

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE**



DEPARTEMENT : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

*Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement*

**MEMOIRE**

**Présenté par : Okba MOUSSAOUI**

*Ingénieur en Génie de l'Environnement*

*En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Génie de l'Environnement*

*Option : Génie de l'Environnement*

*Thème*

**Biodégradation des pesticides : Etude comparative des activités bactériennes et fongiques**

<b>Président :</b>	<b>Madame Moussaoui K.M.</b>	Professeur	ENP
<b>Directrice de thèse :</b>	<b>Madame Hellal A.</b>	Professeur	ENP
<b>Examineurs :</b>	<b>Madame Harik D.</b>	Professeur	ENP
	<b>Madame Arrar J.</b>	Maître de Conférences	ENP
	<b>Madame Fazouane F.</b>	Maître de Conférences	Université de Boumerdes
<b>Invitées :</b>	<b>Madame Zeboudj S.</b>	Maître de Conférences	ENP
	<b>Madame Kourougli N.</b>	Maître Assistante	INA

Année Universitaire 2009-2010

---

## ملخص

---

الهدف من هذا العمل هو دراسة التحلل البيولوجي للبيفنترين و المتريبوزين في وسط مائي بتغيير بعض الخصائص التجريبية مثل تركيز الأولي للمبيد، طبيعة الجرثومة، و استخدام مذيب عضوي. تم تحليل العينات عن طريق قياس كمية البكتريا، الأوكسجين الكيمايئي المطلوب، و الرسيروميترى مانومتريك. تشير النتائج المتحصل عليها إلى أن أنشطة التحلل الحيوي للمبيدات أعلى نسبيا للطحالب مقارنة مع البكتريا. من جهة أخرى أكدت دراستنا على أنه من بين الاختبارات المستخدمة التي تسمح بحساب التحلل البيولوجي، أن الرسيروميترى مانومتريك هي الأكثر فائدة من حيث بساطتها وكفاءتها ودقة القياس.

**الكلمات المفاتيح :** بيفنترين، متريبوزين، التحلل البيولوجي، البكتريا، الطحالب، الرسيروميترى مانومتريك.

---

## Résumé

---

L'objectif de ce travail est d'étudier la biodégradation de la bifenthrine et de la métribuzine en milieu liquide en faisant varier certains paramètres expérimentaux tels que la concentration initiale en pesticide, la nature de la souche et l'utilisation d'un solvant organique.

L'analyse des échantillons est effectuée par mesure de la concentration en biomasse, de la demande chimique en oxygène et par respirométrie manométrique.

Les résultats obtenus indiquent que les activités de biodégradation des deux pesticides sont relativement plus intéressantes avec les champignons qu'avec les bactéries.

Par ailleurs, notre étude a confirmé que parmi les tests utilisés qui permettent de quantifier la biodégradation, la respirométrie manométrique est le plus avantageux par sa simplicité, son efficacité et sa précision de mesure.

**Mots clés :** bifenthrine, métribuzine, biodégradation, bactéries, champignons, respirométrie manométrique.

---

## Abstract

---

The objective of this work is to study the biodegradation of bifenthrin and metribuzin in liquid medium by varying some experimental parameters such as the initial concentration of pesticide, the nature of strain, and the use of an organic solvent.

Analyses of the samples were performed by the measure of the concentration of biomass, the chemical oxygen demand and by the manometric respirometry test.

The results indicate that the biodegradation activities of the two pesticides are relatively more interesting with fungi than with bacteria.

Furthermore, our study confirmed that among the tests used that quantify the biodegradation, the manometric respirometry is the most advantageous for its simplicity, efficiency and accuracy of measurement.

**Keywords:** bifenthrin, metribuzin, biodegradation, bacteria, fungi, manometric respirometry.

## *Dédicaces*

*Louange à Allah Seul et que la prière et le salut soient sur  
l'ultime prophète Muhammad, sur sa famille et sur ses*

### *Compagnons*

*Je dédie ce travail à ma très chère mère et à mon père, qui  
m'ont vraiment soutenu, à ma grande famille et à mes  
frères et sœurs, ainsi qu'à mes amis et camarades d'études*

*Enfin, que tous ceux qui ont participé de près ou de loin  
dans l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression*

*de ma reconnaissance : ils se reconnaîtront*

*Okba*

## **REMERCIEMENTS**

*L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été effectué au Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement (LSTE) de l'Ecole Nationale polytechnique d'Alger.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde gratitude à Mme A. Hallal professeur à l'ENP qui m'a honoré par son encadrement. Je lui exprime également ma profonde reconnaissance pour son dévouement et d'avoir bien voulu me faire profiter de ses compétences scientifiques et de ses idées pour l'accomplissement de ce travail.*

*Je tiens également à remercier Madame K.M. Moussaoui, professeur à l'ENP pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma thèse.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Madame D.Harik professeur à l'ENP, à Madame J.Arrar maître de conférences à L'ENP et Madame F.Fazoune maître de conférences à l'université de Boumerdès, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements sont également destinés aux deux invitées du jury : Madame S. Zeboudj maître de conférences à L'ENP et Madame N. Kourougli chargée de cours à l'INA.*

*J'adresse aussi mes remerciements à l'ensemble des enseignants du département du Génie de l'Environnement.*

*Et je remercie tous les post-graduants pour leur aide et pour le soutien qu'ils m'ont apporté.*

*Mes derniers remerciements vont à ma famille, mes amis et toute personne qui m'a aidé de près ou de loin à accomplir ce travail.*

## *Liste des principales abréviations et sigles*

---

atm : atmosphère  
ATU : l'Allyl Thio-Urée  
CEE : commission économique européenne.  
COD : carbone organique dissout  
DA: Deamino-metribuzin.  
DADK: Deamino-Diketo-metribuzin.  
DBO : Demande Biologique en Oxygène  
DCO : Demande chimique en oxygène  
DDT : Dichloro Diphényl Trichloroéthane  
DJA : dose journalière admissible  
DK: Diketo-metribuzin.  
DL50 : Dose Létale 50  
DSE : dose sans effet  
DThO : Demande Théorique en Oxygène  
EMPA : Eidgenössische "Materialprüfungs" und Forschungsanstalt : Laboratoire fédéral suisse d'essai des matériaux et de recherches.  
EPA: Environmental Protection Agency.  
ESPS : 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase  
IUPAC : international union of pure and applied chemistry  
LMR : limite maximale de résidu  
MITI : Ministère de l'Industrie et du Commerce International.  
OCDE : organisation de développement et de coopération économique  
OMS : organisation mondiale de la santé  
ONAPSA : Office National d'Approvisionnement et de Service Agricoles  
PDA : Potato dextrose agar  
YMA : Yeast Malt Ager

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I.1</b> - Classification des pesticides selon l'espèce indésirable et les molécules utilisées pour les éliminer.....	5
<b>Tableau I.2</b> - Classification OMS des pesticides par degré de risque pour l'homme.....	8
<b>Tableau II.1</b> - Propriétés physicochimiques de la bifenthrine.....	11
<b>Tableau II.2</b> - Propriétés physicochimiques de la métribuzine.....	15
<b>Tableau V.1</b> - Analyse de la variance.....	35
<b>Tableau VII.1</b> - Paramètres de dégradation de la bifenthrine dans l'eau et l'éthanol par respirométrie manométrique par la culture mixte et la <i>SD7</i> .....	46
<b>Tableau VII.2</b> - Paramètres de biodégradation par le test respirométrie manométrique par la culture mixte et la <i>SD7</i> .....	50
<b>Tableau VII.3</b> - Paramètres de dégradation de la bifenthrine à une concentration de 50 mg.L <sup>-1</sup> par la méthode de la DCO par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	54
<b>Tableau VII.4</b> - Paramètres de dégradation de la bifenthrine par respirométrie manométrique de la souche <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	56
<b>Tableau VII.5</b> - Paramètres de dégradation de la métribuzine par respirométrie manométrique de la souche <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	59
<b>Tableau VII.6</b> – Le Domaine d'étude.....	60
<b>Tableau VII.7</b> - Les essais du plan d'expérience.....	60
<b>Tableau VII.8</b> - Plan d'expérimentation utilisé dans notre étude.....	60
<b>Tableau VII.9</b> - Détermination des coefficients du modèle.....	62
<b>Tableau VII.10</b> - Statistique de la régression du modèle.....	63
<b>Tableau VII.11</b> - Comparaison des valeurs expérimentales et estimées.....	64
<b>Tableau VII.12</b> - Analyse des résidus.....	66
<b>Tableau VII.13</b> - Intervalle de confiance des coefficients du modèle.....	69
<b>Tableau VII.14</b> - Calcul de F observé.....	69
<b>Tableau VII.15</b> - Analyse de la variance.....	70

## Liste des figures

---

<b>Figure I.1</b> - Schéma simplifié du métabolisme et du co-métabolisme d'un produit phytosanitaire par les microorganismes.....	7
<b>Figure II.1</b> - Structure de la bifenthrine.....	11
<b>Figure II.2</b> - Les voies de dégradation de la bifenthrine dans l'environnement.....	13
<b>Figure II.3</b> - Structure de la métribuzine.....	15
<b>Figure II.4</b> - Les voies probables de dégradation de la métribuzine dans l'environnement.....	17
<b>Figure IV.1</b> - Arbre phylogénétique des êtres vivants.....	22
<b>Figure IV.2</b> - La forme des souches ( <i>SC7</i> , <i>SE7</i> , <i>SD7</i> , <i>SE6</i> ) bactériennes observée sous microscope photonique.....	23
<b>Figure IV.3</b> - La souche <i>Aspergillus niger</i> observé au microscope électronique à balayage (au centre et à droite) et à l'oeil nue (à gauche).....	24
<b>Figure IV.4</b> - La souche <i>Rhizopus stolonifer</i> observé au microscope électronique à balayage (au centre et à droite) et à l'œil nue (à gauche).....	24
<b>Figure V.1</b> - Représentation du système à étudier par la méthode des plans d'expériences.....	27
<b>Figure VI.1</b> - Incubateur servant à la mesure de la DCO et la croissance microbienne.....	37
<b>Figure VII.1</b> - Cinétiques de croissance de la culture mixte et de la souche <i>SD7</i> .....	41
<b>Figure VII.2</b> - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine par la culture mixte et par la souche <i>SD7</i> par mesure de la DCO.....	42
<b>Figure VII.3</b> - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine dissoute dans l'éthanol par l'essai de respirométrie manométrique.....	43
<b>Figure VII.4</b> - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine dissoute dans l'eau distillée et l'éthanol par l'essai de respirométrie manométrique.....	44
<b>Figure VII.5</b> - Cinétique de biodégradation sans pesticide par l'essai de respirométrie manométrique.....	44
<b>Figure VII.6</b> - Cinétique de croissance des souches <i>SC7</i> , <i>SD7</i> , <i>SE7</i> , <i>SE6</i> à différentes concentrations en métribuzine.....	48
<b>Figure VII.7</b> - Taux de croissance des souches <i>SC7</i> , <i>SD7</i> , <i>SE6</i> , <i>SE7</i> à différentes concentrations initiales en métribuzine.....	49

## Liste des figures

---

<b>Figure VII.8</b> - Cinétique de biodégradation de la métribuzine à différentes concentrations initiale par l'essai de respirométrie manométrique.....	50
<b>Figure VII.9</b> - Cinétiques de croissance de la souche <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> à différentes concentrations en bifenthrine.....	52
<b>Figure VI.10</b> - Taux de croissance des souches <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> à différentes concentrations initiales en bifenthrine.....	53
<b>Figure VI.11</b> - Cinétique de dégradation de la bifenthrine par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> par mesure de la demande chimique en oxygène.....	54
<b>Figure VI.12</b> - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> par respirométrie manométrique.....	55
<b>Figure VI.13</b> - Cinétiques de croissance de la <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> différentes concentrations en métribuzine.....	57
<b>Figure VI.14</b> - Taux de croissance des souches <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> à différentes concentrations initiales en métribuzine.....	58
<b>Figure VI.15</b> - Cinétique de dégradation de la métribuzine par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> par respirométrie manométrique .....	58
<b>Figure VII.16</b> - Courbes de régression.....	65
<b>Figure VII.17</b> - Résultat de l'essai confirmatif au centre du domaine.....	71



# Sommaire

---

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

## Chapitre 1 : Généralités sur les pesticides

I.1. Introduction.....	3
I.2. Définitions.....	3
I.3. Classification.....	4
I.4. Mode d'action.....	6
I.5. Devenir des pesticides dans l'environnement.....	6
I.6. Principaux mécanismes de dissipation.....	6
I.6.1. La dégradation.....	7
I.6.2. Le phénomènes de biodégradation.....	7
I.7. Toxicité des pesticides.....	8
I.8. La pollution des eaux par les pesticides en Algérie.....	9
I.9. Réglementations et normes pour les pesticides.....	9
I.9.1. Règlements.....	9
I.9.2. Normes.....	10

## Chapitre 2 : La bifenthrine et la métribuzine

II.1. La bifenthrine.....	11
I.1.1. Introduction.....	11
I.1.2. Caractéristiques générales et mode d'action.....	12
I.1.3. Devenir dans l'environnement.....	12
I.1.3.1. Dans l'air.....	13
I.1.3.2. Dans l'eau.....	13
I.1.3.3. Dans le sol.....	14
I.1.3.4. Dans le biote.....	14
II.2. La métribuzine.....	14
II.2.1. Introduction.....	14
II.2.3. Caractéristiques générales et mode d'action.....	15
II.2.3. Devenir dans l'environnement.....	16
II.2.3.1. Dans le sol.....	16

# Sommaire

---

II.2.3.2. Dans l'eau.....	16
II.2.3.3. Dans le biote.....	16
II.2.4. Dégradation de la métribuzine.....	17

## Chapitre 3 : Les tests de biodégradation

III.1. Introduction.....	18
III.2. Les tests de biodégradation.....	18
III.3. Le test de respirométrie manométrique.....	18
III.3.1. Introduction.....	18
III.3.2. Principe de la méthode.....	19
III.3.3. Mesure de la demande biologique en oxygène.....	19
III.4. L'essai Zahn-Wellens/EMPA.....	20
III.4.1. Introduction.....	20
III.4.2. Principe de la méthode.....	20
III.4.3. Mesure de la demande chimique en oxygène.....	21

## Chapitre 4 : Les bactéries et les moisissures

VI.1. Les bactéries.....	22
IV.2. Les moisissures.....	23
IV.2.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	24
IV.2.2. <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	24
IV.3. Dégradation des composés aromatiques par les bactéries.....	25
IV.4. Dégradation des composés aromatiques par les champignons.....	25

## Chapitre 5 : Méthode des plans d'expériences

V.1. Introduction.....	26
V.2. Définition des plans d'expériences.....	26
V.3. Construction d'un plan d'expérience.....	27
V.4. Les plans factoriels.....	27
V.5. Plan factoriel complet à deux niveaux et à k facteurs (2k).....	28

## Sommaire

---

V.6. Construction des plans factoriels complets à deux niveaux.....	28
V.6.1. Matrice d'expériences.....	28
V.6.2. Effet global et effet moyen d'un facteur.....	28
V.6.2.1. Cas de deux facteurs.....	29
V.6.2.2. Calcul de l'interaction.....	30
V.6.3. Détermination des effets par une méthode matricielle.....	31
V.7. Tests de significativité des effets et validation du modèle.....	31
V.7. 1. La qualité d'ajustement des résultats.....	31
V.7. 1.1. Le coefficient de détermination $R^2$ .....	31
V.7. 1.2. Le coefficient $R^2$ ajusté.....	31
V.7.2. Réalisation du test de significativité des effets (Test de Student).....	32
V.7.3. Analyse de la variance et validation du modèle linéaire (Test de Fisher).....	34

### Chapitre 6 : Matériel et méthodologie expérimentale

VI.1. Matériel.....	36
VI.1. 1. Matériel Chimique.....	36
VI.1. 2. Matériel biologique.....	36
VI.1. 2.1. Souches microbiennes.....	36
VI.1.2.1.1. Les bactéries.....	36
VI.1.2.1.2. Les champignons.....	36
VI.1.2.2. Milieux de culture.....	36
VI.2. Méthodes d'analyse.....	37
VI.2. 1. Mesure de la croissance microbienne.....	37
VI.2. 1.1. Les bactéries.....	37
VI.2. 1.2. Les champignons.....	37
VI.2. 2. Mesure de la demande chimique en oxygène.....	37
VI.2. 3. Essai de respirométrie manométrique.....	38
VI.3. Mode opératoire.....	38
VI.3. 1. Ensemencement des souches.....	38
VI.3. 1.1. Bactéries.....	38
VI.3.1.2. Champignons.....	38

## Sommaire

---

VI.3.2. Préparation des solutions de pesticides.....	39
VI.3.3. Mode opératoire de la demande chimique en oxygène.....	39
VI.3.4. Mode opératoire de l'essai de respirométrie manométrique.....	39

### Chapitre 7 : Résultats et discussions

VII. Etude de la biodégradation des pesticides.....	40
VII.1. Etude de la dégradation des pesticides par les bactéries.....	40
VII.1.1. Cas de la bifenthrine.....	40
VII.1.1.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse.....	40
VII.1.1.2. Etude de la biodégradation basée sur la demande chimique en oxygène.....	41
VII.1.1.3. Etude de la biodégradation basée sur la respirométrie manométrique.....	42
VII.1.1.3.1. Effet du solvant.....	43
VII.1.1.3.2. Calcul des paramètres de biodégradations.....	45
VII.1.1.4. Conclusion.....	47
VII.1.2. Cas de La métribuzine.....	47
VII.1.2.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse.....	48
VII.1.2.2. Etude de la biodégradation basée sur la respirométrie manométrique.....	49
VII.1.2.3. Conclusion.....	51
VII.2. Étude de la dégradation des pesticides par les champignons.....	52
VII.2.1. Cas de la bifenthrine.....	52
VII.2.1.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse.....	52
VII.2.1.2. Etude de la cinétique de biodégradation par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> basée sur la demande chimique en oxygène.....	53
VII.2.1.3. Etude de la cinétique de biodégradation par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> par respirométrie manométrique.....	55
VII.2.1.4. Conclusion.....	56
VII.2.2. Cas de la Métribuzine.....	57
VII.2.2.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse.....	57

## Sommaire

---

VII.2.2.2. Etude de la cinétique de biodégradation par <i>A.niger</i> et <i>Rhizopus stolonifer</i> par respirométrie manométrique.....	58
VII.2.2.3. Conclusion.....	59
VII.3. Plan d'expérience et modélisation.....	60
VII.3.1. Construction de la matrice d'expérience (La matrice d'Hadnard).....	60
VII.3.2. Interprétation des résultats.....	61
VII.3.3. Application du modèle d'ordre 1 sans interaction.....	62
VII.3.3.1.Statistique de la régression du modèle.....	63
VII.3.3.2. Coefficient de détermination.....	63
VII.3.3.3.Analyse de la régression.....	64
VII.3.3.4. Analyse des résidus.....	65
VII.3.3.5. La significativité des coefficients du modèle postulé.....	66
VII.3.3.5.1. Calcul de la variance.....	67
VII.3.3.5.2. Calcul des coefficients de Student.....	67
VII.3.3.5.3. Intervalle de confiance des coefficients.....	68
V.3.4. Validation du modèle mathématique (l'analyse de la variance).....	69
V.3.5. Essai confirmatif de la validité du modèle postulé.....	70
V.3.6. Conclusion.....	71
Conclusion générale.....	72
Références bibliographiques.....	74
Annexe.....	83

## Introduction générale

---

L'introduction des pesticides dans l'agriculture a contribué d'une façon générale à l'amélioration des rendements agricoles, mais elle suscite de nombreuses inquiétudes liées notamment à leur toxicité et à leur impact négatif sur l'homme et l'environnement [1]. En effet, plusieurs pathologies leur sont directement associées dans le long terme, notamment les cancers, les stérilités, les malformations congénitales [2,3].

Si aujourd'hui, l'utilisation des pesticides dans les pays développés est très réglementée et surveillée, c'est grâce à une opinion publique de plus en plus exigeante et soucieuse de son lendemain. Dans les pays en voie de développement et en Afrique particulièrement, l'usage des pesticides est plus récent mais certes beaucoup plus inquiétant que partout ailleurs dans le monde [4].

De nombreuses techniques existent pour traiter les eaux chargées en pesticides. Il s'agit le plus souvent de traitements physiques (adsorption sur charbon actif [5], la photolyse par les rayons ultraviolets [6], la micro et la nanofiltration) ou chimiques (procédés d'oxydation variés [7]).

En plus, ces procédés relativement coûteux, ne sont finalement que très peu mis en œuvre et des alternatives moins onéreuses ont été imaginées. Les traitements biologiques, notamment, répondent à cette contrainte; ils sont souvent simples et bon marché. Ce type de traitement entraîne la consommation par biodégradation ou minéralisation des substances polluantes par une biomasse capable d'utiliser le pesticide comme source nutritive [8].

Etant donné le rôle primordial que les pesticides jouent pour l'amélioration des rendements des cultures agricoles et pour la conservation des récoltes, que ce soit en traitements préventifs et/ou curatifs, leur production et leur utilisation sont en augmentation croissante à travers le monde [9].

Aussi, l'objectif de notre travail est d'apporter une contribution à l'étude de la biodégradation des pesticides par des cultures pures et mixtes de microorganismes. Pour cela, trois méthodes de biodégradation ont été utilisées basées sur la mesure des paramètres globaux de la pollution des eaux usées (la concentration en biomasse, la respirométrie manométrique [10] et la demande chimique en oxygène [11]). Le choix des pesticides à étudier s'est porté sur des molécules utilisées dans l'agriculture algérienne, à savoir la bifenthrine et la métribuzine, et cela par deux espèces de champignons (*Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*), et quatre espèces de bactéries (*SC7*, *SD7*, *SE6*, *SE7*). L'accent sera mis sur une étude comparative des activités bactérienne et fongique.

## *Introduction générale*

---

Le manuscrit est divisé en deux parties:

La première partie comporte:

- Quelques généralités sur les pesticides et leurs dangers, notamment leur dégradation dans l'environnement.
- La présentation de quelques techniques d'estimation de la biodégradation des polluants en milieu liquide.
- Des rappels sur les bactéries et les moisissures, leurs caractéristiques culturaux et leurs modes de dégradation.
- La modélisation mathématique par la méthode des plans d'expériences.

La deuxième partie consacrée à l'étude expérimentale est divisée en deux chapitres, le premier porte sur la description du matériel et produits utilisés ainsi que sur le protocole expérimental. Les résultats obtenus, suivis de leur discussion et interprétation sont donnés dans le deuxième chapitre :

- L'influence de quelques paramètres expérimentaux tels que la nature du solvant et de la concentration initiale de la solution sur la cinétique de dégradation.
- Une comparaison des cinétiques de dégradation des deux pesticides, par la souche pure et la souche mixte de bactérie d'une part, et par les souches bactériennes et les souches fongiques d'autre part.
- La quantification de quelques paramètres opératoires qui permet d'établir un modèle mathématique régissant la biodégradation de la bifenthrine par les champignons.

**I.1. Introduction :**

Les progrès dans la protection des plantes ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la production. Faciles d'accès et d'emploi, les produits phytosanitaires de synthèse se sont révélés très efficaces et fiables dans un nombre important de cas, sur de grandes surfaces agricoles [12].

Mais différents problèmes liés à l'utilisation de ces produits ont contrebalancé ce bilan :

- Résistances des insectes, des mauvaises herbes et des maladies,
- Accumulation des produits phytosanitaires dans la chaîne alimentaire,
- Problèmes des résidus dans les produits agricoles destinés à la consommation,
- Risques encourus par les utilisateurs,

La prise de conscience de ces problèmes a conduit à la mise en place progressive de nouvelles méthodes de lutte, et d'une réglementation de plus en plus rigoureuse [13].

**I.2. Définitions :**

Appelés également produits phytosanitaires, produits phytopharmaceutiques ou produits de traitement [14], les pesticides sont des produits chimiques ou des substances biologiques employés pour éliminer ou contrôler les parasites [15].

On utilise aussi le terme « biocides », qui a deux significations [16]:

- D'un point de vue général (et étymologique), il englobe toutes les substances susceptibles d'éliminer des organismes vivants. Selon cette définition, les pesticides sont une sous famille des biocides.
- D'un point de vue réglementaire, ce terme est employé pour les pesticides autres que les phytosanitaires, c'est-à-dire ceux qui permettent de traiter autres choses que des végétaux : soins vétérinaires, protection des matériaux, usages domestiques etc.

Il faut différencier la substance active qui correspond au produit chimique pur responsable de l'activité biocide, de la formulation commerciale, qui est l'association d'une ou de plusieurs substances actives avec des adjuvants.



**I.3. Classification :**

Il existe trois façons de classer les pesticides : par leurs usages, par les organismes vivants visés et par leurs caractéristiques chimiques. Les trois sont utiles mais ne répondent pas aux mêmes préoccupations. En effet, pour l'agronome qui a un problème phytosanitaire à résoudre, il faut savoir quelle substance est appropriée pour lutter contre un champignon pathogène, un insecte ravageur ou une mauvaise herbe et dans quelles conditions l'utiliser. Dans ce cas, sa recherche est facilitée par l'utilisation d'une classification selon l'usage ou selon l'activité biologique des pesticides qui sont classés en fonction de l'organisme vivant nuisible qui est visé [17]. Les trois principales classes sont [18,19] :

- Les herbicides : ce sont les plus utilisés en tonnage et en surface ; ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Ils appartiennent à plus de 35 familles chimiques ;
- Les insecticides : ce sont les premiers pesticides utilisés, destinés à détruire les insectes nuisibles ;
- Les fongicides : ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés, servant à combattre la prolifération des champignons pathogènes.

Les grandes familles de phytosanitaires sont classées selon la cible, comme l'illustre le tableau I.1 ci-après.

**Tableau I.1** - Classification des pesticides selon l'espèce indésirable et les molécules utilisées pour les éliminer [20].

Famille de produits phytosanitaires	Nature de l'espèce nuisible	Familles de molécules	Exemples de molécules
Insecticides	Insectes	Organophosphorés	Chlorpyrifoséthyl Méthidathion
		Carbamates	Méthomyl Thiodicarbe
		Pyréthroïdes de synthèse	Bifenthrine Deltaméthrine
Fongicides	Champignons	Imides cycliques	Vinchlozoline
		Carbamates	Métirame-zinc
		Phtalamides	Folpel
		Triazoles	Epoxyconazole
Herbicides	Mauvaises herbes	Benzamide	Isoxaben
		Urées substituées	Diuron
		Chlorotriazines	Terbutylazine
		Acides phosphiniques	Glusinate ammonium
		Triazines	Métribuzine

On distingue en outre [19,21] :

- les taupicides contre les taupes ;
- les acaricides contre les acariens ;
- les rodenticides contre les rongeurs ;
- les nématicides contre les nématodes et vers ;
- les molluscicides contre les mollusques, limaces et escargots ;
- les corvicides contre les corbeaux et tous les oiseaux ravageurs de cultures.

**I.4. Mode d'action :**

Les substances actives des pesticides agissent sur les fonctions physiologiques nécessaires à la survie de l'organisme (photosynthèse, reproduction, respiration...) : inhibiteurs respiratoires, inhibiteur de la division cellulaire, inhibiteur de la biosynthèse des stérols, inhibiteur des acides aminés ou des protéines,....

L'action du phytosanitaire sur l'organisme ciblé peut se faire de deux façons : direct par simple contact avec l'organisme cible ou indirect si le pesticide doit pénétrer dans l'organisme pour agir.

Par exemple, le diuron (herbicide) inhibe la photosynthèse, quant au glyphosate (herbicide non sélectif), il bloque la biosynthèse des acides aminés aromatiques, nécessaires au développement des procaryotes et eucaryotes primaires, et inhibant la synthèse d'une enzyme (ESPS : 5-énolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) [22].

**I.5. Devenir des pesticides dans l'environnement :**

Malgré un souci de protection de l'environnement constant et croissant lors de l'utilisation des produits phytosanitaires, il y a une forte partie qui n'atteint pas sa cible [23,24] et qui se retrouve dans l'environnement, principalement dans l'air sous forme de gouttelette par dérive ou sur le sol. Les taux de transfert dans les différents compartiments sont fortement conditionnés par les réglages employés pour l'appareil, les caractéristiques physicochimiques de la préparation, de la végétation traitée et des conditions climatiques [25].

**I.6. Principaux mécanismes de dissipation :**

On distingue trois principaux phénomènes à l'origine de la disparition de la zone d'application dont un mécanisme contribuant à l'immobilisation des substances chimiques suite à leur application [26] :

- Les phénomènes participant à l'entraînement des produits hors du point d'application, on parlera alors de dispersion.
- Les phénomènes participant à l'immobilisation des produits sur la parcelle, on parlera de rétention.
- Les phénomènes participant à la transformation de la molécule jusqu'à sa minéralisation dans certains cas, on parlera alors de dégradation.

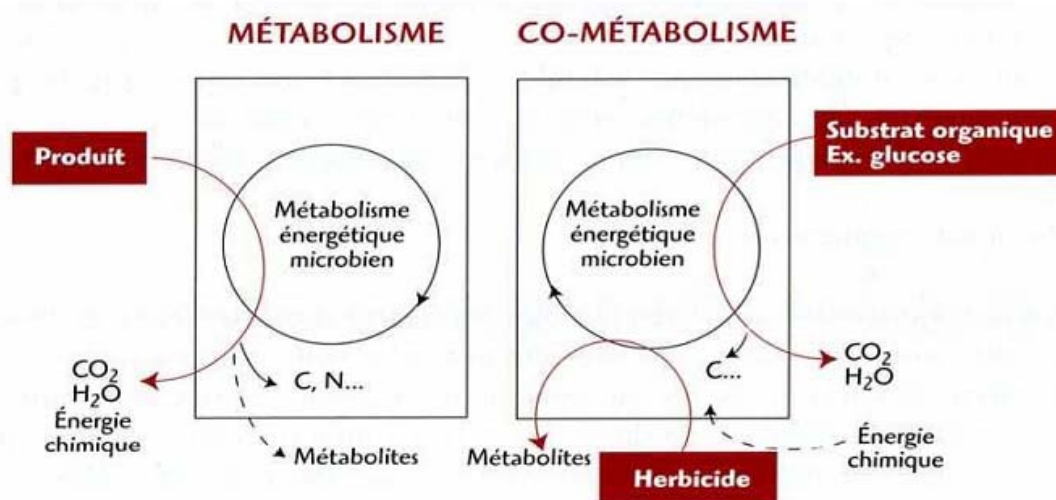
### I.6.1. La dégradation :

Deux types de mécanismes peuvent entrer en jeu dans la dégradation des pesticides : la transformation abiotique d'une part et la transformation microbienne d'autre part. Ces deux phénomènes peuvent se superposer, mais leur contribution relative est fonction des caractéristiques du composé à dégrader et des conditions physico-chimiques du milieu. La connaissance de ces processus permet d'abord d'estimer au mieux la quantité de produit disponible pour le transfert et puis dans un second temps d'estimer la toxicité et la mobilité des molécules filles.

### I.6.2. Le phénomènes de biodégradation :

Les micro-organismes peuvent être impliqués dans la dégradation des pesticides selon trois principaux mécanismes d'action (figure I.1) :

- Le métabolisme direct qui fait des pesticides une source d'énergie utilisée pour leur croissance.
- Le co-métabolisme : il induit une transformation des pesticides mais ils ne sont pas une source d'énergie.
- La conjugaison : ce sont des réactions chimiques catalysées par des enzymes exocellulaires, entre les pesticides et d'autres pesticides ou d'autres molécules présentes dans la solution du sol.



**Figure I.1 :** Schéma simplifié du métabolisme et du co-métabolisme d'un produit phytosanitaire par les microorganismes [27].

Plus la cinétique de réaction des processus de dégradation est rapide, plus les quantités de pesticides à transporter est faible. Les molécules issues de la dégradation des pesticides sont des molécules souvent plus stables mais également plus toxiques que les molécules mères.

### I.7. Toxicité des pesticides :

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. Les manifestations peuvent se limiter à des signes locaux : irritations cutanéomuqueuses, réactions allergiques cutanées ou oculaires, vomissements, toux, gêne respiratoire ou bien traduire l'atteinte d'un ou plusieurs organes ou systèmes : foie, rein, système nerveux central... On parle alors d'effets systémiques. L'intoxication massive peut avoir des conséquences graves, parfois mortelles. La toxicité aiguë (directe) qui provient d'une exposition à court terme (24 heures au maximum) aux produits phytosanitaires ou à ses produits de dégradations. Elle évalue l'effet immédiat du produit lors de sa libération dans le milieu. La toxicité chronique qui correspond aux effets induits par une exposition à long terme. Dans le deuxième cas, les effets sont beaucoup moins contrôlables d'autant plus qu'il est difficile d'effectuer des études sur les êtres humains [28].

Les paramètres principaux qui contrôlent la toxicité des résidus de pesticides dans l'eau et les aliments pour un pesticide et une matrice donnés sont [29,30] :

- **Dose Létale 50 (DL50) :** c'est la dose d'une substance provoquant la mort de 50% d'un lot d'animaux d'expérience. Elle s'exprime en milligramme ou en gramme par kilogramme de poids de l'animal. Le tableau I.2 donne la classification OMS des pesticides par degré de risque pour l'homme [31].

**Tableau I.2 - Classification OMS des pesticides par degré de risque pour l'homme [31].**

Classe des risques	DL50 pour le rat (mg.kg <sup>-1</sup> de poids corporel)			
	Par voie orale		Par voie cutanée	
	Solide	Liquide	Solide	Liquide
Extrêmement dangereux	< 5	< 20	< 10	< 40
Très dangereux	5 à 50	20 à 200	10 à 100	40 à 400
Modérément dangereux	50 à 500	200 à 2000	100 à 1000	400 à 4000
Peu dangereux	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

- **LMR (limite maximale de résidu)** : c'est la concentration maximale en résidus pour que les denrées restent commercialisables. Elle est exprimée en  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (ou en ppm).
- **DJA (dose journalière admissible)** : c'est la quantité de produit pouvant être quotidiennement absorbée sans manifestation des effets secondaires (en  $\text{mg.Kg}^{-1}$  de poids corporel).
- **DSE (dose sans effet)** : c'est la dose la plus élevée d'un produit qui ne provoque aucun effet décelable chez les animaux à expérimentation. Elle s'exprime en  $\text{mg.Kg}^{-1}$ .

### **I.8. La pollution des eaux par les pesticides en Algérie :**

L'Algérie est aujourd'hui confrontée à de sérieux problèmes de pollution industrielle. Le parc industriel national est ancien et fréquemment polluant, en outre, le processus d'industrialisation s'est effectué dans des conditions ne tenant pas compte des impératifs écologiques.

On estime que les entreprises industrielles génèrent annuellement plus de 220 millions de  $\text{m}^3$  d'eau usée, en majorité déversée dans les enceintes portuaires [32]. Une enquête initiée par le ministère de l'agriculture et a fait ressortir l'existence de stocks importants d'herbicides périmés de l'ordre de 11000 tonnes [32]. Une étude effectuée sur des eaux prélevées dans des puits du domaine agricole de la région de Staoueli a montré que dans plus de 30 % des échantillons, les normes OMS sont dépassées. Les principaux pesticides détectés sont les DDT, DDE, l'endosulfan, le lindane, le malathion et le methyl-parathion [33].

### **I.9. Réglementation et normes pour les pesticides :**

#### **I.9.1. Réglementation :**

En droit algérien, le contrôle des pesticides est régi par [34] :

- La loi numéro 87-17 du 1 août 1987 relative à la protection phytosanitaire.
- Le décret exécutif numéro 95-405 du 02-décembre 1995 relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole. A ce titre, il couvre les activités de commercialisation et d'homologation.

En droit communautaire, de nombreuses réglementations s'appliquent au développement, à l'emballage et à l'utilisation des pesticides. Seules les principales directives « mères » concernant ce domaine sont listées ci-après [35] :

- La directive 91/414/CEE relative à la mise en marché des produits phytosanitaires.
- Les directives 76/895/CEE et 86/363/CEE concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides.
- Les directives 80/68/CEE, 75/440/CEE, 86/280/CEE, 76/464/CEE et 80/778/CEE relatives à la protection des eaux.

### **I.9.2. Normes :**

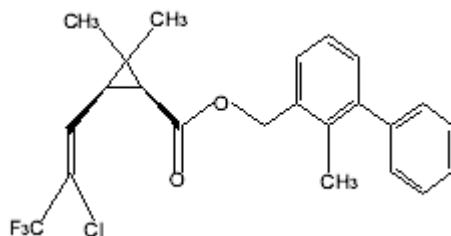
Les teneurs limites en pesticides dans l'eau destinée à la consommation humaine sont fixées par la directive européenne 98/83/CE [36]:

- 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  par substance individualisée sauf pour l'aldrine (insecticide), la dieldrine (insecticide), l'héptachlore (insecticide à large spectre utilisé notamment contre les termites), et l'époxyde de l'héptachlore (insecticide à large spectre) pour lesquels la limite est de 0,03  $\mu\text{g.L}^{-1}$
- 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le totale des pesticides quantifiés.

A l'échelle mondiale, c'est l'OMS qui fixe les teneurs critiques à ne pas dépasser et prend en considération l'impact toxicologique de ces molécules. Les limites imposées par l'OMS sont moins strictes que celles proposées à l'échelle européenne. L'objectif des normes européennes était « objectif zéro pesticides » basé sur les limites de détection des produits. C'est pourquoi, les normes appliquées dans les pays européens sont beaucoup plus sévères que les recommandations de l'OMS [37] et US.EPA.

**II.1. La bifenthrine :****I.1.1. Introduction :**

Les pyréthriinoïdes sont des insecticides utilisés pour les applications d'intérieur et d'extérieur [38,39]. La bifenthrine [nomenclature attribuée par l'IUPAC: 2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS)-cis-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethyl cyclopropanecarboxylate] (Fig. II.1), est un solide léger et cireux de couleur blanc cassé ayant une légère odeur [40]. Elle fait partie de la troisième génération de la famille chimique des pyréthriinoïdes de synthèse [41,42,43], qui structurellement et biologiquement est unique (Structurellement pour sont fragment de diphenyle d'alcool, biologiquement pour sont activité acaricide élevée) [44], et pour laquelle la dose journalière acceptable est de 0,015 mg.Kg<sup>-1</sup> de poids corporel [45]. Le tableau II.1 représente les principales caractéristiques physicochimique de la bifenthrine.



**Figure II.1** - Structure de la bifenthrine.

**Tableau II.1** - Propriétés physicochimiques de la bifenthrine [46]

Masse moléculaire :	422,9 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilité (à 25°C) :	0,1mg.L <sup>-1</sup>
Pression de vapeur (à 25°C) :	1,81 x 10 <sup>-7</sup> mm.Hg
Constante d'Henry (pH 7, 25°C) :	7,20 x 10 <sup>-3</sup> atm.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>
Durée de demi-vie par hydrolyse (eau naturelle, à pH 6,7 et 25°C) :	Stable
Coefficient de partage octanol-eau (Kow) :	1,0 x 10 <sup>6</sup>
Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc) :	1,31 – 3,02x10 <sup>5</sup>
Photolyse :	276-416 jours



**I.1.2. Caractéristiques générales et mode d'action :**

Comme la plupart des pyréthrinoïdes, la bifenthrine affecte le système nerveux central et périphérique des insectes causant la paralysie [47]. Sa grande toxicité pour les organismes aquatiques, rend les produits à base de bifenthrine classé comme « pesticide à usage limité » vendu seulement aux utilisateurs de pesticides certifiés.

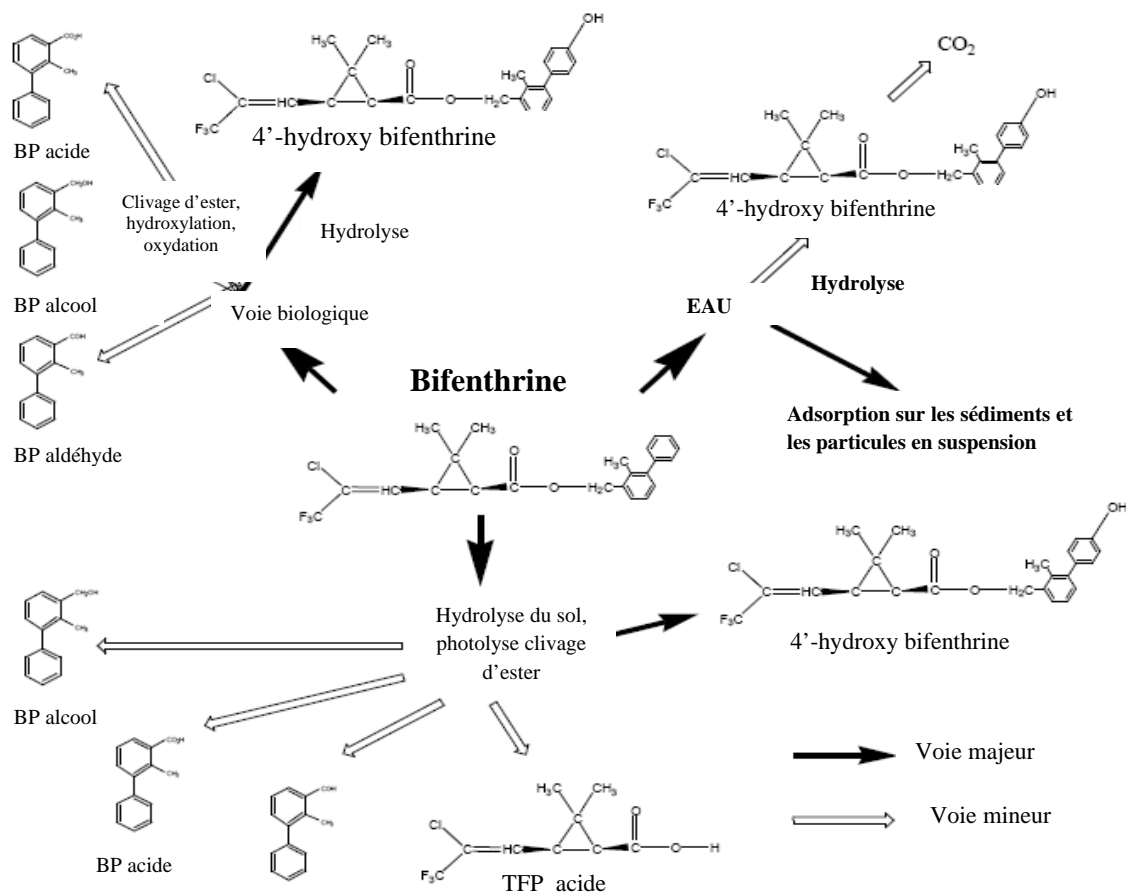
La troisième génération des pyréthrinoïdes est caractérisée par une grande stabilité photochimique et une grande activité insecticide comparée à la précédente [48].

Les pyréthrinoïdes utilisent un nombre différent de voies pour causer des dommages au système nerveux des invertébrés [47]. Une des plus importantes d'entre elles est l'interférence avec l'ouverture des canaux sodiques se trouvant dans les terminaisons des cellules nerveuses [49]. En agissant sur les canaux de sodium par la dépolarisation des bornes présynaptiques, les pyréthrinoïdes paralysent efficacement les organismes en limitant rigoureusement la neurotransmission [50]. Cette paralysie est souvent précédée par une activité spastique de l'organisme en raison de l'hyper-activité des terminaisons nerveuses. L'activité spastique est provoquée par les canaux de sodium à plusieurs reprises en polarisant et dépolarisant, imitant ainsi la neurotransmission où aucune n'a réellement lieu.

Les pyréthrinoïdes ont également montré qu'ils empêchaient la production d'enzymes d'ATPase [51]. Ceci est d'une importance primordiale dans la compréhension de la raison pour laquelle les organismes aquatiques sont beaucoup plus sensibles aux pyréthrinoïdes que les organismes terrestres.

**I.1.3. Devenir dans l'environnement :**

Le schéma suivant représente le devenir de la bifenthrine dans l'environnement de manière générale.



**Figure II.2** – Les voies de dégradation de la bifenthrine dans l’environnement [46].

### I.1.3.1. Dans l’air :

La valeur de la pression de vapeur ainsi que celle de la constante d’Henry, indiquent que la bifenthrine a un bas potentiel de volatilisation dans l’air une fois appliquée au sol sec, et un potentiel légèrement plus élevé une fois appliquée au sol humide [46]. La bifenthrine peut être trouvée dans l’air attachée aux particules du sol ou sous forme de dérivés de pulvérisation.

### I.1.3.2. Dans l’eau :

La bifenthrine est une molécule non polaire avec un coefficient octanol-eau élevé. Par conséquent, a une basse solubilité dans l’eau et une forte tendance à se lier au sol [48]. Elle est stable à l’hydrolyse abiotique aux pH 5, 7, et 9, à 25°C sur une période de 30 jours [52]. La demi-vie de la photodégradation en phase aqueuse est de 276 jours pour la bifenthrine marquée C-14-Cyclopropyl et de 416 jours pour celle marquée au C-14-phenyl, indique la photo-stabilité [46].

**I.1.3.3. Dans le sol :**

En raison de sa valeur élevée de Koc, la bifenthrine se lie fortement aux particules de sol, et a tendance à ne pas se déplacer dans les sols. Les essais en sol saturé ont montré que les formulations de bifenthrine étaient pratiquement stables au métabolisme anaérobique du sol. Aucun produit majeur de dégradation n'a été trouvé, sauf le 4'-hydroxy bifenthrine qui représentait 4,5% du total appliquée après 30 jours de conditions anaérobiques [53].

**I.1.3.4. Dans le biote :**

Le mode d'action et les caractéristiques chimiques de la bifenthrine la rendent très efficace contre les insectes pourtant elle est relativement sans gravité pour les mammifères et les oiseaux une fois appliquée correctement [48]. Le facteur de bioconcentration, très élevé, pourrait conduire à l'exposition aux risques pour les oiseaux et les mammifères prédateurs qui se nourrissent sur les organismes des écosystèmes aquatiques. Drenner et al. (1992) ont examiné les effets de la bifenthrine fixée sur sédiment, sur l'aloose de gésier et le plancton dans un mesocosme. La mort complète de l'aloose de gésier s'est produite quand les concentrations maximales moyennes en bifenthrine ont atteint 7,75 ppb, et une mortalité partielle a été observée à des concentrations de 0,185, 0,250 et 1,55 ppb. Les copépodes étaient extrêmement sensibles à la bifenthrine attachée aux sédiments, indiquant une mortalité à 0,090 ppb en bifenthrine appliquée, qui été la plus basse concentration appliquée. Hoagland et al. (1993) ont constaté des taux similaires de mortalité des copépodes et cladocères à des concentrations de 39 ppb de bifenthrine liée aux sédiments.

**II.2. La métribuzine :****II.2.1. Introduction :**

La métribuzine est un herbicide de la famille des triazines [54,55], employé pour lutter contre les mauvaises herbes qui parasitent diverses cultures agricoles [54]. La métribuzine est un produit blanc, solide cristallin avec une odeur légèrement pointue et sulfureuse [56,57]. Sa formule développée selon l'IUPAC est : 4-amino-6-tertiobutyl-3-méthylthio-1,2,4-triazine-5-one (figure II.3). Les principales caractéristiques de la métribuzine sont représentés dans le tableau II.2.

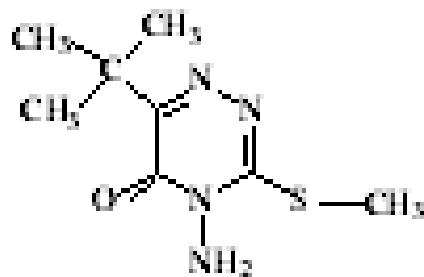


Figure. II.3 – Structure de la métribuzine.

Tableau II.2 - Propriétés physicochimiques de la métribuzine [58,59].

Masse moléculaire :	214,29 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilité (eau, 20°C) :	1,05 g.L <sup>-1</sup>
Pression de vapeur (à 20°C) :	0,058 mpa
pKa	0,99±0,08
Stabilité	
37°C, pH1,2	6,7h
70°C, pH 4	569h
70°C, pH 7	47h
70°C, pH 9	191h
Coefficient de partage octanol-eau (Kow)	10 <sup>1,6</sup>
Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc)	10 <sup>1,81</sup> -10 <sup>2,72</sup>
Photodécomposition/eau	inférieur à 1 jour
Surface de sol/lumière naturelle	14-25jours

### II.2.3. Caractéristiques générales et mode d'action :

La métribuzine est un herbicide résiduel absorbé essentiellement par les racines, et circule à travers la plante dans le courant de la sève.

Toutefois, une absorption limitée peut se produire par les feuilles et les tiges des plantes soumises à une pulvérisation directe [60].

Cette matière active est homologuée pour utilisation sur certains végétaux (luzerne, asperge, orge, carotte, pois chiche, féverole, maïs de grande culture, lentille, pois, pomme de terre,

soja, lupin blanc doux, tomate et blé), les arbres fruitiers (pommier, abricotier, cerisier, pêcher, poirier et prunier) et les brise-vent pour combattre les graminées annuelles et les dicotylédones [61].

Le spectre d'activité de la métribuzine est très large sur les graminées et les dicotylédones et aussi certaines vivacés.

### **II.2.3. Devenir dans l'environnement :**

#### **II.2.3.1. Dans le sol :**

La métribuzine a une persistance modérée dans le sol. La demi-vie de la métribuzine est approximativement 60 jours, et varie selon le type de sol et les conditions climatiques [62].

Son grand potentiel à se lixivier dans les sols limoneux ou sableux s'explique par la faible présence des minéraux [63]. Au cours des périodes climatiques froides, la métribuzine est lixiviée à des couches plus profondes de sol, car l'activité biologique est minime et la capacité d'adsorption des pesticides par le sol est généralement faible [64].

#### **II.2.3.2. Dans l'eau :**

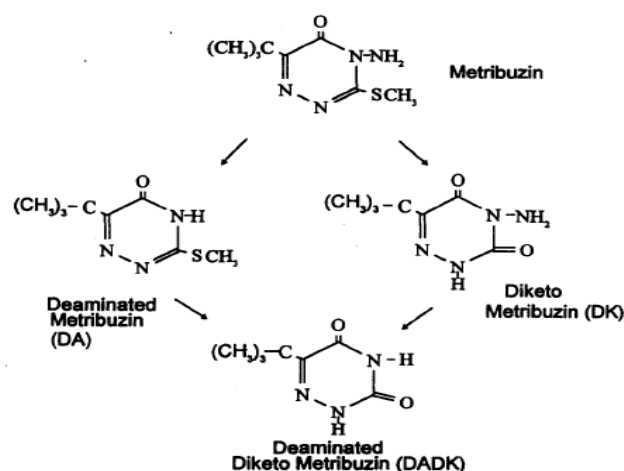
Selon l'agence de protection de l'environnement (EPA) la métribuzine fait partie des pesticides qui ont un grand potentiel de contamination des eaux souterraines [65,66,67], son degré de lixiviation dans la nappe phréatique est, une fonction inversement proportionnelle à la teneur du sol en matière organique [55,63]. La demi-vie de la métribuzine dans l'eau est approximativement de sept jours, due à sa grande solubilité dans l'eau [55,68,69].

#### **II.2.3.3. Dans le biote :**

La métribuzine est une base faible avec un pKa de 1,0 à 21,8°C [70] et fortement hydrosoluble (solubilité maximale à 20°C : 1,05 g.L<sup>-1</sup>), sa pression de vapeur à 20°C est inférieure à 1,3x10<sup>-3</sup> Pa. Le logarithme de son coefficient de partage octanol-eau est de 1,7, par conséquent, il est probable que cette substance possède une bioaccumulation importante [55,69,70].

### II.2.4. Dégradation de la métribuzine :

La figure II.4 représente les voies probables de dégradation de la métribuzine dans l'environnement.



**Figure II.4.** Les voies probables de dégradation de la métribuzine dans l'environnement [71].

La photodégradation et la volatilisation ont une incidence sur la disparition de la métribuzine [72]. Les quantités volatilisées à partir de la surface du sol peuvent, au cours des premières heures, représenter de 10 à 12 % de la quantité répandue à l'origine. Des demi-vies de 4 à 5 jours ont été calculées pour la métribuzine appliquée à la surface du sol après exposition à des températures « chaudes » et à un rayonnement intense [73]. On a établi que la dégradation photochimique ne survenait qu'en présence d'humidité [74].

Bien que la métribuzine subisse une certaine dégradation non biologique [75], la métabolisation microbienne demeure le principal mécanisme d'élimination de cette substance dans le sol [76]. Les constantes relatives aux vitesses de dégradation de la métribuzine sont étroitement liées à l'activité microbienne et fortement corrélées avec la quantité d'herbicide disponible dans la solution de sol, le coefficient d'adsorption de Freundlich, la teneur en argile, en sable et en matières organiques du sol et la quantité de potassium disponible [77].

Lawrence et al. (1993), Raschke et al. (1998), Pavel et al. (1999), Khoury et al. (2003), Huertas-Pérez et al. (2006) et Quesada-Molina et al. (2007) ont souligné que la métribuzine est principalement métabolisée en trois métabolites DA (Deamino-metribuzin), DK (Diketo-metribuzin) et DADK (Deamino-Diketo-metribuzin) [70,71,72,76,80], et que le taux des métabolites est proportionnel à la concentration de la métribuzine [74].

**III.1. Introduction :**

La dégradation d'un composé se ramène à sa décomposition en petites molécules. Le processus peut être physique, chimique ou biologique. La biodégradation est due aux micro-organismes. Elle joue un rôle important dans l'élimination des produits dans l'environnement et dans la diminution de la concentration des composés chimiques libérés. Par conséquent, la biodégradation des produits chimiques dans les réseaux d'égouts, dans les usines de traitement des eaux résiduaires et des eaux naturelles constitue un facteur crucial pour décider de leur approbation de distribution [81,82,83].

**III.2. Les tests de biodégradation :**

La réglementation de l'OCDE et de la CEE exige que la biodégradabilité des nouveaux produits chimiques soit testée. La stratégie pour l'examen adoptée par l'OCDE se divise en trois catégories [84,85] :

- Le test de biodégradation facile ou test de criblage.
- Le test de biodégradation intrinsèque.
- Le test de simulation.

Le taux de biodégradation est crucial pour l'estimation de la concentration d'un produit chimique dans l'environnement ainsi que dans l'évaluation des risques [86]. Comme les taux de biodégradation dans les différents compartiments de l'environnement peuvent changer considérablement, préciser la méthode d'estimation et de calcul est nécessaire pour prévoir la concentration du polluant. Dans la suite de ce chapitre nous allons nous intéresser à deux méthodes de mesure de la biodégradation : la respirométrie manométrique qui est une méthode de biodégradabilité facile, et la méthode de Zahn-Wellens qui est une méthode de biodégradabilité intrinsèque.

**III.3. Le test de respirométrie manométrique :****III.3.1. Introduction :**

En 1981, l'OCDE publie à l'échelle internationale les méthodes de tests de tous les produits chimiques [87]. Les protocoles de l'OCDE ont été remis à jour en 1993 [88], après harmonisation des conditions de test [90]. Les méthodes analytiques utilisées sont : la disparition du carbone organique dissout (COD) (utilisé dans le test 301A : COD disparition,

et le test 301 E : Essai de screening modifié), mesure de la production de CO<sub>2</sub> (utilisé dans 301B : test d'évolution du CO<sub>2</sub>), l'utilisation de l'O<sub>2</sub> dans la demande biologique en oxygène (utilisé dans 301C : test MITI(I) modifié ; 301D : test en fiole fermée ; et 301 F, : test de respirométrie manométrique) [90].

### III.3.2. Principe de la méthode de respirométrie :

Un volume mesuré de milieu minéralensemencé, contenant une concentration connue de la substance d'essai, comme seule source de carbone organique, est agité en fiole fermée, à température constante pendant une durée maximale de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée soit en mesurant la quantité d'oxygène nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans la fiole respirométrique, soit en se basant sur les modifications de volume ou de pression (ou sur une combinaison des deux) dans l'appareil. Le dioxyde de carbone produit, est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la substance à étudier (après une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par le témoin inoculum, analysée parallèlement) est exprimée en pourcentage de DThO (la demande théorique en oxygène) [91].

### III.3.3. Mesure de la demande biologique en oxygène :

La détermination de la DBO est avantageuse parce que c'est un paramètre direct de la dégradation aérobie, ce qui n'est pas le cas pour les autres tests de criblages utilisant le carbone organique dissout dans l'eau, ce qui inclut des mécanismes comme l'adsorption sur la surface et/ou sur les solides en suspension [92]. D'après de récentes publications [93], en plus du taux de biodégradation en fonction du temps, la constante cinétique, le temps de demi-vie et la phase de latence doivent être rapportés dans les essais de biodégradation OCDE.

Pour être complète, la DBO demande 21 à 28 jours, ce qui est difficilement réalisable expérimentalement dans le cadre d'un contrôle. Si l'on étudie la cinétique de consommation de l'oxygène au cours du temps on s'aperçoit de l'existence de deux plateaux correspondant à des phénomènes biochimiques différents :

- Durant les cinq premiers jours, se produit la dégradation des molécules carbonées ;
- Du cinquième au vingt et unième jour, se produit la nitrification, c'est-à-dire l'oxydation des molécules azotées réduites par les bactéries nitrifiantes, si elles sont



présentes dans le milieu. Ce deuxième stade est généralement décalé dans le temps, du fait que la nitrification ne peut intervenir qu'après la dégradation avancée des substrats carbonés.

C'est pourquoi, il est habituel de réaliser la DBO en 5 jours ( $DBO_5$ ) pour ne prendre en compte que la dégradation de la pollution carbonée. La norme européenne EN 1899-1 permet une incubation de 5 jours comme de nombreux pays européens ou de 7 jours comme dans plusieurs pays nordiques depuis de nombreuses années. Le choix de l'incubation est essentiellement pratique car elle évite de travailler le Week-end pour réaliser la lecture. Enfin l'apparition possible de la nitrification avant 5 jours (et bien sûr 7) contribue à augmenter la  $DBO_5$  de certains effluents traités, dans des installations à faible charge en particulier. C'est pourquoi la norme prévoit l'ajout d'un inhibiteur des bactéries nitrifiantes dans le milieu d'incubation, l'allyl thio-urée (ATU) [94].

#### **III.4. L'essai Zahn-Wellens/EMPA :**

##### **III.4.1. Introduction :**

L'essai Zahn-Wellens [95] original a été adopté en 1981 comme Ligne directrice 302 B de l'OCDE pour la détermination de la biodégradabilité intrinsèque. La Suisse et l'Allemagne ont ensuite fait des propositions en vue de modifier cette ligne directrice en intégrant des éléments contenus dans un essai mis au point par l'EMPA (Laboratoire fédéral suisse d'essai des matériaux et de recherches) [96]; d'où le changement de nom de l'essai. La version nouvelle de l'essai contient en outre des modifications en ce qui concerne le milieu minéral utilisé.

##### **III.4.2. Principe de la méthode :**

Un mélange contenant la substance d'essai, des substances nutritives minérales et une proportion relativement importante de boue activée en milieu aqueux, est agité et aéré à 20-25°C à l'obscurité ou sous lumière diffuse pendant une durée pouvant atteindre 28 jours. On prépare en parallèle des témoins contenant de la boue activée et des substances minérales nutritives, mais pas la substance à étudier. Le processus de biodégradation est suivi par dosage du COD ou en déterminant la DCO dans des échantillons filtrés prélevés chaque jour ou à d'autres intervalles de temps. Le pourcentage de biodégradation au moment de la prise d'échantillon est donné par le rapport du COD éliminé (ou DCO), ce dernier étant corrigé de

la valeur obtenue dans le témoin, sur la teneur initiale en COD. Ce pourcentage est porté sur un graphique en fonction du temps pour donner la courbe de biodégradation [97].

#### **III.4.3. Mesure de la demande chimique en oxygène :**

La demande chimique en oxygène (DCO) est la mesure de la quantité d'oxygène requise pour oxyder la matière organique et inorganique oxydables contenue dans un échantillon. Les substances organiques et inorganiques présentes dans les effluents industriels proviennent principalement des raffineries de métaux et des fabriques de pâtes et papiers.

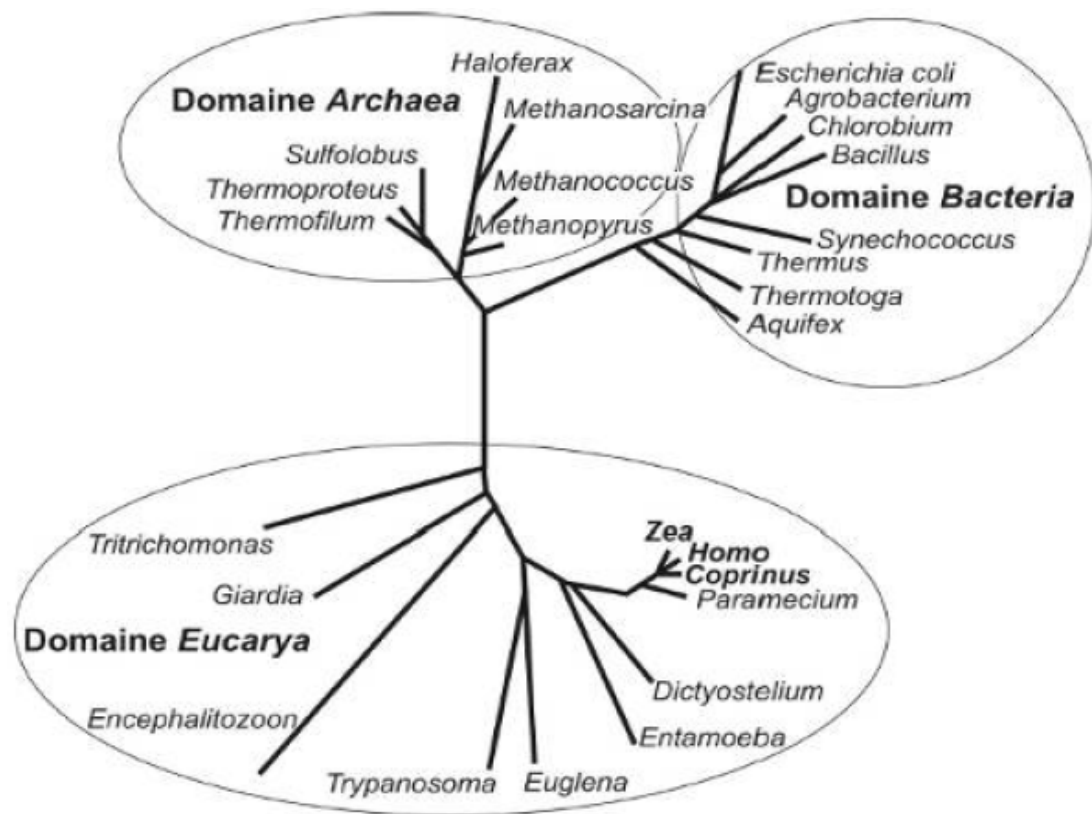
La matière oxydable contenue dans un échantillon est oxydée par chauffage à reflux en milieu fortement acide avec une quantité connue de bichromate de potassium dans une éprouvette fermée. La consommation d'oxygène par l'échantillon provoque un changement de couleur dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit et se mesure en équivalent d'oxygène [98].

#### IV.1. Les bactéries :

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes (sans noyau, l'ADN est diffus dans la cellule). Elles représentent une des plus anciennes formes de vie connue sur la terre (environ 3,5 milliards d'années). Elles appartiennent à deux des trois règnes différents du vivant [99] (figure IV.1) :

- les eubactéries (Bacteria) qui regroupent la plupart des bactéries classiques (bactéries marines, d'eau douce, etc.),
- les archaebactéries (Archaea) qui regroupent les bactéries dites méthanogènes ou extrémophiles (halophiles extrêmes, thermophiles extrêmes, etc.)

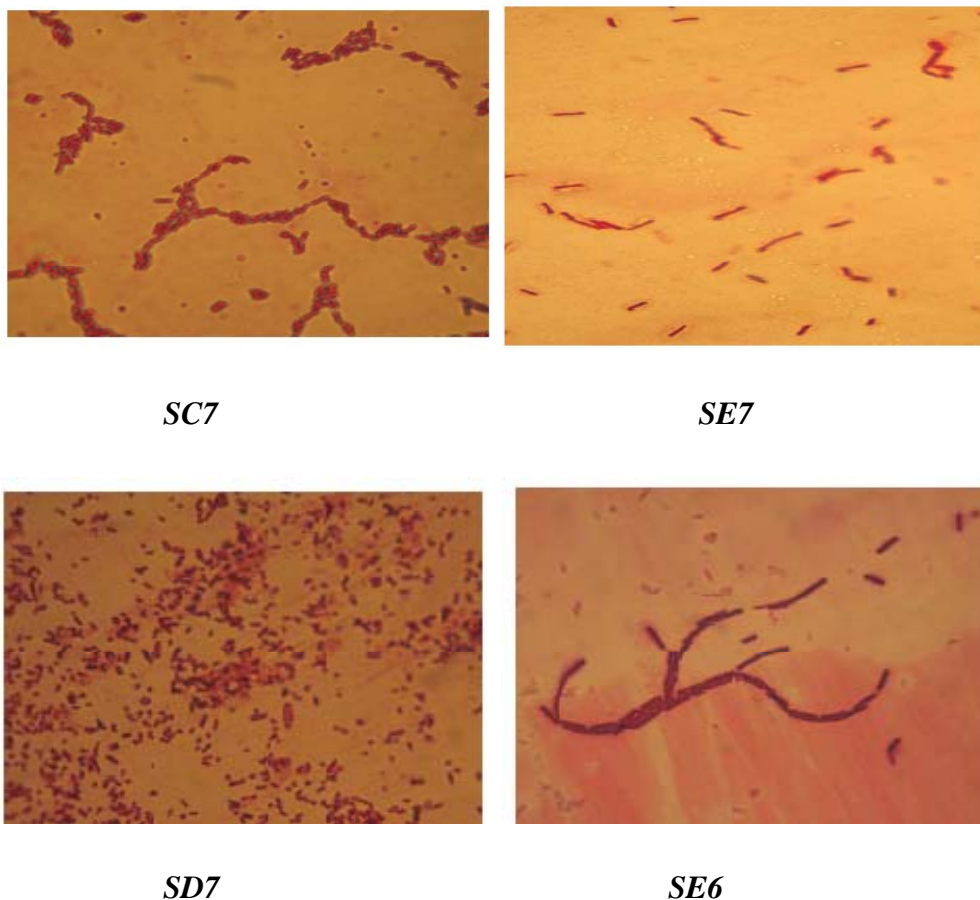
Le troisième règne du vivant regroupe les eucaryotes dont le matériel génétique est regroupé dans un noyau au sein de la cellule et qui est composé des levures, des protozoaires, des champignons, des plantes et des animaux (dont les êtres humains).



**Figure IV.1** - Arbre phylogénétique des êtres vivants [100]

La longueur des branches est proportionnelle à la divergence génétique

La figure II.2 illustre la forme des souches bactériennes après la coloration de Gram.



**Figure IV.2** - Forme des souches (*SC7*, *SE7*, *SD7*, *SE6*) bactériennes observée sous microscope photonique [101].

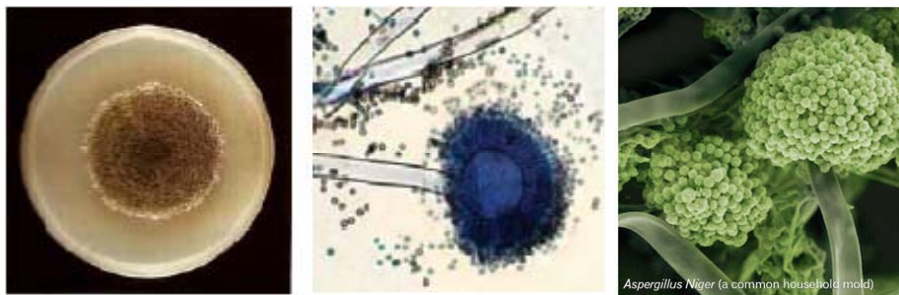
#### IV.2. Les moisissures :

Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux ubiquitaires [102], qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Ce sont des eucaryotes, hétérotrophes, donc obligés de puiser dans le milieu de développement les substances nutritives nécessaires à leur métabolisme. On peut les trouver partout, dans le sol et dans l'air, sur les vêtements, les plantes, les aliments. Ces derniers sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures, notamment les genres *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites toxiques [103,104,105].

**IV.2.1. *Aspergillus niger* :**

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C.

Les colonies d'*A.niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, *A.niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore (Figure IV.3).

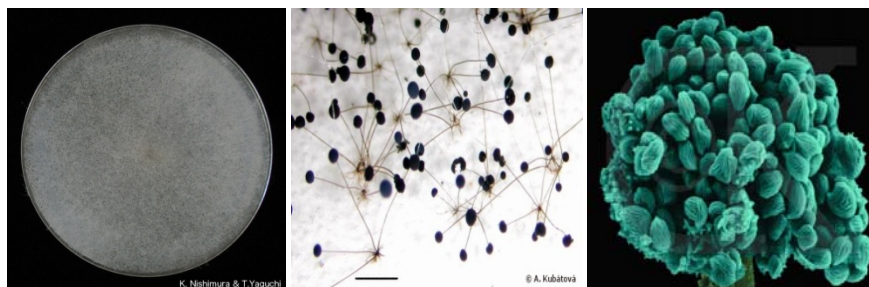


**Figure IV.3** - La souche *Aspergillus niger* observée au microscope électronique à balayage (au centre et à droite) et à l'œil nu (à gauche) [106].

**IV.2.2. *Rhizopus stolonifer* :**

*Rhizopus* est l'une des nombreuses espèces de la classe zygomycète, d'ordre mucorale; ce champignon pousse rapidement (4 jours) sur milieu PDA. *Rhizopus* peut se développer à 30°C.

La colonie de *Rhizopus stolonifer*, forme des stolons ; oranges sphériques dressés ; spores rondes ; rhizoïdes (figure IV.4).



**Figure IV.4** - La souche *Rhizopus stolonifer* observée au microscope électronique à balayage (au centre et à droite) et à l'œil nu (à gauche) [107]

**IV.3. Dégradation des composés aromatiques par les bactéries :**

Les bactéries aérobies et spécialement les *pseudomonas* sont capables d'utiliser une variété de composés organiques contenant un ou plusieurs cycles aromatiques. La division du cycle est une étape enzymatique importante dans leur dégradation. Différents HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) contenant jusqu'à quatre cycles, comme le pyrène et le chrysène, peuvent être minéralisés par des souches bactériennes pures [108].

**IV.4. Dégradation des composés aromatiques par les champignons :**

Une des applications des champignons dans le domaine de l'environnement est la dégradation des hydrocarbures dérivés du pétrole [109,110], et le traitement des déchets dans le secteur de l'industrie des pâtes à papiers [111, 112,113].

Le genre *Graphium*, *Aspergillus* et *Penicillium*, utilisent les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques et les composés xénobiotiques récalcitrants comme substrat de croissance [114,115,116], *Aspergillus fumigatus* s'est avérée être capable de croître sur le phénol, le p-cresol, et le 4-ethylphénol [117,118]. Weber et al. [119], ont signalé la découverte d'un champignon qui dégrade le toluène, *Cladosporium sphaerosperum*. En plus du toluène, ce champignon peut utiliser le styrène, l'éthylbenzène, et le propylbenzène comme source de carbone et d'énergie. Tout récemment un hyphomycete *Scedosporium apiospermum* a été isolé qui est capable de croître sur le phénol et le p-cresol avec le 3-oxoadipate comme métabolite [120], les champignons aident aussi à réduire les substances organiques solubles et insolubles dans les boues des stations d'épurations des eaux usées [121,122].

**V.1. Introduction :**

La méthode des plans d'expériences, a été inventée vers 1920 à Rothamsed (en Angleterre) par le statisticien britannique Ronald Fisher pour les études agronomiques. De l'agronomie, la méthodologie des plans d'expériences a été adaptée à d'autres disciplines dont l'industrie, la physique, la chimie et au domaine biologique et médical.

L'utilisation de la méthode nécessitait des connaissances en statistiques, et en mathématiques relativement peu étendues [123].

A partir de 1975, Généchi Taguachi vulgarisera la méthode et publiera des tables pratiquement utilisables. Il mettra ensuite au point de nouvelles procédures [124].

Au niveau industriel, la confection et l'utilisation d'un plan d'expérience conforme à un cahier des charges précis et à une modélisation donnée des phénomènes étudiés, requiert des outils mathématiques relativement sophistiqués : algèbre linéaire, algèbre finie, géométrie sur des corps finis, modèle linéaire généralisé de la statistique.

**V.2. Définition des plans d'expériences :**

On nomme « plan d'expérience » l'organisation d'une expérience qui accompagne une recherche scientifique ou des études industrielles, dont le déroulement lui-même sera conditionné par les résultats obtenus en cours de route. La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles : celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées [125].

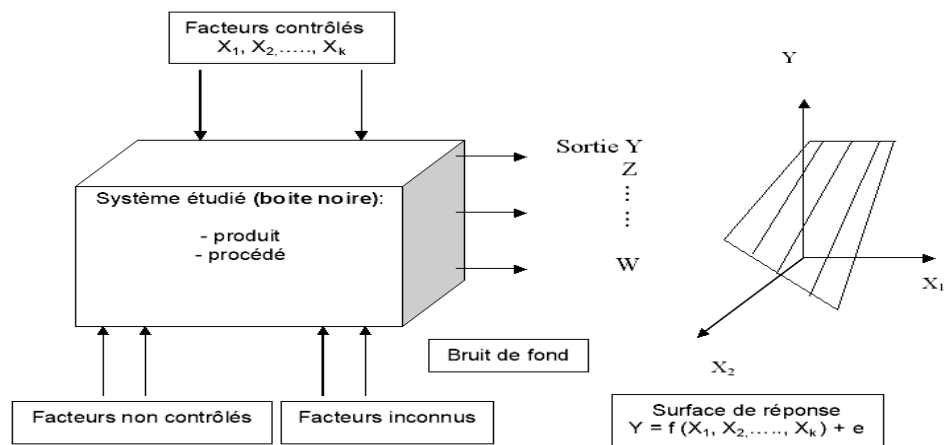
Un plan d'expérience permet d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse [126]. Le plan d'expérience permet donc de réduire le nombre d'essais à ce qui est strictement nécessaire pour prendre une décision; ce qui permet un gain en temps et en coût financier.

Pour l'industrie : Un plan d'expérience est une suite d'essais rigoureusement organisés, afin de déterminer avec un minimum d'essais et un maximum de précision, l'influence respective des différents paramètres de conception ou de fabrication d'un produit, et ainsi optimiser les performances [123].

La grande nouveauté de la méthode des plans d'expériences est qu'elle propose une expérimentation factorielle, c'est-à-dire que tous les facteurs varient à l'aide de la régression linéaire multiple et l'analyse de variance [127].

Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant le nombre des essais à des hauteurs raisonnables. C'est pourquoi parmi leurs applications principales on trouve la recherche des facteurs influents et celle des facteurs optimums [123].

La figure V.1 représente un système étudié par la méthode des plans d'expériences.



**Figure V.1 - Représentation du système à étudier par la méthode des plans d'expériences[128]**

### V.3. Construction d'un plan d'expérience [123] :

La construction d'un plan d'expérience peut se décomposer en plusieurs étapes :

- Choix de la réponse et des facteurs d'étude.
- Choix d'un plan d'expériences.
- Etablissement de la matrice.
- Réalisation des essais.
- Interprétation des résultats des essais.

### V.4. Les plans factoriels :

Parmi les différents plans expérimentaux, les plans factoriels sont courants car ils sont les plus simples à mettre en œuvre [123].



Les plans factoriels permettent de mettre en évidence très rapidement l'existence d'interactions entre les facteurs. Les plans factoriels à deux niveaux sont très utiles car ils ont de nombreuses applications, soit sous forme de plans complets, soit sous forme de plans fractionnaires [127,129].

#### **V.5. Plan factoriel complet à deux niveaux et à k facteurs ( $2^k$ ) :**

L'hypothèse de base est d'assigner à chaque facteur (normalisé) sa valeur la plus basse (-1) et sa valeur la plus haute (+1) ; donc chaque facteur possède un nombre de niveaux limité à deux. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ainsi, pour k facteurs, on se retrouve avec un ensemble de  $2^k$  d'expérimentations à faire. D'où la notation  $2^k$  [127].

On peut augmenter le nombre de facteurs. L'espace expérimental possède autant de dimensions qu'il y a de facteurs [123,125].

Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes [125].

#### **V.6. Construction des plans factoriels complets à deux niveaux :**

##### **V.6.1. Matrice d'expériences :**

La matrice d'expériences est le tableau qui récapitule l'ensemble des essais. En même temps, il indique le nombre d'expériences à réaliser avec la façon de faire varier les facteurs et l'ordre dans lequel il faut réaliser les expériences. Ce tableau est donc composé des nombres (+1) et (-1) [129].

Plus généralement, la matrice d'expérience comporte k colonnes pour les facteurs principaux et  $2^k$  lignes. Elle se construit suivant la règle suivante :

- Colonne du premier facteur : alternance -1 et +1
- Colonne du deuxième facteur : alternance -1 et +1 de 2 en 2.
- Colonne du troisième facteur : alternance -1 et +1 de 4 en 4.
- Colonne du quatrième facteur : alternance -1 et +1 de 8 en 8.

##### **V.6.2. Effet global et effet moyen d'un facteur :**

**V.6.2.1. Cas de deux facteurs :**

Supposons que nous avons deux facteurs notés :  $X_1$  et  $X_2$  avec chacun deux niveaux (ce qui correspond au plan  $2^2$ ). On réalisera alors, dans la pratique 4 expériences, une matrice d'expérience des réponses est donnée par :

Expérience	$X_1$	$X_2$	Réponse : $Y_{\text{rep}}$
1	-1	-1	$Y_1$
2	+1	-1	$Y_2$
3	-1	+1	$Y_3$
4	+1	+1	$Y_4$

La colonne de gauche de la matrice d'expérience indique le numéro de l'expérience (ou de l'essai). La troisième ligne (par exemple) indique que lors de la réalisation du deuxième essai, le facteur  $X_1$  sera au niveau haut alors que le facteur  $X_2$  sera, au niveau bas [123,129,130].

L'effet moyen de  $X_1$  est toujours la demi-variation de la réponse lorsque  $X_1$  passe du niveau -1 au niveau +1. Or, pour chacun des niveaux de  $X_1$ , il y a 2 expériences (une pour chacun des niveaux de  $X_2$ ). Nous devons alors envisager des réponses moyennes [10].

Quand  $X_1$  est au niveau -1, nous avons la réponse moyenne :

$$\frac{y_1 + y_3}{2}$$

Et quand  $X_1$  est au niveau +1, nous avons la réponse moyenne :

$$\frac{y_2 + y_4}{2}$$

L'effet moyen  $a_1$  de  $X_1$  donne :

$$a_1 = \frac{\frac{y_2 + y_4}{2} - \frac{y_1 + y_3}{2}}{2}$$

$$a_1 = \frac{-y_1 + y_2 - y_3 + y_4}{4}$$

Les effets, moyen et global, de  $X_2$  se calculent de la même manière. Et l'effet moyen  $a_2$  soit :

$$a_2 = \frac{-y_1 - y_2 + y_3 + y_4}{4}$$

On calcule  $a_0$  ou « réponse théorique » pour  $X_1=0$  (au centre de son domaine de variation) comme la moyenne des réponses observées aux niveaux -1 et +1.

$$a_0 = \frac{\frac{y_2 + y_4}{2} + \frac{y_1 + y_3}{2}}{2}$$

$$a_0 = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4}$$

#### V.6.2.2. Calcul de l'interaction :

Puisque nous considérons l'interaction entre deux facteurs comme un nouveau facteur, l'effet moyen de l'interaction  $X_1X_2$  est la demi-variation de l'effet moyen de  $X_2$  lorsque  $X_1$  passe du niveau bas au niveau haut. Explicitons cela sur l'exemple de la matrice d'expériences et des réponses dans le cas de 2 facteurs  $X_1$  et  $X_2$ , avec chacun deux niveaux.

Au niveau haut de  $X_1$ , l'effet moyen de  $X_2$  est :

$$\frac{y_4 - y_2}{2}$$

Au niveau bas de  $X_1$ , l'effet moyen de  $X_2$  est :

$$\frac{y_3 - y_1}{2}$$

L'effet moyen de l'interaction  $X_1X_2$  est :

$$a_{12} = \frac{\frac{y_4 - y_2}{2} - \frac{y_3 - y_1}{2}}{2}$$

$$a_{12} = \frac{y_1 - y_2 - y_3 + y_4}{4}$$

**V.6.3. Détermination des effets par une méthode matricielle**

Pour calculer les effets à partir des résultats d'expériences nous avons construit une matrice X qu'on appelle matrice des effets. Elle sert au calcul des coefficients du modèle, et s'obtient en ajoutant à gauche de la matrice d'expérience une colonne ne contenant que des 1.

On s'intéresse toujours à un plan  $2^k$  et un modèle polynomial du premier degré de la forme :

$$Y = a_0 + a_1 x_1 + \dots + a_k x_k \quad (\text{sans interaction}).$$

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z \quad (\text{avec interaction})$$

**V.7. Tests de significativité des effets et validation du modèle :****V.7.1. La qualité d'ajustement des résultats**

La qualité d'ajustement des résultats est évaluée à partir du coefficient de détermination et le coefficient de détermination ajusté.

**V.7.1.1. Le coefficient de détermination  $R^2$** 

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est utilisé comme mesure de la qualité d'une droite de régression. Il mesure la proportion (le pourcentage) de la variation totale de Y expliquée par le modèle de régression.

Le coefficient de détermination est donné par [127] :

$$R^2 = \frac{\text{Somme des carrés des réponses calculée corrigées de la moyenne}}{\text{Somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne}}$$

**V.7.1.1. Le coefficient  $R^2$  ajusté**

Le  $R^2$  ajusté (utilisé en régression multiple) tient compte du nombre de paramètres du modèle.

$$R^2 \text{ ajusté} = 1 - \frac{((n-1)(1-R^2))}{(n-p)}$$

n = le nombre d'expériences réalisées

p = le nombre de coefficients du modèle

Le reproche fait au coefficient de détermination est qu'il peut approcher la valeur 1, interprétée comme un ajustement parfait, si on ajoute suffisamment de variables régresseurs. Le  $R^2$  ajusté tient compte du rapport  $p/n$  entre les paramètres du modèle et le nombre d'observations.

### V.7.2. Réalisation du test de significativité des effets (Test de Student).

L'outil fondamental de ces tests de significativité est l'estimation de la variance des résidus du modèle linéaire qui n'est utilisable que s'il y a moins de coefficients ( $p$ ) que d'expériences réalisées.

L'analyse de la variance permet alors de tester l'influence des facteurs sur la réponse  $Y$ , qui

est donnée par :  $S^2 = \frac{1}{n-p} \cdot \sum e_i^2$

Où  $n$  est le nombre d'expériences réalisées et  $p$  le nombre de coefficient du modèle. Dans ces conditions, on peut montrer que tous les effets ont la même variance donnée par :

$$S_i^2 = \frac{S^2}{n}$$

$n$  = le nombre d'essais réalisés.

Dans le cas particulier où le nombre d'expériences réalisées ( $n$ ) est égale au nombre de coefficients du modèle ( $p$ ), on détermine  $S^2$  par une méthode dite des <<mesures au centre>> [123,124].

Dans la méthode des <<mesures au centre>>, on effectue plusieurs mesures au centre du domaine (tous les facteurs sont réglés à 0) et on détermine  $S^2$  à partir des résultats sur ces <<points au centre>>.

Si les mesures  $y_i$  au centre du domaine sont répétées  $n$  fois, on en déduit une estimation de la variance en ce point,  $\bar{y}$  est la moyenne de ces mesures [124].

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}$$

L'écart type  $S$  ainsi est calculé avec  $n-1$  degrés de liberté.

Le test utilisé est le test  $t$  de Student. Un effet sera dit significatif (c'est-à-dire que la variable ou que l'interaction qui lui est associée a une influence sur la réponse), s'il est, pour un risque donné, significativement différent de 0, on testera donc l'hypothèse notée par (H) :

$$H_0 = \langle\langle a_i = 0 \rangle\rangle$$

Contre l'hypothèse :

$$H_1 = \langle\langle a_i \neq 0 \rangle\rangle$$

Pour cela on calcule :

$$t_i = \frac{|a_i|}{s_i}$$

L'intervalle de confiance de tout coefficient est alors :

$$a_i \pm t_{crit} * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

On utilise alors une table de Student à  $(n - p)$  degré de liberté ( $n$  est le nombre d'expériences réalisées et  $p$  le nombre d'effets, y compris la constante), et à  $(n-1)$  degrés de liberté dans le cas des mesures au centre. On choisit un risque de première espèce (le plus souvent 5% ou 1%). A partir de la table de Student on détermine la valeur de  $t_{crit}$  qu'on compare avec  $t_i$ .

Le test obéit à la règle suivante :

Si  $t > t_{crit}$ , on rejette  $H_0$  au risque accepté.

Si  $t_i < t_{crit}$ , on accepte  $H_0$  au risque accepté.

Si l'hypothèse  $H_0$  est acceptée, cela veut dire que la variable qui lui est associée n'a pas d'influence sur la réponse [125,129].

On admettra qu'un coefficient est significatif si son intervalle de confiance n'englobe pas la valeur 0. Si la valeur 0 n'appartient pas à l'intervalle de confiance, on en déduira que le coefficient n'est pas significativement différent de zéro pour le risque envisagé.

**V.7.3. Analyse de la variance et validation du modèle linéaire (Test de Fisher)**

L'analyse de la variance consiste à comparer à l'aide d'un test de Fisher (F), la somme des carrés des écarts due uniquement à la régression (donc au modèle), avec la somme des carrés des résidus [123,125].

On notera,  $Y_i$  les réponses observées lors de la réalisation des expériences et  $Y_i^{est}$  la réponse observée estimée à l'aide du modèle linéaire. On notera, de même,  $Y_{moy}$  la moyenne des réponses.

On définit alors trois types de "variations ":

1 - La variation due au modèle linéaire :

$$SCEL = \sum (Y_i^{est} - Y_{moy})^2$$

2 – La variation résiduelle :

$$SCER = \sum (Y_i - Y_i^{est})^2$$

3 – La variation totale :

$$STCE = SCEL + SCER$$

On définit de plus un "carré moyen" qui est le quotient d'une somme de carrés par son degré de liberté.

SCEL aura (p-1) degré de liberté (p est le nombre de coefficients estimé à partir du modèle).

SCER aura (n-p) degré de liberté (n est le nombre d'expériences réalisées).

STCE aura (n-1) degré de liberté.

En outre, on note CML le carré moyen associé à SCEL, et CMR le carré moyen associé à SCER.

Le tableau de l'analyse de variance se représente alors de la façon suivante :

Tableau V.1 - Analyse de la variance

Variation due à	Somme des carrés	DDL	Carré moyen	F
Modèle	SCEL	p-1	$\frac{SCEL}{p-1} = CML$	$\frac{CML}{S^2}$
Résidus	SCER	n-p	$\frac{SCER}{n-p} = S^2$	
Total	SCET	n-1		

DDL : le degré de liberté

Le test F permet alors de comparer pour un risque fixé à l'avance le  $F_{obs}$  que l'on a calculé dans le tableau précédent avec un F (critique) lu dans la table de Fisher-Snedecor avec (p-1) et (n-p) degrés de liberté.

Hypothèse  $H_0$  : « les deux carrés moyens sont du même ordre de grandeur » et donc la régression n'est pas significative

Hypothèse  $H_1$  : « le carré moyen dû à la régression est significativement plus grand que le carré moyen dû aux résidus » donc la régression est globalement significative.

La règle du test est alors, pour un risque choisi :

Si  $F_{obs}$  est inférieur au F(critique), on accepte l'hypothèse  $H_0$ .

Si  $F_{obs}$  est supérieur au F(critique), on accepte l'hypothèse  $H_1$  avec la confiance 1-a [129].



Ce chapitre sera consacré à la description du matériel utilisé, aux méthodes de mesure ainsi qu'au mode opératoire.

## **VI.1. Matériel :**

### **VI.1. 1. Matériel chimique :**

Les deux pesticides testés sont choisis parmi ceux communément utilisés pour les traitements phytosanitaires en Algérie; le premier la bifenthrine et le deuxième la métribuzine sous leurs formulations commerciales qui sont respectivement le Talsar et la Metriphar.

Les réactifs sont cités en annexe.

### **VI.1. 2. Matériel biologique :**

#### **VI.1. 2.1. Souches microbiennes :**

**VI.1.2.1.1. Les bactéries:** Quatre souches bactériennes autochtones (*SC7*, *SD7*, *SE6*, *SE7*) ont été préalablement isolées dans notre laboratoire à partir des eaux résiduaires de Oued El Harrach [101], sont utilisées.

**VI.1.2.1.2. Les champignons :** Une souche d'*Aspergillus niger* et une souche de *Rhizopus stolonifer* provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, ont été conservées à 4°C et repiquées sur une gélose YMA.

#### **VI.1.2.2. Milieux de culture :**

C'est un mélange solide ou liquide qui contient les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne. Pour notre travail, nous avons utilisé plusieurs milieux, qui sont :

- **Milieu de conservation :** Les souches bactériennes et fongiques sont conservées à 4°C au réfrigérateur dans des tubes à essai remplis de gélose nutritive solide inclinée pour les bactéries, et de milieu YMA (Yeast Extract. Mannitol Agar) gélosé incliné pour les champignons.
- **Milieux de pré-culture :** La préculture est réalisée avant les essais; elle permet d'avoir une population suffisante en microorganismes. Deux milieux ont été utilisés à cet effet :
  - Le bouillon nutritif utilisé pour la revitalisation des bactéries réfrigérées à 4°C,
  - Le milieu YMA utilisé pour la revitalisation des champignons réfrigérés à 4°C.

- **Milieu réactionnel** : les essais sont réalisés sur milieu de culture minéral, avec le pesticide comme seule source de carbone.

## VI.2. Méthodes d'analyse:

### VI.2. 1. Mesure de la croissance microbienne:

#### VI.2. 1.1. Les bactéries :

La variation de la densité cellulaire est déterminée au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu mini 1200) en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm [131]. La valeur de la DO est ensuite convertie en poids cellulaire sec par le biais d'une courbe d'étalonnage dont l'allure est une droite [132].

#### VI.2. 1.2. Les champignons :

La quantité de biomasse a été déterminée par la mesure de la masse de substrat biodégradé convertie en masse cellulaire. Les pesées ont été effectuées quotidiennement à une température de 30°C et sous agitation à 120 rpm, en se référant au blanc contenant uniquement le milieu de culture et la souche fongique.

### VI.2. 2. Mesure de la demande chimique en oxygène :

La méthode pratiquée est celle au bichromate de potassium dont le principe est le dosage colorimétrique du chrome trivalent formé au cours de la réaction d'oxydoréduction dans des conditions bien définies : milieu fortement acide, à chaud (température 150°C) et pendant 2h. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit [133]. La concentration de la DCO de l'échantillon, exprimée en  $\text{mg.L}^{-1} \text{O}_2$ , est déduite, après mesure de la DO à 600 nm, de l'équation de la courbe d'étalonnage.



**Figure VI.1** - Incubateur servant à la mesure de la DCO et la croissance microbienne.

**VI.2. 3. Essai de respirométrie manométrique :**

La méthode adoptée est une méthode manométrique utilisant un respiromètre de type oxitop (Appareil permettant la lecture directe de la quantité d'O<sub>2</sub> consommé). La mesure repose sur une mesure de la pression dans un système clos. Les microorganismes qui se trouvent dans l'échantillon consomment l'oxygène en formant du CO<sub>2</sub>. Celui-ci est absorbé par NaOH. Il s'ensuit une dépression dont la mesure peut être lue directement en mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>.

**VI.3. Modes opératoires :****VI.3. 1. Ensemencement des souches :****VI.3. 1.1. Bactéries :**

L'ensemencement s'effectue à partir d'un tube de gélose nutritive (conservé à 4°C). Quelques colonies sont prélevées et mises dans un flacon de 200 mL de bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 48 h jusqu'à apparition d'un trouble qui indique une croissance bactérienne. Après incubation à 37°C pendant 48 à 72 h, les bactéries sont récupérées par centrifugation (15 mn à 6000 tr/mn à 4°C), le culot récupéré est remis en suspension dans l'eau physiologique pour subir un lavage, puis centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions opératoires (15 mn à 6000 tr/mn à 4°C), le culot sera finalement dilué dans 10 ml de milieu minéral.

La concentration en bactéries de cette suspension est déterminée en mesurant la densité cellulaire par spectrométrie UV/Visible et cela à 600 nm. La correspondance densité optique / concentration se fait à partir d'une courbe d'étalonnage établie au préalable (voir annexe 2) .

**VI.3.1.2. Champignons :**

Une suspension de spores est ensemencée à partir de boîtes de Pétri ou des tubes inclinés contenant le milieu YMA (conservé à 4°C). Après un temps d'incubation variant de 3 à 10 jours (suivant le test) à 30°C, 10 à 100 mL de la suspension contenant le milieu liquide YMA et les champignons sera centrifugé (15 mn à 6000 tr/mn à 4°C). Le culot récupéré est remis en suspension dans un volume connu de milieu minéral.

La correspondance masse / concentration se fait à partir d'une courbe d'étalonnage établie au préalable.

**VI.3.2. Préparation des solutions de pesticides :**

Pour les besoins de notre étude, nous avons préparé des solutions mères de bifenthrine et de métribuzine, obtenues directement par dissolution des formulations commerciales dans l'eau distillée, exception faite pour le premier test où on a utilisé l'éthanol comme co-solvant.

**VI.3.3. Mode opératoire de la demande chimique en oxygène (voir annexe 3):**

- Prélever à l'aide d'une pipette 2,5 ml d'échantillon et l'introduire dans une éprouvette.
- Ajouter lentement 1,5 ml de la solution de digestion (voir annexe 3).
- Ajouter lentement 3,5 ml du réactif acide.
- Visser fermement le bouchon et mélanger à l'agitateur.
- Porter à reflux dans un bloc chauffant à une température de 150 °C pendant une période de 2 heures.
- Retirer de l'étuve et laisser refroidir à la température ambiante.
- Ajuster la longueur d'onde du spectrophotomètre à 600 nm et lire la densité optique.

**VI.3.4. Mode opératoire de l'essai de respirométrie manométrique :**

- Laisser les récipients atteindre la température souhaitée.
- Ensemencer les récipients appropriés avec le milieu minéral, le pesticide (le blanc ne contenant pas le pesticide), et les microorganismes préparés au préalable.
- Assembler le matériel, mettre l'agitateur en marche, vérifier l'étanchéité à l'air et commencer à mesurer la consommation d'oxygène.
- Le déroulement de l'essai ne nécessite normalement aucune attention particulière en dehors des lectures et des vérifications quotidiennes permettant de s'assurer que la température et l'agitation appropriées sont maintenues.

## VII. Etude de la biodégradation des pesticides

L'étude de la biodégradation de la bifenthrine et de la métribuzine a été effectuée sur des bactéries et des champignons. Afin de déterminer l'influence de la concentration initiale en pesticide et du type de microorganisme sur le rendement de biodégradation des deux pesticides, une comparaison par l'essai de respirométrie manométrique a été réalisée.

La modélisation du phénomène de biodégradation de la bifenthrine par les champignons a été réalisée par la méthodologie des plans d'expériences.

### VII.1. Etude de la dégradation des pesticides par les bactéries

La première partie des essais a concerné les bactéries répertoriées sous les désignations *SC7*, *SD7*, *SE6*, *SE7*, isolées à partir des eaux résiduaires de Oued El-Harrach, au sein de notre laboratoire par Hamdi [101], ainsi que la culture mixte (*SMi*) qui est le mélange des quatre souches. Le choix de ces souches se justifie par le fait qu'elles ont montré une très bonne activité de dégradation de certains polluants organiques tel que le phénol.

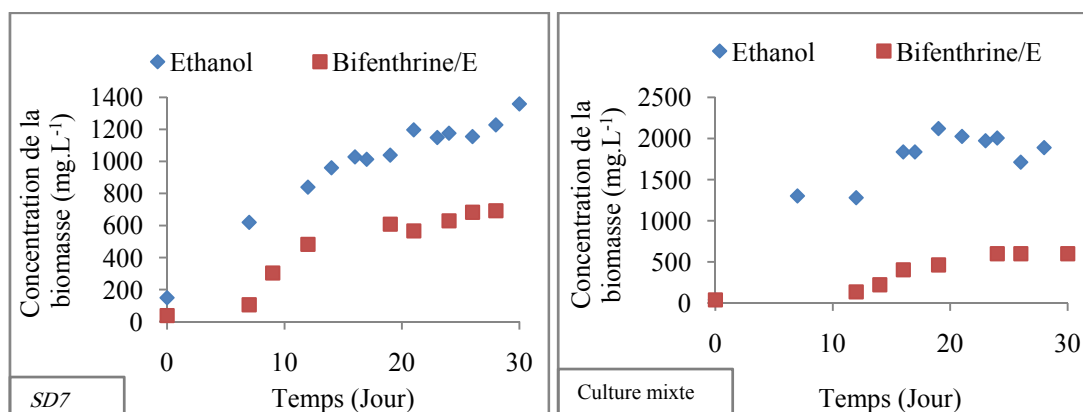
#### VII.1.1. Cas de la bifenthrine

L'étude de la dégradation de la bifenthrine par la souche la plus active *SD7* [134], et une culture mixte composée des quatre souches citées précédemment, est réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml, contenant 200 ml de milieu de culture, 1 ml de bifenthrine ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), et 2 ml de l'inoculum bactérien (préculture de 48h). Les cultures sont maintenues sous agitation à  $120 \text{ trs.min}^{-1}$  et une température de  $37^\circ\text{C}$ . Des échantillons sont prélevés à des intervalles de temps réguliers afin de mesurer l'évolution de la biomasse, et la demande chimique en oxygène. Le test de respirométrie manométrique a été effectué en parallèle.

##### VII.1.1.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse

La bifenthrine est faiblement hydrosoluble ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), et se dissout très bien dans les solvants organiques; c'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'influence du solvant sur la biodégradation. Pour faire la distinction nous avons choisi la notation de bifenthrine/E pour indiquer la bifenthrine dissoute dans l'éthanol, et garder le nom de bifenthrine pour indiquer celle dissoute dans l'eau distillée

La figure VII.1 représente la variation de la concentration de la biomasse à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 30 jours de la culture mixte et la souche *SD7*.



**Figure VII.1** – Cinétiques de croissance de la culture mixte et de la souche *SD7*.

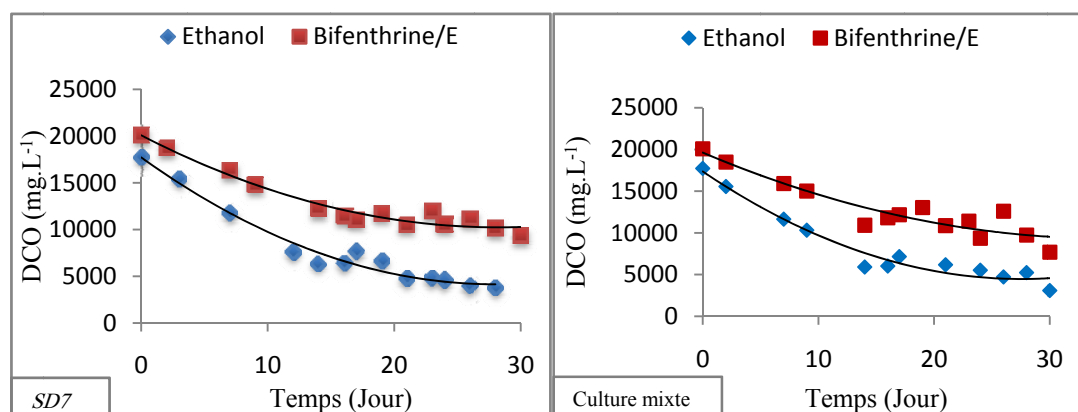
L'augmentation de la masse cellulaire indique la biodégradation de la source de carbone. On notera que la croissance est meilleure pour la culture mixte avec une concentration maximale moyenne de 1837 mg.L<sup>-1</sup> pour le blanc (éthanol à 0,95% (v/v)) et 708 mg.L<sup>-1</sup> pour la suspension d'essai atteintes au bout de 17 jours, alors que pour la souche *SD7* la concentration maximale est de 1197 mg.L<sup>-1</sup> pour le blanc et de 609 mg.L<sup>-1</sup> pour la suspension d'essai atteintes au bout de 21 jours.

Les valeurs supérieures de la culture mixte par rapport à celles de la souche *SD7* s'expliquent par l'effet synergique des souches composant la culture mixte, c'est-à-dire qu'une souche peut dégrader le composé en un produit qui peut être métabolisé par une autre sans risque de toxicité ou d'inhibition pour l'ensemble.

La culture mixte comme la souche *SD7* ont montré des valeurs inférieures pour la suspension de l'essai par rapport à l'éthanol. Selon *Salanitro et al.* (1994), ceci est dû soit au lent métabolisme des intermédiaires, soit à l'inhibition par le substrat [135,136].

#### VII.1.1.2. Etude de la biodégradation basée sur la demande chimique en oxygène

La figure VII.2, montre la variation de la demande chimique en oxygène de la culture mixte et la souche *SD7* à 37°C, pendant 30 jours.



**Figure VII.2** - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine par la culture mixte et par la souche *SD7* par mesure de la DCO.

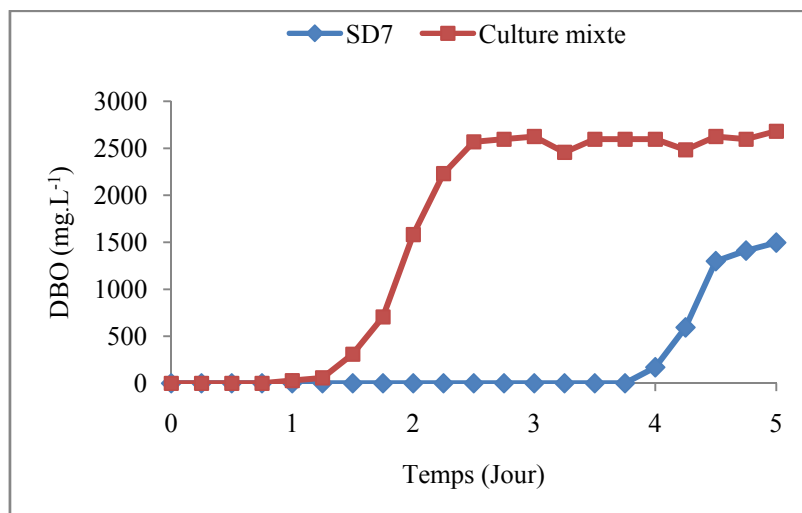
Nous pouvons constater que les deux courbes de tendances ont une allure identique et décroissante en fonction du temps et cela dès le début de l'essai. Ce qui indique la biodégradation par les souches avec les deux substrats considérés et confirme les résultats de la variation de la concentration en biomasse, avec un palier à  $10000 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $4725 \text{ mg.L}^{-1}$  atteint au bout de 18 jours pour la culture mixte comme pour la souche *SD7*. Ceci nous amène à conclure que la dégradation de la bifenthrine n'est pas arrivée au stade de la minéralisation vu que les courbes n'ont pas atteint le niveau  $0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

### VII.1.1.3. Etude de la biodégradation basée sur la respirométrie manométrique

Le test de respirométrie manométrique repose sur la mesure d'un paramètre biologique direct de la biodégradation aérobie [92]. Il ne nécessite pas de réactifs chimiques contrairement à la méthode de la demande chimique en oxygène. Il est aussi avantageux parce que c'est un essai analytique rapide et automatique [137].

On a réalisé l'essai en 5 jours ( $\text{DBO}_5$ ) pour ne prendre en compte que la dégradation de la pollution carbonée (voir chapitre "Les tests de biodégradations").

La figure VII.3 illustre, la variation de la demande biologique en oxygène de la bifenthrine à  $37^\circ\text{C}$  pendant 5 jours par la culture mixte et la souche *SD7* par respirométrie manométrique.



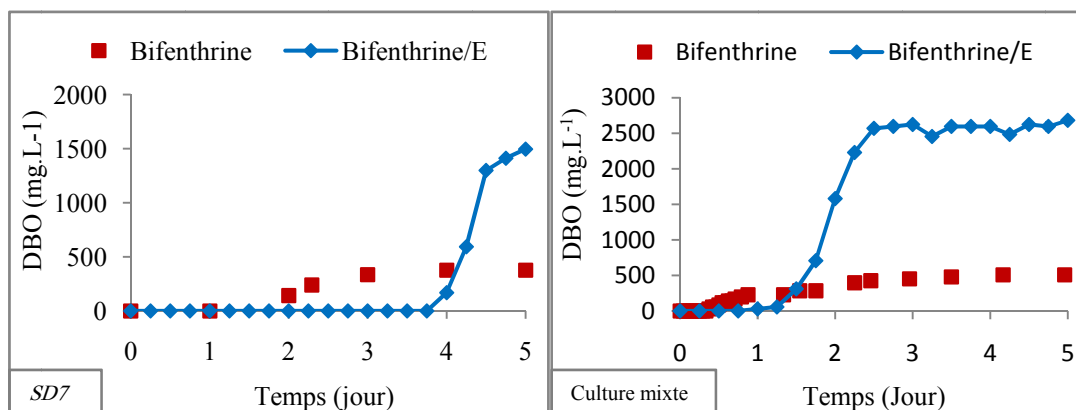
**Figure VII.3** - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine dissoute dans l'éthanol par l'essai de respirométrie manométrique.

Le maximum de la demande biologique en oxygène dans le cas de la culture mixte est de  $2597 \text{ mg.L}^{-1}$ , atteint au bout d'un temps  $t=2,25$  jours comparée à la souche *SD7* qui est de  $1411 \text{ mg.L}^{-1}$  atteint au bout d'un temps  $t=4,5$  jours. Ceci indique que la souche mixte a un potentiel de dégradation de la bifenthrine dans l'éthanol relativement plus important; ce qui confirme les résultats obtenus par le suivi de la concentration de la biomasse. Ainsi la souche mixte, donne un meilleur résultat dans le solvant considéré que la souche *SD7*.

#### VII.1.1.3.1. Effet du solvant :

Les figures VII.4, et VII.5, illustrent l'influence du solvant sur la variation de la demande biologique en oxygène à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours de la souche *SD7* et de la culture mixte par respirométrie manométrique



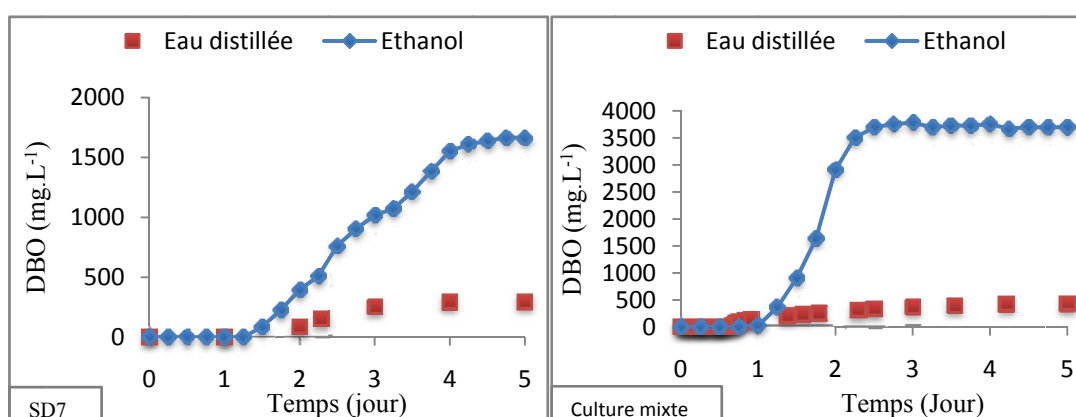


**Figure VII.4** - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine dissoute dans l'eau distillée et l'éthanol par l'essai de respirométrie manométrique.

Comme on peut le constater sur la figure VII.4, l'activité de biodégradation de la culture mixte est plus importante que celle de la souche *SD7*.

Par ailleurs, les valeurs maximales de DBO obtenues dans le cas de la bifenthrine dissoute dans l'éthanol qui sont  $1496 \text{ mg.L}^{-1}$  pour *SD7* et  $2682 \text{ mg.L}^{-1}$  pour la culture mixte sont nettement supérieures à celles de la bifenthrine dissoute dans l'eau distillée et qui sont de  $377 \text{ mg.L}^{-1}$  pour *SD7* et  $508 \text{ mg.L}^{-1}$  pour la culture mixte. Ceci s'explique par le fait que les bactéries utilisent l'éthanol qui est une source de carbone facilement dégradable en plus de la bifenthrine.

Pour mieux apprécier l'effet de l'éthanol nous présentons en figure VII.5 des essais de mesure de la DBO en absence de pesticide en comparaison avec l'eau distillée.



**Figure VII.5** - Cinétique de biodégradation sans pesticide par l'essai de respirométrie manométrique.

On peut distinguer la différence entre les valeurs de l'éthanol et celles de l'eau distillée : le maximum en présence d'éthanol est de 1665 mg.L<sup>-1</sup> pour la souche *SD7* et de 3698 mg.L<sup>-1</sup> pour la culture mixte. Par contre l'activité est quasi-nulle en présence d'eau distillée dans les deux cas. Ce résultat confirme le fait que les bactéries dégradent l'éthanol.

#### VII.1.1.3.2. Calcul des paramètres de biodégradation

D'après Boethling et Lynch [138], en plus du taux de biodégradation en fonction du temps, les termes cinétiques comme la constante de dégradation, le temps de demi-vie et la phase de latence doivent être mentionnés dans les essais de biodégradation OCDE.

Nous avons appliqué ici une cinétique du premier ordre dans la phase de dégradation et les temps de demi-vie ont été calculés par les formules suivantes :

$$DBO_r = DBO_{ult} \times e^{-k_1 t}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1}$$

Où :

- $DBO_{ult}$  : DBO ultime (mg.L<sup>-1</sup>),
- $DBO_r$  (DBO réduite) :  $DBO_{ult} - DBO$  (mg.L<sup>-1</sup>),
- $k_1$  : constante de dégradation (jour<sup>-1</sup>)
- $t_{1/2}$  : temps de demi-vie (jour).

La constante de dégradation ( $k_1$ ) est déterminée en traçant  $\ln\left(\frac{DBO_r}{DBO_{ult}}\right)$  en fonction de  $t$  ( $R^2 > 0,95$ ) [10]. Ce modèle a été beaucoup utilisé dans le passé, décrivant d'autres composés organiques [139,140].

Pour calculer le pourcentage de dégradation au cours du temps, la quantité d'oxygène consommée par la population microbienne dans la suspension du test est exprimée en pourcentage de DThO :

$$\text{Dégradation (\%)} = 100 \times \frac{DBO - DBO_{blanc}}{DThO}$$

Où DBO est la demande biologique en oxygène dans la suspension du test ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $\text{DBO}_{\text{blanc}}$  est la demande biologique dans le témoin ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) et DThO est la demande théorique en oxygène requise pour que le composé soit complètement minéralisé et elle est égale à la DCO au temps  $t=0$  (voir annexe1).

Les différents calculs sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau VII.1** - Paramètres de dégradation de la bifenthrine dans l'eau et l'éthanol par respirométrie manométrique par la culture mixte et la *SD7*.

Paramètre Souches	Substrat	Dégradation (%)	Phase de latence (jour)	$k_1$ ( $\text{jour}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (jour)
<i>SD7</i>	Ethanol	7,74	3,56	0,603	1,658
	Bifenthrine	5,23	0	0,054	18,519
	Bifenthrine/E	6,04	1,54	0,284	3,521
culture mixte	Ethanol	18,48	1,29	1,368	0,734
	Bifenthrine	5,29	0	0,138	7,246
	Bifenthrine/E	11,24	1,25	0,903	1,07

Après un temps initial de latence variant entre 1,54 et 3,56 jour pour *SD7* et entre 0,46 et 1,29 jour pour *SMi* (voir tableau VII.1), reflétant le temps requis pour la synthèse des enzymes métaboliques spécifiques et/ou pour la croissance de l'espèce capable de métaboliser le composé cible [141,142], la souche *SD7* a montré une plus faible activité de dégradation de la bifenthrine par rapport à la culture mixte. D'autre part, les taux de dégradation de la bifenthrine dissoute dans l'eau distillée qui sont 5,23% et 5,29% respectivement pour la souche *SD7* et la culture mixte sont inférieurs à ceux de l'éthanol seul qui sont 7,74% et 18,4% et ceux de la bifenthrine dissoute dans l'éthanol qui sont 6,04% et 11,24%. L'hydrosolubilité limitée de la bifenthrine influence considérablement sa biodisponibilité pour les microorganismes ; ce qui favorise les risques de transfert de cette substance et le risque de pollution des eaux par accumulation.

Une des conditions de l'essai normalisé de l'OCDE pour que le composé soit classé facilement biodégradable, est qu'il doit atteindre un taux de biodégradation de 60% après un temps de latence de 10%, c'est la raison pour laquelle nous avons calculé ce paramètre [88].

Les valeurs inférieures du temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) pour la culture mixte par rapport à la souche *SD7*, indique une plus grande affinité de biodégradation de la culture mixte pour les substrats considérés [10].

Dans la littérature plusieurs valeurs de la constante  $k_1$  ont été publiées pour différents produits chimiques tel que le benzène, le chlorobenzène, 4-chlorophénol, méthyl parathion, nitrilotriacétique acide (NTA) [85]. La constante de dégradation du premier ordre varie entre 0,01 et 4,8 jour<sup>-1</sup> ce qui en accord avec nos résultats. La plupart des différences rapportées étaient dues à la quantité et à la qualité de l'inoculum utilisé [143].

#### VII.1.1.4. Conclusion :

Globalement la biodégradation de la bifenthrine par les bactéries est très faible que ce soit en culture pure ou en culture mixte. Comparée à la culture mixte avec un taux de 11,24%, la souche *SD7* a montré une plus faible dégradation de la bifenthrine dissoute dans l'éthanol avec un taux de 6,04%, ce qui signifie que les bactéries peuvent être plus efficaces en culture mixte qu'en souche libre (*SD7*). D'après Mo et al. (1997) ceci s'explique par le fait qu'une souche dégrade le composé en un produit qui peut être dégradé à son tour par une autre [135].

La dégradation de la bifenthrine par la culture mixte a été accrue de 5,29% à 11,24 % par la présence d'un composé organique facilement dégradable. Ce résultat a aussi été trouvé par Sarkar et al. (2009) pour la biodégradation d'un pesticide (propagite) par *Pseudomonas putida* avec le glucose comme co-substrat [144].

Dans notre expérience il a aussi été observé que la présence de l'éthanol dans la suspension du test augmente la dégradation de la bifenthrine par la souche pure (*SD7*) de 5,23% à 6,04%. Ceci est dû au fait que l'addition de la matière organique facilement métabolisée telle que l'éthanol augmente la biodégradation des composés récalcitrants qui ne sont pas habituellement employés comme sources de carbone et d'énergie par les micro-organismes [145].

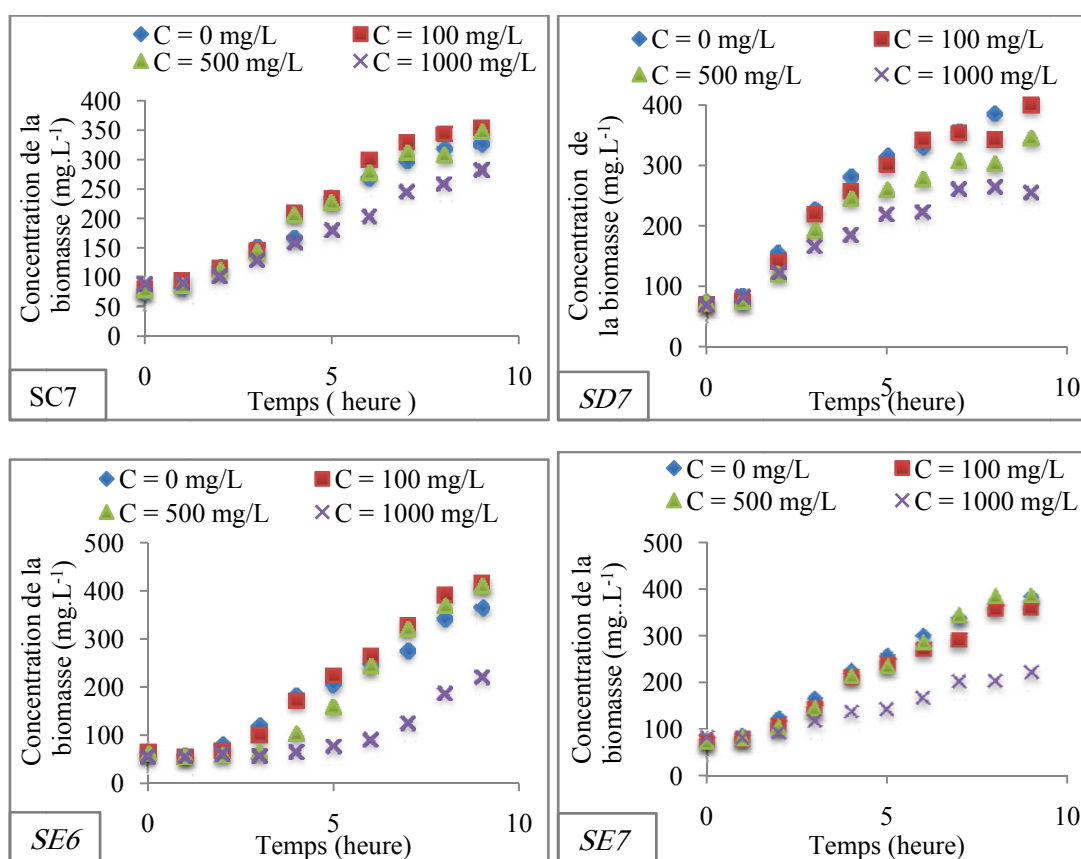
#### VII.1.2. Cas de la métribuzine

Afin de comparer les résultats obtenus avec la bifenthrine, nous avons réalisé des essais de biodégradation de la métribuzine par les quatre souches bactériennes. L'essai d'évolution de la biomasse est réalisé dans des erlenmeyers de 250 mL, contenant 200 mL de milieu de culture, 1 ml de métribuzine à différentes concentrations (0, 100, 500 et 1000 mg.L<sup>-1</sup>), et 2 ml de l'inoculum bactérien (préculture de 48h). Les cultures sont maintenues sous agitation à 120 trs.min<sup>-1</sup>, et une température de 37°C. Des échantillons sont prélevés à des intervalles de temps réguliers afin de mesurer la croissance bactérienne.

## VII.1.2.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse

La cinétique de croissance des souches *SC7*, *SD7*, *SE6*, *SE7* sur bouillon nutritif est suivie en présence de différentes concentrations (0, 100, 500 et 1000 mg.L<sup>-1</sup>) en métribuzine (Figure VII.6). Des échantillons sont prélevés à des intervalles réguliers afin de mesurer la concentration en biomasse.

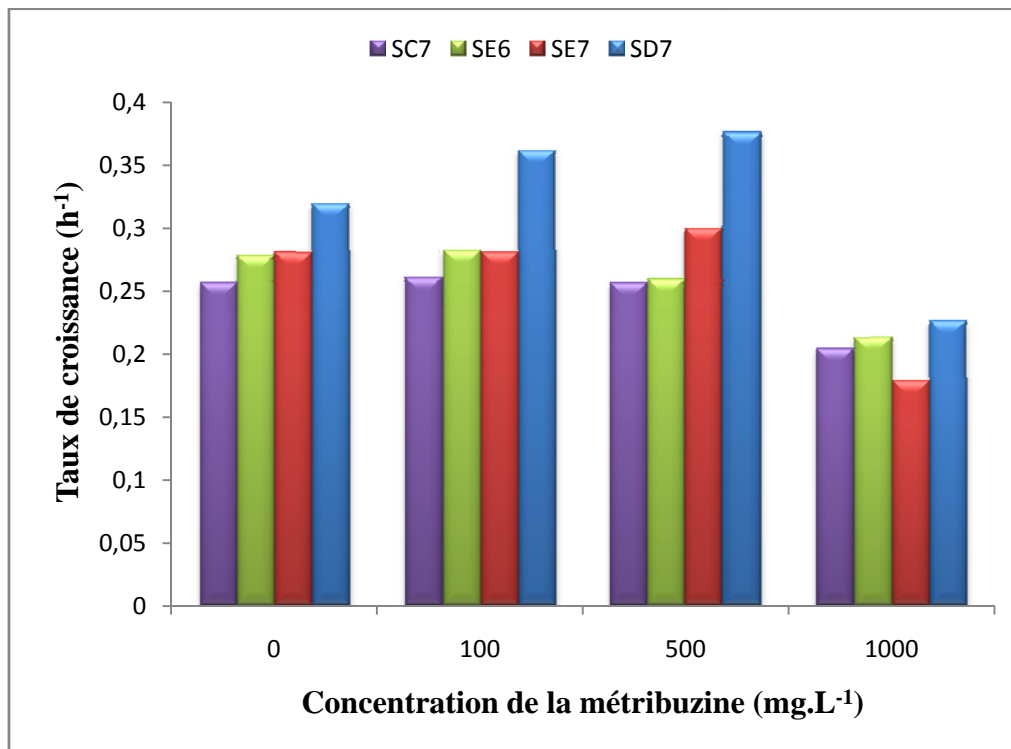
La figure VII.6 illustre l'effet de la concentration initiale en métribuzine sur la variation de la concentration en biomasse des quatre souches bactériennes à 37°C pendant 9 heures dans le cas où le milieu de croissance est le bouillon nutritif.



**Figure VII.6** - Cinétique de croissance des souches *SC7*, *SD7*, *SE7*, *SE6* à différentes concentrations en métribuzine.

En observant la figure, on peut remarquer que l'écart entre les courbes pour les trois concentrations 0, 100, 500 mg.L<sup>-1</sup> en métribuzine, est relativement faible avec une concentration maximale en biomasse ne dépassant pas les 400 mg.L<sup>-1</sup>. Une concentration élevée égale à 1000 mg.L<sup>-1</sup> en métribuzine conduit inéluctablement à l'inhibition des cellules; ceci est dû à l'effet toxique du pesticide à forte concentration.

Grâce à ces courbes nous pouvons déterminer le taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) représenté sur la figure suivante.



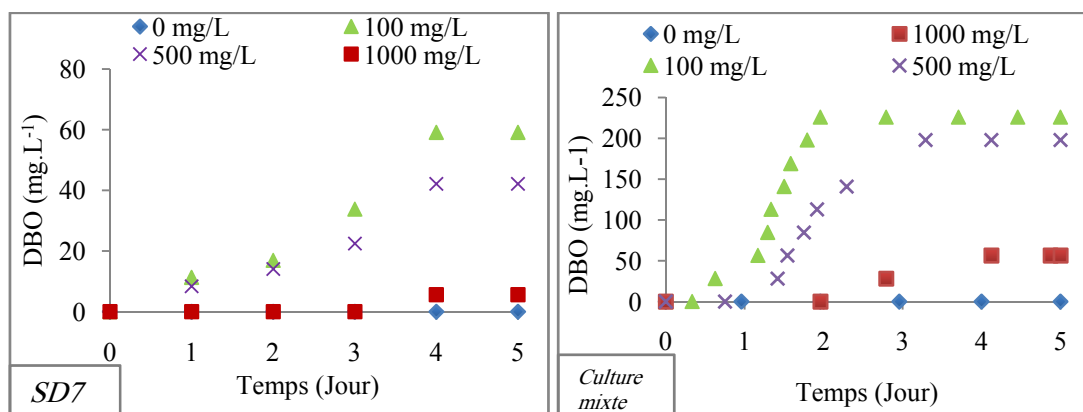
**Figure VII.7** - Taux de croissance des souches *SC7*, *SD7*, *SE6*, *SE7* à différentes concentrations initiales en métribuzine.

La croissance est facilitée par la forte solubilité de la métribuzine qui est de 1,05 g.L<sup>-1</sup>. La meilleure croissance est celle de la souche *SD7*. Elle est maximale pour une concentration initiale en métribuzine comprise entre 200 et 400 mg.L<sup>-1</sup>.

Sur la base de ce dernier résultat nous allons poursuivre les essais en considérant la souche *SD7* et la culture mixte, en utilisant le respiromètre Oxitop pour la mesure de la biodégradation.

#### VII.1.2.2. Etude de la biodégradation basée sur la respirométrie manométrique

Nous avons effectué des essais de respirométrie manométrique sur milieu minérale en gardant les mêmes conditions opératoires. Le résultat est indiqué sur la figure VII.8.



**Figure VII.8** - Cinétique de biodégradation de la métribuzine à différentes concentrations initiales par l'essai de respirométrie manométrique.

On remarque que les valeurs de la demande biologique en oxygène de la culture mixte sont quatre fois supérieures à celles de la souche *SD7*. Ceci peut s'expliquer par l'effet synergique des souches dans la culture mixte. La DBO obtenue avec la souche *SD7* varie de façon décroissante allant de 100, 500, 1000, et enfin 0 mg.L<sup>-1</sup>. On constate que pour une concentration de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, le métabolisme de la souche est inhibé, alors que pour la culture mixte elle varie de façon décroissante allant de 100, 500, 1000, 0 mg.L<sup>-1</sup> et l'inhibition par la forte concentration n'apparaît pas; ceci est aussi dû à l'effet synergique des souches.

Les différents paramètres de dégradation associés à l'essai respirométrie manométrique sont représentés dans le tableau suivant.

**Tableau VII.2** - Paramètres de biodégradation de la métribuzine par le test de respirométrie manométrique par la culture mixte et la *SD7*.

Souche	Paramètre	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	Dégradation (%)	Phase de latence (jour)	k <sub>1</sub> (jour <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (jour)
<i>SD7</i>		100	18,82	4	0,275	3,636
		500	7,06	0	0,237	4,219
		1000	0,47	0	/	/
Culture mixte		100	47,25	2,876	0,247	4,048
		500	33,12	1,527	2,901	0,344
		1000	3,75	0	0,775	1,290

Comme on peut le noter sur le tableau, la valeur maximum du taux de dégradation obtenue avec la culture mixte est 47,25, et 18,82% pour la souche *SD7*, alors que pour la bifenthrine elle est de 5,23% pour la culture mixte et 5,29% pour la souche *SD7*. Ceci montre l'effet de la nature chimique du pesticide utilisé sur les bactéries.

Des résultats préliminaires de divers genre d'arthrobacter et de pseudomonas ont montré un taux moyen de disparition de la métribuzine d'environ 20% comparé au témoin non inoculé [146], alors que Memić et al. (2004), ont indiqué que la biodégradation de la métribuzine à une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup> ne dépasse pas les 50 % en utilisant une boue activée [147].

### **VII.1.2.3. Conclusion**

A travers les résultats obtenus, nous pouvons conclure que la métribuzine est plus biodégradable par les souches utilisées avec un taux maximum de 47,25% pour la culture mixte et 18,82% pour la souche *SD7* par rapport à la bifenthrine avec un taux de 5,29% pour la culture mixte et 5,23% pour la souche *SD7*.

Les taux de biodégradation les plus élevés de la métribuzine ont été déterminés pour la souche mixte et pour une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup>. Ceci montre l'effet de la concentration initiale en pesticide et l'effet synergique des souches sur le phénomène de biodégradation.



## VII.2. Étude de la dégradation des pesticides par les champignons

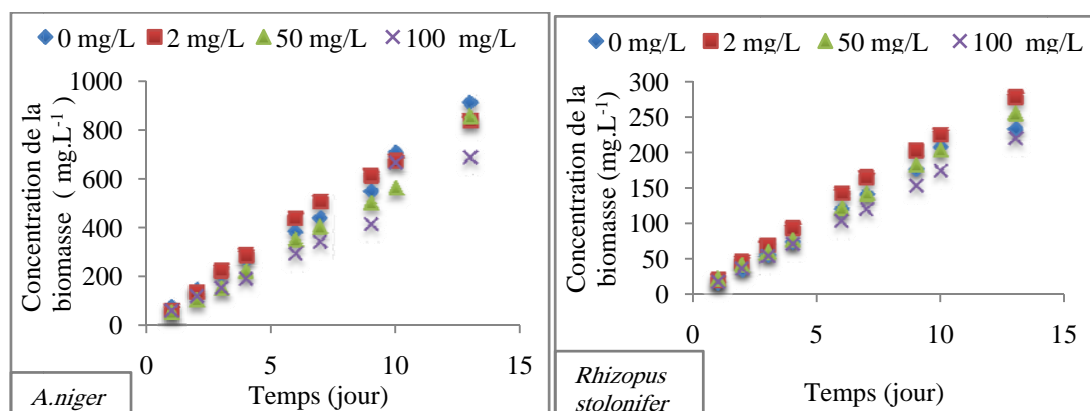
Dans la présente partie du chapitre, le phénomène de biodégradation de la bifenthrine et de la métribuzine a été abordé en utilisant la mesure de la demande chimique en oxygène, la respirométrie manométrique et l'évolution de la concentration de la biomasse. Deux souches fongiques ont été comparées: *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* afin de déterminer l'influence de la souche sur le taux de dégradation.

### VII.2.1. Cas de la bifenthrine

#### VII.2.1.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse

Les essais sont réalisés dans des erlenmeyers de 100 millilitres, contenant 50 millilitres de milieu de culture YMA auquel on a ajouté 1 millilitre de bifenthrine pour atteindre des concentrations croissantes égales à 2, 50, 100 mg.L<sup>-1</sup> et un témoin à 0 mg.L<sup>-1</sup>, à l'aide d'un filtre seringue. Les cultures sont maintenues sous agitation à 120 trs.min<sup>-1</sup> à une température de 30°C. Les erlenmeyers ont été inoculés par deux souches de champignons, quatre avec *A.niger* et quatre avec *Rhizopus stolonifer*.

La figure VII.9 illustre, l'effet de la concentration initiale en pesticide sur la variation de la concentration en biomasse de deux souches fongiques (*Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer*) à 30°C pendant 14 Jours.



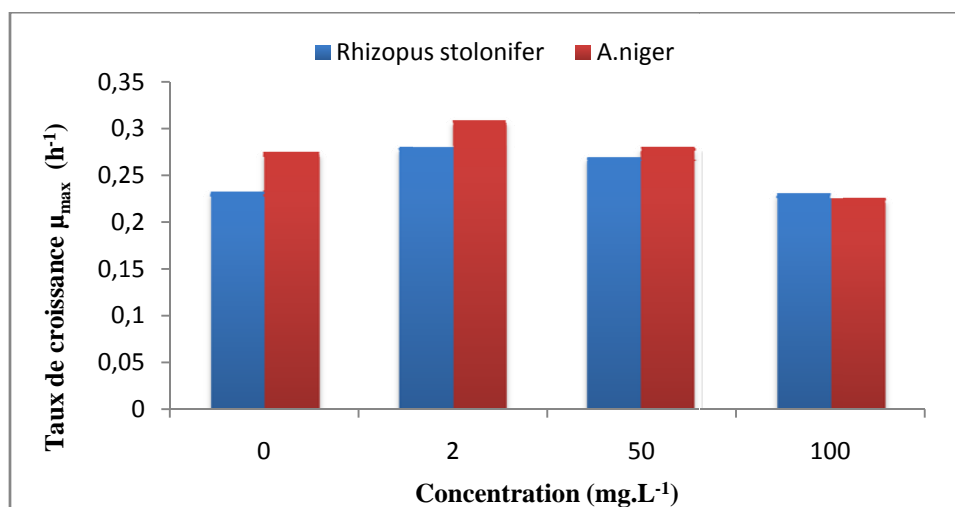
**Figure VII.9** - Cinétiques de croissance de la souche *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* à différentes concentrations en bifenthrine

Sur la figure VII.9 on peut observer un développement rapide, ce qui indique que le phénomène de biodégradation a lieu. On notera que la croissance est meilleure pour la souche *A.niger* atteignant une biomasse de 900 mg.L<sup>-1</sup> en 14 jours, alors que pour la souche *Rhizopus*

les valeurs ne dépassent pas les 300 mg.L<sup>-1</sup> pour la même durée. La différence est due aux caractéristiques métaboliques spécifiques à chaque souche.

Globalement, la bifenthrine ne montre pas d'effet inhibiteur de la croissance des deux champignons pour l'ensemble des concentrations considérées. Un léger abattement peut néanmoins être constaté pour la plus élevée des concentrations (100 mg.L<sup>-1</sup>).

Grâce à ces courbes nous pouvons déterminer le taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) représenté sur la figure suivante (Figure VII.12).



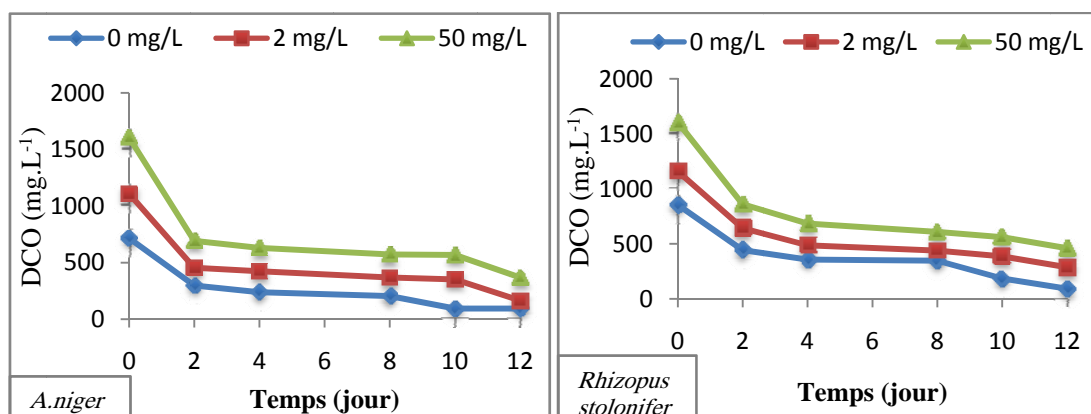
**Figure VII.10** - Taux de croissance des souches *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* à différentes concentrations initiales en bifenthrine.

Une légère différence en faveur des concentrations de 2 et 50 mg.L<sup>-1</sup> justifie le choix de ces concentrations dans la suite de l'étude.

#### VII.2.1.2. Etude de la cinétique de biodégradation par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* basée sur la demande chimique en oxygène

La détermination du pourcentage de dégradation par la méthode Zahn-Wellens s'est faite par mesure de la demande chimique en oxygène par prélèvement de 0,5 mL des suspensions d'essai.

La figure VII.11, montre la variation de la demande chimique en oxygène de la souche *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* à 30°C, pendant 12 jours [148], à des concentrations de 0, 2, 50 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figure VII.11** - Cinétique de dégradation de la bifenthrine par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* par mesure de la demande chimique en oxygène.

Nous pouvons constater que les courbes ont une allure décroissante rapide jusqu'au temps  $t=2$  jours en fonction du temps et cela dès le début de l'essai, ce qui confirme les résultats de la variation de la concentration en biomasse, avec un palier à 238, 423, 630  $\text{mg.L}^{-1}$  pour *Aspergillus niger* et 375, 487, 685  $\text{mg.L}^{-1}$  pour *Rhizopus stolonifer* respectivement pour des concentrations de 0, 2, 50  $\text{mg.L}^{-1}$  en bifenthrine atteint au temps  $t=4$  jours.

Le taux de biodégradation se calcule par la formule de Zahn-Wellens [97] qui est la suivante :

$$D_t = \left[ 1 - \frac{C_t - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100$$

Où :

$D_t$  = pourcentage de dégradation à l'instant  $t$  ;

$C_A$  = concentration de la DCO dans la suspension d'essai, mesurée après 3 h  $\pm$  30 min d'incubation (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ;

$C_t$  = concentration moyenne de la DCO dans la suspension d'essai au temps  $t$  (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ;

$C_B$  = concentration moyenne de la DCO dans les témoins au temps  $t$  (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ;

$C_{BA}$  = concentration moyenne de la DCO dans les témoins mesurée après 3 h  $\pm$  30 min. d'incubation (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

Le tableau VII.3 représente les paramètres de biodégradation associés au test de la DCO.

**Tableau VII.3** - Paramètres de dégradation de la bifenthrine à une concentration de 50  $\text{mg.L}^{-1}$  par la méthode de la DCO par *A.niger* et *Rhizopus stolonife* [88,97].

Paramètre	Dégradation (%)	Phase de latence (jour)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	70	0,66
<i>A.niger</i>	87,5	0,64

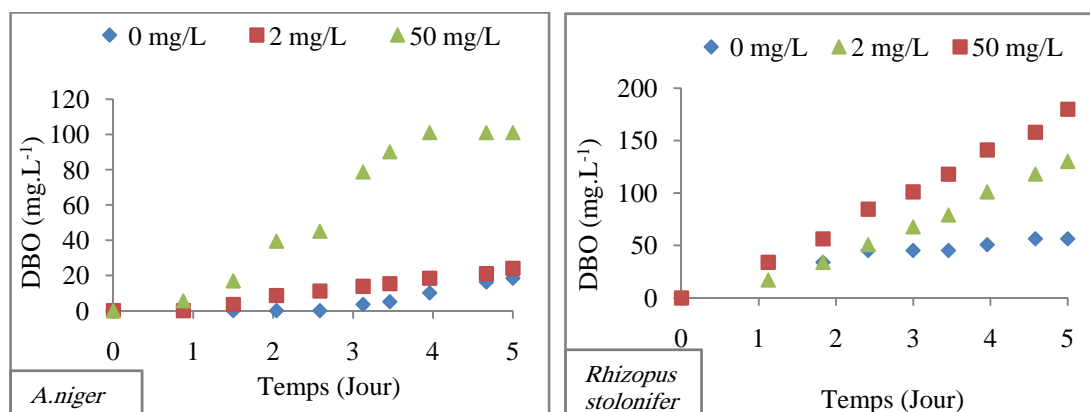
On note d'après le tableau VII.3 que pour une concentration initiale de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  le temps de latence est de 0,66 jours pour *Rhizopus stolonifer* et est de 0,64 jours pour *A.niger*. Ceci signifie qu'à cette concentration, *A.niger* et *Rhizopus stolonifer*, ont une vitesse d'adaptation équivalente.

La biodégradation de la souche *A.niger* est légèrement meilleure que celle de la souche *Rhizopus stolonifer*. Pour un temps  $t = 12$  jours, alors que *A.niger* dégrade à 87,5%, *Rhizopus stolonifer* dégrade à 70 %.

L'élimination des polluants par les champignons a été étudiée par plusieurs auteurs. Ils ont constaté que la demande chimique en oxygène est réduite par des cultures mixtes d'*A.niger* et *corylophilum*, *A.awamori* et *Trichoderma reese*, et des cultures pures de *Penicillium sp.*, *A. oryzae* et *Rhizopus oligosporus* dans les eaux usées [149,150,151,152], avec des taux compris entre 60-90% [153]. Ceci concorde avec nos résultats.

### VII.2.1.3. Etude de la cinétique de biodégradation par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* par respirométrie manométrique :

La figure VII.12 illustre, l'influence de la concentration initiale sur la variation de la demande biologique en oxygène à  $30^\circ\text{C}$  pendant 5 jours, des souches *A.niger* et *Rhizopus stolonifer*.



**Figure VII.12** - Cinétique de biodégradation de la bifenthrine par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* par respirométrie manométrique.

Comme on peut le voir sur la figure VII.12, globalement les résultats obtenus par respirométrie manométrique avec la souche *Rhizopus stolonifer* sont meilleurs que ceux obtenus avec la souche *A.niger* pour 2 et 50 mg.L<sup>-1</sup>. D'autre part, les valeurs de la demande biologique en oxygène enregistrées avec le témoin (0 mg.L<sup>-1</sup> en bifenthrine) qui sont 56,3 mg.L<sup>-1</sup> pour *Rhizopus stolonifer* et 21,1 mg.L<sup>-1</sup> pour *A.niger* dans le cas de la bifenthrine sont liées à la respiration endogène.

**Tableau VII.4** - Paramètres de dégradation de la bifenthrine à une concentration de 50 mg.L<sup>-1</sup> par respirométrie manométrique de la souche *A.niger* et *Rhizopus stolonifer*.

Paramètre Souches	Dégradation (%)	Phase de latence (jour)	k <sub>1</sub> (jour <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (jour)
<i>A.niger</i>	82,5	1,118	0,245	2,830
<i>Rhizopus stolonifer</i>	73,7	2,569	0,251	2,762

Après un temps initial de latence de 1,118 jour pour *A.niger* et de 2,569 jour pour *Rhizopus stolonifer* (voir tableau VII.4), en 5 jours, les deux souches fongiques arrivent à biodégrader la bifenthrine à des taux respectifs de 82,5 et 73,7%. Ceci indique que la souche *A.niger* a un meilleur potentiel de dégradation de la bifenthrine que *Rhizopus stolonifer* et confirme les résultats précédemment obtenus avec la variation de la concentration en biomasse et l'évolution de la demande chimique en oxygène.

Des résultats semblables ont été obtenus par *Osman et al.* (2008) qui ont noté des taux de dégradation du dicofol variant entre 84 et 87 % après un temps t = 3 jours par deux souches pures de champignons [154].

#### VII.2.1.4. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que le suivi de l'évolution des paramètres biologiques telles que la concentration en biomasse, la demande biologique en oxygène ainsi que la demande chimique en oxygène permet de mettre en évidence le phénomène de biodégradation par les champignons vis-à-vis de la bifenthrine, d'une part. D'autre part la dégradation rapide dès le commencement de l'essai. Ce résultat est en accord avec beaucoup de recherches qui ont porté sur la cinétique de dégradation des pesticides dans le sol [155,156].

Le taux de biodégradation par respirométrie manométrique le plus élevé a été observé avec la souche *A.niger* qui a donné un taux égale à 82,5% par rapport à *Rhizopus stolonifer* qui est de 73,7%, et par rapport aux bactéries qui est 11,24% pour la culture mixte et 6,04% pour la souche *SD7*.

Les taux de dégradation obtenus par la méthode de la demande chimique en oxygène sont en accord avec ceux obtenus par respirométrie manométrique et ceux de la concentration en biomasse.

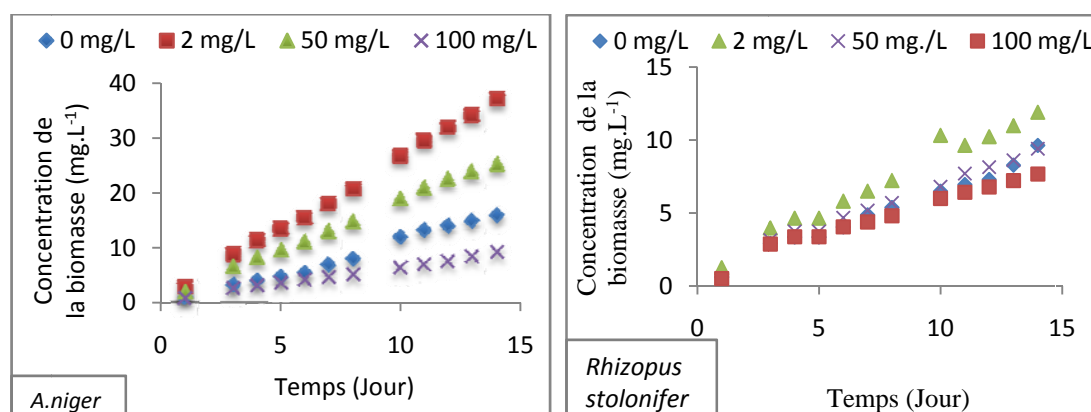
A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les champignons testés sont plus efficaces en ce qui concerne la diminution de la concentration de la bifenthrine comparés aux bactéries.

## VII.2.2. Cas de la métribuzine

### VII.2.2.1. Etude de la biodégradation basée sur la concentration en biomasse

Les essais sont réalisés dans les mêmes conditions que ceux du paragraphe VII.2.1.1.

La figure VII.13 illustre, l'effet de la concentration initiale en pesticide sur la variation de la concentration en biomasse des deux souches fongiques à 30°C pendant 14 Jours.



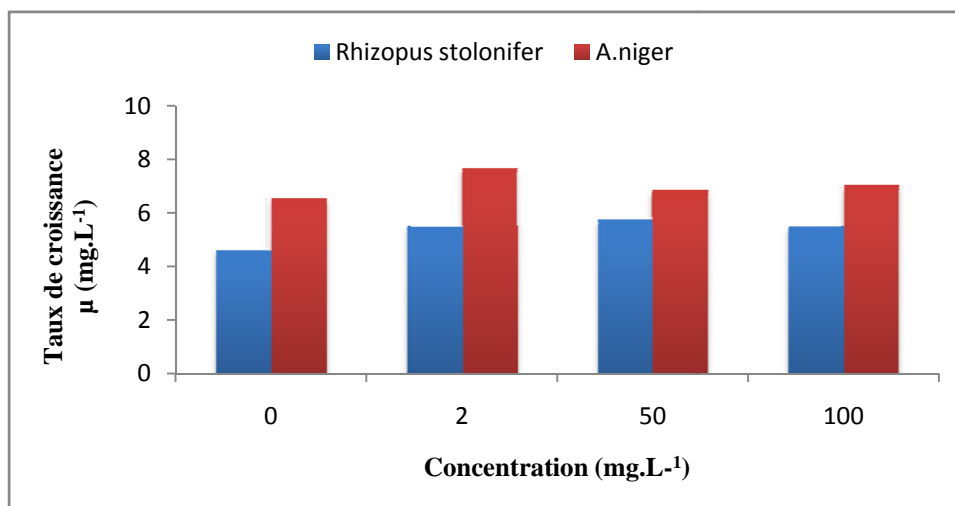
**Figure VII.13** - Cinétiques de croissance de la souche *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* à différentes concentrations en métribuzine.

L'effet activateur ou inhibiteur du pesticide dépend de la concentration. Ces effets s'observent par rapport à la courbe témoin (0 mg.L<sup>-1</sup>). Pour les deux souches, la croissance est meilleure en présence de 2mg.L<sup>-1</sup> de pesticide.

La croissance est par contre inhibée pour la concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

On remarque que pour la souche *A.niger* à 50 mg.L<sup>-1</sup> en métribuzine la courbe de croissance ne se confond pas avec celle de 0 mg.L<sup>-1</sup> contrairement aux autres essais.

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer le taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) représenté sur la figure suivante.

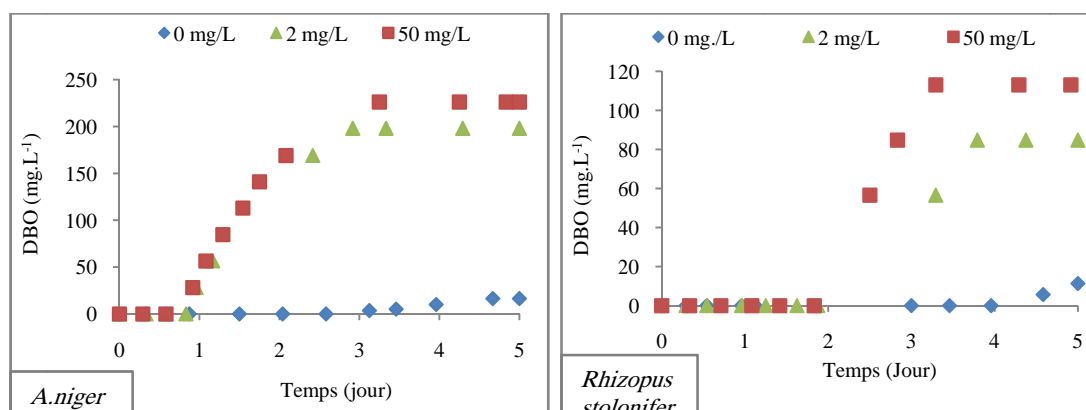


**Figure VII.14** - Taux de croissance des souches *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* à différentes concentrations initiales en métribuzine.

Le maximum du taux de croissance est noté pour des concentrations comprises entre 2 et 50 mg.L<sup>-1</sup> en métribuzine. Ce résultat confirme l'essai de l'évolution de la concentration en biomasse de la bifenthrine.

#### VII.2.2.2. Etude de la cinétique de biodégradation par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* par respirométrie manométrique.

La figure VII.15, illustre respectivement, la variation de la demande biologique en oxygène de la métribuzine ayant été en contact avec la souche *A.niger* et la souche *Rhizopus stolonifer* à 30°C pendant 5 jours, à des concentrations de 2 mg.L<sup>-1</sup>, 50 mg.L<sup>-1</sup> ainsi que l'échantillon témoin (0 mg.L<sup>-1</sup>).



**Figure VII.15** - Cinétiques de dégradation de la métribuzine par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* par respirométrie manométrique

D'après les figures VII.15 on remarque que les valeurs de la demande biologique en oxygène à 50 mg.L<sup>-1</sup> en métribuzine sont supérieures à celles de 2 mg.L<sup>-1</sup>. Ceci a été aussi observé dans l'essai avec la bifenthrine. Ce qui signifie qu'entre 0 et 50 mg.L<sup>-1</sup> la cinétique de dégradation des pesticides en question par ces champignons est fonction directe de la concentration.

**Tableau VII.5** - Paramètres de dégradation de la métribuzine par respirométrie manométrique de *A.niger* et *Rhizopus stolonifer*

Paramètre Souches	Dégradation (%)	Phase de latence (jour)	k <sub>1</sub> (jour <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (jour)
<i>A.niger</i>	69,9	0,755	1,251	0,799
<i>Rhizopus stolonifer</i>	33,9	2,446	0,348	2,874

D'après le tableau il ressort que la métribuzine est dégradée à un pourcentage de 69,9 % et 33,9 % respectivement par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* au bout de cinq jours. Ces données indiquent que la souche *A.niger* a une capacité de dégradation meilleure que celle de *Rhizopus stolonifer*.

Schilling et al.(1985) ont souligné que la métribuzine était transformée par *Rhizopus japonucus* à un taux de 100% au bout de quatre semaines, et le taux de dégradation dans les échantillons contenant *A.niger* était aux alentours de 45%. Le résultat obtenu avec *A.niger* correspond à nos données [146].

### VII.2.2.3. Conclusion :

Les résultats expérimentaux obtenus lors des essais de biodégradation montrent que la bifenthrine est mieux dégradée par les deux souches fongiques à des taux de 82,5% pour *A.niger* et 73,7% pour *Rhizopus stolonifer* que la métribuzine avec 69,9% pour *A.niger* et 33,9% pour *Rhizopus stolonifer* et que la capacité de biodégradation par les champignons est fonction de la teneur en pesticide.

Les résultats de la respirométrie manométrique viennent conforter ceux obtenus dans l'étude de la croissance fongique. Par ailleurs, c'est une concentration de 50 mg.L<sup>-1</sup> qui a donné un taux de biodégradation des plus élevés pour le test de respirométrie manométrique, alors que pour la croissance c'est à une concentration de 2 mg.L<sup>-1</sup> qu'on obtient le taux de dégradation élevé. Ceci est dû à l'effet du co-métabolisme (voir page 7 du chapitre I).



### VII.3. Plan d'expérience et modélisation

La modélisation du phénomène de biodégradation de la bifenthrine par *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* par respirométrie manométrique nécessite l'établissement d'une relation entre les variables d'entrées. Dans notre cas, les trois facteurs retenus sont:

1. Facteur 1 : Le temps de contact (jour).
2. Facteur 2 : Le potentiel hydrogène pH.
3. Facteur 3 : La concentration initiale en bifenthrine en mg.L<sup>-1</sup>

La variable de sortie est représentée, dans notre étude, par la demande biologique en oxygène.

Les niveaux haut et bas de chaque facteur sont définis comme l'indique le tableau suivant.

**Tableau VII.6. Le domaine d'étude**

Facteur	Niveau -1	Niveau +1
Temps $t_c$ (1)	1	5
pH (2)	4	8
Concentration (3)	0	50

#### VII.3.1. Construction de la matrice d'expérience (La matrice d'Hadmark) :

Pour un plan factoriel du type  $2^k$ , le nombre des essais qu'il faut réaliser est égal à 8, ces expériences sont organisées en appliquant l'algorithme d'Hadmark.

Le tableau suivant nous résume les expériences réalisées et la façon de faire varier les facteurs :

Tableau VII.7. Les essais du plan d'expérience

N° d'essai	(X <sub>1</sub> )	(X <sub>1</sub> ) (en VCR)	(X <sub>2</sub> )	(X <sub>2</sub> ) (en VCR)	(X <sub>3</sub> )	(X <sub>3</sub> ) (en VCR)
1	1	-1	4	-1	0	-1
2	5	+1	4	-1	0	-1
3	1	-1	8	+1	0	-1
4	5	+1	8	+1	0	-1
5	1	-1	4	-1	50	+1
6	5	+1	4	-1	50	+1
7	1	-1	8	+1	50	+1
8	5	+1	8	+1	50	+1

### VII.3.2. Interprétation des résultats :

A partir de ces résultats, nous pouvons déterminer les réponses (Y<sub>i</sub>) par détermination de la demande biologique en oxygène pour chaque essai. Ces réponses sont récapitulées dans le tableau suivant :

Tableau VII.8. Plan d'expérimentation utilisé dans notre étude

N° d'essai	X1	X2	X3	Réponse (Y <sub>i</sub> )	<i>A.niger</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
1	-1	-1	-1	Y <sub>1</sub>	39,55	3,8025
2	+1	-1	-1	Y <sub>2</sub>	91,15	41,6875
3	-1	+1	-1	Y <sub>3</sub>	4,05	37,5975
4	+1	+1	-1	Y <sub>4</sub>	38,75	75,3825
5	-1	-1	+1	Y <sub>5</sub>	69,45	32,2175
6	+1	-1	+1	Y <sub>6</sub>	137,85	70,0025
7	-1	+1	+1	Y <sub>7</sub>	45,25	54,6125
8	+1	+1	+1	Y <sub>8</sub>	79,85	126,2975

**VII.3.3. Application du modèle d'ordre 1 sans interaction :**

Le plan factoriel complet du type  $2^3$  utilisé dans notre étude, donne une réponse de la forme suivante :

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3$$

Les coefficients du modèle sont exprimés par la somme algébrique des réponses expérimentales  $Y_i$  affectés des signes de la colonne de la matrice X correspondant au facteur  $X_i$  divisé par le nombre d'expériences.

L'ensemble des résultats sont rapportés dans le tableau VII.9 suivant

**Tableau VII.9. Détermination des coefficients du modèle**

	Coefficient ( $a_i$ )	Valeur des $a_i$	
		<i>A.niger</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
La constante	$a_0$	64,65	56,6125
Le temps	$a_1$	22,25	21,73
Le pH	$a_2$	-19,85	16,86
La concentration	$a_3$	18,45	14,17

Le modèle mathématique retenu finalement sera le suivant :

1. *A.niger* :  $Y = 64,65 + 22,25X_1 - 19,85X_2 + 18,45X_3$
2. *Rhizopus stolonifer* :  $Y = 56,6125 + 21,73X_1 + 16,86X_2 + 14,17X_3$

Le domaine de validité du modèle est le suivant :

$$1 \text{ jour} < \text{Temps} < 5 \text{ jours}$$

$$4 < \text{pH} < 8$$

$$0 < \text{concentration} < 50 \text{ mg.L}^{-1}$$

**VII.3.3.1. Statistique de la régression du modèle**

La validité du modèle mathématique représenté par la régression linéaire a été estimée par l'approche des points suivants : l'analyse du coefficient de détermination ( $R^2$ ), l'analyse des résidus, l'intervalle de régression et de confiance, la significativité des coefficients (le test de Student), et le test de Fisher pour la validation du modèle [157].

**VII.3.3.2. Coefficient de détermination :**

La valeur du  $R^2$  fournit une mesure de la variabilité des réponses qui pourrait être expliquée par les facteurs expérimentaux [158]. Plus la valeur de  $R^2$  ajusté se rapproche de l'unité plus le modèle est adéquat aux données expérimentales et par conséquent, la différence est minime entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par le modèle [159].

$$R^2 = \frac{SCEModèle}{SCETotale} \quad [157]$$

Par application numérique, on trouve :

Pour *A.niger*  $R^2 = 0,95541156$

Pour *Rhizopus stolonifer*  $R^2 = 0,93772429$

$$R^2 \text{ ajusté} = 1 - \frac{((n-1)(1-R^2))}{(n-p)} \quad [158]$$

Pour *A.niger*  $R^2 \text{ ajusté} = 1 - ((8-1)(1-0,93772429))/(8-4) = 0,92197023$

Pour *Rhizopus stolonifer*  $R^2 \text{ ajusté} = 1 - ((8-1)(1-0,95541156))/(8-4) = 0,8910175$

**Tableau VII.10. Statistique de la régression du modèle**

Statistique de la régression	<i>A.niger</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Coefficient de détermination multiple R	0,97745156	0,96836165
Coefficient de détermination $R^2$	0,95541156	0,93772429
Coefficient de détermination ajusté $R^2$	0,92197023	0,8910175

L'examen du coefficient de détermination  $R^2$  indiquerait que 95,54% et 93,77% de la variabilité dans la réponse respectivement pour *A.niger* et *Rhizopus stolonifer* peut être expliquée par les modèles. Dans notre cas,  $R_{adj}^2 = 0,92197023$  pour *A.niger* et  $R_{adj}^2 = 0,8910175$  pour *Rhizopus stolonifer* qui sont très proche des valeurs du  $R^2$  leurs correspondant, indiquerait que les modèles sont adéquats pour décrire les données expérimentales [158].

### VII.3.3.3. Analyse de la régression :

L'examen des graphes des régressions accompagnant le modèle permettra de voir plus clairement la localisation de chaque point expérimental par rapport à sa valeur estimée [157].

Nous avons déterminé à partir du modèle les réponses  $Y_i$  et nous les avons comparées avec celles obtenues en expérimentation. Les résultats sont portés dans le tableau VII.11 suivant :

**Tableau VII.11. Comparaison des valeurs expérimentales et estimées**

<i>A.niger</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
$Y_i$ (expérimentale)	$Y_i^{est}$ (estimé par le modèle)	$Y_i$ (expérimentale)	$Y_i^{est}$ (estimé par le modèle)
39,55	43,8	3,8025	3,8525
91,15	88,3	41,6875	47,3125
4,05	4,1	37,5975	37,5725
38,75	48,6	75,3825	81,0325
69,45	80,7	32,2175	32,1925
137,85	125,2	70,0025	75,6525
45,25	41	54,6125	65,9125
79,85	85,5	126,2975	109,372

Les graphes de la figure VII.16. montrent qu'effectivement le modèle proposé s'approche fortement du phénomène étudié.

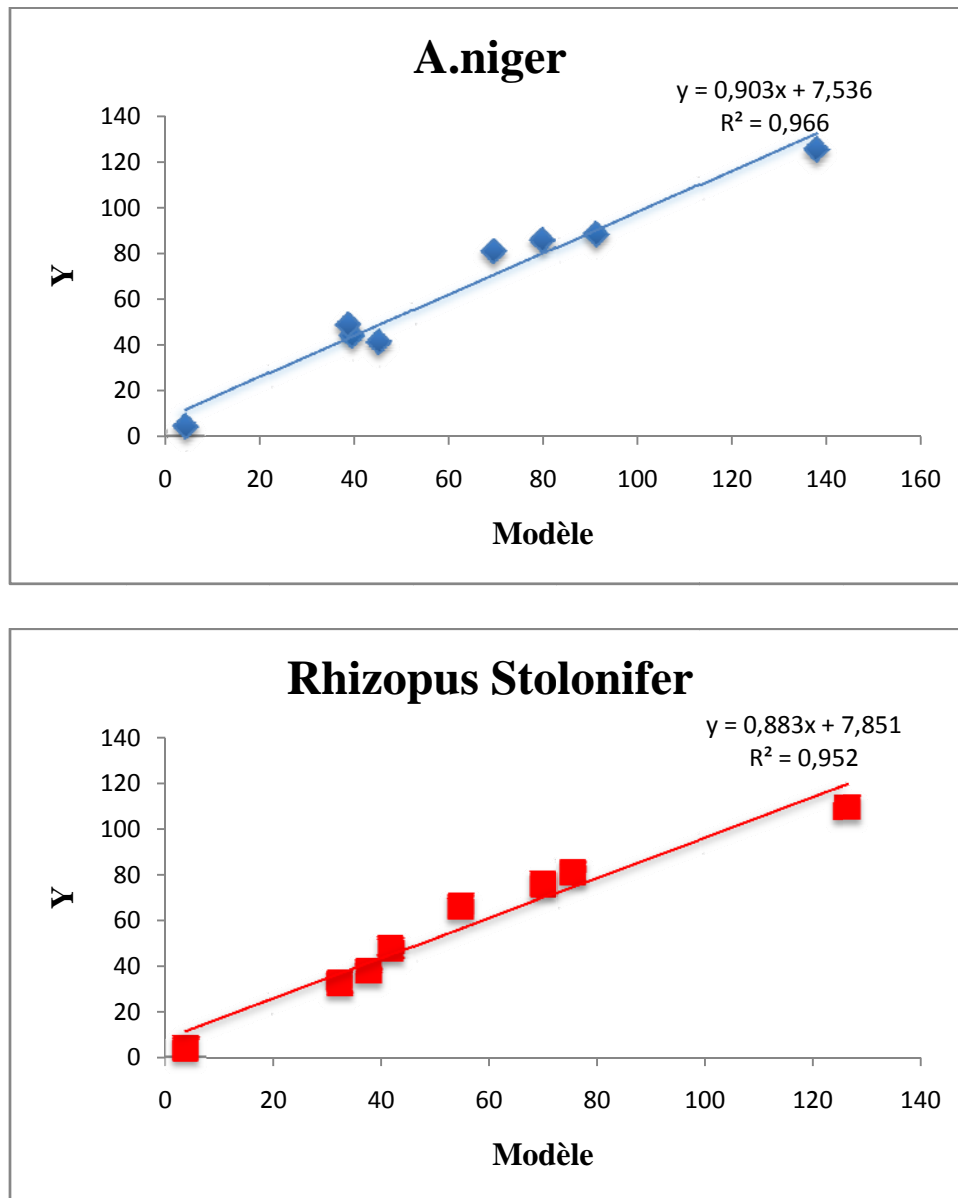


Figure VII.16. Courbes de régression

#### VII.3.3.4. Analyse des résidus :

Les résidus sont les différences entre les valeurs Y réellement observées et celles qui sont fournies par l'équation de la régression [160].

Pour un point donné, que le résidu ait une faible ou une forte valeur n'a absolument aucun rapport avec le fait que le modèle soit bon ou mauvais.

Mais bien sûr, si tous les résidus de la région sont faibles (resp. élevés), alors le modèle est bon (resp. mauvais).

D'après le tableau présenté ci-dessous, on remarque bien que les résidus ont des valeurs faibles ce qui nous confirme l'adéquation de notre modèle.

**Tableau VII.12. Analyse des résidus**

Observation	<i>A.niger</i>		Résidus	<i>Rhizopus stolonifer</i>		Résidus
	Yi (expérimentale)	Y (estimée)		Yi (expérimentale)	Y (estimée)	
1	39,55	43,8	-4,25	3,8025	3,8525	-0,05
2	91,15	88,3	2,85	41,6875	47,3125	-5,625
3	4,05	4,1	-0,05	37,5975	37,5725	0,025
4	38,75	48,6	-9,85	75,3825	81,0325	-5,65
5	69,45	80,7	-11,25	32,2175	32,1925	0,025
6	137,85	125,2	12,65	70,0025	75,6525	-5,65
7	45,25	41	4,25	54,6125	65,9125	-11,3
8	79,85	85,5	-5,65	126,2975	109,372	16,925

### VII.3. 3.5. La significativité des coefficients du modèle postulé

Pour effectuer l'évaluation statistique de la significativité des coefficients  $a_i$  on utilise le test de Student :

Si  $t_i > t_c$ , le coefficient est significatif; sinon il est rejeté du modèle.

$t_i$  : le coefficient de Student calculé

$t_{crit}$  : le coefficient de Student critique ou tabulée.

- La valeur  $t_{crit}$  est déterminée par une lecture sur la table de Student à  $(n-p)$  degrés de liberté et avec un seuil de confiance = 95%
- L'intervalle de confiance de tout coefficient est donné par :

$$a_i \pm t_{crit} * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$n$  : le nombre d'expériences réalisés dans notre cas  $n=8$

$p$  : le nombre de coefficient du modèle, pour notre étude  $p=4$ .

$S$  : l'écart type.

On dit qu'un coefficient est significatif s'il appartient à cet intervalle.

**VII.3.3.5.1. Calcul de la variance :**

$$S^2 = \frac{1}{n-p} \cdot \sum e_i^2$$

$e_i$  : étant le résidu,

1. Pour *A.niger*

$$\sum e_i^2 = 459,78, S^2 = 114,945$$

$$S_i^2 = \frac{S^2}{n}, S_i^2 = \frac{114,945}{8}, S_i = 3,79053097.$$

2. Pour *Rhizopus stolonifer*

$$\sum e_i^2 = 509,635, S^2 = 127,40875$$

$$S_i^2 = \frac{S^2}{n}, S_i^2 = \frac{127,40875}{8}, S_i = 3,99075103$$

**VII.3.3.5.2. Calcul des coefficients de Student :**

Les valeurs calculées des coefficients de Student sont égales à :

1. Pour *A.niger*

$$t_{a0} = \frac{|a_0|}{S_i} = 64,65/3,79053097 = 17,0556581$$

$$t_{a1} = \frac{|a_1|}{S_i} = 22,25/3,79053097 = 5,86989005$$

$$t_{a2} = \frac{|a_2|}{S_i} = 19,85/3,79053097 = 5,23673337$$

$$t_{a3} = \frac{|a_3|}{S_i} = 18,45/3,79053097 = 4,86739197$$

2. Pour *Rhizopus stolonifer*

$$t_{a0} = \frac{|a_0|}{S_i} = 56,6125/3,99075103 = 14,1859263$$

$$t_{a1} = \frac{|a_1|}{S_i} = 21,73/3,99075103 = 5,44509037$$



$$t_{a2} = \frac{|a_2|}{S_i} = 16,86/3,99075103 = 4,22476869$$

$$t_{a3} = \frac{|a_3|}{S_i} = 14,17/3,99075103 = 3,5507101$$

La valeur tabulée du coefficient de Student retenue avec quatre degrés de liberté : d.d.l.=(n-p)=4 et avec un seuil de confiance de 95% est égale à  $t_{crit} = 2,132$

La condition  $t_i > t_{crit}$  est vérifié, donc on peut dire que les facteurs considérés influent.

### VII.3.3.5.3. Intervalle de confiance des coefficients :

En se basant sur la formule  $a_i \pm t_{crit} * \frac{S}{\sqrt{n}}$ , nous avons déterminé l'intervalle de confiance des

coefficients du modèle :

1. Pour *A.niger* :

$$a_0 \pm 2,132 * \frac{10,7212406}{\sqrt{8}} = 64,65 \pm 8,08141202, a_0 \in [56,568588, 72,731412]$$

$$a_1 \pm 2,132 * \frac{10,7212406}{\sqrt{8}} = 22,25 \pm 8,08141202, a_1 \in [14,168588, 30,331412]$$

$$a_2 \pm 2,132 * \frac{10,7212406}{\sqrt{8}} = -19,85 \pm 8,08141202, a_2 \in [-11,768588, -27,931412]$$

$$a_3 \pm 2,132 * \frac{10,7212406}{\sqrt{8}} = 6,35 \pm 8,08141202, a_3 \in [10,368588, 26,531412]$$

2. Pour *Rhizopus stolonifer* :

$$a_0 \pm 2,132 * \frac{11,28754845}{\sqrt{8}} = 56,6125 \pm 8,50828119, a_0 \in [48,1042188, 65,1207812]$$

$$a_1 \pm 2,132 * \frac{11,28754845}{\sqrt{8}} = 21,73 \pm 8,50828119, a_1 \in [13,2217188, 30,2382812]$$

$$a_2 \pm 2,132 * \frac{11,28754845}{\sqrt{8}} = 16,86 \pm 8,50828119, a_2 \in [8,35171881, 25,3682812]$$

$$a_3 \pm 2,132 * \frac{11,28754845}{\sqrt{8}} = 14,17 \pm 8,50828119, a_3 \in [5,66171881, 22,6782812]$$

Les résultats sont rapportés dans le tableau VII.13 suivant :

**Tableau VII.13. Intervalle de confiance des coefficients du modèle**

Souche	Coefficients		Statistique t		Limite inférieure pour seuil de confiance =95%		Limite supérieure pour seuil de confiance =95%	
	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi
Constante	64,65	56,612	17,055658	14,1859263	56,568588	48,1042188	72,731412	65,1207812
Variable X <sub>1</sub>	22,25	21,73	5,8698900	5,44509037	14,168588	13,2217188	30,331412	30,2382812
Variable X <sub>2</sub>	-19,85	16,86	5,2367333	4,22476869	-11,768588	8,35171881	27,931412	25,3682812
Variable X <sub>3</sub>	18,45	14,17	4,8673919	3,5507101	10,368588	5,66171881	26,531412	22,6782812

**V.3.4. Validation du modèle mathématique (l'analyse de la variance)**

L'adéquation est le degré d'approximation des résultats expérimentaux et ceux des modèles. En mathématique statistique, on utilise le critère de Fisher pour vérifier l'adéquation du modèle qui consiste principalement à comparer deux dispersions : dispersion d'adéquation résiduelle, et dispersion expérimentale.

Si  $F_{obs} > F(critique)$ , on accepte l'hypothèse H : « le carré moyen dû à la régression est significativement plus grand que le carré moyen dû aux résidus » avec la confiance 1-a; dans ce cas, la régression est globalement significative .

**Tableau VII.14. Calcul de F observé**

Numéro d'essai	Y <sub>i</sub>		Y <sub>i</sub> <sup>est</sup>		Y <sub>moy</sub>		(Y <sub>i</sub> - Y <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup>		(Y <sub>i</sub> -Y <sub>i</sub> <sup>est</sup> ) <sup>2</sup>	
	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi
1	39,55	3,8025	43,8	3,8525	63,2375	55,2	377,8164062	2636,56576	18,0625	0,0025
2	91,15	41,6875	88,3	47,3125	63,2375	55,2	628,1289063	62,2126563	8,1225	31,64062
3	4,05	37,5975	4,1	37,5725	63,2375	55,2	3497,243906	310,728756	0,0025	0,000625
4	38,75	75,3825	48,6	81,0325	63,2375	55,2	214,2564063	667,318056	97,0225	31,9225
5	69,45	32,2175	80,7	32,1925	63,2375	55,2	304,9389063	529,345056	126,5625	0,000625
6	137,85	70,0025	125,2	75,6525	63,2375	55,2	3839,351406	418,304756	160,0225	31,9225
7	45,25	54,6125	41	65,9125	63,2375	55,2	494,5064063	114,757656	18,0625	127,69
8	79,85	126,2975	85,5	109,372	63,2375	55,2	495,6189063	2934,65976	31,9225	286,455625

1. *A.niger* :

$$SCEL = \sum (Y_i^{est} - Y_{moy})^2 = 9851,86125$$

$$SCER = \sum (Y_i - Y_i^{est})^2 = 459,78$$

2. *Rhizopus stolonifer* :

$$SCEL = \sum (Y_i^{est} - Y_{moy})^2 = 7673,89245$$

$$SCER = \sum (Y_i - Y_i^{est})^2 = 509,635$$

Tableau VII.15. Analyse de la variance

Variation due à :	Somme des carrés		DDL		Carré moyen		F	
	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi	A.n	Rhi
Liaison	9851,86125	7673,89245	3	3	3283,95375	2557,96415	28,5697834	20,0768326
Résidus	459,78	509,635	4	4	114,945	127,40875		
Total	10311,6413	8183,52745	7	7				

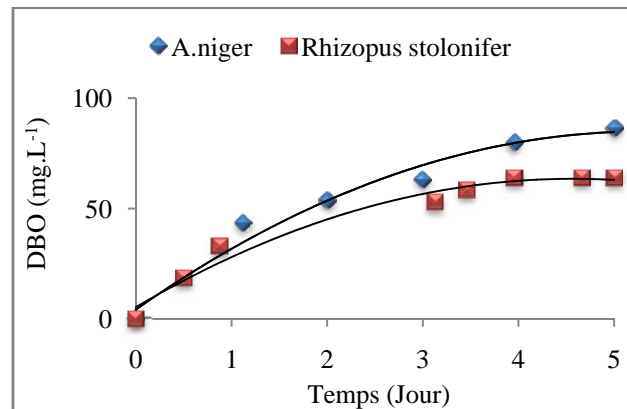
F(critique) lu sur la table de Fisher-Snedecore avec (p-1) et (n-p) degrés de liberté et un seuil de confiance =95% est de 6,59.

D'après le tableau, Fobs est égale à 28,5697834 pour *A.niger* et 20,0768326 pour *Rhizopus stolonifer*, on remarque bien que Fobs > au F(critique), l'hypothèse H est vérifiée et globalement significative.

**V.3.5. Essai confirmatif de la validité du modèle postulé**

La validité des résultats donnés par le modèle consiste à vérifier si les hypothèses retenues au départ du plan d'expérience sont bien vérifiées. La validation peut être réalisée en effectuant un essai complémentaire en dehors des essais du plan d'expérience.

Un essai au centre du domaine d'étude permet de vérifier la linéarité de la réponse. Si la réponse de cet essai est égale à la moyenne des réponses du plan d'expérience, la linéarité des facteurs est vérifiée.



**Figure VII.17.** Résultat de l'essai confirmatif au centre du domaine

$T=30^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{agitation}=180 \text{ tours/mn}$ ,  $[\text{bifenthrine}]_0 = 25\text{mg.L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=6$ .

D'après le graphe, pour les conditions opératoires citées ci dessus et un temps = 3 jours, on arrivera à une DBO =  $63,2 \text{ mg.L}^{-1}$  pour *A.niger* et  $52,7 \text{ mg.L}^{-1}$  pour *Rhizopus stolonifer*.

On outre si on remplace les coordonnées de ce point dans notre modèle on aura :

1. *A.niger* :  $Y = 64,65 + 22,25(0) - 19,85(0) + 18,45(0) = 64,65 \text{ mg.L}^{-1}$

2. *Rhizopus stolonifer* :  $Y = 56,6125 + 21,73(0) + 16,86(0) + 14,17(0) = 56,6125 \text{ mg.L}^{-1}$

On remarque bien que la réponse déterminée expérimentalement est très proche des résultats théoriques, ce qui confirme la validité de notre modèle.

### V.3.6. Conclusion :

À travers ces résultats, on peut conclure que la biodégradation de la bifenthrine dépend essentiellement, du temps de contact, du potentiel hydrogène, de la concentration initiale en bifenthrine, et aussi du type de souche.

Le plan factoriel du type  $2^k$  du premier ordre sans interaction, peut être utilisé avec succès pour décrire le phénomène de biodégradation de la bifenthrine par les champignons.

## Conclusion générale

---

Les pesticides forment un groupe important de substances chimiques qui peuvent contaminer l'écosystème aboutissant à l'exposition humaine [161,162,163,164]. Malgré les efforts pour développer des méthodes alternatives, les pesticides sont toujours le moyen de lutte prédominant et leurs résidus constituent une menace potentielle [165,166,167].

Deux pesticides ont été considérés, à savoir, la bifenthrine et la métribuzine. Les essais ont porté sur des périodes comprises entre 1 et 30 jours à température constante avec agitation. L'étude de la biodégradation des pesticides sus cités a montré l'influence de certains paramètres tels que : la nature du solvant, la nature de la souche microbienne, la nature du pesticide et la concentration initiale du pesticide.

A la lumière de tous les résultats que nous avons obtenus, nous pouvons formuler les conclusions suivantes :

L'application de différentes méthodes d'analyse telles que la mesure de la concentration en biomasse, la demande chimique en oxygène et la respirométrie manométrique ont permis de suivre les cinétiques de biodégradation.

Le modèle cinétique de premier ordre peut être utilisé avec succès pour décrire l'évolution des courbes de dégradation visant à diminuer les concentrations des pesticides dans le milieu aqueux.

Pour les bactéries, l'ajout d'un substrat en plus de la bifenthrine a fait apparaître le phénomène de dégradation par co-métabolisme.

Les valeurs du taux de dégradation obtenues illustrent les conclusions données. Ainsi pour les bactéries, ces valeurs sont : 5,23% dans l'eau et 6,04% dans l'éthanol pour la souche *SD7* et 5,29% et 11,24% pour la souche mixte pour la bifenthrine, et 0,47%, 7,06%, 18,82% pour la souche *SD7* et 3,75%, 33,12%, 45,25% pour la culture mixte respectivement pour des concentrations de 100, 500 et 1000 mg.L<sup>-1</sup> pour la métribuzine.

Le taux de dégradation le plus important est apparu dans les échantillons mis en contact avec la souche mixte; ceci nous donne une information sur l'effet synergique des souches sélectionnées.

Pour les champignons, il s'est avéré que les vitesses de dégradation des deux pesticides sont élevées dès le commencement de l'essai, avec des taux plus élevés observés pour la souche *A.niger* avec 82,5% pour la bifenthrine et 69,9% pour la métribuzine comparés à *Rhizopus*

## Conclusion générale

---

*stolonifer* pour laquelle les taux sont 73,7% pour la bifenthrine et 33,9% pour la métribuzine. Ceci montre l'influence de la nature de la souche fongique. Les taux de dégradation obtenus par la méthode de la demande chimique en oxygène sont dans le même ordre de grandeur que ceux obtenus par respirométrie manométrique concernant la bifenthrine.

Par contre, l'évolution de la concentration de la biomasse a montré un résultat inverse en ce qui concerne les concentrations et ceci pour les deux pesticides; c'est-à-dire qu'on a un maximum de biomasse pour une concentration de 2 mg.L<sup>-1</sup> en pesticide contrairement à la respirométrie manométrique où le maximum est obtenu pour une concentration de 50 mg.L<sup>-1</sup> en pesticide. Ceci est dû à l'effet du co-substrat sur le phénomène de biodégradation.

La méthodologie des plans d'expériences peut être utilisée avec succès pour l'optimisation d'un procédé de biodégradation. Elle nous a permis, à partir d'une estimation globale de la demande biologique en oxygène, de déterminer mathématiquement une relation entre la variable de sortie et les conditions opératoires.

Globalement, cette étude a permis de mettre en évidence le phénomène de biodégradation qui a eu lieu par les bactéries et les champignons, et ceci pour la bifenthrine et la métribuzine en milieu liquide, avec un meilleur taux de dégradation pour les champignons d'une part, d'autre part, elle a confirmé que parmi les tests utilisés qui permettaient de quantifier la biodégradation, la respirométrie manométrique est le test le plus avantageux par sa simplicité, son efficacité et sa précision de mesure.

Enfin cette étude se voulait une source importante d'information sur la biodégradation. Comme perspective, il serait intéressant d'intégrer des outils mathématiques pour l'estimation des biodégradations tels que le modèle de Monod avec croissance ou le modèle logistique modifié.

- [1] : K.M. Moussaoui, R. Boussahel et D. Harik. 1999. « **Pesticides et environnement : utilisation, contrôle et recherche des résidus dans l'eau et les aliments** », Bulletin international de l'eau et de l'environnement, EDIL Inf-EAU, 44 : p. 5-12.
- [2] : OMS. (1991). **L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique**, Genève.
- [3] : Cortes D.R., I. Basu, C.W. Sweet, K.A. Brice, Hoff R.M., Hites R.A. (1998). « **Temporal trends in gas-phase concentrations of chlorinated pesticides measured at the shores of great lakes** », Environmental Science and technology, Vol 32, n°13, pp. 1920-1927.
- [4] : M. O.-S.-A. Ould Kankou. 2004. « **Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie : étude en laboratoire du comportement de deux pesticides** ». Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges. France.
- [5] : Martín-Gullón I. and Font R., 2001, « **Dynamic pesticide removal with activated carbon fibers** » Wat. Res., 35:516-520 pp.
- [6] : Bourguine F., Chapman J., Martin S. (1997). « **Traitement des pesticides par photolyse UV** », TSM l'eau, n°7-8, juillet-août, pp.23-27.
- [7] : Acero J.L., Stemmler K., and von Gunten U., 2000. **Degradation kinetics of atrazine and its degradation products with ozone and OH radicals: a predictive tool for drinking water treatment**. Environ. Sci. Technol., 34:591-597 pp.
- [8] : Sénat. 2004. Disponible sur internet [www.senat.fr/rap/I02-215-2/I02-215-275.htm](http://www.senat.fr/rap/I02-215-2/I02-215-275.htm), « **Etapas et procédés de traitement des eaux usées** », Consulté en juillet 2004.
- [9] : Koplín, D.W., Nations B.K., Goolsby D.a., E. Michael Thurman., « **Acetochlor in the hydrologic system in the Midwestern United States** », Environmental Science and technology, Vol 30, n°5, 1996, pp. 1459-1464.
- [10] : Stasinakis, A.S. et al., « **Application of the OECD 301F respirometric test for the biodegradability assessment of various potential endocrine disrupting chemicals** », Bioresour. Technol. (2007), doi:10.1016/j.biortech.2007.08.002.
- [11] : Milena Eleonore Lapertot, Cesar Pulgarin, « **Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: Choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity (2006)** », doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.046.
- [12] : J.-N. Aubertot, J.-M Barbier, A. Carpentier, J.-J Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, M. Voltz, « **Pesticides, agriculture et environnement** », synthèse du rapport, 64 p, INRA et Cemagref, France, (2005).
- [13] : E. Lachuer, « **Les produits phytosanitaires** », Tome 1, Edition educagri, Dijon, (2003).
- [14] : Les pesticides, réglementation et effets sur la santé et l'environnement, capture par mémo web à partir de : [http://www.mce-info.org/Pdf/synthese\\_pesticides.pdf](http://www.mce-info.org/Pdf/synthese_pesticides.pdf)
- [15] : G.W.A. Milne « **Handbook of pesticides** », Edition Lewis publishers, USA, (1998).
- [16] : Pesticides : quels dangers ? quelles alternatives ?, capture par mémo web a partiredes : [http://www.cg44.fr/cg44/upload/docs/application/pdf/plaquette\\_pesticides.pdf](http://www.cg44.fr/cg44/upload/docs/application/pdf/plaquette_pesticides.pdf)
- [17] : R. Calvet, E. Barriusso, C. Bedos, P. Benoit, M.-P. Charnay et Y. Coquet, « **Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales** ». Edition France Agricole. France(2005).
- [18] : C. G.-B. Margoum, « **Contribution à l'étude du devenir des produits phytosanitaires lors d'écoulements dans les fosses : caractérisation physico-chimique et hydrodynamique** ». Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier - Grenoble I. France (2003).
- [19] : K. Mellanby et F. Vincent, « **Biologie de la pollution** ». Thèmes Vuibert Université Biologie. Librairie Vuibert. Paris,(1976).

- [20] : Thiollet-Scholtus, « **2004 - DEUS Gestion de l'environnement eau, sol, sous-sol** », (2004).
- [21] : M. O.-S.-A. Ould Kankou, « **Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie : étude en laboratoire du comportement de deux pesticides** ». Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges. France, (2004).
- [22] : S. Cluzeau, M.C. Paternelle, C. Lhoutellier, index phytosanitaire ACTA 2000. ISBN 2-85794-184-6.
- [23] : CEMAGREF, INRA, « **Pesticides, agriculture et environnement – Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective** ». Chapitre 2, Connaissance de l'utilisation des pesticides, 61 p, Décembre (2005).
- [24] : F. Colin, « **Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson (Gers, France)** ». Thèse de doctorat de l'ENGREF, PARIS VI, Montpellier. 233 p, (2000).
- [25] : D. Pimentel, « **Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics** ». Journal of Agricultural and Environmental Ethics. 8, 17-29, (1995).
- [26] : R. CALVET, « **Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales** ». Ed. France agricole. ISBN 2-8557-119-7. Chapitre 5 p 255, (2005).
- [27] : G.-W. BAILEY, R.-R. SWANK, H.-P. NICHOLSON, « **Predicting pesticide runoff from agricultural land : a conceptual model** ». Journal of environmental quality N° 3, p: 95-102, (1974).
- [28] : Burn A., Picarel J. et Plouzane M. (2003). « **Les sous-produits de dégradation des produits phytosanitaires** ». Office International de l'Eau.
- [29] : R. Darrache, « **Toxicité et Sécurité des Aliments** ». Librairie Lavoisier, Paris (1986).
- [30] : F. Ramade, « **Ecotoxicologie** ». 2eme Edition Masson ; Paris (1979).
- [31] : OMS, « **L'utilisation des pesticides en Agriculture et conséquences pour la santé publique** ». Genève, (1991).
- [32] : Ministry of land planning and environment. **Report on the environmental state and future**. Review n°2 pp 64 –74. Algeria 2000.
- [33] : B. Bali, « **Contribution à la mise au point d'une méthode d'extraction liquide – liquide d'un pesticide organochloré (DDT) dans l'eau** ». Mémoire de Magister, ENP Alger, (2005).
- [34] : INPV « **Instrument de développement de la protection phytosanitaire** », (1999).
- [35] : « **Utilisation d'intrants dans les exploitations agricoles en Belgique** », capture par mémo web à partir de : <http://environnement.wallonie.be/eew2000/agri/agrp1b.htm>.
- [36] : M. Gérard, R Henri, « **La qualité de l'eau et de l'assainissement en France** », Rapport 215 tome 1 (2002-2003) – Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, (2003).
- [37] : C. Courbis, « **Evaluation des potentialités de transferts des pesticides vers les eaux de surface : apports et limites d'un modèle parcellaire** », mémoire de fin d'étude, unité de recherche qualité des eaux et prévention des pollutions, Groupement de Lyon, (2006).
- [38] : J.E. Casida, G.B. Quistad, « **Golden age of insecticide research: past, present, or future?** », Annu Rev Entomol 43, 1-16, (1998).
- [39] : M. Elliott, Janes, N.F., « **Synthetic pyrethroids- a new class of insecticide** », Chem Soc Rev 7, 473-505, (1978).
- [40] : Dhananjay Kumar Tewary, Vipin Kumar, S.D. Ravindranath, Adarsh Shanker, « **Dissipation behavior of bifenthrin residues in tea and its brew** », Elsevier Ltd, doi:10.1016/j.foodcont, (2004).



- [41] : Naumann, K. Synthetic , « **Pyrethroid Insecticides: Structures and Properties** », Springer-Verlag: New York, 1990.
- [42] : Davies, J. H, « **In The Pyrethroid Insecticides; Leahey** », J. P., Ed.; Taylor & Francis: Philadelphia, pp. 1-41, (1990).
- [43] : Ruigt, G. S. F. « **In Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology: Kerkut** », G. A.; Gilbert, L. I., Eds.; Pergamon: New York, Vol. 12, Chapter 7, pp. 183-262,(1985).
- [44] : Engel, J. F.; Plummer, E. L.; Stewart, R. R.; Van Saun, W. A.; Montgomery, R. E.; Cruickshank, P. A. Harnish, W. N.; Nethery, A. A.; Crosby, G. A. In « **Proceedings of the Fifth International Congress of Pesticide Chemistry** », Miyamoto, J.; Keamey, P. C., Eds.; Pergamon: New York, p. 101, (1983).
- [45] : Royal Society of Chemistry, « **The agrochemicals handbook (3rded.)** ». Information systems. Surrey, England: Unwin brothers Ltd, (1994).
- [46] : Andrew Fecko, « **Environmental fate of bifenthrin** », Environmental Monitoring and Pest Management Branch , 830 K St. Sacramento, CA 95814, (1999).
- [47] : Miller, T.A. and V.L. Salgado. « **The mode of action of pyrethroids on insects, in The Pyrethroid Insecticides** », Leahy, J.P., Ed., Taylor & Francis, London. 43-97, (1985).
- [48] : Mokrey, L.E., K.D. Hoagland, « **Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to Daphnia magna and Ceriodaphnia dubia** », Environmental Toxicology and Chemistry. 9:1045-1051, (1989).
- [49] : Lund A.E. and T. Narahashi, « **Modification of sodium channel kinetics by the insecticide tetramethrin in crayfish giant axons. Neurotoxicology** », 2:213-219, (1981).
- [50] : Salgado V.L., S.N. Irving and T.A. Miller. « **The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects. Pesticide Biochemical Physiology** », 20:169-182, (1983).
- [51] : Clark, J.M. and F. Matsumura, « **Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca- and Ca+ Mg ATPase in the squid, Loligo pealea. Pesticide Biochemical Physiology** ». 4:232-238, (1982).
- [52] : Drenner, R.W., K.D. Hoagland, J.D. Smith, W.J. Barcellona, P.C. Johnson, M.A.Palmeiri, J.F. Hobson, « **Effects of sediment bound bifenthrin on gizzard shad and plankton in experimental tank mesocosms. Environmental Toxicology and Chemistry** », 12:1297-1306, (1992).
- [53] : FMC Corporation, « **Application for Experimental Use Permit, Product Chemistry** », DPR Report No. 50429-025. Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, (1983).
- [54] : « **La métribuzine** ». 1989. Disponible sur : [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/doc-sup-appui/metribuzin-metribuzine/metribuzin-metribuzine.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/doc-sup-appui/metribuzin-metribuzine/metribuzin-metribuzine.pdf)
- [55] : K. Majumdar et N. Singh. 2007. « **Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils** ». Chemosphere, 66: p. 630-637.
- [56] : Extention Toxicology Network. 1996. « **Pesticides Information Profiles. Metribuzin**». DuPond Agricultural Products. Wilmington. Disponible sur : <http://extoxnet.orst.edu/pips/metribuz.html>.
- [57] : CDS. Tomlin. 1997. « **The Pesticide Manual** ». 11<sup>ème</sup> édition, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- [58] : E. M. Scherer, Q.-Q. Wang, A. G. Hay, A. T. Lemley. 2004.« **The Binary Treatment of Aqueous Metribuzin Using Anodic Fenton Treatment and Biodegradation** », ARCHIVES OF Environmental Contamination and Toxicology.

- [59] : F. Flores Céspedes, M. Villafranca Sánchez, S. Pérez García, M. Fernández Pérez, Modifying sorbents in controlled release formulations to prevent herbicides pollution, *Chemosphere* (2007), doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.005.
- [60] : Bayer AG. Document interne; pp 125-126; (1990).
- [61] : « **Réévaluation de la Metribuzine** », Projet d'acceptabilité d'homologation continu; Canada 2005.
- [62] : Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby A. G., Augustijn-Beckers, P. W. M. and Burt, J. P. 1992..SCS/ARS/CES « **Pesticide properties database for environmental decisionmaking. Reviews of Environment Contamination and Toxicology** », 123: 1-157, 8-21.
- [63] : M. Stenrod, J. Perceval, P. Benoit, M. Almvik, R. I. Bolli, O. M. Eklo, T. E. Sveistrup et J. Kvaerner. 2007. « **Cold climatic conditions; effects on bioavailability and leaching of the mobile pesticide metribuzin in a silt loam soil in Norway** ». *Cold Regions Science and Technology*, 10.1016/2007.06.007.
- [64] : M. Stenrod, J. Perceval, P. Benoit, M. Almvik, R. I. Bolli, O. M. Eklo, T. E. Sveistrup et J. Kvaerner. 2007. « **Cold climatic conditions; effects on bioavailability and leaching of the mobile pesticide metribuzin in a silt loam soil in Norway** ». *Cold Regions Science and Technology*, 10.1016/2007.06.007.
- [65] : MSDS. 2005. « **METRI DF** ». Material Safety Data Sheet. Disponible sur: <http://www.cdms.net/LDat/mp7L9001.pdf>.
- [66] : E. Ayranci et N. Hoda. 2004. « **Studies on removal of metribuzin, bromacil, 2,4-D and atrazine from water by adsorption on high area carbon cloth** ». *Journal of Hazardous Materials*, 112: p. 163-168.
- [67] : BASF Canada Inc. 2006. «**Conquest A. Métribuzine 75 % : Herbicide pour mélange en réservoir**». Disponible sur : [http://pr-rp.pmra-arla.gc.ca/PR\\_SOL/pr\\_web.ve2?p-ukid=9898](http://pr-rp.pmra-arla.gc.ca/PR_SOL/pr_web.ve2?p-ukid=9898).
- [68] : Extention Toxicology Network. 1996. « **Pesticides Information Profiles. Metribuzin** ». DuPond Agricultural Products. Wilmington. Disponible sur : <http://extoxnet.orst.edu/pips/metribuz.html>.
- [69] : Extention Toxicology Network. 1993. « **Pesticides Information Profiles. Metribuzin** ». DuPond Agricultural Products. Wilmington. Disponible sur : <http://magritte.psur.cornell.edu/profiles/extoxnet/metiram-propoxur/metribuzin-ext.html>.
- [70] : M. Stenrod, J. Perceval, P. Benoit, M. Almvik, R.I. Bolli, O.M. Eklo, T.E. Sveistrup, J.Kvaerner, 2007. « **Cold climatic conditions: Effects on bioavailability and leaching of the mobile pesticide metribuzin in a silt loam soil in Norway** », *Cold Regions Science & Technology*, xxxx, xxx-xxx.
- [71] : E. Ayranci., N. Hoda, 2004. «**Studies on removal of metribuzin, bromacil, 2,4-D and atrazine from water by adsorption on high area carbon cloth** », *Hazardous Materials*.112, p 163-168.
- [72] : B.J. Naquin, 2005. « **Herbicide retention as affected by sugarcane mulch residue**», Thèse (Master de l'université de Louisiana). Chapitre 1.
- [73] : Jams R. Lawence, Michael Eldan and William C. Sonzognit. 1993. « **Metribuzin and metabolites in wisconsin (u.s.a.) well water** ». *Wat. Res.* Vol. 27, No. 8, pp. 1263-1268, 1993.
- [74] : Jensen, K.I.N., J.A. Ivany et E.R. Kimball. 1989. « **Effect of canopy and incorporation on metribuzin persistence in soils** », *Rev. can. sci. sol.* 69:711–714.
- [75] : Savage, K.E. 1980. « **Metribuzin persistence on the soil surface**», *Proc. South. Weed Sci. Soc.* 33:288 (abstract).
- [76] : C. Quesada-Molina, A. M. Garcia-Campana, L. del Olmo-Iruela et M. del Olmo. 2007. « **Large volume sample stacking in capillary zone electrophoresis for the monitoring of**

- the degradation products of metribuzin in environmental samples** ». Journal of Chromatography A, 1164: p. 320-328.
- [77] : Webster, G.R.B., L.P. Sarna et S.R. Macdonald. 1978. « **Nonbiological degradation of the herbicide metribuzin in Manitoba soils** », Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20:401–408.
- [78] : Ladlie, J.S., W.F. Meggitt et D. Penner. 1976b. « **Effect of pH on metribuzin activity in the soil** », Weed Sci. 24(5):505–507.
- [79] : Allen, R. et A. Walker. 1987. « **The influence of soil properties on the rates of degradation of metamitron, metazachlor and metribuzin. Pestic** », Sci. 18(2):95–111.
- [80] : J. F. Huertas-Pérez A. Gonzalez-Casadoa et A. Sanchez-Navarro. 2006.« **Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography** ». Journal of Chromatography A, 1102: p.280-286.
- [81] : Larson RJ, Cowan CE, « **Quantitative application of biodegradation data to environmental risk and exposure assessments** », Environmental Toxicology and Chemistry 14:1433–1442, (1995).
- [82]: Nyholm N, « **The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals** ». Environmental Toxicology and Chemistry 10:1237–1246, (1991).
- [83] : Struijs J, Stoltenkamp J, van de Meent D, « **A spreadsheet-based box model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant** ». Water Research 25:891–900, (1991).
- [84] : PainterHA, « **Detailed review paper on biodegradability testing** », Environment monograph no. 98. Environment Directorate, OECD, Paris, (1995).
- [85] : Peter Reuschenbach , Udo Pagga , Uwe Strotmann, « **A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods** », Elsevier Science Ltd, (2002).
- [86] : Larson RJ, Cowan CE, « **Quantitative application of biodegradation data to environmental risk and exposure assessments** » , Environmental Toxicology and Chemistry 14:1433–1442, (1995).
- [87] : OECD, « **Guidelines for testing chemicals** », section III : Degradation and accumulation, (1981).
- [88] : OECD, « **OECD guideline for testing chemicals, “ready biodegradability”** », (1993).
- [89] : Blok, J., de Morsier, A., Gerike, P., Reynolds, L., & Wellens, H, « **Harmonisation of ready biodegradability tests** », Chemosphere,14, 1805–1820, (1985).
- [90] : LEONP. O’MALLEY, « **Evaluation and modification of the oecd 301f respirometry biodegradation test method with regard to test substance concentration and inoculum** », (2006).
- [91] : Directive 92/69/CEE de la Commission, du 31 juillet 1992, portant dix-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.
- [92] : Guhl, W., Steber, J, « **The value of biodegradation screening test results for predicting the elimination of chemicals organic carbon in waste water treatment plants** », Chemosphere 63, 9–16, (2006).
- [93] : Boethling, R.S., Lynch, D.G. « **Biodegradation of US premanufacture notice chemicals in OECD tests** ». Chemosphere 66, 715–722, (2006).
- [94] : Franck Rejsek, « **ANALYSE DES EAUX : Aspects réglementaires et techniques** », (2002).

- [95] : Zahn R. et Wellens H, « **Ein einfaches Verfahren zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von Produkten und Abwasserinhaltsstoffen** », Chemiker Zeitung 98, 228-232, (1974).
- [96] : Schefer W. et Walchli O, « **Prüfung der biologischen Eliminierbarkeit organisch-chemischer Abwasser-inhaltsoffen** », Z. Wasser-und Abwasserforschung 13,205-209, (1980).
- [97] : Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, « **Essai Zahn-Wellens/EMPA** », 17 juillet (1992).
- [98] : Centre D'expertise En Analyse Environnementale Du Quebec, « **Détermination de la demande chimique en oxygène dans les effluents : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium** », MA. 315 – DCO 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 14 p, (2003).
- [99] : Magot, M., « **Introduction à la microbiologie des bactéries, in Biodétérioration des matériaux**», C. Lemaitre, N. Perbère, and D. Festy. 1998, EDP Sciences: Les Ulis. p. 27-46.
- [100] : Magot, M., « **Micro-organismes et métabolisme. in Ecole thématique CNRS Biodétérioration des matériaux - Action des microorganismes de l'échelle nanométrique à l'échelle macroscopique** », 8-13 octobre 2006. Obernai (67, France):Ellypse. p.
- [101] : H.Hamdi (2006), « **La biodegradation des hydrocarbures : activité de la microflore des eaux pollués** », mémoire de magistère ENP, El Harrach Alger.
- [102] : Pitt, J.I., Basílico, J.C., Abarca, M.L., Lopez, C. 2000. « **Mycotoxins and toxigenic fungi** », Medical Mycology, 38, 41-46.
- [103] : Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., J.M. Frémy, Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D. & Roquebert, M.F. (1998) « **Moisissuers des aliments peu hydrates** », Lavoisier Tec&Doc, France.
- [104] : Doyle, M. P., Beuchat, L. R. & Montville, T. J. (1998), « **Food microbiology: Fundamentals and frontiers**», ASM press. Washington D.C.
- [105] : Meyer, A., Deiana, J. & Bernard, A. (2004), « **Cours de microbiologie générale** », Doin. France.
- [106] : Cristina TABUC (2007), « **Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines** » thèse de doctorat de l'INP de Toulouse.
- [107] : Images de la souche Rhizopus stolonifer disponible sur les sites : <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/rhi.htm> et <http://www.cartage.Org.lb/en/themes/Sciences/BotanicalSciences/MajorDivisions/KingdomFungi/Fungi/Fungi.htm>
- [108] : Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, Xue W, Warshawsky D (1996) Appl Environ Microbiol 62:13–19.
- [109] : Cerniglia, C. E. 1934. «**Microbial transformation of aromatic hydrocarbons** », p. 99-128. In R. M. Atlas (ed), Petroleum Microbiology. Macmillan, New York, N.Y.
- [110] : Gibson, D. T. (ed.). 1984. **Microbial Degradation of Organic Compounds**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- [111] : Kirk, T. K. 1983. «**Degradation and conversion of lignocelluloses** », p. 266-795. In J. Smith, D. R. Berry, and B. Kristiansen (ed.), The Filamentous Fungi, ol. IV. Fungal Technology. Edward Arnold, London, United Kingdom.
- [112] : Kirk, T. K. 1984. Degradation of lignin, p. 399-437. In D. T. Gibson (ed.), **Microbial Degradation Of organic Compound**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- [113] : Kirk, T. K., and P. Fenn. 1982. «**Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes**, p. 67-90. In J. C. Frankland, N.H. Hedger, and J. J. Swift (ed.), Decomposer Basidiomycetes : Their Biology and Ecology.
- [114] : Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ. «**4-Ethylphenol metabolism by Aspergillus fumigatus**. Appl Environ Microbiol 1994;60:1978–83.

- [115] Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ. «**Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigatus***». Arch Microbiol 1985;163:176–81.
- [116] García IG, Peña PRJ, Venceslada JLB, Matín AM, Santos MAM, Gómez ER. «**Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum***». Proc Biochem 2000;35:751–8.
- [117] : Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ (1993) Appl Environ Microbiol 59:1125–1130.
- [118] : Jones KH, Trudgill PW, Hopper DJ (1995) Arch Microbiol 163:176–181.
- [119] : Weber FJ, Hage KC, de Bont JA (1995) Appl Environ Microbiol 61:3562–3566.
- [120] : Claußen M, Schmidt S (1998) Res Microbiol 149:399–406.
- [121] : Fakhru'l-Razi A, Alam MZ, Idris A, Abd-Aziz S, Molla AH. «**Domestic wastewater biosolids accumulation by liquid state bioconversion process for rapid composting** », J Environ Sci Health 2002;A37(8):1533–43.
- [122]:Friedrich J,Cimerman A, Perdih A. «**The use of *Aspergillus.niger* for bioconversion of apple distillery waste** », Eur Appl Microbiol Biotechnol 1983;17:243–7.
- [123] : GOUPY, «**Introduction aux plans d'expériences**, seconde édition, Dunod, 2001.
- [124] : Jean Jacques DROESBEKE, Jeanne Fine, Gibert Saporta, «**Plans d'expériences. Application à l'entreprise** », Edition TECHNIP 1997.
- [125] : M.PILLET, «**Les plans d'expériences par la méthode de Taguchi** », Les éditions d'organisation, 2001.
- [126] : G.& M.C SADO, «**les plans d'expériences** », AFNOR, 2000.
- [127] : Jacques Goupy et Lee Creighton, Dunod «**Introduction aux plans d'expérience** », l'usine nouvelle, 2006.
- [128]: Chergui Y (2008), «**Etude de l'élimination du phénol dans un bioréacteur continu a culture fixe** », Magister, ENP.
- [129] : Plan d'expérience, Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre.
- [130] : Jacques. Goupy, Technique de l'ingénieur, P :230 – 1997.
- [131] : «**S.-J. Wang, K.-C. Loh. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation** », Enzyme and Microbial Technology 25 (1999), pp.177–184.
- [132] : Ali O (2005), «**Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur** », Magister, ENP.
- [133] : **Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec**, Détermination de la demande chimique en oxygène dans les effluents : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium. MA.315-DOC 1.0, Ministère de l'environnement du Québec, 14 p.
- [134] : N.Bouras (2009), «**Etude de la biodégradabilité d'un insecticide "La bifenthrine" par des souches bactériennes**», mémoire de magistère ENP, El Harrach Alger.
- [135] : K. Mo, C.O. Lora, A. E. Wanken, M. Javanmardian X. Yang, C. F. Kulpa, «**Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial cultures** », Appl Microbiol Biotechnol (1997) 47: 69 ± 72.
- [136] : Salanitro JP, Diaz LA, Williams MP, Wisniewski HL (1994) «**Isolation of a bacterial culture that degrades MTBE**». Appl Environ Microbiol 60: 2593±2596.
- [137] : Katri Roppola, Toivo Kuokkanen, Jaakko Rämö, Hanna Prokkola, and Eeva Heiska, «**Comparison Study of Different BOD Tests in the Determination of BOD<sub>7</sub> Evaluated in a Model Domestic Sewage** », Journal of Automated Methods and Management in Chemistry Volume 2007, Article ID 39761, 4 pages.
- [138] : Boethling, R.S., Lynch, D.G., 2006. «**Biodegradation of US premanufacture notice chemicals in OECD tests** », Chemosphere 66, 715–722.

- [139] : Staples, C.A., Williams, J.B., Blessing, R.L., Varineau, P.T., 1999, « **Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether arboxylates, and nonylphenol** », *Chemosphere* 38, 2029–2039.
- [140] : Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Nikolaou, A., Kantifes, A., 2005, « **Aerobic biodegradation of organotin compounds in activated sludge batch reactors** », *Environ. Pollut.* 134, 431–438.
- [141] : Richterich, K., Steber, J., 2001, « **The time window – an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants** », *Chemosphere* 44, 1649–1654.
- [142] : Foulk, J.A., Bunn, J.M., 2007, « **Factors influencing the duration of lag phase during in vitro biodegradation of compression-molded, acetylated biodegradable soy protein films** », *J. Food Eng.* 79, 438–444.
- [143] : Battersby NS. A review of biodegradation kinetics in the aquatic environment. *Chemosphere* 1990;21:1243–84.
- [144] : S. Sarkar, et al., **Biodegradation of propargite by *Pseudomonas putida*, isolated from tea rhizosphere**, *J. Hazard.Mater.* (2009), doi:10.1016/j.jhazmat.2009.09.050.
- [145] : L.M. Prescott, J.P. Harley, D.A. Klein, *Microbiology*, fifth ed., The McGraw-Hill Companies, Inc, North America, 2002.
- [146] : R. Schilling, G. Engelhardt, P.R. Wallnöfer, « **Degradation of the herbicide of metribuzin (sencor) by pure cultures of *Cunninghamella echinulata* thaxter atcc 38447** », *Chemosphere*, Vol.14, No.3/4, pp 267-270, 1985.
- [147] : M. Memić, M. Vrtačnik, V. Vatrejak-Velagić, K.S. Wisiak Grm, « **Comparative biodegradation studies of pre-emergence broadleaf and grass herbicides in aqueous medium** », *international bioeterioration et biodegradation*. doi:10.1016/j.ibiod.2004.08.004.
- [148] : T.S. Bhalerao, P.R. Puranik, « **Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*** », *Int. Biodeter. Biodegr.* 59 (2007) 315–321.
- [149] : Alam MZ, Fakhru'l-Razi A, Abd-Aziz S, Idris A., « **Bioconversion of wastewater sludge by immobilized microbial treatment. Proceedings of the International Water Association (IWA) Conference on Water and Wastewater Management for Developing Countries**», Vol. 1, October 29–31, Kuala Lumpur, 2001. p. 344–53.
- [150] : Friedrich J, Cimerman A, Perdih A. « **Mixed culture of *Aspergillus awamori* and *Trichoderma reesei* for bioconversion of apple distillery waste. *Appl Microbiol Biotechnol*** », 1987;26:299–303.
- [151] : Hamdi M, Hamed HB, Ellouz R. « **Optimisation of olive mill waste-waters by *Aspergillus niger*** ». *Appl Microbiol Technol* 1991;36:285–8.
- [152] : Jin B, Van Leeuwen J, Yu Q, Patel B. « **Screening and selection of microfungi for microbial biomass protein production and water reclamation from starch processing wastewater** ». *J Chem Technol Biotechnol* 1999;74:106–10.
- [153] : Md. Zahangir Alam, A. Fakhru'l-Razi, Abul H. Molla, « **Biosolids accumulation and biodegradation of domestic wastewater treatment plant sludge by developed liquid state bioconversion process using a batch fermenter** », *water research*, doi:10.1016/S0043-1354(03)00260-4.
- [154] : Khaled A. Osman, Gamal H. Ibrahim, Ahmad I. Askar, Abdul Rahman A. Aba Alkhail, « **Biodegradation kinetics of dicofol by selected microorganisms** », *Pesticide Biochemistry and Physiology*, doi:10.1016/j.pestbp.2008.03.012.
- [155] : J.J. Pignatello, B. Xing, « **Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles** », *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1–11.

- [156] : K.C. Jones, R.E. Alcock, D.L. Johnson, G.L. Nothcott, K.T. Semple, P.J. Woolgar, « **Organic chemicals in contaminated land: analysis, significances and research priorities** », Land Contam. Reclamat. 3 (1996) 189–197.
- [157] : DAMODAR, N.GUJARATI, « **Econométrie** » (2004) ; Traduction de la 4<sup>ème</sup> édition Américaine par Bernard Bernier.
- [158] : Yugui, T., et al., **Optimization of omethoate degradation conditions and a kinetics model, International Biodeterioration & Biodegradation** (2008), doi:10.1016/j.ibiod.2008.01.014.
- [159] : Filiz, Karacan, Umit, Ozden, Süleyman, Karacan, 2007. **Optimization of manufacturing conditions for activated carbon from Turkish lignite by chemical activation using response surface methodology**. Applied Thermal Engineering 27, 1212–1218.
- [160] : J.D.Lagrade « **Initiation à l'analyse des données** » Edition Dunod, Paris, 1983.
- [161] : Urban D. J., and Cook N. J., 1986. « **Standard evaluation procedure: ecological risk assessment** ». EPA 540/9-95-001. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C, 102 p.
- [162] : Rakitsky V. N., Koblyakov V. A., Turusov V. S., 2000. « **Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: Pesticides as an Example. A Critical Review. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis** », 20, 229-240.
- [163] : McCarroll N. E., Protzel A., Ioannou Y., Stack H. F., Jackson M. A., Waters M. D., Dearfield K. L., 2002. « **A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim** ». Mutation Research, 512, 1-35.
- [164] : Perera F. P., Rauh V., Whyatt R. M., Tang D., Tsai W. Y., Bernert J. T., Tu Y. H., Andrews H., Barr D. B., Camann D. E., Diaz D., Dietrich J., Reyes A., Kinney P. L., 2005. « **A Summary of Recent Findings on Birth Outcomes and Developmental Effects of Prenatal ETS, PAH, and Pesticide Exposures** ». NeuroToxicology, 26, 573-587.
- [165] : Tsakiris I. N. Toutoudaki M., Nikitovic D. P., Danis T. G., Stratis I. A., Tsatsakis A. M., 2002, « **Field study for degradation of methyl parathion in apples cultivated with integrated pest management system** ». Bulletin of environmental contamination and toxicology, 69, 6, 771-778.
- [166] : Akiyama Y., Yoshioka N., Ichihashi K., 2005, « **Study of pesticide residues in agricultural products towards the “positive list” system** ». Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 46, 6, 305-318.
- [167] : Aulakh R. S., Gill J. P. S., Bedi J. S., Sharma J. K., Joia B. S., Ockerman H., 2006. « **Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry farm in Punjab, India. Journal of the science of food and agriculture** », 86, 741-744.
- [168] : A. Benahmed Djilali (2005). « **Biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisée dans l'Alginate de Calcium** ». Mémoire de magister, ENP El Harrach, Alger.
- [169] : Exxon mobil, « **Ready biodegradability: OECD 301F manometric respirometry test on pyrolysis C10+ fuel oil (from pyrolysis gasoline distillation)** », October 28, 2004, STUDY NUMBER: 176994A.
- [170] : S. Givry (2006), « **Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifermentans*** ». Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, France.
- [171] : J. H heritage, E. G. V. Evans, R. A. Killington (1996). Introductory microbiology. Cambridge University press 1996. ISBN 0521 58692 5. 208- R. J. Shimp, K. Pfaender (1987), « **Microbiology Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial** ». Applied and Environmental Microbiology 53, 1496-1499.

**Annexe 1 :**

**1. Calcul du taux de croissance  $\mu$  :**

Les microorganismes suivent une progression géométrique d'ordre 2 et de raison  $\mu$  [168].

$$X = 2^{\mu t} X_0$$

Où

X : concentration cellulaire (g L<sup>-1</sup>)

X<sub>0</sub>: concentration cellulaire initiale (g L<sup>-1</sup>)

t : temps (h)

$\mu$  : taux de croissance (h<sup>-1</sup>)

Par intégration nous obtenons :

$$\mu = \mu_{\max} = \frac{1}{t} \cdot \frac{\ln X - \ln X_0}{\ln 2}$$

La linéarisation de cette équation permet de déterminer graphiquement le taux de croissance  $\mu$  :

$$\ln x = \mu t \ln 2 + \ln x_0.$$

**2. Calcul de la demande théorique en oxygène (DThO) [169]:**

C'est la quantité totale d'oxygène nécessaire pour parvenir à l'oxydation complète d'un produit chimique. Elle est calculée à partir de la formule moléculaire. Le calcul de DThO des substances du test est basé sur l'annexe IV de la directive d'OCDE 301F. L'éthanol a été pris comme exemple de calcul pour sa structure simple comparé aux autres substances.

La substance du test	%C	%H	%O	Mole de Carbone	Mole d'Hydrogène	Mole d'Oxygène	Masse moléculaire
Ethanol	0,52	0,13	0,35	4,34	13,02	2,17	46,07

Mole = % Élément (en gramme)/masse moléculaire.

Masse moléculaire du Carbone = 12.011 g/mole.

Masse moléculaire de l'Hydrogène = 1.0079 g/mole.

Masse moléculaire de l'oxygène = 15.999 g/mole.

$$DThO = \frac{16 \times ((2 \times \text{mole C}) + (0.5 \times \text{mole H}) - (\text{mole O}))}{\text{Masse moléculaire}} = 2,1 \text{ g.L}^{-1}$$



**Annexe 2 :**

**Courbes d'étalonnage de la croissance bactérienne :**

La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible). Dans des conditions techniques précises, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. La turbidité étant inversement proportionnelle à la surface de la particule, pour que la turbidité soit une mesure précise de la masse bactérienne, il faut que la surface cellulaire moyenne reste constante au cours de la mesure. Cette situation ne se produit qu'au cours de la phase active de croissance et toute mesure effectuée sur des cellules au repos est erronée. La mesure de la densité optique a une sensibilité modérée (il faut au moins 10<sup>7</sup> bactéries par mL pour pouvoir mesurer une densité optique), elle est inutilisable avec des milieux très colorés et elle est incapable de différencier les cellules vivantes des cellules mortes [170].

**La courbe d'étalonnage est réalisée comme suit :**

A partir d'une culture en batch dans un milieu minéral contenant la bactérie, on prélève 200 mL de milieu que l'on centrifuge pendant 30 mn à 6000 tr/mn, on récupère le culot que l'on lave deux fois à l'eau distillée stérile, et on centrifuge à chaque fois. Puis on remet le culot en suspension dans 60 mL d'eau distillée; alors on pèse 50 ml du culot en suspension pour déterminer le poids en biomasse fraîche, puis on sèche dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant ( $m - m_0$ ), durant 18 à 24 heures, pour déterminer le poids en biomasse en matière sèche.

$$C_0 = \frac{(m - m_0)}{50ml}$$

Prendre 10 mL du culot en suspension, et à l'aide d'un spectromètre UV-Visible on détermine la densité optique de différentes dilutions de la suspension initiale (1,1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) à 600 nm.

Le tracé du graphe absorbance (DO) en fonction de la concentration cellulaire en cellules sèche nous donne les courbes d'étalonnage suivantes :

1. La Souche mixte :

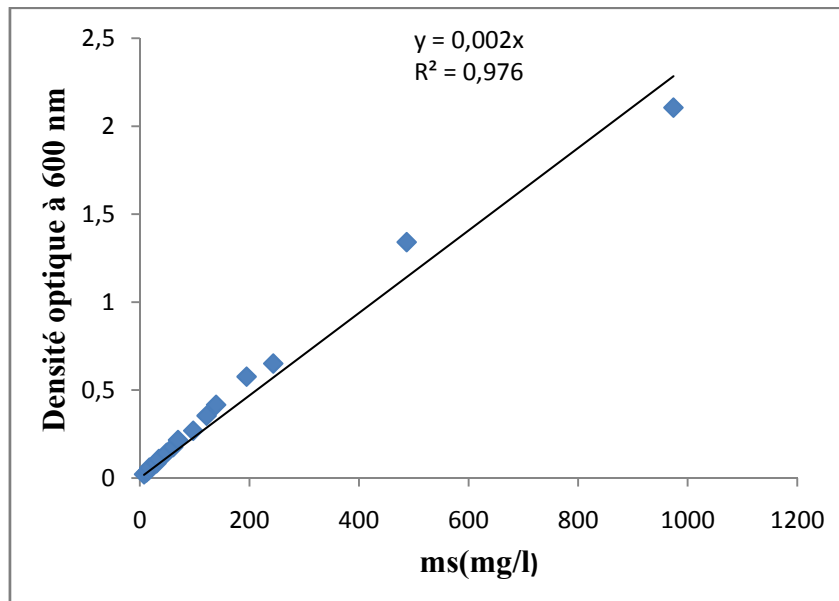


Figure 1: Droite d'étalonnage souche mixte : Absorbance = f (concentration de cellules)  
 $C = DO / \text{Pente de la courbe d'étalonnage} \cdot 1000$ , tel que la pente =  $2 \text{ g.L}^{-1}$

$$C = \frac{DO}{2} \cdot 1000$$

2. La souche SD7

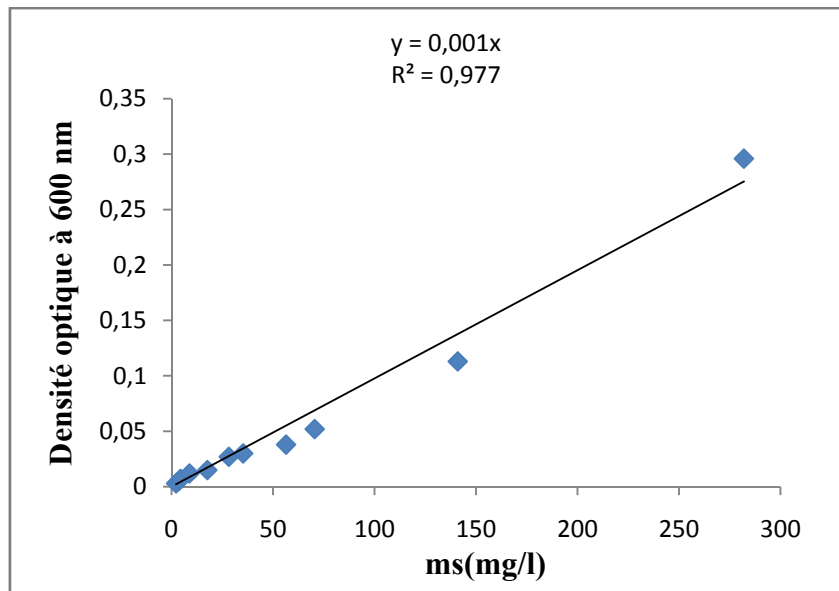


Figure 2: Droite d'étalonnage SD7 : Absorbance = f (concentration de cellules)  
 $C = DO / \text{Pente de la courbe d'étalonnage} \cdot 1000$ , tel que la pente =  $1 \text{ g.L}^{-1}$

$$C = \frac{DO}{1} \cdot 1000$$

### **Annexe 3 :**

#### **Réactifs de la DCO et leurs préparations :**

##### **Solution de digestion**

➤ **Pour la méthode à haut niveau**

Dissoudre 10,2 g de  $K_2Cr_2O_7$ , préalablement séché à 105 °C pendant 2 heures, dans environ 500 ml d'eau. Ajouter doucement 167 ml de  $H_2SO_4$  et 33,3 g de  $HgSO_4$ . Agiter jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

➤ **Pour la méthode à bas niveau**

Dans une fiole jaugée de 1 000 ml, verser 100 ml de la solution de digestion pour la méthode à haut niveau dans 800 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

##### **Réactif acide**

Verser 23,4 g de  $Ag_2SO_4$  dans une bouteille de 4,25 kg de  $H_2SO_4$  (2,5 L). Laisser reposer 1 à 2 jours afin que le  $Ag_2SO_4$  soit complètement dissous. La solution peut également être préparée dans une quantité moindre d'acide sulfurique. Cependant, la quantité de  $Ag_2SO_4$  ajoutée doit représenter 5,5 g de  $Ag_2SO_4$  par kg d'acide sulfurique.

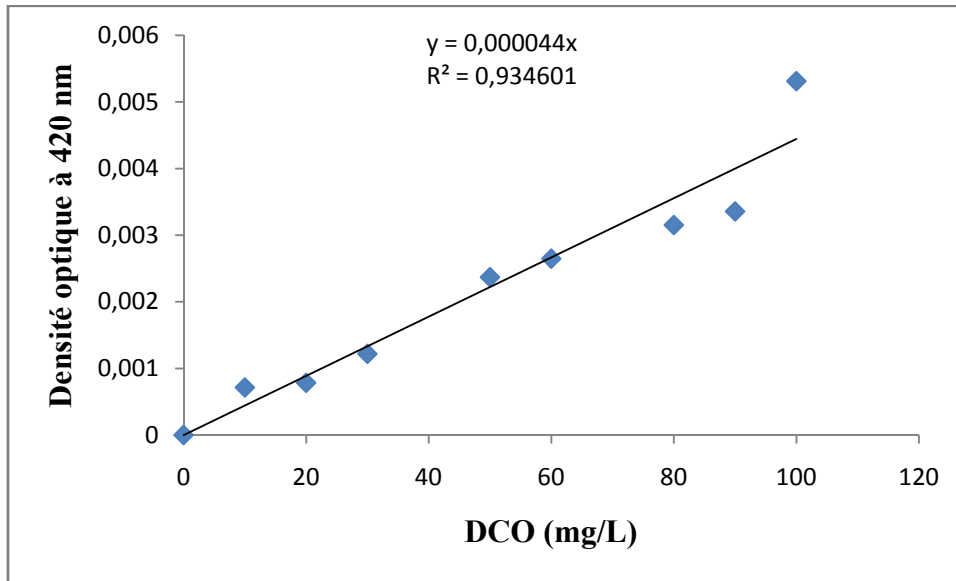
#### **Courbes d'étalonnage de la demande chimique en oxygène**

##### **Solution étalon**

- Sécher le biphthalate de potassium au four à 120°C pendant 2 heures et laisser refroidir au dessiccateur.

- Dissoudre 2,125 g de biphthalate de potassium dans environ 250 ml d'eau distillée. Cette solution correspond à une DCO = 10000 mg/L  $O_2$

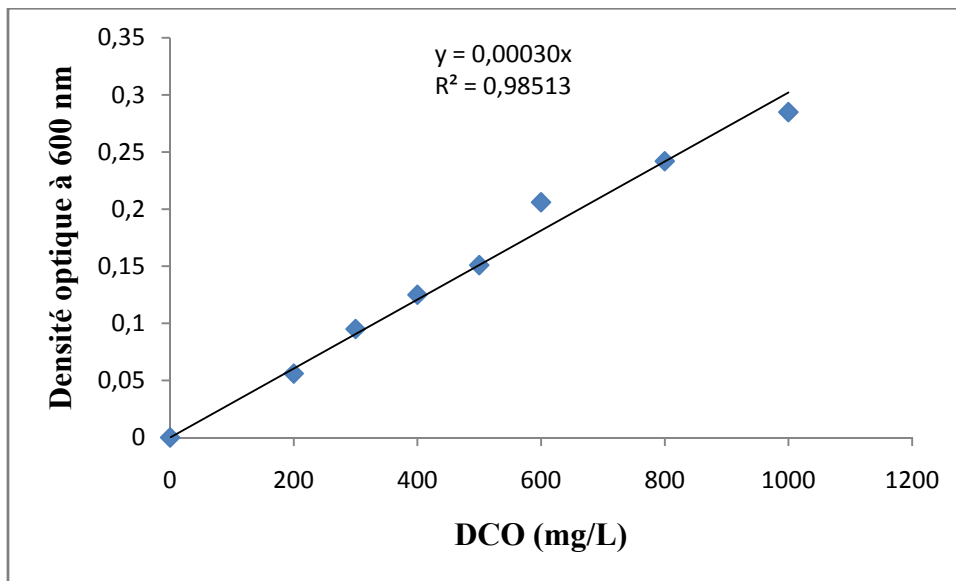
Pour les solutions étalons de la méthode haut niveau, il suffit de faire des dilutions de la solution mère (DCO=10000 mg.L<sup>-1</sup>), jusqu'à une concentration minimale de 100 mg.L<sup>-1</sup>. Les solutions étalons de la méthode bas niveau sont préparées par dilution de la solution mère de façon à obtenir une concentration au dessous de 100 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figure 3** : La droite d'étalonnage de la DCO bas niveau Absorbance = f (demande chimique en oxygène)

DO /Pente de la courbe d'étalonnage  $\cdot 10^5$ , tel que la pente =  $4,4 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1}$

$$C = \frac{DO}{4,4} \cdot 10^5$$



**Figure 4** : La droite d'étalonnage de la DCO haut niveau Absorbance = f (demande chimique en oxygène)

DO /Pente de la courbe d'étalonnage  $\cdot 10^4$ , tel que la pente =  $3 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1}$

$$C = \frac{DO}{3} \cdot 10^4$$

**Annexe 4 :**

**Composition chimique du milieu minéral :**

➤ **Bactéries**

Pour 1L d'eau distillée :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,5g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 0,5g

$\text{NaCl}$  : 0,5g

$\text{MgSO}_4$  : 0,5g

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  : 3g

Autoclaver pendant 20 minutes à 120°C.

$\text{CaCl}_2$  : 0,02g } Ajouter stérilement à l'aide d'un filtre de 0,2 µm de pore.  
 $\text{FeSO}_4$  : 0,02g }

➤ **Champignons :**

Pour 1L d'eau distillée :

$\text{K}_2\text{SO}_4$  : 0,5 g

$\text{MgCl}_2$  : 0,5 g

$\text{MnSO}_4$  : 0,001 g

$\text{NaCl}$  : 0,5 g

Autoclaver pendant 20 minutes à 120°C.

$\text{CaCl}_2$  : 0,1 g } Ajouter stérilement à l'aide d'un filtre de 0,2 µm de pore.  
 $\text{FeSO}_4$  : 0,01 g }

**Composition chimique du bouillon nutritif :**

Pour 1L d'eau distillée :

Peptone-caséine-viande : 8,6 g

$\text{NaCl}$  : 6,4 g

## Annexe

---

### Composition chimique du milieu YMA :

Pour 1L d'eau distillée :

Extrait de levure : 3 g

Extrait de malte : 3 g

Glucose : 10 g

Peptone : 5 g

### Composition du bouillon nutritif GN (Gélose Nutritive) :

Pour 1L d'eau distillée :

Extrait de viande : 1 g

Extrait de levure : 2 g

Chlorure de sodium : 5 g

Peptone : 5 g

Agar : 15 g

### Annexe 5:

#### Matériel utilisé

Matériel	Marque
Etuve	MEMMERT UE -400
Autoclave	CERTOCLAVE
Spectromètre UV/Visible	SHIMADZU UV MINI-1240
Centrifugeuse	MIKRO 22R HETTICH
pH mètre	HANNE INSTRUMENTS 211
Balance numérique	DENVER Instruments
Bloc chauffant	HACK DRB-200
Microfiltre 0,2 µm	MILLEX-HA
Bec bunsen	-
Incubateur	Incubateur 1000
Agitateur vortex	FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC

**Annexe 6 :****Table de distribution de la loi T de Student**

DL / P	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,025	0,010	0,005
1	0,000	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	0,000	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	0,000	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,000	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,000	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,000	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,000	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	0,000	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	0,000	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,263	2,821	3,250
10	0,000	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	0,000	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	0,000	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	0,000	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	0,000	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	0,000	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	0,000	0,258	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	0,000	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	0,000	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	0,000	0,257	0,533	0,961	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	0,000	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	0,000	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	0,000	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	0,000	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	0,000	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	0,000	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	0,000	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	0,000	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	0,000	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	0,000	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	0,000	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
40	0,000	0,255	0,529	0,851	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
80	0,000	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
120	0,000	0,254	0,526	0,845	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617
Infini	0,000	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

Table de distribution de la loi F de Fisher-Snedecor

*	DL1 = 1		DL1 = 2		DL1 = 3		DL1 = 4		DL1 = 5	
	P = 0,05	P = 0,01	P = 0,05	P = 0,01	P = 0,05	P = 0,01	P = 0,05	P = 0,01	P = 0,05	P = 0,01
1	161,4	4052,00	199,5	4999,00	213,7	3403,00	224,6	5625,00	230,2	5764,00
2	18,51	98,49	19,00	99,00	19,16	99,17	19,25	99,25	19,30	99,30
3	10,13	34,12	9,55	30,81	9,28	29,46	9,12	28,71	9,01	28,24
4	7,71	21,20	6,94	18,00	6,59	16,69	6,39	13,98	6,26	13,32
5	6,61	16,26	5,79	13,27	5,41	12,06	5,19	11,39	5,03	10,97
6	3,99	13,74	3,14	10,91	4,76	9,78	4,53	9,13	4,39	8,75
7	3,39	12,23	4,74	9,35	4,33	8,43	4,12	7,85	3,97	7,45
8	3,32	11,26	4,46	8,63	4,07	7,39	3,84	7,01	3,69	6,63
9	5,12	10,56	4,26	8,02	3,86	6,99	3,63	6,42	3,48	6,06
10	4,96	10,04	4,10	7,56	3,71	6,33	3,48	5,99	3,33	5,64
11	4,84	9,65	3,98	7,20	3,59	6,22	3,36	5,67	3,20	5,32
12	4,75	9,33	3,88	6,93	3,49	5,93	3,26	5,41	3,11	5,06
13	4,67	9,07	3,80	6,70	3,41	5,74	3,18	5,20	3,02	4,86
14	4,60	8,86	3,74	6,31	3,34	5,56	3,11	5,03	2,96	4,69
15	4,34	8,68	3,68	6,36	3,29	5,42	3,06	4,89	2,90	4,56
16	4,49	8,53	3,63	6,23	3,24	5,29	3,01	4,77	2,85	4,44
17	4,45	8,40	3,59	6,11	3,20	5,18	2,96	4,67	2,81	4,34
18	4,41	8,28	3,53	6,01	3,16	5,09	2,93	4,58	2,77	4,25
19	4,38	8,18	3,52	5,93	3,13	5,01	2,90	4,50	2,74	4,17
20	4,35	8,10	3,49	5,85	3,10	4,94	2,87	4,43	2,71	4,10
21	4,32	8,02	3,47	5,78	3,07	4,87	2,84	4,37	2,68	4,04
22	4,30	7,94	3,44	5,72	3,05	4,82	2,82	4,31	2,66	3,99
23	4,28	7,88	3,42	5,66	3,03	4,76	2,80	4,26	2,64	3,94
24	4,26	7,82	3,40	5,61	3,01	4,72	2,78	4,22	2,62	3,90
25	4,24	7,77	3,38	5,37	2,99	4,68	2,76	4,18	2,60	3,86
26	4,22	7,72	3,37	5,33	2,98	4,64	2,74	4,14	2,39	3,82
27	4,21	7,68	3,33	5,49	2,96	4,60	2,73	4,11	2,37	3,78
28	4,20	7,64	3,34	5,43	2,95	4,57	2,71	4,07	2,56	3,75
29	4,18	7,60	3,33	5,42	2,93	4,34	2,70	4,04	2,34	3,73
30	4,17	7,56	3,32	5,39	2,92	4,31	2,69	4,02	2,53	3,70
40	4,08	7,31	3,23	5,18	2,84	4,31	2,61	3,83	2,43	3,31
60	4,00	7,08	3,15	4,98	2,76	4,13	2,32	3,65	2,37	3,34
120	3,92	6,85	3,07	4,79	2,68	3,93	2,43	3,48	2,29	3,17
Infini	3,84	6,64	2,99	4,60	2,60	3,78	2,37	3,32	2,21	3,02