents types de micro-organismes. Les actinomycètes sont l'un des grands groupes de la population du sol. Ils représentent presque 10 à 50% de la communauté microbienne totale. Numériquement ils sont moins dominants que les bactéries et plus dominants que les champignons. Leur nombre est très variable dans différents types de sols, il est relativement important dans les zones tempérées (10^5 à 10^8 g⁻¹). Les faibles nombres d'actinomycètes ont été enregistrés dans l'Antarctique, les tourbes acides, et les sols saturés (en sel, en eaux, en produits toxiques ...etc.). Dans les sols secs alcalins, leur abondance est relativement élevée. Leur présence est maximale dans les premiers centimètres du sol et diminue avec la profondeur (**Arvind et al., 2003**).

2.2. Les actinomycètes dans les milieux aquatiques

Les actinomycètes ne sont pas adaptés pour la croissance dans les habitats aquatiques, mais ils peuvent néanmoins être récupérés facilement de l'eau douce, de l'eau de mer et à partir des sédiments. L'isolement des actinomycètes à partir de l'eau ne signifie pas qu'elles sont réellement aquatiques, une provenance à partir d'un environnement terrestre avoisinant ou même atmosphérique doit toujours être prise en considération (**Hsu et Lockwood, 1975**).

2.2.1. Les actinomycètes dans les eaux douces

La présence et l'importance des actinomycètes dans l'écosystème d'eau douce ont été étudiés par plusieurs chercheurs. Les genres d'actinomycètes qui sont fréquents dans les habitats d'eau douce comprennent : *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* et *Thermoactinomyces*. Les actinomycètes sont généralement plus nombreux dans les ruisseaux et les rivières, que dans les lacs et les réservoirs. Ils transforment l'eau potable en une eau désagréable, en développant un goût et une odeur de terre ou de moisi. La géosmine et le méthyl iso-bornéol en sont les responsables. La géosmine conduit à une odeur terreuse à aussi peu que 0,22 ppb. Autres composés volatils des actinomycètes responsables de l'odeur comprennent : mucidone, 2-phényl éthanol, phénol-3 actonone, Salicylaldehyde, isopropyl-3-méthoxy pyrazine et le 5-méthyl-3-neptanone (Arvind *et al.*, 2003).

2.2.2. Les actinomycètes dans les eaux marines

Les actinomycètes sont moins nombreux dans les eaux marines par rapport aux habitats terrestres et aux eaux douces. Ils peuvent survivre dans les sédiments marins et terrestres sous forme de spores (Okazaki et Okami 1975; Goodfellow et Williams, 1983). Plusieurs actinomycètes tel que : *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Micropolyspora*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium* et *Thermoactinomyces*, ont été isolés de l'eau de mer et des habitats marins (Goodfellow et Williams, 1983). Le genre *Streptomyces* prédomine dans les zones peu profondes des océans Pacifiques et Atlantiques, alors que *Micromonospora* et *Nocardiaforms* dominant dans les sédiments d'eau profonde (Williams *et al.*, 1983).

2.2.3. Les actinomycètes dans les boues d'épuration

Les actinomycètes mésophiles sont présents dans les boues d'épuration. Le genre *Nocardia* existe souvent, il forme des floes qui facilitent la sédimentation des particules présentant une importance particulière (Schuppler *et al.*, 1998, Lechevalier et Lechevalier, 1994). Le genre *Gordona* a été également isolé dans les boues activées, les Actinobacteria font parties des bactéries accumulatrices des polyphosphates (Seviour *et al.*, 2003).

3. Physiologie

Plusieurs facteurs environnementaux vont conditionner la croissance des actinomycètes:

- **Le PH** : Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin (Omura, 1992).

- **La température** : Les actinomycètes sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C ou plus (**Omura, 1992**).

- **L'oxygène** : Selon le type respiratoire, les actinomycètes peuvent être séparés en deux groupes: les formes oxydatifs aérobies, qui se trouvent essentiellement dans le sol, et les formes fermentatifs anaérobies strictes ou facultatives, qui vivent dans les cavités naturelles de l'homme et des animaux.

Les actinomycètes sont, en général, des chimoorganotrophes, utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi d'être chimioautotrophes, utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**). Afin d'obtenir une croissance abondante, des matières suffisamment énergétiques doivent être fournies par des protéines, des hydrates de carbone, ou des acides organiques. Des sources appropriées d'azote, soit organique ou inorganique et certains minéraux notamment le potassium, le magnésium, le phosphore, le soufre et le fer, sont également nécessaires (**Srinivasan et al., 1991**). Certains ont des exigences nutritionnelles en facteurs de croissance telles que les vitamines et certains acides aminés. D'autres aliments peuvent être aussi nécessaires pour soutenir des activités métaboliques dans l'utilisation des actinomycètes au niveau industriel, comme par exemple, le besoin en cobalt pour la synthèse de vitamine B12 (cobalamine), et le besoin en chlorure pour la synthèse de chloramphénicol.

4. Caractères culturels

Les meilleurs milieux de culture pour l'isolement des actinomycètes sont ceux contenant de l'amidon, du glycérol ou de la chitine comme source de carbone, la caséine, l'asparagine ou l'arginine comme source d'azote organique (**Burman, 1973 ; Williams et al., 1993 ; Hilali et al., 2002**). Plusieurs milieux sont utilisés pour l'isolement sélectif des actinomycètes on cite par exemple : le milieu Olson, le milieu de Bennett, le milieu amidon- caséine et bien d'autre, mais il n'existe à ce jour aucune liste exhaustive. (**Larpent et Sanglier, 1989**)

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les bactéries, ces colonies de 1 à 4 mm de diamètre ont un aspect compact, sec, lisse, rugueux ou en chou-fleur à contours lisses ou échancrés plus ou moins profondes. Elles sont le plus souvent pigmentées en jaune, orangé, blanc, crème, violet, rose, vert, gris et noir (**Leclerc, 1977**)

5. Reproduction et biologie de développement

Les actinomycètes possèdent trois principaux modes de reproduction. Chez certains, de nombreuses cloisons transversales se forment parfois à travers le mycélium qui se fragmente en courts éléments en forme de bâtonnets, chacun capable de donner naissance à un nouveau mycélium. Chez d'autres, des cellules reproductrices ovales ou sphériques, les conidies, se forment isolément ou par scission des extrémités de certains hyphes du mycélium. Enfin, certains actinomycètes peuvent former des sporanges à l'extrémité des hyphes. A l'intérieur de ces petites structures en forme de sac, existent un grand nombre de cellules qui seront éventuellement libérées par la rupture de la paroi du sporange (Stanier *et al.*, 1966). D'autres groupes d'actinomycètes peuvent former des athrospores par fragmentation des hyphes (figure 2).

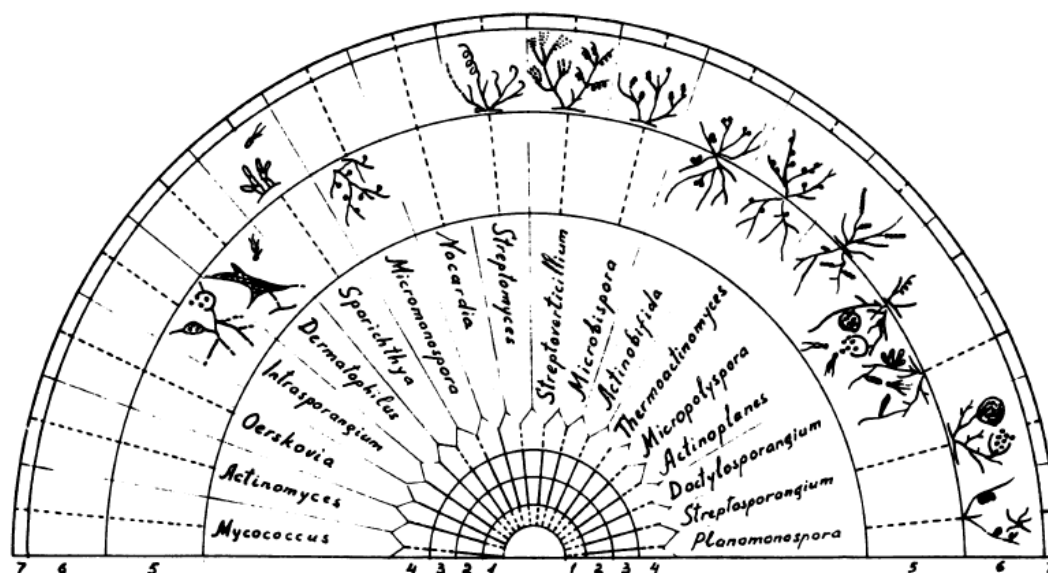


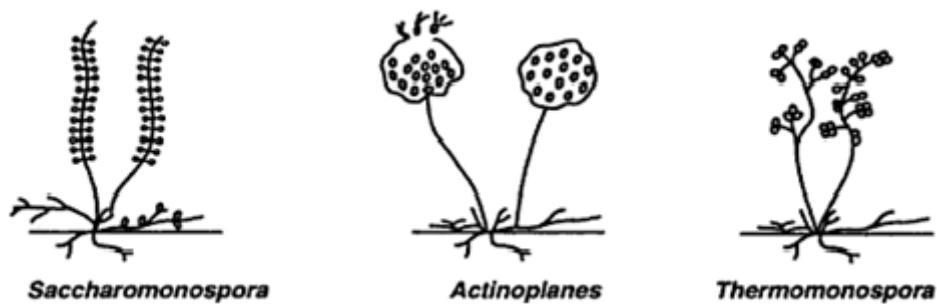
Figure N°2: Les modes de reproduction dans certains représentants des actinomycétales (Kalakoutskii et Agre, 1976).

Les lignes pleines indiquent la présence des étapes correspondantes; les lignes pointillées indiquent l'absence d'une étape. (1-4) Cycle de vie végétative; (5-7) spores ; (1) des cellules mobiles, (2) des cellules immobiles; (3) mycélium; (4) la fragmentation du mycélium; (5) la formation des spores sur le mycélium de substrat; (6) formation des spores sur le mycélium aérien; (7) spores mobiles.

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes. Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes. Ainsi les actinomycètes les plus différenciés se développent sur un milieu gélosé. Une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux

couches : le mycélium aérien et le mycélium du substrat. Selon les cas les spores peuvent se former sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois, elles permettent la propagation de la souche.

Le mycélium du substrat également dénommé mycélium végétatif ou primaire, se développe à partir de tube de germination issu de la spore (**Theilleux, 1993**). La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. La largeur des filaments mycéliens varie de 0,5 à 2 µm. Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. Cette habitude de formation de mycélium de substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (**Locci, 1976**). Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, ses hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat. Elles sont en général pigmentées et enfermées dans une enveloppe externe hydrophobe. Le mycélium du substrat est aérobic facultatif, par contre le mycélium aérien est aérobic strict (**Silvey et Roach, 1975**). Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvus de ce type de croissance (mycélium aérien) (figure 3). Divers mutants de streptomycètes sans mycélium aérien ou incapables de sporuler ont été décrits (**Chater et Merrick, 1979**).



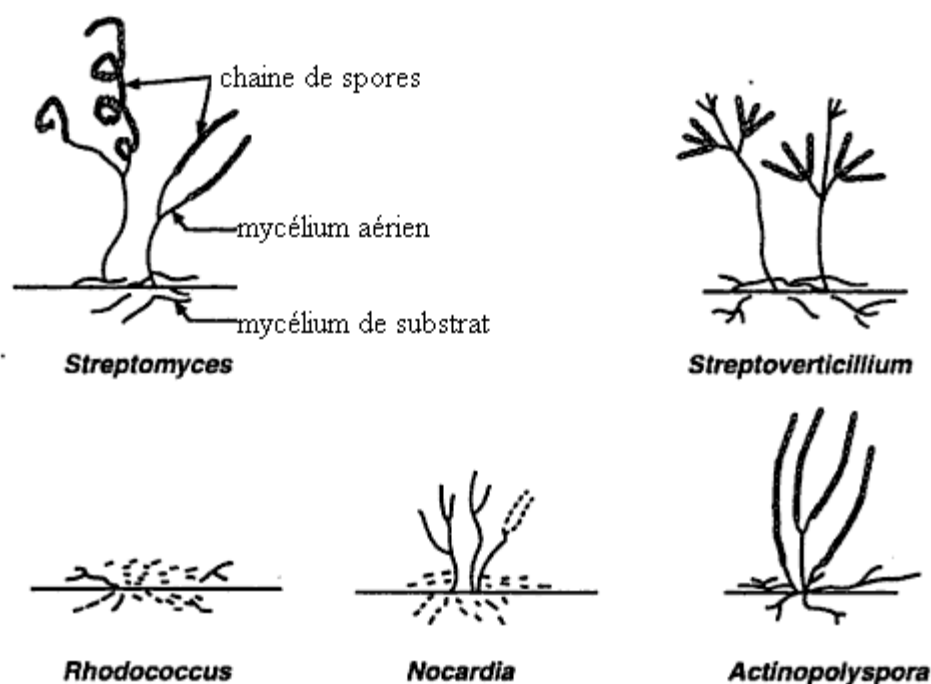


Figure N°3: Le mycélium de substrat et le mycélium aérien chez certains genres d'actinomycètes (Chandrakant, 2008).

6. Formation des spores chez les actinomycètes et structures particulières

6.1. Les exospores

Les actinomycètes forment généralement des exospores qui peuvent avoir des formes très variables. Elles se développent par septation des extrémités du filament, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative (Prescott *et al.*, 1995).

6.2. Les endospores

Les endospores naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. Dans ce groupe une subdivision supplémentaire est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (Locci et Sharples, 1984).

6.3. Germination des spores

C'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative. Quatre étapes distinctes sont décrites : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance.

6.4. Structures particulières

D'autres structures morphologiques particulières sont observées chez certaines espèces d'actinomycètes à savoir :

- **Les sclérotés** trouvés chez *Chainia*, sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.

- **Les synnemata**, appelés également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

Des vésicules appelés **sporanges**, contenant des spores, chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium*.

7. Les actinomycètes en tant qu'agents de biodégradation

Les actinomycètes sont des microorganismes saprophytes qui jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des différentes matières organiques, et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignocellulose, la pectine, grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extracellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. Il existe une constante augmentation dans la demande pour ces enzymes afin d'améliorer certains procédés de fabrications industrielles (tableau N°5).

Tableau N°5: Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels (Kirk et al., 2005).

Secteur industriel ou classe d'utilisation	Enzyme	Applications
Industrie des détergents	-Cellulase -Amylase -Protéase -Lipase	-Nettoyage, clarification des couleurs. -Enlèvement des tâches d'amidon -Enlèvement des tâches protéiques -Enlèvement des tâches des graisses
Industrie des boissons	-Pectinase -Amylase	Dépectinisation, Clarification des jus, broyage. -Traitement des jus
Produits laitiers	-Pectine méthylestérase -Protéase -Lipase	-Affermissement de produits à base de fruits. -Lait caillé. -Aromes des fromages
Industrie textile	Cellulase -Pectate lyase	-Assouplissement du coton -Lessivage
Pâte à papier	Cellulase -Xylanase	-Désencrage, améliorant de drainage, Modification de la fibre. -Augmentation du blanchiment

7.1. Biodégradation de la matière organique

La biodégradation consiste à décomposer un substrat organique comme, les hydrocarbures, les solvants, les composés organochlorés, etc. par l'action des microorganismes vivants. Les polluants sont digérés par les microbes et transformés en composés plus simples non toxiques. On distingue la biodégradation en présence d'oxygène (en aérobiose), de la biodégradation en absence d'oxygène (en anaérobiose), par la nature des microorganismes dégradateurs et les produits de dégradation (Van der zee et al., 1994).

La biodégradation est une dégradation biotique qui met en jeu l'action des microorganismes, qui grâce aux enzymes qu'ils excrètent peuvent utiliser les matières organiques comme sources de carbone et d'énergie conduisant à une décomposition du substrat au niveau moléculaire. Si la biodégradation du substrat organique est totale, c'est-à-dire formation uniquement de produits inorganiques tels H₂O, H₂, Cl⁻, on parle de minéralisation (Pelmont, 1993). Cependant, si la biodégradation n'est pas totale, il s'agit donc de biotransformation. Le terme biotransformation implique la notion de transformation incomplète d'un substrat organique métabolisé qui n'aboutit donc pas forcément à son assimilation totale (Pelmont, 1993). Il peut s'agir par exemple d'une

oxydation partielle du substrat qui se traduit par un rejet de produits intermédiaires (métabolites) dans le milieu.

7.1.1. Certains enzymes de biodégradation des composés organiques naturels

- **Les cellulases**

Les actinomycètes, en particulier les espèces thermophiles et les *Streptomyces*, sont capables de dégrader la cellulose grâce à l'excrétion d'enzymes (**Sanglier et al., 1993 ; Mason et al., 2001**). Il s'agit: des endoglucanases, des exoglucanases ou des cellobiohydrolases et des cellobiases. Les endoglucanases rompent les liaisons internes de la chaîne cellulosique ce qui entraîne une libération des sucres réducteurs. Les exoglucanases attaquent les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libèrent exclusivement du cellobiose. Les cellobiases attaquent la liaison β -glucosidique du cellobiose et libèrent deux molécules de glucose. D'autres espèces d'actinomycètes produisent des enzymes qui dégradent l'hémicellulose (**Klemm et al., 2002**).

- **Les ligninases**

Streptomyces thermoviolaceus, *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces fusca* et beaucoup d'autres espèces d'actinomycètes ont une activité lignocellulolytique grâce la production d'une enzyme qui dégrade la lignine appelée l'hémoperoxydase, (**Mason et al., 2001**).

- **Les xylanases**

Elles sont produites par beaucoup espèces d'actinomycètes tel que *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces fusca* ont une activité lignocellulolytique et sont capables de produire l'hémoperoxydase, enzyme qui dégrade la lignine. Elles sont élaborées par des espèces thermophiles du genre *Streptomyces* et des souches du genre *Promicromonospora*, ainsi que par différentes espèces de *Microbispora*, *Micromonospora* et *thermomonospora* (**Demain et Solomon, 1985 ; Rivas et al., 2003 ; Petrosyan et al., 2003**).

- **Les dextrinases**

Elles sont excrétées par de nombreuses souches d'*Oerskovia xanthineolytica* et *Actinomyces israeli* (**Demain et Solomon, 1985**).

- **Les amylases**

Elles sont produites par la majorité des actinomycètes, les plus intéressantes sont celles produites par les espèces thermophiles comme *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermomonospora curvata*, *Saccharomonospora viridis* et les espèces du genre *Streptomyces* (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al.*, 1993).

- **Les chitinases**

Elles sont produites par de nombreux genres d'actinomycètes tel que les genres *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* et par les espèces *Nocardia mediterranei*, *Actinomadura pelletierii* (Hsu et Lockwood, 1975 ; Demain et Solomon, 1985).

- **Les lipases**

Les lipases endo et exocellulaires sont isolées à partir de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*. Des phospholipases sont également isolées avec un taux élevé à partir des espèces du genre *Streptoverticillium* et de l'espèce *Micromonospora chalcea* (Demain et Solomon, 1985).

- **Les protéases**

Des protéases alcalines thermostables sont produites par les espèces thermophiles du genre *Micropolyspora*, d'autres protéases résistantes à la majorité des inhibiteurs de protéases, sont isolées à partir du genre *Oerskovia*, d'autres genres d'actinomycètes tel que les genres *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planomonospora*, *Planobispora* sont capables de produire des *kératinases*. Les élastinases sont élaborées par plusieurs souches appartenant à 14 genres d'actinomycètes (Demain et Solomon, 1985 ; Chitte *et al.*, 1999).

7.1.2. Les processus impliqués dans la biodégradation des polymères organiques

Le processus de biodégradation est généralement réalisé en deux étapes :

- **La fragmentation**

Les microorganismes utilisent différents modes opératoires pour fragmenter les polymères en un mélange d'oligomères et/ou monomères, dont principalement, la sécrétion des enzymes spécifiques. Ces enzymes peuvent être des hydrolases comme les cellulases, les amylases et les chitinases ou des

oxydoréductases comme les mono-oxygénases, les di-oxygénases, les peroxydases et les oxydases (Lucas *et al.*, 2008).

- **L'assimilation**

Dans ce processus, il ya une intégration réelle des atomes à partir des fragments d'un polymère à l'intérieur des cellules microbiennes. Trois principales voies cataboliques sont responsables de l'oxydation des molécules transportées et donc de la production d'ATP et des éléments constitutifs de la structure cellulaire. Il s'agit de la respiration aérobie, de la respiration et anaérobie et de la fermentation (Lucas *et al.*, 2008).

7.1.3. La biodégradation des polymères naturels complexes

Les actinomycètes peuvent utiliser beaucoup de sources naturelles de carbone et d'azote. Les genres mésophiles et thermophiles et plus particulièrement : *Streptomyces* et *Thermomonospora* respectivement, ont la capacité de dégrader l'amidon par hydrolyse grâce à des complexes enzymatiques extra-cellulaires composés α et β amylases. L'amylase de *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces praecox* peuvent produire des concentrés de sirop de maltose à partir d'amidon (Martin *et al.*, 1998). Ils sont capables également d'attaquer tous les composants lignocellulotiques, y compris la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Il a été montré que *Thermomonospora fusca* peut convertir les déchets des usines de pâte hautement cellulosiques et à lignine faible, en un produit protéique à haute valeur nutritionnelle, utilisé comme complément alimentaire dans le régime alimentaire des poussins (Martin *et al.*, 1998). La présence de grandes quantités de chitine dans les sols et dans les environnements marins a permis l'évolution d'une grande diversité de microorganismes capables de décomposer cette substance, dont les principaux sont les actinomycètes tel que les genres *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* et les espèces *Nocardia mediterranei*, *Actinomadura pelletierii*. Le tableau N°6 illustre quelques exemples de composés organiques synthétiques métabolisés par les actinomycètes.

Tableau N°6: Exemples de composés organiques synthétiques métabolisés par les actinomycètes.

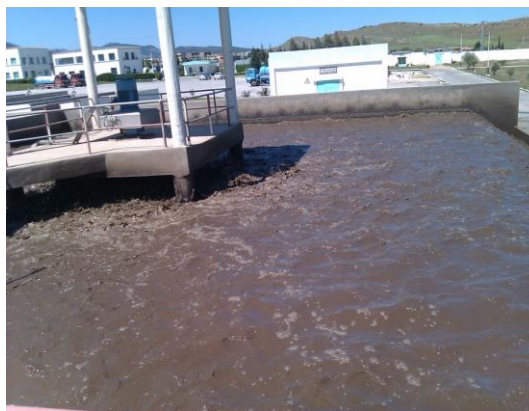
Composé	Microorganisme	Bibliographie	Type de dégradation
Hydrocarbures monoaromatiques : Benzène, toluène, xylène, phénols, crésols	<i>G.alkanivorans</i> CC-JG39 <i>Mycobacterium</i> sp. T103, T104 <i>R. opacus</i> M213 <i>R.phenolicus</i> G2P <i>Rhodococcus</i> sp. DK17 <i>Rhodococcus</i> sp. MS11	Lin et al., 2005 Uz et al., 2000 Kimura and Urushigawa, 2001 Reh fuss and Urban, 2005 Kim et al., 2002 Rapp and Gabriel-jugens, 2003	SCE* SCE SCE SCE SCE SCE
Hydrocarbures polyaromatiques (PAH)	<i>Gordonia-like Strain</i> BP9	Mutnuri et al., 2005	SCE
Acide phtalique	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1 <i>Rhodococcus</i> sp. YU6 <i>M.vanbaalenii</i> PYR-1	Navarro-Liorens et al., 2005 ; Patrochan et al., 2005 Stingley et al., 2004	SCE SCE SCE
Esters d'acide phtalique	<i>R.rhodochrous</i> ATCC 21766	Nalli et al., 2002	Cométabolisme avec l'hexadécane
Monochlorobenzéne Dichlorobenzéne Mono-et dichlorophénols Tri- et tetrachlorophénol Tri- et tetrachlorobenzénes Pentachlorophénol	<i>R.phenolicus</i> G2P <i>Rhodococcus</i> sp. MS11 <i>R. opacus</i> 1CP <i>R.percolatus</i> MBS1 <i>Rhodococcus</i> sp. MS11 <i>M.chlorophenolicum</i> CP-2	Reh fuss and Urban, 2005 Rapp and Gabriel-jugens, 2003 Gurther et al., 2004 Brigilia et al., 1996 Rapp and Gabriel-jugens, 2003 Haggbloom et al., 1988	SCE SCE SCE SCE Minéralisation en présence de 0.1% de glucose
Gomme isopréne	<i>G.westfalica</i> Kb2 <i>G.polyisoprenivorans</i> Kd2	Linos et al., 2002 Linos et al., 2002	SCE SCE

(*) SCE : source de carbone et d'énergie.

1. Isolement des actinomycètes à partir des boues activées

1.1. Origine et prélèvement de l'échantillon

L'échantillon de boues activées a été prélevé à partir de la station d'épuration des eaux usées de KHENCHELA située dans la région de BAGEY à l'Est du pays. Le prélèvement a été effectué dans le bassin d'aération de la station (photographie N° 1) dans un flacon stérile de 250 ml. L'échantillon a été transporté au laboratoire dans la même journée puis conservé à 4° C au réfrigérateur jusqu'à utilisation.



Photographie N°1: Le bassin biologique de la station d'épuration des eaux usées de Khenchela

1.2. Réalisation des dilutions décimales

1 ml de la solution mère a été dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile contenant 9 % d'NaCl, puis agité au vortex, ensuite une deuxième dilution décimale a été réalisée (jusqu'à 10^{-6}) (**Finance et al., 1986**).

1.3. Préparation du milieu d'isolement

Les milieux sélectifs utilisés sont le milieu Olson et le milieu GLM (Annexe 1).

1.3.1. Addition de la solution d'antifongique

La Nystatine est utilisée comme agent antifongique afin d'éliminer la flore fongique envahissante qui perturbe et empêche les actinomycètes de se développer. Elle est additionnée

aux milieux de culture à une concentration de 50 µg/ml (**Larpent J. P. et Sanglier J. J. 1989**).

1.3.2. Addition de la solution antibactérienne

Afin d'inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif qui représentent une concurrence pour les actinomycètes, la Polymixine est additionnée aux milieux de culture à une concentration de 10 µg/ml (**Larpent J. P. et Sanglier J. J. 1989**).

1.4. Ensemencement et incubation

Les deux milieux sont ensemencés en surface à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sous forme de râteau à raison de 0,1 ml par dilution et par boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à 30 °C et observées quotidiennement pendant une durée de 3 semaines.

1.5 Récolte des actinomycètes et purification

Dans un premier temps, les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique grossissement $\times 10$. Les boîtes présentant des colonies dénombrables et bien distinctes, sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.

1.6. Purification des souches

Les colonies obtenues sont purifiées après repiquage successif sur le même milieu d'isolement (GLM), puis les boîtes sont incubées pendant une semaine à 30° C.

1.7. Observation microscopique des bactéries actinomycétales

Elle est effectuée selon la méthode classique de la coloration de Gram. Des frottis de colonies sont préparés, colorés puis observés sous microscope optique (grossissement X100). Les Gram positif apparaissent en violet tandis que les Gram négatif prennent la couleur rose (Annexe 2).

2. Mise en évidence de la capacité des actinomycètes à dégrader certains composés de synthèse

Afin de mettre évidence la capacité des souches d'actinomycètes isolées à partir des boues activées à dégrader certains composés de synthèse, quatre pesticides ont été utilisés : deux insecticides (Méthomyl et Cypermétrine), un herbicide (Glyphosate) et un fongicide (Ortiva) (Annexe 2).

2.1. Biodégradation de l'insecticide : le méthomyl

La technique utilisé nécessite l'emploi d'un milieu minimum ne contenant pas de source de carbone (Annexe 1). Les souches bactériennes actinomycétales purifiées ont étéensemencées par des stries à la surface du milieu minimum additionné de 5 ml de Méthomyl. Les boîtes sont incubées pendant une semaine à 28° C. La dégradation des deux pesticides se traduit par une croissance des colonies sur les deux milieux comparativement à un milieu témoin (milieu minimum) sans l'ajout du composé chimique testé.

2.2. Biodégradation de l'insectide : la Cypermétrine

Pour mettre en évidence la croissance des isolats d'actinomycètes sur un milieu contenant un pesticide, 5 ml de Cypermétrine a été introduite dans les boîtes de petri contenant le milieu minimum. Elles sont ensuite incubées dans une étuve réglée à 28°C.

2.2. Biodégradation de l'herbicide : le Glyphosate

Afin de déterminer la capacité de dégradation du Glyphosate par les bactéries testées, la méthode précédente a été fidèlement répétée. Une quantité de 5 ml de l'herbicide a été cependant utilisée.

2.3. Biodégradation du fongicide : l'Ortiva

Afin de mettre en évidence la biodégradation de l'Ortiva par les actinomycètes purifiés, la même technique utilisée pour les pesticides précédents a été effectuée en additionnant 5mL du fongicide ortiva à chaque boîte de Pétri. Les souches bactériennes sontensemencées par stries à la surface solide du milieu, les boîtes ainsi préparées ont été incubées pendant 21 jours à une température de 28°C.

1. Isolement des actinomycètes à partir des boues activées

1.1. Description de l'échantillon

L'échantillon de boues activées prélevé à partir du bassin biologique de la station d'épuration des eaux usées de KHENCHELA est de couleur marron foncé et présentant une odeur nauséabonde.

1.2. Isolement des actinomycètes

Après 21 jours d'incubation, 191 colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique des actinomycètes. Ce sont des colonies d'aspect poudreux ou dures incrustées dans les milieux d'isolement utilisés. Ces colonies ont été prélevées sur les deux milieux sélectifs Olson et GLM avec et sans antibiotiques. Les résultats de chaque milieu sont représentés dans le tableau N°7. En effet, 15 actinomycètes ont été dénombrés sur le milieu GLM avec antibiotiques contre 116 isolats sur le milieu GLM sans antibiotiques, alors que sur le milieu Olson sans antibiotique 60 colonies actinomycétales ont été dénombrées. On constate également la présence de 3 champignons sur le milieu GLM sans antibiotique et d'un seul champignon sur le milieu GLM avec antibiotique. Cependant, aucun champignon n'a été dénombré sur le milieu Olson.

Tableau N°7 : Dénombrement des isolats d'actinomycètes sur les milieux (Olson et GLM)

	Milieux d'isolement							
	GLM +		GLM -			OLSON -		
Dilutions	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Nombre de champignons	1	0	1	0	2	0	0	0
Nombre de colonies d'actinomycètes	9	6	40	20	56	34	16	10

+ : Présence d'antibiotiques

- : Absence d'antibiotiques

Selon les résultats rassemblés dans le **tableau N°7**, on constate que pour les deux milieux utilisés, nous observons une différence importante du nombre des colonies des actinomycètes isolées à partir des boues activées de la station. D'autre part, le plus grand nombre de colonies d'actinomycètes prélevées est obtenu avec le milieu GLM sans antibiotique avec 116 bactéries actinomycétales contre 15 isolats d'actinomycètes sur le milieu GLM avec antibiotiques. Ce résultat, indique que l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu GLM, réduit considérablement le nombre des actinomycètes isolés. Sur le milieu Olson sans d'antibiotiques, 60 actinomycètes ont été isolés. D'après ces résultats, le milieu GLM est le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir de cet écosystème. Les résultats concernant le nombre d'actinomycètes sur le milieu d'Olson sans antibiotique, n'ont pas été représentés suite à une mauvaise manipulation. Cette différence de nombre revient probablement à la composition des deux milieux de culture.

Plusieurs techniques ont été utilisées par des chercheurs pour l'isolement sélectif des actinomycètes. Elles reposent essentiellement sur l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpen et Sanglier, 1989; Ouhdouche et al., 2001; Hilali et al., 2002; Jung yeop lee, 2002**). C'est cette dernière méthode que nous avons adoptée au cours de notre travail. Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon **Porter et al., (1960)** la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Dulaney et al., (1955), Williams et Davies (1965)**, recommandent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour l'isolement des actinomycètes.

L'actidione (cyclohexémide) à 50-100 ug/ml, la piramicine et la nystatine à une concentration respectivement de 10 et 50 ug/ml sont les antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isollements des actinomycètes (**Dulaney et al, 1955 ; Porter et al. 1960**). Les antibactériens les plus utilisés dans l'isolement sélectif des actinomycètes, sont la polymixine à 5ug/ml, la pénicilline à 1ug/ml et l'acide nalidixique à 10ug/ml (**Williams et Davies, 1965 ; Cavala, 1994 ; Takizawa et al, 1993**).

Dans nos résultats, la nystatine ajoutée au milieu a inhibé la croissance des champignons. **Williams et Davies (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en majorité à une concentration de 50 ug/ml, en plus cet antibiotique lorsqu'il est testé sur les actinomycètes n'a pas altéré leur

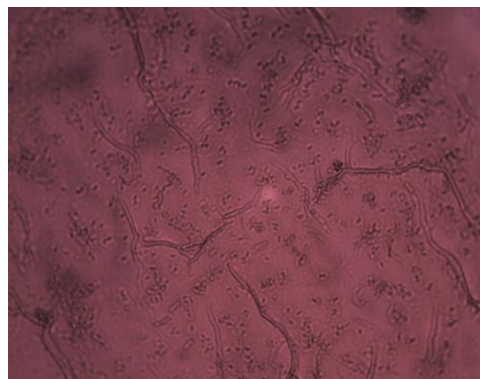
croissance même en augmentant sa concentration à 100 ug/ml. L'addition de la polymixine a permis l'élimination des bactéries à Gram négatif.

1.3. Etude de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes actinomycétales

Après repiquage sur milieu GLM, 6 colonies pures ont été obtenues. Ce nombre est très réstreint comparant avec le nombre d'actinomycètes isolés. Cela est dû à la ressemblance morphologique des colonies. Ces dernières sont généralement rondes aux contours irréguliers, opaque qui adhèrent à la surface de la gélose, leur couleur est blanche. Ces colonies ressemblent à l'aspect caractéristique des actinomycètes.

1.4. Etude de l'aspect microscopique des isolats d'actinomycètes

Toutes les souches d'actinomycètes purifiées sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive (figure N°3). Les actinomycètes se présentent sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés, ces filaments se fragmentent pour certaines ou pas pour d'autres en éléments bacillaires ou ovoïdes. Ils sont regroupés quelques fois en masse pour former des thalles denses où la coloration est très apparente.



Photographie N°2 : Exemple de la coloration de Gram de la souche 1

2. Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques naturels

La capacité de croissance des isolats d'actinomycètes a été mise en évidence sur un premier milieu minimum additionné de Métomyl, un deuxième additionné de Cypermétrine, un troisième additionné de Glyphosate et un quatrième additionné de l'Ortiva. Ces quatre pesticides sont pris comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats obtenus

sont rassemblés dans le tableau N°8. Si les souches sont incapables d'utiliser ce substrat, leur croissance est faible ou absente. Ceci explique l'absence d'enzymes de biodégradation. Dans le cas contraire, les souches présentant une bonne croissance, sont donc capables de produire des enzymes qui dégradent ce composé.

Tableau N°8 : Croissance des souches sur le milieu témoin et sur les quatre milieux minimums contenant chacun un pesticide.

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Milieux						
Milieu minimum	-	-	-	-	-	-
MM +Méthomyl	+	+	+	+	+	+
MM +Ortiva	-	-	-	-	+	+
MM+Glyphosate	-	+	-	-	+	-
MM+Cyperméthrine	-	-	-	-	-	-

MM : milieu minimum (témoin)

S : souche

+ : bonne croissance. - : absence de croissance.

Les résultats, réunis dans le tableau 8, montrent que sur le milieu minimum il y a absence totale de bactérie ce qui prouve que le milieu minimum ne contient aucune source de carbone ou d'azote nécessaire pour la croissance des actinomycètes.

On remarque par contre que les 6 souches d'actinomycètes ont pu croître sur le milieu qui contient l'insecticide méthomyl, ce qui induit qu'elles sont capables de dégrader cet insecticide (Photo.3) en l'utilisant comme source de carbone et d'énergie. Ce résultat indique que les actinomycètes présents dans les boues activées possèdent la capacité de dégrader ce pesticide. Les problèmes de pollution par ce xénobiotique ne sont pas notés.

Deux souches d'actinomycètes (S5 et S6) peuvent se développer sur l'ortiva (Photo.4) elles peuvent donc être de bons agents biologiques pour la biodégradation de ce xénobiotique étudié.

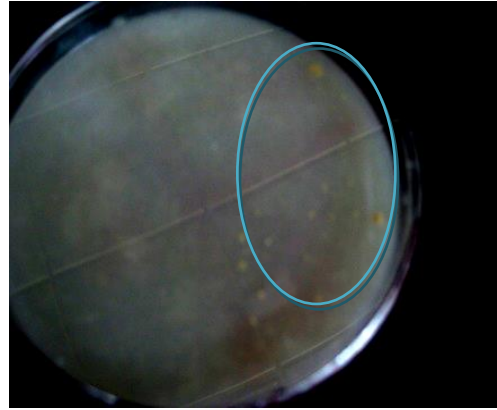
Selon la **EFSA, 2009; EFSA, 2010 et US-EPA, 1997**, aucune étude portant sur la biodégradation de l'azoxystrobine (produit actif de l'ortiva) n'est disponible. Ainsi les travaux qui ont étudié la biodégradation de l'azoxystrobine par une culture pure sont très rares, Les cultures mixtes et les consortiums sont couramment utilisés. En présence de boue activée, la dégradation complète de l'azoxystrobine agit sur la microfaune et la microflore présentent dans cette dernière, entraînent une augmentation des bactéries libres et des rotifères de la classe des Donogononta et Digononta. Dans une étude menée par **Garau et al., 2002** sur la disparition de l'azoxystrobine, appliqué sur les tomates en serre a montré que les résidus de ce dernier sont restés stables, aucune action de dégradation n'a été détecté au cours de toutes les expériences.

Deux souches actinomycétales ont pu dégrader l'herbicide Glyphosate (Photo.5). Les actinomycètes isolés, exposés au glyphosate, ont pu croître sur cet herbicide, tout au moins dans les conditions du laboratoire, ces résultats sont en accord avec ceux de **Araùjo et al., 2003** sur la biodégradation du glyphosate dans le sol par l'évaluation du CO_2 dégagé, ils montrent que des grandes quantités de dioxyde de carbone ont été libérées en présence de glyphosate, ils suggèrent que le microbiote du sol est capable d'utiliser le glyphosate comme seule source de carbone. Aussi nos résultats sont en accord avec ceux de **Wardle et Parkinson (1990)** qui suggèrent que la production de dioxyde de carbone est liée à la décomposition de glyphosate dans le sol. **Souza et al., (1999)**, ont observé que le glyphosate a été dégradé rapidement au 10^e jour d'incubation, tandis que d'autres auteurs (**Sprankle et al., 1975; Nomura et al., 1977**) ont rapporté une dégradation rapide du glyphosate dans la période initiale d'incubation. Dans les environnements aquatiques, une étude a révélé que 50% du glyphosate ajouté directement dans les eaux d'un canal d'irrigation étaient encore présents 14,4 km en aval (**Livré et al., 1976**). L'analyse des données disponibles représentent de nombreuses études qui indiquent que la demi-vie du glyphosate dans un milieu aquatique typique varie de 7 à 14 jours. Des études ont établi que les micro-organismes des eaux de surface décomposent le glyphosate au fil du temps.

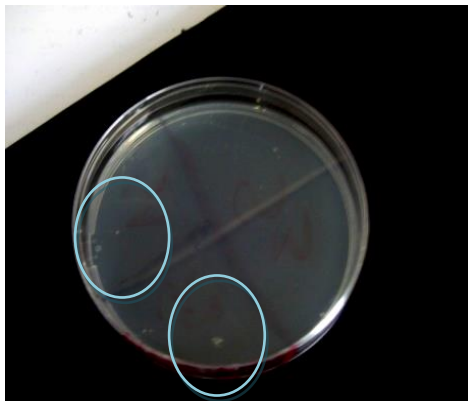
Par ailleurs aucun actinomycète n'est capable de dégrader la cyperméthrine (Photo.6). Ce résultat important, montre l'urgence de rechercher d'autres microorganismes capables de dégrader ce polluant.



Photographie N° 3 : Biodégradation du Méthomyl par les 6 souches



Photographie N°4 : Biodégradation de l'Ortiva par S5 et S6



Photographie N°5 : Biodégradation du Glyphosate par S2 et S5



Photographie N° 6 : Biodégradation négative du Cyperméthrine

1. Isolement des actinomycètes à partir des boues activées

1.1. Description de l'échantillon

L'échantillon de boues activées prélevé à partir du bassin biologique de la station d'épuration des eaux usées de KHENCHELA est de couleur marron foncé et présentant une odeur nauséabonde.

1.2. Isolement des actinomycètes

Après 21 jours d'incubation, 191 colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique des actinomycètes. Ce sont des colonies d'aspect poudreux ou dures incrustées dans les milieux d'isolement utilisés. Ces colonies ont été prélevées sur les deux milieux sélectifs Olson et GLM avec et sans antibiotiques. Les résultats de chaque milieu sont représentés dans le tableau N°7. En effet, 15 actinomycètes ont été dénombrés sur le milieu GLM avec antibiotiques contre 116 isolats sur le milieu GLM sans antibiotiques, alors que sur le milieu Olson sans antibiotique 60 colonies actinomycétales ont été dénombrées. On constate également la présence de 3 champignons sur le milieu GLM sans antibiotique et d'un seul champignon sur le milieu GLM avec antibiotique. Cependant, aucun champignon n'a été dénombré sur le milieu Olson.

Tableau N°7 : Dénombrement des isolats d'actinomycètes sur les milieux (Olson et GLM)

	Milieux d'isolement							
	GLM +		GLM -			OLSON -		
Dilutions	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Nombre de champignons	1	0	1	0	2	0	0	0
Nombre de colonies d'actinomycètes	9	6	40	20	56	34	16	10

+ : Présence d'antibiotiques

- : Absence d'antibiotiques

Selon les résultats rassemblés dans le **tableau N°7**, on constate que pour les deux milieux utilisés, nous observons une différence importante du nombre des colonies des actinomycètes isolées à partir des boues activées de la station. D'autre part, le plus grand nombre de colonies d'actinomycètes prélevées est obtenu avec le milieu GLM sans antibiotique avec 116 bactéries actinomycétales contre 15 isolats d'actinomycètes sur le milieu GLM avec antibiotiques. Ce résultat, indique que l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu GLM, réduit considérablement le nombre des actinomycètes isolés. Sur le milieu Olson sans d'antibiotiques, 60 actinomycètes ont été isolés. D'après ces résultats, le milieu GLM est le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir de cet écosystème. Les résultats concernant le nombre d'actinomycètes sur le milieu d'Olson sans antibiotique, n'ont pas été représentés suite à une mauvaise manipulation. Cette différence de nombre revient probablement à la composition des deux milieux de culture.

Plusieurs techniques ont été utilisées par des chercheurs pour l'isolement sélectif des actinomycètes. Elles reposent essentiellement sur l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpen et Sanglier, 1989; Ouhdouche et al., 2001; Hilali et al., 2002; Jung yeop lee, 2002**). C'est cette dernière méthode que nous avons adoptée au cours de notre travail. Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon **Porter et al., (1960)** la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Dulaney et al., (1955), Williams et Davies (1965)**, recommandent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour l'isolement des actinomycètes.

L'actidione (cyclohexémide) à 50-100 ug/ml, la piramicine et la nystatine à une concentration respectivement de 10 et 50 ug/ml sont les antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isolements des actinomycètes (**Dulaney et al, 1955 ; Porter et al. 1960**). Les antibactériens les plus utilisés dans l'isolement sélectif des actinomycètes, sont la polymixine à 5ug/ml, la pénicilline à 1ug/ml et l'acide nalidixique à 10ug/ml (**Williams et Davies, 1965 ; Cavala, 1994 ; Takizawa et al, 1993**).

Dans nos résultats, la nystatine ajoutée au milieu a inhibé la croissance des champignons. **Williams et Davies (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en majorité à une concentration de 50 ug/ml, en plus cet antibiotique lorsqu'il est testé sur les actinomycètes n'a pas altéré leur

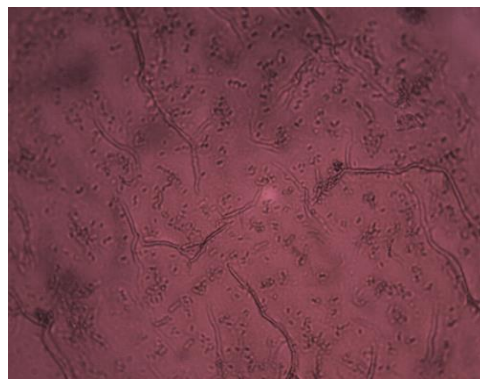
croissance même en augmentant sa concentration à 100 ug/ml. L'addition de la polymixine a permis l'élimination des bactéries à Gram négatif.

1.3. Etude de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes actinomycétales

Après repiquage sur milieu GLM, 6 colonies pures ont été obtenues. Ce nombre est très réstreint comparant avec le nombre d'actinomycètes isolés. Cela est dû à la ressemblance morphologique des colonies. Ces dernières sont généralement rondes aux contours irréguliers, opaque qui adhèrent à la surface de la gélose, leur couleur est blanche. Ces colonies ressemblent à l'aspect caractéristique des actinomycètes.

1.4. Etude de l'aspect microscopique des isolats d'actinomycètes

Toutes les souches d'actinomycètes purifiées sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive (figure N°3). Les actinomycètes se présentent sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés, ces filaments se fragmentent pour certaines ou pas pour d'autres en éléments bacillaires ou ovoïdes. Ils sont regroupés quelques fois en masse pour former des thalles denses où la coloration est très apparente.



Photographie N°2 : Exemple de la coloration de Gram de la souche 1

2. Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques naturels

La capacité de croissance des isolats d'actinomycètes a été mise en évidence sur un premier milieu minimum additionné de Métomyl, un deuxième additionné de Cypermétrine, un troisième additionné de Glyphosate et un quatrième additionné de l'Ortiva. Ces quatre pesticides sont pris comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats obtenus

sont rassemblés dans le tableau N°8. Si les souches sont incapables d'utiliser ce substrat, leur croissance est faible ou absente. Ceci explique l'absence d'enzymes de biodégradation. Dans le cas contraire, les souches présentant une bonne croissance, sont donc capables de produire des enzymes qui dégradent ce composé.

Tableau N°8 : Croissance des souches sur le milieu témoin et sur les quatre milieux minimums contenant chacun un pesticide.

Souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Milieux						
Milieu minimum	-	-	-	-	-	-
MM +Méthomyl	+	+	+	+	+	+
MM +Ortiva	-	-	-	-	+	+
MM+Glyphosate	-	+	-	-	+	-
MM+Cyperméthrine	-	-	-	-	-	-

MM : milieu minimum (témoin)

S : souche

+ : bonne croissance. - : absence de croissance.

Les résultats, réunis dans le tableau 8, montrent que sur le milieu minimum il y a absence totale de bactérie ce qui prouve que le milieu minimum ne contient aucune source de carbone ou d'azote nécessaire pour la croissance des actinomycètes.

On remarque par contre que les 6 souches d'actinomycètes ont pu croître sur le milieu qui contient l'insecticide méthomyl, ce qui induit qu'elles sont capables de dégrader cet insecticide (Photo.3) en l'utilisant comme source de carbone et d'énergie. Ce résultat indique que les actinomycètes présents dans les boues activées possèdent la capacité de dégrader ce pesticide. Les problèmes de pollution par ce xénobiotique ne sont pas notés.

Deux souches d'actinomycètes (S5 et S6) peuvent se développer sur l'ortiva (Photo.4) elles peuvent donc être de bons agents biologiques pour la biodégradation de ce xénobiotique étudié.

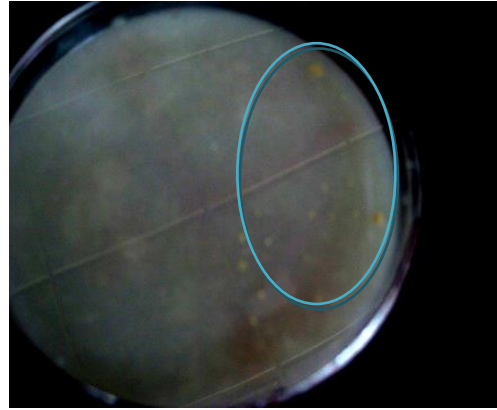
Selon la **EFSA, 2009; EFSA, 2010 et US-EPA, 1997**, aucune étude portant sur la biodégradation de l'azoxystrobine (produit actif de l'ortiva) n'est disponible. Ainsi les travaux qui ont étudié la biodégradation de l'azoxystrobine par une culture pure sont très rares, Les cultures mixtes et les consortiums sont couramment utilisés. En présence de boue activée, la dégradation complète de l'azoxystrobine agit sur la microfaune et la microflore présentent dans cette dernière, entraînent une augmentation des bactéries libres et des rotifères de la classe des Donogononta et Digononta. Dans une étude menée par **Garau et al., 2002** sur la disparition de l'azoxystrobine, appliqué sur les tomates en serre a montré que les résidus de ce dernier sont restés stables, aucune action de dégradation n'a été détecté au cours de toutes les expériences.

Deux souches actinomycétales ont pu dégrader l'herbicide Glyphosate (Photo.5). Les actinomycètes isolés, exposés au glyphosate, ont pu croître sur cet herbicide, tout au moins dans les conditions du laboratoire, ces résultats sont en accord avec ceux de **Araùjo et al., 2003** sur la biodégradation du glyphosate dans le sol par l'évaluation du CO_2 dégagé, ils montrent que des grandes quantités de dioxyde de carbone ont été libérées en présence de glyphosate, ils suggèrent que le microbiote du sol est capable d'utiliser le glyphosate comme seule source de carbone. Aussi nos résultats sont en accord avec ceux de **Wardle et Parkinson (1990)** qui suggèrent que la production de dioxyde de carbone est liée à la décomposition de glyphosate dans le sol. **Souza et al., (1999)**, ont observé que le glyphosate a été dégradé rapidement au 10^e jour d'incubation, tandis que d'autres auteurs (**Sprankle et al., 1975; Nomura et al., 1977**) ont rapporté une dégradation rapide du glyphosate dans la période initiale d'incubation. Dans les environnements aquatiques, une étude a révélé que 50% du glyphosate ajouté directement dans les eaux d'un canal d'irrigation étaient encore présents 14,4 km en aval (**Livré et al., 1976**). L'analyse des données disponibles représentent de nombreuses études qui indiquent que la demi-vie du glyphosate dans un milieu aquatique typique varie de 7 à 14 jours. Des études ont établi que les micro-organismes des eaux de surface décomposent le glyphosate au fil du temps.

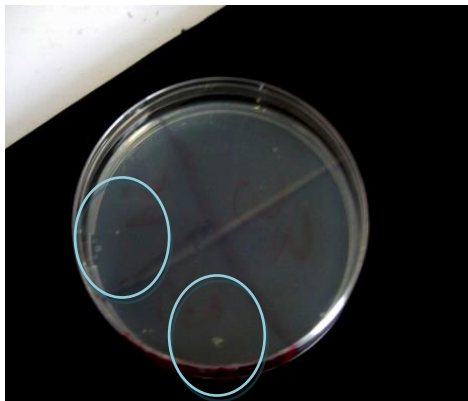
Par ailleurs aucun actinomycète n'est capable de dégrader la cyperméthrine (Photo.6). Ce résultat important, montre l'urgence de rechercher d'autres microorganismes capables de dégrader ce polluant.



Photographie N° 3 : Biodégradation du Méthomyl par les 6 souches



Photographie N°4 : Biodégradation de l'Ortiva par S5 et S6



Photographie N°5 : Biodégradation du Glyphosate par S2 et S5



Photographie N° 6 : Biodégradation négative du Cyperméthrine

Conclusion et perspectives

Les eaux usées peuvent être définies comme étant des eaux dégradées principalement par les activités humaines (domestiques, agricoles et industrielles). Pour des raisons d'ordre écologiques, sanitaires et économiques, ces eaux, doivent être traitées avant d'être réintroduites dans les circuits d'alimentation. Les eaux usées provenant du secteur agricole sont généralement difficiles à traiter, à cause de la présence de nombreux pesticides très persistants. Ces différentes substances utilisées en agriculture, constituent une menace considérable pour l'environnement. Les procédés biologiques de dépollutions, sont actuellement les plus employées essentiellement à cause de leurs efficacités et leurs moindres coûts. Les stations d'épuration des eaux usées sont les structures de dépollution par excellence. Ces stations sont le réservoir de microorganismes capables de supprimer l'effet toxique de différents polluants. Les actinomycètes sont connus par leurs aptitudes de biodégradation des polymères les plus variés. Le traitement des eaux usées est un des problèmes des plus complexes tant pour les pays riches que pour ceux en voie de développement. De plus, la mondialisation place la question de la gestion des ressources en eau parmi les préoccupations majeures des sociétés. Car elle touche plusieurs points sensibles comme le développement durable, les enjeux économiques, les préoccupations de santé ainsi que les problèmes environnementaux liés aux pollutions.

Dans la présente étude, les six souches actinomycétales isolées à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées de Khenchela (Baghey), ont montré une capacité de dégrader le méthomyl, l'ortiva, et le glyphosate. La cyperméthrine n'est pas dégradée par les six actinomycètes isolés. Ainsi, les eaux traitées dans la dite station, sont épurées de ces xénobiotiques. Il est impératif de confirmer ce résultat, par analyse des eaux à la sortie de la station. Pour la cyperméthrine, il est essentiel de chercher d'autres microorganismes capables de dégrader ce polluant, dans ces boues ou dans d'autres écosystèmes afin d'augmenter le patrimoine microbien des boues de cette station

Nous comptons dans l'avenir étudier la dégradation de ces xénobiotiques par ces isolats en testant par fermentation en culture continue et suivre leurs cinétiques de dégradation. Il est également très intéressant de tester plus spécialement la biodégradation de ces mêmes composés, par des cultures mixtes de ces actinomycètes isolés. Enfin, Il est aussi très souhaitable d'identifier ses isolats au niveau de l'espèce.

Conclusion et perspectives

Les eaux usées peuvent être définies comme étant des eaux dégradées principalement par les activités humaines (domestiques, agricoles et industrielles). Pour des raisons d'ordre écologiques, sanitaires et économiques, ces eaux, doivent être traitées avant d'être réintroduites dans les circuits d'alimentation. Les eaux usées provenant du secteur agricole sont généralement difficiles à traiter, à cause de la présence de nombreux pesticides très persistants. Ces différentes substances utilisées en agriculture, constituent une menace considérable pour l'environnement. Les procédés biologiques de dépollutions, sont actuellement les plus employées essentiellement à cause de leurs efficacités et leurs moindres coûts. Les stations d'épuration des eaux usées sont les structures de dépollution par excellence. Ces stations sont le réservoir de microorganismes capables de supprimer l'effet toxique de différents polluants. Les actinomycètes sont connus par leurs aptitudes de biodégradation des polymères les plus variés. Le traitement des eaux usées est un des problèmes des plus complexes tant pour les pays riches que pour ceux en voie de développement. De plus, la mondialisation place la question de la gestion des ressources en eau parmi les préoccupations majeures des sociétés. Car elle touche plusieurs points sensibles comme le développement durable, les enjeux économiques, les préoccupations de santé ainsi que les problèmes environnementaux liés aux pollutions.

Dans la présente étude, les six souches actinomycétales isolées à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées de Khenchela (Baghey), ont montré une capacité de dégrader le méthomyl, l'ortiva, et le glyphosate. La cyperméthrine n'est pas dégradée par les six actinomycètes isolés. Ainsi, les eaux traitées dans la dite station, sont épurées de ces xénobiotiques. Il est impératif de confirmer ce résultat, par analyse des eaux à la sortie de la station. Pour la cyperméthrine, il est essentiel de chercher d'autres microorganismes capables de dégrader ce polluant, dans ces boues ou dans d'autres écosystèmes afin d'augmenter le patrimoine microbien des boues de cette station

Nous comptons dans l'avenir étudier la dégradation de ces xénobiotiques par ces isolats en testant par fermentation en culture continue et suivre leurs cinétiques de dégradation. Il est également très intéressant de tester plus spécialement la biodégradation de ces mêmes composés, par des cultures mixtes de ces actinomycètes isolés. Enfin, Il est aussi très souhaitable d'identifier ses isolats au niveau de l'espèce.

ANNEXES

Annexe 1

- **Milieu Olson**

- Sodium caséinate..... 2 g
- L-Asparagine.....0,1 g
- Sodium propionate 4 g
- K₂HPO₄.....0,5 g
- FeSO₄0,01 g
- Eau distillée.....1000 ml
- Agar 20 g
- pH = 7

- **Milieu GLM (Gélose à l'extrait de levure-extrait de malt)**

- Extrait de levure..... 03 g
- Extrait de malt..... 03 g
- Peptone.....05 g
- Glucose.....10 g
- Agar..... 20 g
- Eau distillée1000 ml
- PH =7.2

- **Milieu minimum**

- Na NO₃..... 13, 76 g
- KH₂PO₄.....1, 78 g
- Na H PO₄ 7H₂O.....4, 66 g
- Na₂ SO₄.....9,68g
- Mg SO₄ 7H₂O.....0,8g
- EDTA..... 10mg
- FeSO₄ 7H₂O.....5mg
- MnCl₂ 4H₂O.....1,22 mg
- Zn SO₄ 1H₂O.....0,25mg
- CuSO₄ 5H₂O.....0, 2 mg
- CaCl₂ 2H₂O.....1m
- pH=7

Annexe 2

Méthomyl :

Formule chimique : C₂ H₁₀N₂O₂S ou N-méthylcarbamate de (méthylthio-1éthylidène-amine)

Famille chimique : carbamates.

Activité : insecticide.

Origine : Américaine (Dupont)

Présentation : solide cristallin blanc, stable en solution aqueuse.

Solubilité dans l'eau : 58g/l à 25°C

Doté de propriétés systémiques, il agit par contact et ingestion sur de nombreux insectes dont il inhibe le cholinestérase. Il possède en plus une action ovicide sur les pontes de Lépidoptères. Il a en outre une action nématocide et acaricide intéressante.

Toxicité : DL₅₀ pour le rat mâle par ingestion : 17mg/kg.

Classement : N-T+-R28-R50-R53.Dja 0,03mg/kg/jour(FAO/OMS). Dangereux pour les poissons et les abeilles.

L'utilisation :

	Les grandes cultures	Les arbres fruitiers	Les cultures maraichères
Quantité utilisée	La vigne : Tordeuse (375g/ha)	Abricotier : Carpocapse (75g/hl) Pommier : Puceron vert, puceron cendré (50g/hl)	Aubergine : Pucerons (45g/hl) Choux : Noctuelles (40g/hl) Concombre : pucerons (30g/hl)

Délai d'emploi avant la récolte :

Concombre (sous serre) 3jours

Vigne (raisin de cuve) 7jours

Vigne (raisin de table) 28jours

Culture fruitières 7jours

Précaution d'emploi :

Méthomyl 25 est très toxique par ingestion et par inhalation. Ne pas manger, boire, ou fumer pendant l'utilisation.

-Conserver Méthomyl25 uniquement dans son emballage d'origine, fermé, à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux.

-Ne pas respirer les aérosols (brouillards de pulvérisation).

-Lors d'une intoxication par méthomyl25 est l'atropine (sulfate), à administrer uniquement sous surveillance médicale.

-Porter un vêtement de protection, des gants et un appareil respiratoire appropriés pendant la manipulation.

Cyperméthrine :

La cyperméthrine est un produit chimique synthétique semblable à la pyrethrinsinpyrethrumextract (whichcomesfromthe chrysanthème plante). Les pyréthrinoïdes, y compris cyperméthrine ont été conçues pour être efficace plus que les pyréthrines.

- L'action de la cyperméthrine

Cyperméthrine tue les insectes qui mangent ou entrent en contact avec celui-ci. Cyperméthrine fonctionne en affectant l'insecte et rapidement le système nerveux central.

- **Famille Chimique** : Pyréthrinoïdes de synthèse.

- **Formulation** : Concentré émulsionnable (E.C).

- **Activité** : insecticide

- **Mode d'action** : Contact et Ingestion.

- **Cibles** : Insectes volants et rampants tels que guêpes, mouches, moustiques, blattes, fourmis, puces, ainsi que sur les arachnides (araignées et acariens)

- **Substances actives** : Cyperméthrine 100g/L

- **Conditionnement** : Flacon de 250 ml

- **Apparence** : liquide jaune, visqueux ou pâte, d'odeur caractéristique.

- **Mode d'emploi** : agiter le flacon avant dilution

- **Durée de demi-vie** : 30 jours.

- **Écotoxicologie** : Sur le plan de l'écotoxicologie, les concentrations létales 50 (CL50) dont l'ordre de grandeur est indiquées ci-après, sont observées :

- CL50 sur poissons : 5×10^{-4} mg·l⁻¹,
- CL50 sur daphnies : 3×10^{-4} mg·l⁻¹,
- CL50 sur algues : > 0,1 mg·l⁻¹.

- Utilisation

usages homologués	Doses	Délais avant récolte
Cultures légumières : Noctuelles défoliatrices.	120 ml/ha	7 jours
Cultures légumières sous serres : Aleurodes.	120 – 200 ml/ha	7jours
Pomme de terre : Teigne en végétation.	120 – 200 ml/ha	7 jours
Pêcher : Puceron vert.	10 ml/ha	15 jours
Poirier : Psylle.	10 ml/ha	15jours

Ha :hectar

Glyphosate :

Le glyphosate est un herbicide non sélectif, systémique qui peut contrôler la plupart des plantes annuelles et vivaces. Il supprime les mauvaises herbes par l'inhibition de la synthèse d'acides aminés aromatiques nécessaire pour la formation de la protéine dans des plantes sensibles.

- L'action du glyphosate

Le glyphosate tue les plantes en inhibant l'activité de l'enzyme 5 - synthase d'acide-3-phosphate enolpyruvylshikimic (EPSP), qui est nécessaire pour la formation de l'acide aminé tyrosine aromatique, le tryptophane, et la phénylalanine.

- **Synonymes :** acide 2-[(phosphonométhyl) amino]acétique

- **Famille:** Aucune généralement reconnue

- **Formule chimique:** N- (Phosphonométhyl) glycine

- **Mode d'action:** Herbicide systématique non sélectif absorbé par le feuillage avec translocation rapide à travers la plante. Le produit devient inactif lorsqu'il entre en contact avec la terre.

- **Apparence :** solide blanc, inodore.

- **Récipients de stockage :** Le stockage s'effectue habituellement dans des récipients en aluminium, en acier inoxydable ou en plastique

- **Biochimie:** Le glyphosate inhibe le 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), une enzyme du cheminement biosynthétique acide aromatique. Cela empêche la synthèse des acides aminés aromatiques essentiels nécessaires à la biosynthèse des protéines.

- **Espèces cibles:** la plupart annuel et les plantes vivaces

- **La demi-vie du glyphosate :** va de plusieurs semaines à plusieurs années, mais en moyenne deux mois.

- **Solubilité :** Insoluble dans la plupart des solvants organiques

- **Adsorption potentiel:** haut

- Utilisations

Le glyphosate est utilisé pour contrôler la prolifération des mauvaises herbes sur les plans de plantes annuelles et vivaces. Il permet également de contrôler la prolifération des mauvaises herbes à larges feuilles au moment de leur germination et plus généralement des mauvaises herbes s'attaquant aux céréales, aux pois, aux haricots, aux graines oléagineuses, au lin, à la moutarde à mesure de 1.5-2 kg/ha sur les pieds de vigne, les olives. A mesure de 4.3 kg/ha dans les jardins fruitiers, les pâtures, les exploitations forestières. Il peut être utilisé comme produit herbicide aquatique à mesure de 2 kg/ha.

- Écotoxicologie

Quelques études laissent suspecter (ou ont confirmé) plusieurs problèmes :

Le glyphosate pourrait peut-être réagir avec les nitrites présents dans certains aliments, mais aussi dans les sols agricoles pour former le N-nitrosophosphonométhylglycine, un cancérigène possible (effet observé chez le rat de laboratoire)

Ortiva

Fongicide contre les maladies fongiques sur les plantes ornementales

- Caractères

* Fongicide du groupe des strobilurines

* Large spectre

* Protection longue durée

- **Matière active** : 22.9 % d'azoxystrobine (250 g/l)

- **Formulation** : concentré en suspension SC

- **Emballages** : 250ml, 20 x 250ml

- Efficacité

La substance active azoxystrobine appartient au groupe chimique des strobilurines. Son efficacité est tout d'abord protectrice, la substance active doit donc être appliquée avant ou au tout début de l'infection. L'azoxystrobine bénéficie d'une très bonne efficacité durable qui, en fonction de la croissance foliaire et du type de maladie, peut protéger les nouvelles pousses pendant plusieurs semaines.

- **Préparation de la bouillie** : Remplir la moitié du réservoir d'eau, ajouter la quantité de produit nécessaire, mettre le brasseur en marche et compléter avec de l'eau.

- Utilisation

- Plantes ornementales: Dès qu'il y a un risque d'infection, on appliquera 0.1 % (1 l/ha) de produit contre l'oïdium, les champignons de la rouille et le botrytis (efficacité partielle) dans les roses, lys, chrysanthèmes et oeillets (au maximum 4 fois par an et par parcelle). Répéter le traitement tous les 8-10 jours. Sur les chardons, appliquer 0.1 % (1 l/ha) de produit contre la maladie des taches foliaires (au max. 3 fois par an)

- Ecotoxicologie

Toxicité pour les poissons: CL50 truite-arc-en-ciel 96 h: 1,2 mg formulation/l.

CL50 carpe miroir 96 h: 2,8 mg formulation/l.

Toxique pour les poissons.

Toxicité pour la daphnie:

Daphnia magna: approx. 0,5 mg formulation/l.

Très toxique pour les organismes aquatiques invertébrés.

Toxicité pour les algues:

Algues vertes (biomasse): 0,71 mg formulation/l

Algues vertes (croissance): 2,2 mg formulation/l

Très toxique pour les algues.

Annexe 3

Protocole de la coloration de Gram

- **Préparation des frottis**

Sur des lames en verre propres, des frottis des souches isolées ont été réalisés puis fixés par la chaleur en les passant, par mouvements rapides, trois à quatre fois sur la flamme du bec Bunsen.

- **Coloration de Gram**

- Les frottis préparés sont colorés avec une solution de violet de Gentiane, qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite, les lames sont rincées par l'eau distillée, puis elles sont rincées par le lugol, pendant une minute.
- Après le rinçage avec l'eau distillée, les lames sont rincées par l'éthanol pendant 10 secondes.
- Enfin, les lames sont rincées par l'eau distillée et sont colorées par le fushine pendant une minute.
- Après le rinçage par l'eau distillées, les lames sont observées à l'aide d'un microscope optique (grossissement $\times 100$).

Résumé

Dans ce travail, nous présentons les résultats d'une étude de la biodégradation de ceratins pesticides par des actinomycètes isolés des boues activées du bassin biologique de la STEP de Khenchela (Baghey). Ainsi, 6 isolats d'actinomycètes ont été isolés à partir de deux milieux sélectifs le GLM et Olson. L'emploi de la nystatine, comme agent antifongique et la polymexine comme agent antibactérien, ainsi que d'autres variantes de conditions d'isolement ont été également étudiées. Les souches d'actinomycètes purifiées sont capables de dégrader les pesticides suivant : Le méthomyl, l'ortiva et le glyphosate. , la cyperméthrine n'est cependant pas dégradée par toutes les souches d'actinomycètes isolées.

Mots clés : Actinomycètes, biodégradation, pesticides, boues activées.

ملخص

في هذا العمل، قدمنا نتائج دراسة التحليل البيولوجي لبعض المبيدات من طرف البكتيريا الخيطية اكتينوميستات الماخودة من الأوحال النشطة لحوض التهوية لمحطة تطهير المياه المستعملة-خنشلة (بغاي). أيضا، تم عزل 6 عينات من البكتيريا الخيطية اكتينوميستات انطلاقا من وسطين غذائيين Olson وGLM. استعمال نيسنتاتين كمضاد للفطريات بوليميكسين كمضاد بكتيري وشروط العزل المختلفة هي الأخرى كانت قيد الدراسة. العينات المنتقاة من البكتيريا اكتينوميستات كانت قادرة على تفكيك المبيدات التالية: الميتوميل، اورتيفاو الفليفوسات، أما السيبارميترين لم يفكك من قبل كل العينات المعزولة.

كلمات مفتاحية: اكتينوميستات، التحليل البيولوجي، المبيدات، الاوحال النشطة

Abstract

In this work, we have presented the results of biodegradation studies of some pesticides by actinomycets which caught from the active sludges of airing tank of epurating station of used water-khenchela(Baghey).Also,we have isolated 6 samples of actinomycets begening from two selectifs mileu Olson and GLM.The use of nystatin like an antifongic and polymixin like antibacterian and the deffirent conditions of isolaton were also studied.The samples selected of actinomycets were able to dissiciate the following pesticides :methomyl ,ortivaand glyphosat,where cypermethrin was not dissociated by all the samples isolated.

Key words : actinomycets,biodegradation,pesticides,