



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique



Département Génie des procédés et de l'Environnement

Mémoire de projet de fin d'études
Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'État en Génie des
Procédés et Environnement

Sélection de souches microbiennes capables de dégrader un organophosphoré

SMAILI Kenza et HOCINE Asma

Présenté et soutenu publiquement le 03/07/2024 auprès des membres du jury :

Président	Mme. BELHANECHÉ N.	Prof. ENP, Alger
Examineur	M. NAMANE A.	Prof. ENP, Alger
Promoteur	Mme. SALAH R.	MCA. ENP, Alger
Copromoteur	Mme. LARIBI-HABCHI H.	Prof. USDB, Blida

ENP 2024

10, Avenue des Frères Oudek, Hassen Badi, BP. 182, 16200 El Harrach, Alger, Algérie.
www.enp.edu.dz



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique



Département Génie des procédés et de l'Environnement

Mémoire de projet de fin d'études
Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'État en Génie des
Procédés et Environnement

Sélection de souches microbiennes capables de dégrader un organophosphoré

SMAILI Kenza et HOCINE Asma

Présenté et soutenu publiquement le 03/07/2024 auprès des membres du jury :

Président	Mme. BELHANECHÉ N.	Prof. ENP, Alger
Examineur	M. NAMANE A.	Prof. ENP, Alger
Promoteur	Mme. SALAH R.	MCA. ENP, Alger
Copromoteur	Mme. LARIBI-HABCHI H.	Prof. USDB, Blida

ENP 2024

10, Avenue des Frères Oudek, Hassen Badi, BP. 182, 16200 El Harrach, Alger, Algérie.
www.enp.edu.dz

Remerciements

Nous tenons à remercier Allah, le Tout-Puissant, de nous avoir donné la foi, la force et la patience pour réaliser ce travail.

Nous remercions nos chers parents, nos frères et sœurs, ainsi que toute notre famille, qui ont rempli nos vies de joie, de motivation et d'amour.

Nous remercions également Mme. Rym SALAH et Mme. Hassiba LARIBI-HABCHI pour leurs conseils, soutien et orientations tout au long de notre projet. Nous remercions aussi les membres du jury, Mme. Naima BELHANECHÉ et M. Abdelkader NAMANE, pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nous tenons également à remercier sincèrement M. M. ASSALI et M. R. BOURDJOUËL pour leur aide précieuse et leur disponibilité tout au long de cette aventure.

Nous tenons à exprimer une gratitude particulière envers nos camarades et toutes les personnes que nous avons rencontrées au cours de notre parcours d'études, qui nous ont fait sentir un sentiment d'appartenance et qui nous ont offert de l'aide, du soutien ou simplement un sourire.

Enfin, nous remercions toute personne ayant cru en nous et ayant contribué, de près ou de loin, de manière importante ou modeste, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

“

Je dédie ce travail À mes chers parents pour tous leurs sacrifices,

leur amour, leur dévouement et leur soutien tout au long de mes

études.

À mes chers frères et sœurs Selyan, Serine & Nouha.

À ma chère binôme Asma

À mes amis et toutes les personnes qui m'ont aidé pour arriver où j'en

”

suis aujourd'hui.

Kenza

Dédicaces

À ma chère mère Yamina, la femme la plus bienveillante et la plus aimante, mon idole dans la vie, celle de qui je tire ma force et qui se sacrifie sans cesse pour nous.

À mon cher père Mohamed, mon soutien dans la vie, celui qui est toujours là pour moi et dont je suis fier de porter le nom.

À ma sœur unique et chère, Hafsa, la sœur la plus merveilleuse et la plus gentille, sans qui je ne pourrais avancer, celle qui m'encourage avec ses paroles affectueuses et me soutient inlassablement, jusqu'à aujourd'hui.

À tous mes chers amis, et en particulier à H, Chaïma, Khaoula et G, Chaïma.

À ma chère binôme Kenza, ma compagne sur ce chemin, que Dieu seul sait ce que nous avons vécu et les défis auxquels nous avons été confrontées.

Asma

ملخص

في هذه الدراسة، قمنا باختيار وتحديد سلالات ميكروبية قادرة على استقلاب الكلوربيريفوس، وهو مبيد حشري من فئة الفوسفات العضوي يُستخدم على نطاق واسع، من تربة زراعية ملوثة بالمبيدات. تم استكشاف نهجين للاختيار: استخدام الكلوربيريفوس كمصدر وحيد للكربون وكذا استخدامه كمصدر وحيد للنيتروجين. تم تحضير جميع التجارب عند درجة حرارة 20 درجة مئوية تحت التحريك لمدة 36 يومًا. أتاحت النتائج تحديد واختيار سلالتين بكتيريتين من جنس *Bacillus* وسلالة بكتيرية واحدة من جنس *Staphylococcus*، بالإضافة إلى فطر *Epidermophyton floccosum*، حيث تم تحديدها على أنها قادرة على استقلاب الكلوربيريفوس واستخدامه كمصدر وحيد للكربون والنيتروجين.

الكلمات المفتاحية: مبيد حشري، فوسفوري عضوي، كلوربيريفوس، سلالات ميكروبية

Abstract

In this study, we selected and identified microbial strains capable of metabolizing chlorpyrifos, a widely used organophosphate pesticide, from agricultural soils contaminated with pesticides. Two selection approaches were explored: the use of chlorpyrifos as the sole carbon source and as the sole nitrogen source. All tests were incubated at 20°C under agitation for 36 days. The results allowed us to select and identify two bacterial strains of the genus *Bacillus* and one bacterial strain belonging to the genus *Staphylococcus*, in addition to a fungus, *Epidermophyton floccosum*, which were identified as capable of metabolizing chlorpyrifos and using it as the sole source of carbon and nitrogen.

Key words : Pesticide, organophosphate, chlorpyrifos, microbial strains

Résumé

Dans le cadre de cette étude, nous avons sélectionné et identifié des souches microbiennes capables de métaboliser le chlorpyrifos, un pesticide organophosphoré largement utilisé, à partir de sols agricoles contaminés par des pesticides. Deux approches de sélection ont été explorées : l'utilisation du chlorpyrifos comme unique source de carbone et comme unique source d'azote. Tous les essais ont été incubés à 20 °C sous agitation pendant 36 jours. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner et d'identifier deux souches bactériennes du genre *Bacillus* et une souche bactérienne appartenant au genre *Staphylococcus*, en plus d'un champignon, *Epidermophyton floccosum*, qui sont identifiés comme capables de métaboliser le chlorpyrifos et de l'utiliser comme unique source de carbone et d'azote.

Mots clés : Pesticide, organophosphoré, chlorpyrifos, souches microbiennes.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction Générale.....	15
Chapitre I. Revue Bibliographique.....	17
1. Généralités sur les pesticides :	18
1.1. Définition :.....	18
1.2. Historique :	18
1.3. Classification des pesticides :	19
1.3.1. Classification des pesticides en fonction de leur origine.....	20
1.3.1.1. Les pesticides naturels	20
1.3.1.2. Les pesticides synthétiques	20
1.3.2. Classification basée sur la composition chimique des pesticides.....	21
1.3.2.1. Les pesticides organochlorés	21
1.3.2.2. Les pesticides organophosphorés.....	21
1.3.2.3. Carbamates.....	22
1.3.2.4. Pyréthrinés et pyréthrinoïdes	23
1.3.3. Classification basée sur la toxicité des pesticides	24
1.3.4. Classification en fonction de leur cible	24
1.4. Le devenir des pesticides dans l'environnement :	25
1.5. Les effets des pesticides :	26
1.5.1. Effets aigus sur la santé	27
1.5.2. Effets chroniques sur la santé	27
1.6. Dégradation des pesticides :	27
2. Généralités sur les organophosphorés :	29
2.1. Définition et structure	29
2.2. Propriétés	30
2.3. Mode d'action.....	31
2.4. Dégradation des organophosphorés	32

3. Le chlorpyrifos :.....	35
3.1 Définition :.....	35
3.2 Propriétés :.....	35
3.2.1 Propriétés physiques	35
3.2.2 Propriétés chimiques.....	35
3.3 Mode d'action :.....	36
3.4 Biodégradation :	36
Chapitre II. Matériel et Méthodes	38
1. Matériel.....	39
1.1 Équipements.....	39
1.2 Matériel biologique.....	39
1.3 Matériel non biologique.....	39
2. Méthodes.....	40
2.1 Test de solubilité	40
2.2 Isolement des microorganismes dégradant le CPF	40
2.2.1 Préparation du milieu minéral	40
2.2.2 Sélection des microorganismes	41
2.2.2.1 Sélection des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone	41
2.2.2.2 Sélection des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source d'azote :.....	42
2.3 Isolement des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone/azote	43
2.4 Purification des microorganismes.....	44
2.5 Identification des microorganismes	45
2.5.1 Étude macroscopique	45
2.5.2 Étude microscopique	45
2.5.2.1 Coloration de Gram	45
2.5.2.1.1 Principe	45
2.5.2.1.2 Procédure de la coloration.....	46

2.5.2.2. État frais	47
2.5.3. Analyses biochimiques	47
2.5.3.1. Test de la catalase	47
2.5.3.1.1. Principe	47
2.5.3.1.2. Procédure	48
2.5.3.2. Test de l'oxydase	48
2.5.3.2.1. Principe	48
2.5.3.2.2. Procédure	48
2.5.3.3. Les méthodes d'identification par les galeries API®	49
2.5.3.3.1. Procédure	49
2.5.3.3.1.1. Préparation des galeries	49
2.5.3.3.1.2. Préparation de l'inoculum	49
2.5.3.3.1.3. Détermination du profil numérique	49
2.5.3.3.1.4. Identification des souches microbiennes	49
2.5.3.3.2. Galeries API utilisées	50
2.5.3.3.2.1. Galerie API Staph	50
2.5.3.3.2.2. Inoculation de la galerie	50
2.5.3.3.2.3. Lecture de la galerie API Staph	50
2.5.3.4. Gélose Chapman	52
2.5.3.5. Identification de <i>Bacillus cereus</i>	52
2.5.3.5.1. Identification biochimique de <i>Bacillus cereus</i>	52
2.5.3.5.1.1. Test de la catalase	52
2.5.3.5.1.2. Test d'hémolyse	52
2.5.3.5.2. Ensemencement du milieu MEYP	52
Chapitre III : Résultats et discussion	54
1. Isolement des souches bactériennes sur milieu sélectif	55
2. Purification des souches	57
3. Caractères macroscopiques des souches isolées	58
4. Identification des souches	58
4.1. Coloration de Gram	58
4.2. État frais	60

4.3 Recherche des enzymes respiratoires	61
4.3.1 Test de la catalase	61
4.3.2 Test de l'oxydase	61
4.4 Identification de la souche b1	62
4.5 Identification des souches b2 et b13	65
4.6 Identification de la souche b3	65
5. Test de l'utilisation du CPF comme source de carbone/azote par les souches sélectionnées ..	66
6. Interprétation et discussion des résultats	66
Conclusion générale & Perspective	73
Références Bibliographiques	78

Liste des abréviations

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase.
CAS	Chemical Abstract Service
CbE	Carboxylestérase.
CPF	Chlorpyrifos.
CPF-oxon	Chlorpyrifos-oxon.
DETP	Diéthylthiophosphate
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane (bis p-chlorophényl-2,2 trichloro-1,1,1 éthane)
DL₅₀	Dose Létale Médiane
DT₅₀	Temps de Demi-vie
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (L'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture)
Kow	Coefficient de partage octanol/eau
MEYP	Mannitol egg yellow polymyxin
OP	Organophosphoré
OPH	Organophosphates hydrolases
PTE	Phosphotriestérases
POP	Pesticide Organophosphoré
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification.
TCP	3,5,6-trichloro-2-pyridinol

Liste des figures

Figure I.1: Classification des pesticides	20
Figure I.2 : Structures chimiques de certains composés organochlorés.....	21
Figure I.3: Structures chimiques de certains composés organophosphorés	22
Figure I.4 : Structure chimique de quelques carbamates.....	22
Figure I.5 : Structure chimique de quelques pyréthroïdes.....	23
Figure I.6 : Processus et voies de dispersion des pesticides dans l'environnement.....	26
Figure I.7 : Impact des pesticides sur la santé humaine	26
Figure I.8 : Structure de base des pesticides organophosphorés	29
Figure I.9 : Structure des insecticides organophosphorés: (a) structure basique, (b) chlorfenvinphos, (c) parathion, (d) azinphos, (e) quinalphos, (f) dimethoate, (g) diazinon et (h) chlorpyrifos	30
Figure I.10 : Illustration des interactions entre un OP et un AchE.....	32
Figure I.11 : Voie de dégradation d'un OP (Quinalphos QP).....	34
Figure I.12 : Mécanisme d'action du CPF	36
Figure I.13 : Voies de dégradation abiotique du CPF.....	37
Figure I.14 : Voies de dégradation biotique du CPF. Les flèches en pointillés montrent des métabolites théoriques qui n'ont pas été rigoureusement identifiés comme produits de dégradation	37
Figure II.1 : Chlorpyrifos fourni par Alphyt.	40
Figure II.2 : Méthode d'ensemencement en surface par stries d'épuisement « méthode des cadrans »	45
Figure II.3 : Étapes de la coloration de Gram.	46
Figure II.4 Observations microscopiques de bactéries à Gram positif (violette) et bactéries à Gram négatif.....	47
Figure II.5 : Présentation de la galerie API Staph.	50
Figure III.1 : Observation des colonies bactériennes sur les milieux sélectifs après 7 jours de culture.....	56
Figure III.2 : Souches purifiées à partir des milieux sélectifs	57

Figure III.3 : Observation sous microscope photonique des souches isolées après coloration de Gram.....	59
Figure III.4: Observation de l'état frais des souches	60
Figure III.5: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat b1.....	63
Figure III.6 : Résultats du test d'incubation des bactéries b2 et b13 dans le milieu MEYP (Mossel) rajoutez la légende.....	65
Figure III.7. Voies de dégradation du chlorpyrifos proposées.....	69

Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification des pesticides selon l'OMS.....	24
Tableau I.2 : Classification des pesticides par ravageurs cibles.....	25
Tableau I.3 : Les caractéristiques physico-chimiques et toxiques de certains pesticides organophosphorés	31
Tableau I.4 : Toxicité et durée de vie de certains pesticides organophosphorés	33
Tableau I.5 : Les caractéristiques chimiques du CPF.....	35
Tableau II.1: Composition du milieu M	41
Tableau II.2: Variation de la concentration du glucose et du CPF pour la sélection de souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone.....	42
Tableau II.3: Variation de la concentration de l'urée et du CPF pour la sélection de souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source d'azote.....	43
Tableau II.4 : Composition des milieux d'isolement	44
Tableau II.5: Tableau de lecture de la galerie API Staph	51
Tableau III.1. : Caractérisation macroscopique des souches isolées.....	58
Tableau III.2 : Résultats de la coloration de Gram.....	59
Tableau III.3 : Résultats de l'observation à l'état frais des souches isolées.	60
Tableau III.4 : Résultats du test de la catalase.....	61
Tableau III.5 : Résultats du test de la catalase.....	62
Tableau III.6 : Résultats des tests réalisés sur la souche b1 avec la galerie API Staph.....	64

Introduction Générale

Le secteur agricole évolue dynamiquement en réponse à la forte demande alimentaire due à l'augmentation de la population, la production agricole est fortement affectée par les ravageurs et les maladies des plantes. Pour répondre à cette demande croissante, les pesticides ont été introduits pour améliorer le rendement des récoltes [1].

Depuis 1945, l'utilisation des pesticides dans le monde n'a cessé d'augmenter, atteignant une consommation estimée à environ 3,5 millions de tonnes [2]. En effet, seule une petite fraction (environ 1 %) des pesticides utilisés parvient à éliminer les ravageurs ciblés, tandis que le reste des résidus de pesticides se dépose dans le sol agricole [3]. Ces résidus peuvent ensuite se disperser dans les divers compartiments environnementaux par des processus tels que le lessivage, contaminant ainsi les écosystèmes terrestres et aquatiques et causant des effets néfastes sur l'environnement et les organismes non ciblés [4]. Ces effets incluent des dommages aux écosystèmes, la perte de colonies d'abeilles, la contamination des sols, des aliments, des eaux souterraines et de l'eau potable, ainsi que des impacts potentiels sur la santé humaine, notamment pour les applicateurs, les cueilleurs et les consommateurs.

De ces faits, l'industrie des pesticides dans les pays développés évolue vers l'utilisation de formulations plus sûres pour les utilisateurs et l'environnement. En revanche, les pays en développement continuent majoritairement d'utiliser des formulations conventionnelles, parmi lesquelles les pesticides organophosphorés se distinguent comme un exemple significatif. Représentant environ 40 % du total des pesticides utilisés dans le monde [3,5]. L'augmentation de leur utilisation est attribuée à leur efficacité élevée contre les nuisibles ciblés et à leur toxicité relativement faible pour les organismes non ciblés, comparativement à d'autres groupes de pesticides.

Le chlorpyrifos est l'un des pesticides organophosphorés les plus largement utilisés, portant les noms commerciaux Lorsban, Agromil, Dhanwan, Dorson, Omexan, Dursban, Suscon Green, Empire, Equity, pour n'en citer que quelques-uns. Il est efficace contre un large spectre d'insectes nuisibles des cultures économiquement importantes et est utilisé à grande échelle dans le monde entier depuis les années 1965 en tant qu'insecticide pour lutter contre les nuisibles des cultures, les moustiques ainsi que les larves du sol, les foreurs, les vers gris, les vers des racines du maïs, les cafards, les pucerons, les mouches, les termites, les fourmis de feu, les poux et les termites souterrains [6].

Il est crucial de mettre en œuvre des méthodes de traitement efficaces pour décomposer ces substances nocives. Plusieurs approches peuvent être utilisées, telles que la bioremédiation, l'oxydation avancée, la phytoremédiation et d'autres techniques innovantes. C'est donc dans ce contexte que la dégradation du chlorpyrifos dans l'environnement représente un enjeu majeur pour réduire son impact négatif. Les souches microbiennes capables de dégrader efficacement le chlorpyrifos sont ainsi d'un intérêt primordial pour la bioremédiation de ce polluant.

Ce mémoire s'attache à explorer et à isoler des souches microbiennes capables de dégrader le chlorpyrifos. Cette démarche vise à contribuer au développement de solutions durables pour atténuer la contamination par les pesticides dans l'environnement, tout en préservant la santé publique et l'équilibre écologique.

Ce travail est subdivisé en trois parties distinctes. La première partie est dédiée à la recherche bibliographique sur les pesticides, les organophosphorés et le chlorpyrifos (Chapitre I). La seconde partie concerne le matériel et les méthodes employés lors des expériences (Chapitre II).

Le Chapitre III quant à lui sera consacré à l'exposé des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Enfin, une conclusion générale sera présentée, mettant en lumière les résultats les plus significatifs et offrant des recommandations pour de futures recherches dans ce domaine.

Chapitre I. Revue Bibliographique

1. Généralités sur les pesticides :

1.1. Définition :

Un pesticide désigne toute substance ou mélange de substances utilisés afin de prévenir, éliminer ou maîtriser les ravageurs, tels que les insectes, les champignons, les rongeurs ou les espèces de plantes indésirables qui causent des dommages lors de la production et du stockage des récoltes [7].

Le terme "pesticides" est couramment employé tant dans le langage usuel que dans le domaine scientifique. Néanmoins, les définitions qui lui sont attribuées varient en précision et ne font pas toujours l'objet d'un consensus généralisé. Le code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides de (FAO) (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a tenté de clarifier cette notion en le définissant comme suit : "tout produit chimique ou mélange de produits chimiques conçus pour repousser, détruire ou combattre les organismes nuisibles (incluant les vecteurs de maladies humaines ou animales) ainsi que les espèces indésirables de plantes ou d'animaux, causant des dommages ou étant autrement nuisibles lors de la production, de la transformation, du stockage, du transport ou de la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et de ses dérivés, ou des aliments pour animaux" [8].

1.2. Historique :

Les pesticides ont été essentiels dans l'évolution des pratiques agricoles et de la production alimentaire à travers l'histoire. L'utilisation de produits chimiques pour lutter contre les nuisibles remonte aux civilisations anciennes, où les premiers agriculteurs utilisaient des substances naturelles telles que le soufre et l'arsenic pour protéger leurs cultures. Cependant, ce n'est qu'au 20^e siècle que les pesticides synthétiques ont révolutionné l'agriculture [7, 9].

Au début du 20^e siècle, des dérivés de phénothiazine et de carbazole ont remplacé l'arsenic. En 1913, des composés organomercurels ont été employés pour contrôler la carie du blé. Le dithiocarbamate a été le premier fongicide efficace [10].

Entre 1941 et 1945, les États-Unis ont développé la synthèse de l'herbicide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). En 1944, des rodenticides organiques synthétiques sont apparus, et la warfarine, un anticoagulant utilisé comme rodenticide, a été mise au point. Les insecticides organochlorés à base de cyclodiène ont été formulés entre 1946 et 1950.

En 1949, le premier pyréthroïde synthétique, l'althérien, a été développé. En 1952, le malathion, un insecticide organophosphoré, a été largement utilisé aux États-Unis, et les carbamates, comme le carbaryl, ont été synthétisés en 1956 [11].

Durant la seconde guerre mondiale, le mercure, le sulfuryle et l'arsenic ont été utilisés pour détruire les réserves alimentaires, puis, comme pesticides, dans les cultures jusqu'en 1940. En 1939, Paul Müller a élaboré le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et lui a valu le prix Nobel de médecine. Ce pesticide était utilisé à la fois en agriculture et contre le paludisme et le typhus [7].

Après la publication du livre "Printemps silencieux" de Rachel Carson en 1962, de nombreux États ont interdit l'utilisation du DDT en raison de sa dangerosité et de son accumulation dans les organismes vivants et l'environnement. L'Agence de protection de l'environnement l'a interdit en 1972 [11].

Par la suite, d'autres pesticides de synthèse, tels que les organophosphorés, les carbamates et les pyréthroïdes, moins dangereux que le DDT, ont été utilisés. Cependant, aucun pesticide n'est totalement exempt de risques pour les organismes vivants et l'environnement. Les néonicotinoïdes, chimiquement similaires à la nicotine, offrent certains avantages tels qu'une moindre bioaccumulation et une décomposition plus rapide dans l'environnement, cependant ils restent toxiques pour les abeilles et d'autres pollinisateurs. Malgré cela, les néonicotinoïdes sont actuellement parmi les pesticides les plus utilisés dans le monde [10].

1.3. Classification des pesticides :

Les pesticides constituent un groupe très hétérogène de substances, différents par leurs caractéristiques physico-chimiques, leur devenir dans l'environnement, leurs mécanismes d'action toxique, et les nuisibles qu'ils ciblent. Leur classification (figure I.1) se base principalement sur leur mode d'entrée, leur composition chimique et les cibles visées. De plus, l'OMS et le SGH (Système Général Harmonisé) classent les pesticides selon leur toxicité et leurs effets néfastes, en mettant l'accent sur la santé publique [12].

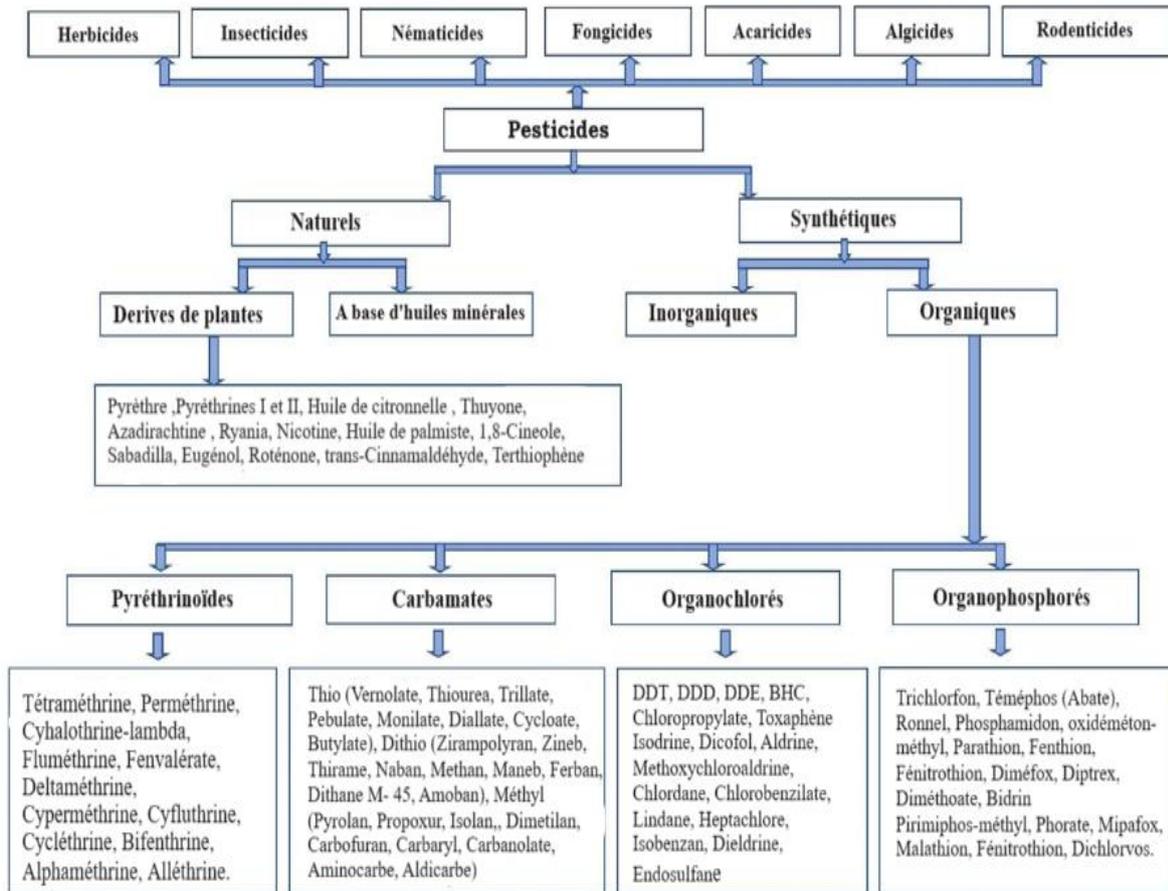


Figure I.1: Classification des pesticides [12].

1.3.1. Classification des pesticides en fonction de leur origine :

1.3.1.1. Les pesticides naturels :

Les pesticides naturels proviennent de ressources telles que les animaux, les plantes et les micro-organismes (champignons, bactéries, virus). Ils sont respectueux de l'environnement, facilement décomposables, moins toxiques et peuvent être génétiquement modifiés dans les plantes (plantes à pesticides intégrés (*Plant Incorporated-Protectants* ou *PIP*)), réduisant ainsi les populations de ravageurs. C'est le cas de l'huile de neem, et des bactéries *Bacillus thuringiensis* et de *Bacillus sphaericus* qui produisent des toxines ciblant les larves de moustiques et de mouches noires [13,14].

1.3.1.2. Les pesticides synthétiques :

Ces pesticides de synthèse sont produits par la modification de minéraux ou de composés chimiques. Ils représentent les pesticides les plus largement utilisés à l'échelle mondiale. De nombreuses études ont démontré que les pesticides synthétiques, qu'ils soient

organiques ou inorganiques, sont très stables dans l'environnement et peuvent s'accumuler au fil du temps [10,15].

1.3.2. Classification basée sur la composition chimique des pesticides :

Les pesticides sont classés selon leur composition chimique et la nature des substances actives qui composent leurs formulations [16].

Selon leur composition chimique, quatre groupes principaux de pesticides sont retrouvés les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et le dernier groupe composé des pyréthrinés et des pyréthriinoïdes [17].

1.3.2.1. Les pesticides organochlorés :

Les pesticides organochlorés contiennent généralement plus de cinq atomes de chlore. Ils sont retrouvés dans le groupe des insecticides et environ 40% de ce type de pesticides sont employés dans le domaine agricole. Les substances organochlorées sont toxiques envers les insectes mais aussi les animaux et l'homme, principalement en stimulant le système nerveux central. Comme exemples de pesticides organochlorés, nous avons le DDT, le lindane, l'endosulfan, l'endrine, le dieldrine, l'heptachlore, l'isodrin, l'isobenzan, l'aldrine, ainsi que le pentachlorophénol et l'atrazine [7,18].

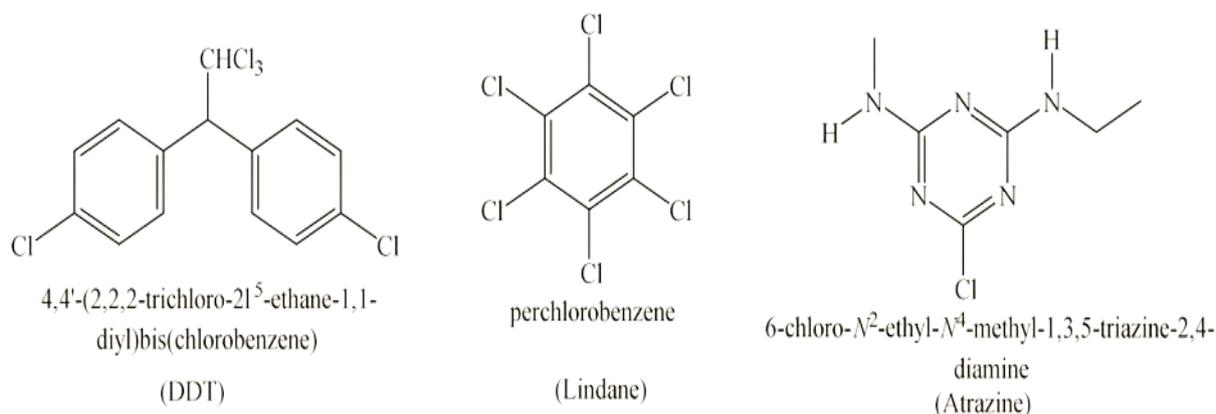


Figure I.2 : Structures chimiques de certains composés organochlorés [10].

1.3.2.2. Les pesticides organophosphorés :

Les pesticides organophosphorés (POP) sont des ester d'acide phosphorique, d'acide thiophosphorique et d'acide dithiophosphorique. En raison de leur action sur un large éventail d'organismes, les pesticides organophosphorés sont désignés comme des pesticides à large

spectre. Ils pénètrent dans l'organisme par ingestion, contact direct ou inhalation, et y provoquent des effets neurotoxiques [19].

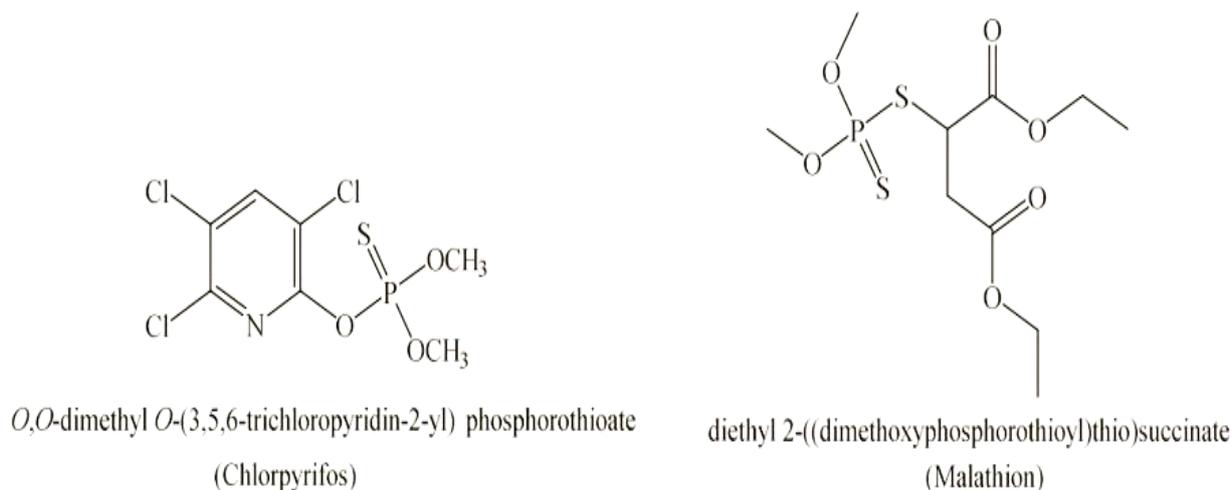


Figure I.3: Structures chimiques de certains composés organophosphorés [10].

1.3.2.3. Carbamates :

Les carbamates sont des esters d'acide carbamique ou thiocarbamique. Ils agissent de manière similaire aux pesticides organophosphorés et perturbent le déplacement de l'influx nerveux des organismes, ce qui entraîne l'empoisonnement et enfin la mort des parasites. Ces produits phytosanitaires se dégradent facilement, ce qui réduit leur impact sur l'environnement. Parmi leurs caractéristiques principales, il y a la solubilité extrêmement faible dans l'eau pour certains (carbaryl, carbofuran, etc.), le caractère hygroscopique pour d'autres (cartap hydrochloride) et la bioaccumulation est quasiment absente [20].

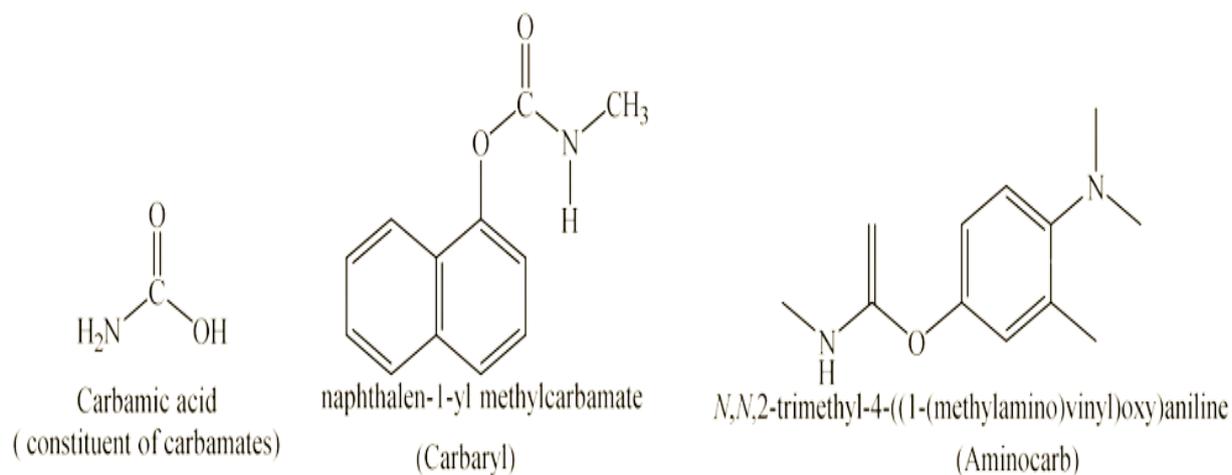


Figure I.4 : Structure chimique de quelques carbamates [18]

1.3.2.4. Pyréthrine et pyréthrinoïdes :

Il s'agit d'analogues synthétiques des pyréthrine, substances naturelles retrouvées dans les fleurs pyrèthre de Dalmatie (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) et qui sont des insecticides efficaces. Ces pesticides sont biodégradables et moins toxiques pour les organismes non ciblés que les organochlorés et les organophosphorés.

Les pyréthrinoïdes agissent en se liant aux canaux sodiques (ce sont des canaux qui, sous l'influence des protons, déclenchent une entrée de sodium dans les neurones et ainsi permettre la formation de potentiels d'action). Ce qui prolonge leur ouverture en réponse à une stimulation électrique. Cela entraîne une dépolarisation prolongée de la membrane cellulaire.

Les pyréthrinoïdes ciblent à la fois les canaux sodiques des insectes et ceux des mammifères, mais ces derniers sont moins sensibles à cette classe d'insecticides [21].

Les pyréthrinoïdes trouvent leur utilisation dans les domaines agricoles et non agricoles, ainsi que dans certains produits de soins personnels [10]. Ces composés sont caractérisés par une faible solubilité dans l'eau.

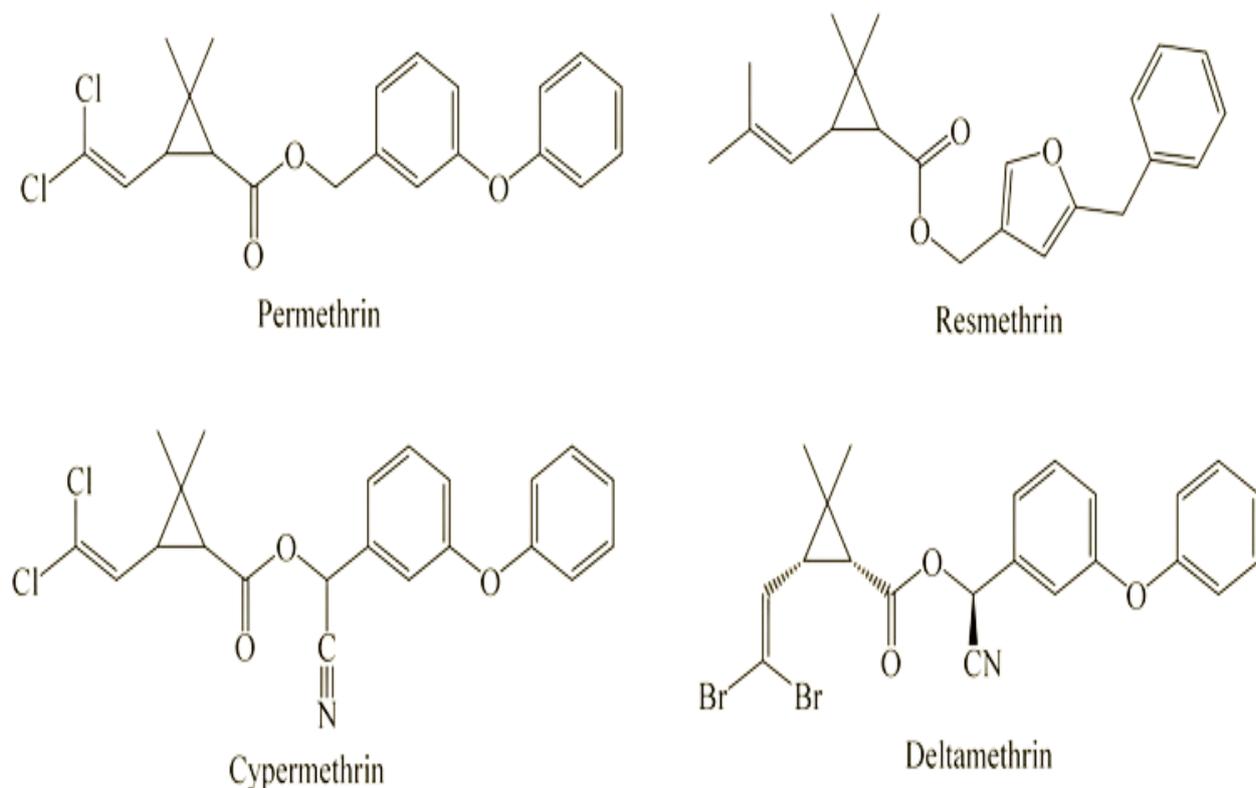


Figure I.5 : Structure chimique de quelques pyréthrinoïdes [10].

1.3.3. Classification basée sur la toxicité des pesticides :

Avec la DL_{50} , on peut estimer statistiquement le nombre de mg de substance toxique par kg de poids corporel nécessaire pour causer la mort de 50 % d'une grande population d'animaux d'étude.

Si un composé a une DL_{50} dermique supérieure à la DL_{50} orale, il sera classé dans une catégorie de danger plus élevée. En cas de variation du risque aigu pour l'homme par rapport aux évaluations de la DL_{50} , le classement du composé peut être ajusté (tableau I.1) [22].

Tableau I.1: Classification des pesticides selon l'OMS [16].

Classe		Niveau de toxicité	DL ₅₀ pour le rat (mg/kg de poids corporel)		Exemples
			Voie orale	Voie cutanée	
I	Catégorie Ia	Extrêmement dangereux	<5	<50	Parathion Dieldrine
	Catégorie Ib	Très dangereux	5-50	50-200	Eldrin Dichlorvos
II		Modérément dangereux	50-2000	200-2000	DDT Chlordane
III		Légèrement dangereux	>2000	>2000	Malathion
IV		Peu de chances de présenter une toxicité aiguë	5000		Carbetamide Cycloprothrine

1.3.4. Classification en fonction de leur cible

Dans cette approche, les pesticides sont catégorisés en fonction de l'organisme nuisible ciblé et sont désignés par des noms spécifiques qui reflètent leur mécanisme d'action [23].

Tableau I.2 : Classification des pesticides par ravageurs cibles [16].

Type de pesticides	Ravageurs cibles	Exemple
Insecticides	Insectes et autres arthropodes	Aldicarbe
Fongicides	Champignons	Azoxystrobine
Bactéricides	Bactéries	Complexes de cuivre
Herbicides	Mauvaises herbes	Atrazine
Acaricides	Acariens	Bifenazate
Rodenticides	Rongeurs	Warfarine
Algicides	Algues	Sulfate de cuivre
Larvicides	Larves	Méthoprène
Ovicides	Œufs d'insectes et d'acariens	Benzoxazine
Virucides	Virus	Scytovirine
Molluscicides	Mollusques	Diméthipin
Nématicides	Nématodes	Aldicarbe
Avicides	Oiseaux	Avitrol
Lampricides	Larves de lamproies	Trifluorométhyl Nitrophénol
Piscicides	Poissons	Roténone
Silvicides	Végétation ligneuse	Tebuthiuron
Termiticides	Termites	Fipronil

1.4. Le devenir des pesticides dans l'environnement :

Les activités industrielles, agricoles et domestiques ont introduit une grande quantité de produits chimiques synthétiques dans l'écosystème. Les pesticides qui sont dispersés deviennent des polluants qui requièrent des mesures de résolution [24].

L'environnement est contaminé par l'utilisation répétée des pesticides. Cependant, la répartition d'une substance entre les différents éléments de l'environnement, tels que l'air, l'eau, les sols et les êtres vivants, varie en fonction du composé lui-même ainsi que des caractéristiques du milieu (température de l'air, teneur en eau, structure du sol) (figure I.6) [25].

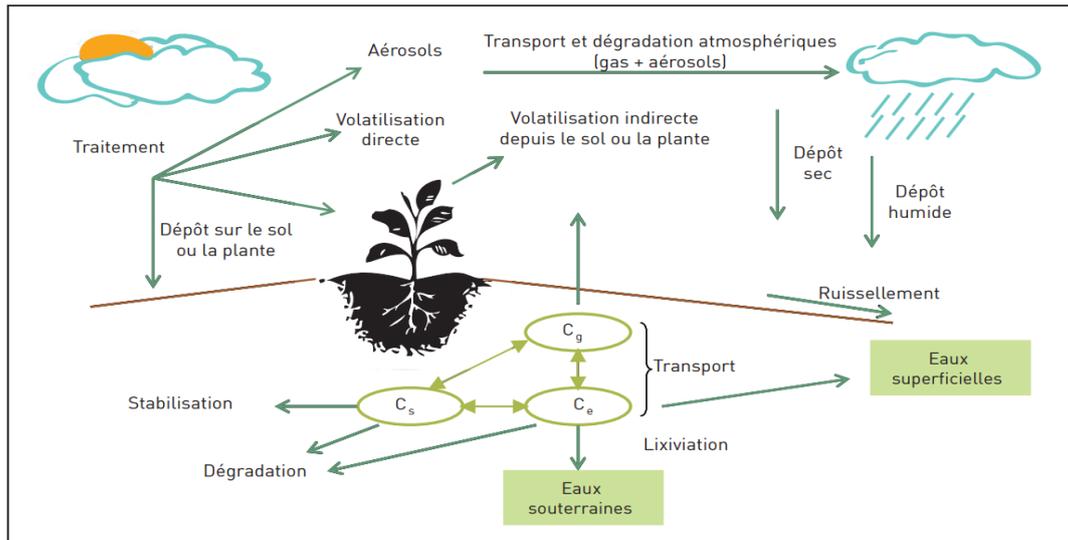


Figure I.6 : Processus et voies de dispersion des pesticides dans l'environnement [25].

1.5. Les effets des pesticides :

En raison de leur activité biologique élevée et de leur volatilité, les pesticides figurent parmi les principaux contaminants environnementaux. La majorité des pesticides ne discriminent pas entre les ravageurs et d'autres formes de vie. Une mauvaise utilisation de ces substances peut donc être dangereuse pour les humains (figure I.7), les animaux, les autres organismes vivants, et l'environnement [16].

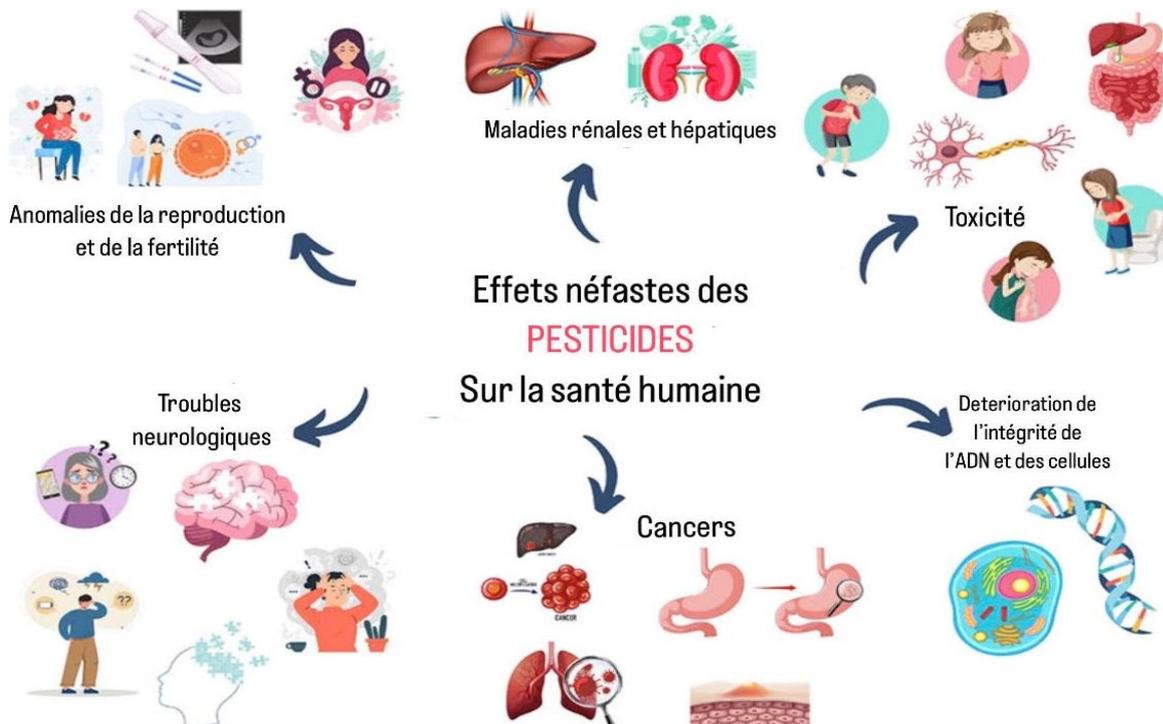


Figure I.7 : Impact des pesticides sur la santé humaine [26].

Chaque année, entre 5 000 et 20 000 individus décèdent et environ 500 000 à 1 million de personnes sont empoisonnées par les pesticides. Au moins la moitié des cas d'empoisonnement et 75 % des décès liés aux pesticides concernent des travailleurs agricoles. Les autres cas d'empoisonnement résultent principalement de la consommation de nourriture contaminée [16].

1.5.1. Effets aigus sur la santé :

Il arrive parfois que les effets aigus sur la santé liés à la levée des pesticides ne soient pas reconnus. Certains symptômes incluent une vision floue, des maux de tête, une salivation, une diarrhée, des nausées, des vomissements, une respiration sifflante, des problèmes de peau, des convulsions, le coma et même la mort. La présence légère ou modérée de pesticides est associée à des causes telles que l'asthme, la bronchite et la gastro-entérite. Les pesticides représentent un risque de plus en plus important pour les enfants en raison de leur croissance, de leur taille et de leur physiologie [27].

1.5.2. Effets chroniques sur la santé :

L'exposition aux pesticides entraîne des effets neurologiques néfastes tels que la maladie de Parkinson, une diminution de la période d'attention, des problèmes de mémoire, une diminution de la coordination, des problèmes liés à la reproduction tels que la diminution de la croissance infantile, les fausses couches, les malformations congénitales, le cancer et la dépression clinique [28].

1.6 Dégradation des pesticides :

La dégradation des pesticides peut se faire par : dégradation biotique (grâce à des organismes vivants) ou dégradation abiotique (hydrolyse, photolyse, etc.).

La dégradation complète du pesticide, où il est converti en une molécule minérale comme le CO₂, est appelée minéralisation. Entre la molécule initiale de pesticide et les produits finaux minéraux, de nombreuses molécules intermédiaires, appelées produits de dégradation ou métabolites, peuvent être formées [29].

Les composés dont le temps de dégradation est particulièrement long sont qualifiés de persistants. La persistance des pesticides est souvent mesurée par leur temps de demi-vie (DT₅₀), qui représente le temps nécessaire pour que 50 % de la substance disparaisse de l'environnement à la suite des transformations biologiques et physico-chimiques [30].

Les micro-organismes ont un rôle essentiel dans l'élimination et la détoxification des substances toxiques présentes dans l'environnement. En général, la dégradation des pesticides est avantageuse car elle transforme la majorité des résidus en composés moins toxiques [24].

2. Généralités sur les organophosphorés :

2.1. Définition et structure :

Les pesticides organophosphorés (POP) sont des pesticides organiques de synthèse [31]. Toutefois, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) les classe comme des substances chimiques très dangereuses [32]. Ces pesticides, notamment les insecticides, sont particulièrement prisés en agriculture en raison de leur faible coût, de leur synthèse simple et de leur efficacité élevée pour éliminer les insectes [33].

Les OP sont des composés où les atomes de phosphore sont doublement liés à l'oxygène (liaison phosphoryle (P=O)) ou au soufre (liaison thiophosphoryle (P=S)), et incluent également les organothiosulfates et les organophosphonates. La structure de base des OP consiste en un atome de carbone, d'oxygène ou de soufre lié à un ester d'acide phosphorique (figure I.8). Les groupes R1 et R2 peuvent être des groupes alkyle ou aryle, et X est un groupe hydrolysable aliphatique, aromatique ou hétérocyclique [32].

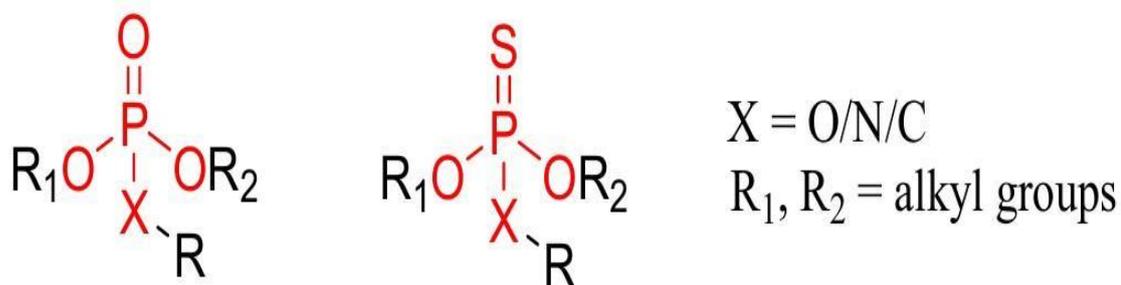


Figure I.8 : Structure de base des pesticides organophosphorés [32].

La figure I.9 illustre la structure de quelques OP.

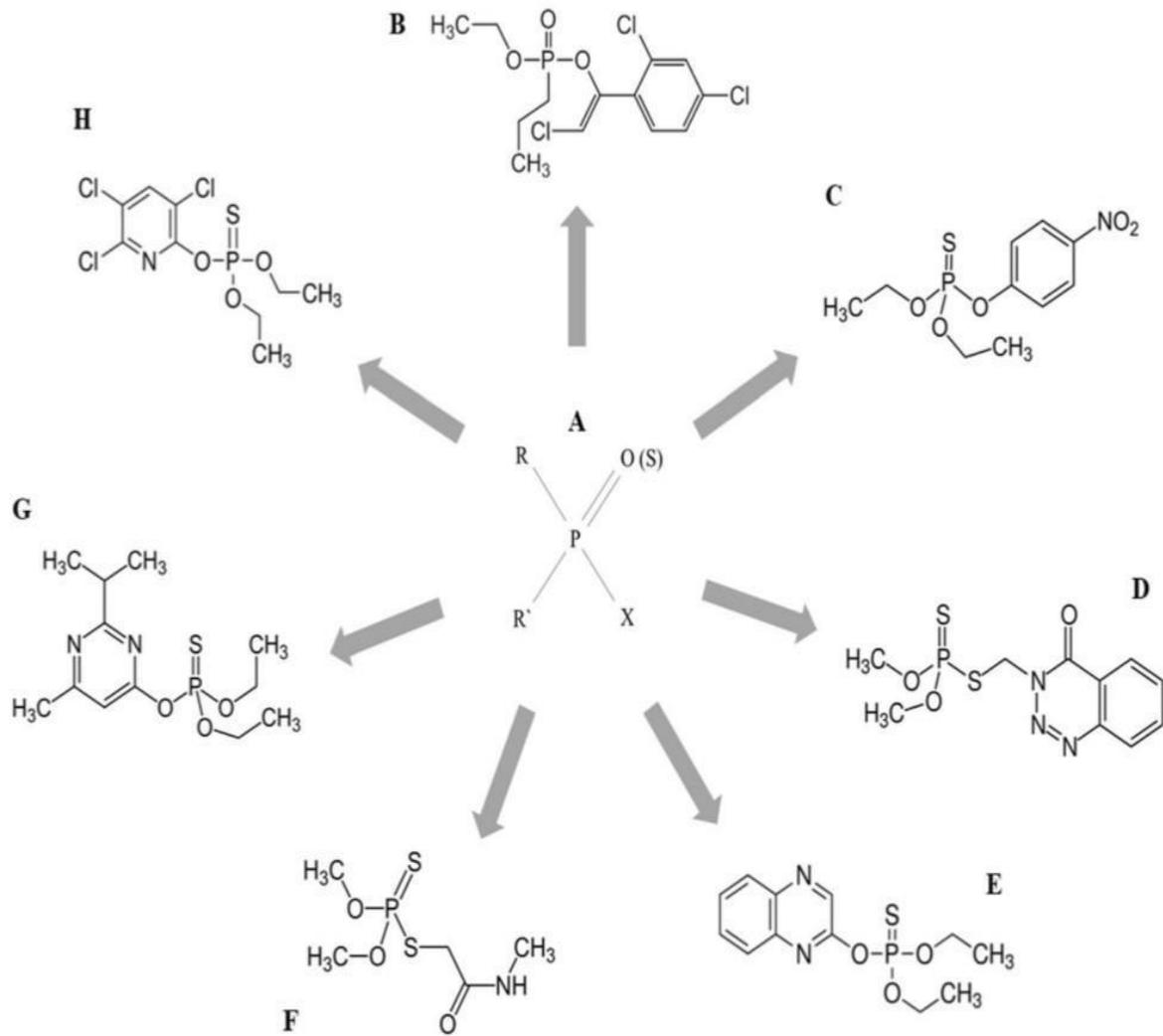


Figure I.9 : Structure des insecticides organophosphorés : (a) structure basique, (b) chlorfenvinphos, (c) parathion, (d) azinphos, (e) quinalphos, (f) dimethoate, (g) diazinon et (h) chlorpyrifos [34].

2.2. Propriétés :

Généralement, ces composés se présentent sous forme liquide et non polaire, ce qui implique leur faible solubilité dans l'eau (tableau I.3). De plus, bon nombre d'entre eux s'évaporent à température ambiante. Cependant, leur stabilité est conditionnée par le pH de leur environnement. Ils se dégradent en milieu fortement alcalin ou sous l'effet de la chaleur. Cette décomposition peut également être déclenchée en présence d'humidité. Ces caractéristiques jouent un rôle crucial dans les voies de pénétration de ces composés [34].

Tableau I. 3 : Les caractéristiques physico-chimiques et toxiques de certains pesticides organophosphorés [35].

Pesticides organophosphorés	Paraoxon	Malathion	Dichlorvos	Chlorpyrifos
Nom chimique	Diéthyl-4-nitrophenyl Phosphate	O,O-diméthylphosphorodithioate de diéthyl-mercaptopuccinate	2,2-dichlorovinyl diméthylphosphate	O,O-diéthyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)phosphorothionate
Formule brute	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Masse molaire (g/mol)	275,19	330,36	220,98	350,58
Solubilité (g/L) à 25°C	13	0.13	10	0.002
Log P	1.98	2,9	1,2	5
DL50° (mg/kg) percutanée chez le rat	4.3	60-1300	30-50	1-30

2.3. Mode d'action :

Les OP agissent en bloquant la décomposition de l'acétylcholine (Ach) (figure I.10), un neurotransmetteur essentiel pour la transmission des signaux nerveux dans le cerveau, les muscles squelettiques et d'autres régions du corps. L'acétylcholine doit être hydrolysée, par l'acétylcholinestérase (AchE), après la transmission de l'impulsion pour éviter une surstimulation du système nerveux [36]. La neurotoxicité des organophosphorés résulte de l'inhibition de cette enzyme [33].

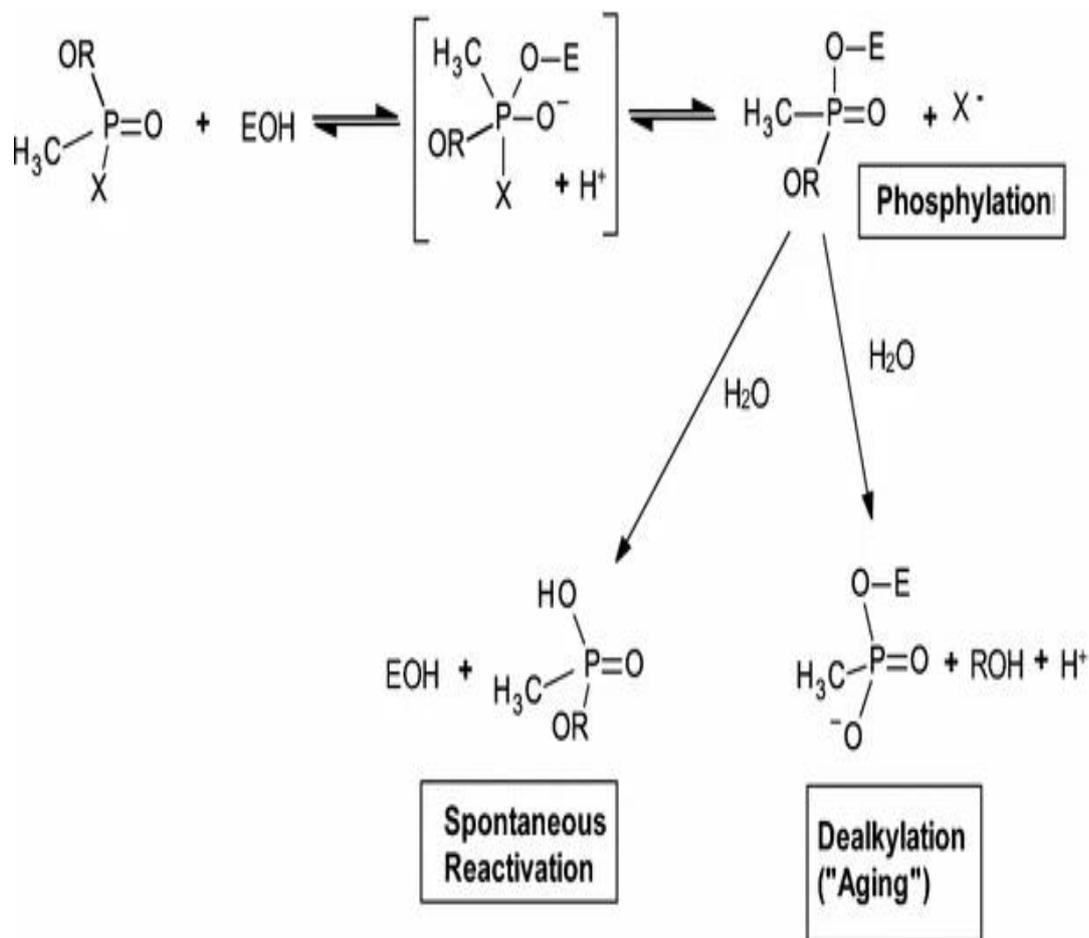


Figure I.10 : Illustration des interactions entre un OP et un AchE [37].

2.4. Dégradation des organophosphorés :

Les pesticides organochlorés, tels que le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) et le lindane, ont connu une baisse significative d'utilisation dans les pays développés en raison de leur longévité, de leur capacité à s'accumuler dans le milieu et de leur toxicité potentielle à l'égard des organismes non ciblés. Les OP, moins résistants et plus performants, ont remplacé les organochlorés. Cependant, la majorité des composés organophosphorés sont hautement toxiques pour les mammifères. Le tableau I.4 résume les caractéristiques chimiques et physiques de certains de ces composés [36].

Tableau I. 4 : Toxicité et durée de vie de certains pesticides organophosphorés [36].

Nom	Type	Année d'introduction	DL ₅₀ chez les mammifères (mg kg ⁻¹)	Demi-vie (jours) au niveau du sol
Chlorpyrifos	Insecticide	1965	135-163	10-120
Parathion	Insecticide	1947	2-10	30-180
Parathion méthyl	Insecticide	1949	3-30	25-130
Glyphosate	Herbicide	1971	3530-5600	30-174
Coumaphos	Acaricide	1952	16-41	24-1400
Fénamiphos	Nématicide	1967	6-10	28-90
Monocrotophos	Insecticide	1965	18-20	40-60
Dicrotophos	Insecticide	1965	15-22	45-60
Diazinon	Insecticide	1953	80-300	11-21
Diméthoate	Insecticide	1955	160-387	2-41
Fénitrothion	Insecticide	1959	1700	12-28
Éthoprophos	Nématicide	1966	146-170	3-30

Au niveau des OP, le phosphore est retrouvé habituellement sous la forme d'un ester de phosphate ou de triphosphonate. Étant donné qu'ils sont des esters, ils possèdent de nombreux sites qui peuvent être hydrolysés. L'hydrolyse, l'oxydation, l'alkylation et la désalkylation sont les réactions principales. Par hydrolyse, les liaisons P-O-alkyle et P-O-aryle sont détruites, ce qui représente l'étape la plus importante de la détoxification [36].

Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans la détoxification des OP. Des bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* sont reconnues pour leur capacité à dégrader les OP. Les enzymes organophosphates hydrolases (OPH) impliquées dans cette détoxification comprennent les phosphotriestérases (PTE) et les carboxylestérases (CbE) (figure I.11) [38].

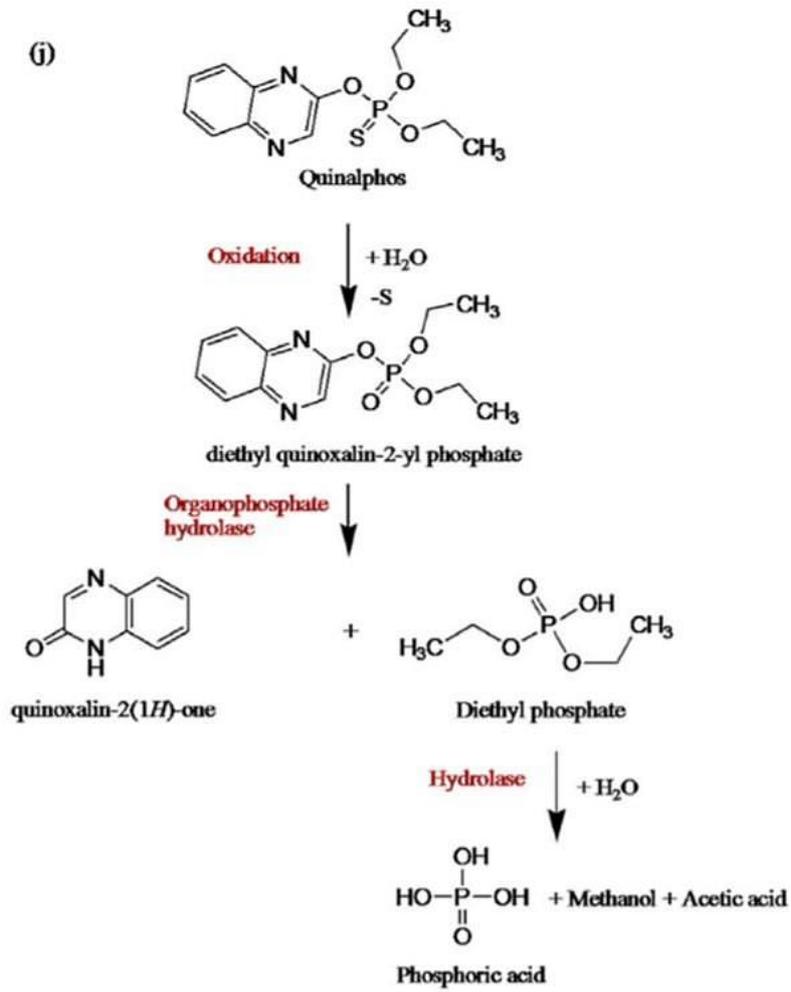


Figure I.11 : Voie de dégradation d'un OP (Quinalphos (QP)) [39]

3. Le chlorpyrifos :

3.1 Définition :

Le chlorpyrifos (CPF) est un insecticide et acaricide organophosphoré utilisé pour contrôler les insectes et les acariens dans le feuillage et le sol [40]. Il est classé parmi les pesticides toxiques de classe II par l'organisation mondiale de la santé.

Le CPF a été largement employé à travers le monde comme insecticide à usage domestique (termites, moustique) et en agriculture, Il est disponible sous différentes formes, telles que des granulés, une poudre soluble dans l'eau, une poudre dispersible et un concentré émulsionnable [41].

3.2. Propriétés :

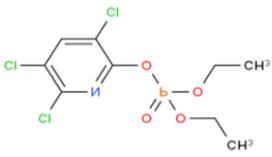
3.2.1. Propriétés physiques :

Le CPF est un solide cristallin de couleur ambre à blanche qui a une légère odeur de mercaptan [42]. Lipophile, il est soluble dans la plupart des solvants organiques et peu soluble dans l'eau (0,73mg/l à 20°C) [43].

3.2.2. Propriétés chimiques :

Les caractéristiques chimiques du CPF sont présentées dans le tableau I.5.

Tableau I. 5 : Les caractéristiques chimiques du CPF [44], [45]

Paramètre	Valeur pour le CPF
Nom chimique	O,O -diethyl O -(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl
Numéro CAS	2921-88-2
Structure chimique	
Formule chimique brute	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Pesticide Code	59101
Code SMILES	S=P(OC1=NC(=C(C=C1Cl)Cl)Cl)(OCC)OCC
Masse Molaire	350,6 g mol ⁻¹
Pression de vapeur (25°C)	1,73×10 ⁻⁵ torr
Solubilité dans l'eau (20°C)	0,73 mg L ⁻¹
Constante d'Henry	1,10×10 ⁻⁵ atm m ⁻³ mol ⁻¹
Log K _{ow}	5,0

3.3. Mode d'action :

Le CPF est un inhibiteur de l'AChE, une enzyme vitale pour les systèmes nerveux des animaux et des humains. La transmission des impulsions à travers certaines jonctions nerveuses implique la libération d'un neurotransmetteur chimique, l'acétylcholine (ACh). L'effet stimulant sur l'ACh est rapidement annulé par l'activité de l'AChE. L'effet inhibiteur du CPF sur l'AChE entraîne des niveaux élevés soutenus d'ACh avec une perturbation sérieuse et généralisée de l'activité nerveuse [46].

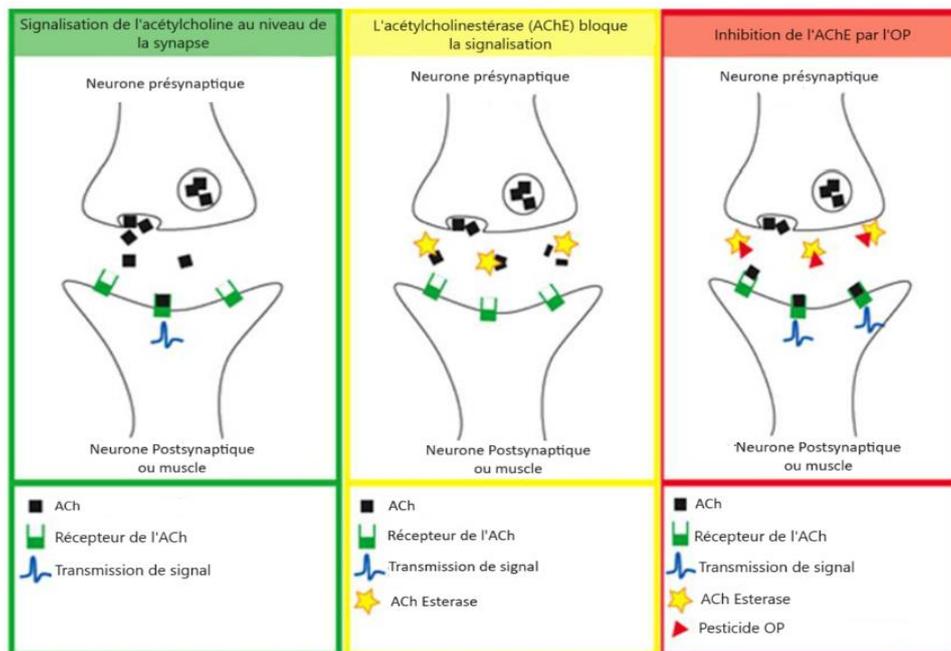


Figure I.12 : Mécanisme d'action du CPF [40].

3.4. Biodégradation :

Après son utilisation, le CPF se fixe aux plantes et au sol, où il subit une dégradation lente à modérée [47]. Cela est dû à plusieurs voies de dégradation abiotique (figure I.13) et biotique (figure I.14) pouvant se produire simultanément, telles que la volatilisation, l'hydrolyse abiotique, la photolyse et la dégradation microbienne [44][46]. Avec le 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) comme principal produit de dégradation [48]. En milieu intérieur, le CPF peut persister pendant plusieurs mois en raison de l'absence d'eau, de lumière solaire ou de micro-organismes du sol présents en extérieur [47].

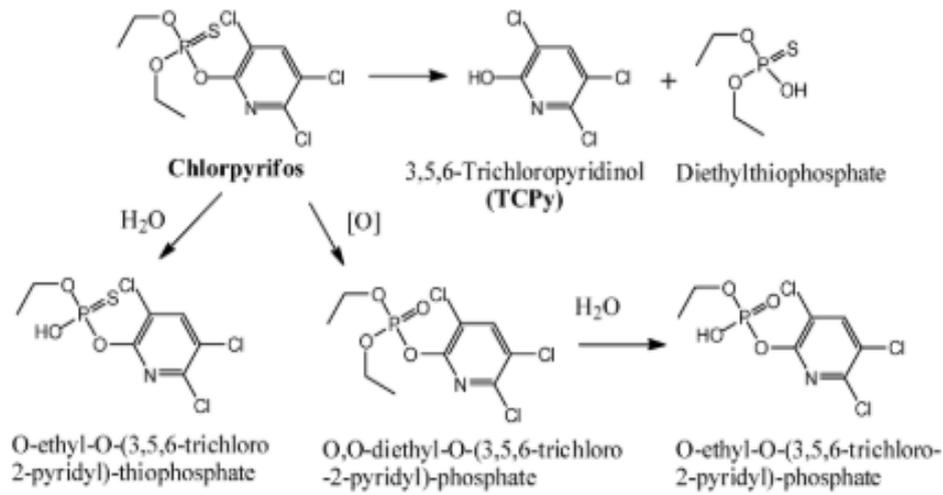


Figure I.13 : Voies de dégradation abiotique du CPF [47].

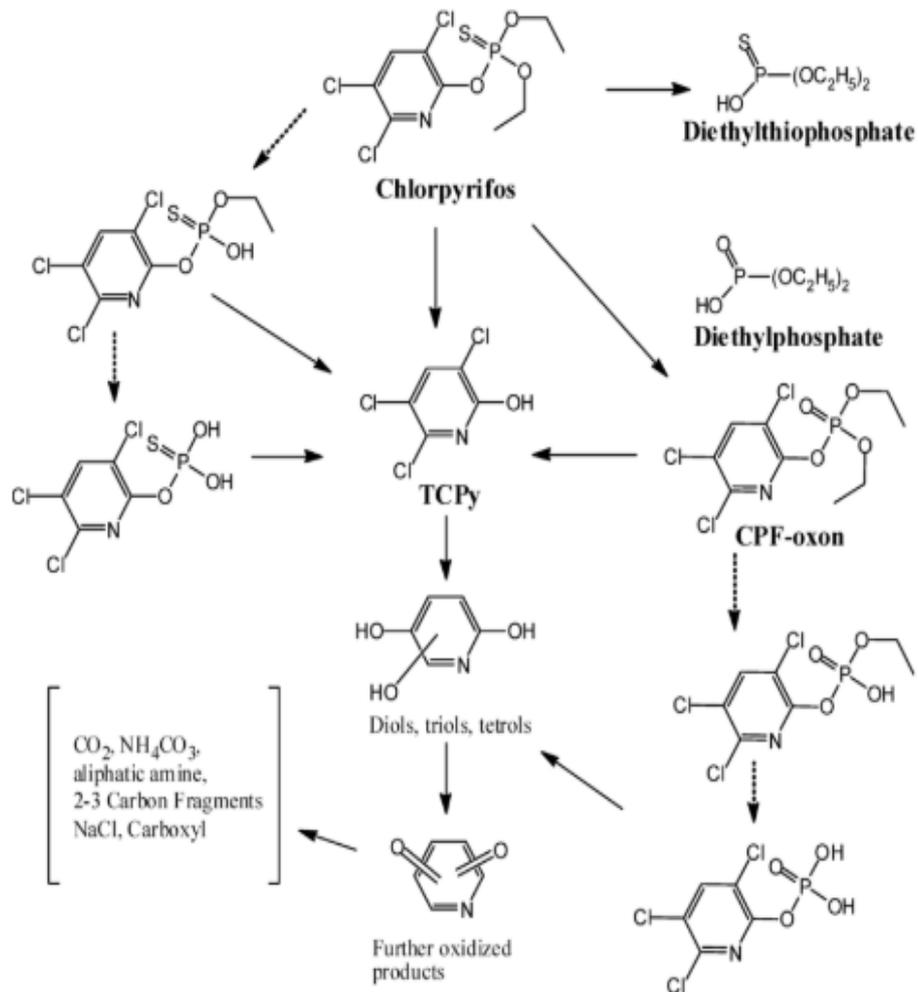


Figure I.14 : Voies de dégradation biotique du CPF. Les flèches en pointillés montrent des métabolites théoriques qui n'ont pas été rigoureusement identifiés comme produits de dégradation [47].

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire BIOGEP de l'École Nationale Polytechnique (ENP).

Notre recherche vise principalement à découvrir un moyen biologique efficace, pratique et respectueux de l'environnement pour la dégradation des organophosphorés, notamment le CPF.

Le travail s'est déroulé autour de deux axes principaux : la sélection des souches bactériennes capables de dégrader le CPF et l'identification des souches sélectionnées.

1. Matériel :

1.1 Équipements :

- Erlenmeyers de 250 mL
- Bêchers
- Boîtes de Pétri stériles.
- Incubateur (étuve)
- Pipettes automatiques (volumes variables).
- Pipettes Pasteur
- Hotte à flux laminaire
- Microscope
- Autoclave
- Balance analytique
- Agitateur magnétique
- Centrifugeuse

1.2. Matériel biologique :

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons prélevé des échantillons de sols agricoles, contaminés par des pesticides, de deux régions distinctes : la wilaya de Bouira et la wilaya de Tipaza. Les échantillons ont été mélangés ensemble pour permettre l'isolement de microorganismes capables de dégrader le CPF.

1.3. Matériel non biologique :

Du chlorpyrifos-éthyl (CAS N° 002921-88-2) nous a été fourni par l'unité de production de la société Alphyt (l'Algérienne des Phytosanitaires), située à Beni Merad, Blida. Alphyt, filiale du groupe ASMIDAL, possède quatre unités de production et quatre unités de

commercialisation. La société est spécialisée dans la fabrication de produits phytosanitaires et d'hygiène publique, notamment des bactéricides, des désinfectants, des insecticides et des rodenticides.

2. Méthodes :

2.1. Test de solubilité :

Le CPF fourni par Alphyt se présente sous forme de cristaux jaunes (Figure II.1). Pour son utilisation, un test de solubilité revêt une importance cruciale en raison de son insolubilité dans l'eau. À cette fin, nous avons testé trois solvants organiques différents, choisis en fonction de la littérature, à savoir l'acétone, le méthanol et l'éthanol absolu.



Figure II.1 : Chlorpyrifos fourni par Alphyt.

Les résultats de ce test ont démontré qu'un faible volume de 5 mL d'acétone permettait la dissolution totale de 3g de CPF, tandis qu'un volume plus important de méthanol (60 mL) permettait également la dissolution totale du CPF. En revanche, pour l'éthanol, le CPF n'a pas été dissous, même avec un volume considérable : 100 mL d'éthanol n'ont pas permis de dissoudre même 0,5 g de CPF.

2.2. Isolement des microorganismes dégradant le CPF :

2.2.1. Préparation du milieu minéral :

Pour la préparation des différents milieux utilisés dans la présente étude, un milieu minéral (milieu M) a tout d'abord été préparé. Sa composition est indiquée dans le tableau II.1.

Tableau II.1: Composition du milieu M [49]

Composants	Concentration mg/l
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2103,2
KH_2PO_4	405,4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	203,7
$CaCl_2$	21,9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	15,8
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	49,5
$MnSO_4 \cdot H_2O$	8,4
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,3
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4,8

2.2.2. Sélection des microorganismes :

La sélection des microorganismes capables de dégrader le CPF a été effectuée après acclimatation. Cette dernière est une étape essentielle pour permettre aux microorganismes de s'adapter à la présence du CPF et de synthétiser toutes les enzymes nécessaires à son catabolisme. Pour ce faire, le milieu minéral présenté dans le tableau II.1 a été utilisé avec supplémentation en une source de carbone (glucose) et une source d'azote (urée) en concentrations décroissantes, et supplémentation en pesticide en concentrations croissantes selon la sélection souhaitée.

Dans la présente étude, nous avons tenté de sélectionner des microorganismes capables d'utiliser le CPF comme unique source de carbone et des microorganismes capables d'utiliser le CPF comme unique source d'azote.

2.2.2.1. Sélection des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone :

Dans cette expérience, 75 g d'homogénat de sols ont été introduits dans 100 ml de milieu minimal (milieu M) mélangé à 3 g.L⁻¹ d'urée (CH₄N₂O), correspondant à la source d'azote. Le milieu a été ensuite enrichi avec du CPF (un essai a été réalisé avec la substance dissoute dans le méthanol, et un autre avec la substance dissoute dans l'acétone.), variant en concentration de 0,3 g.L⁻¹ à 3 g.L⁻¹ (Tableau II.2). En parallèle, la concentration en glucose (C₆H₁₂O₆) a été ajustée progressivement de 3 g.L⁻¹ à 0 g.L⁻¹. À la fin de cette période

d'acclimatation, la concentration de glucose était maintenue nulle (0 g.L^{-1}) afin que le CPF soit utilisé comme unique source de carbone.

Tableau II.2: Variation de la concentration du glucose et du CPF pour la sélection de souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone.

Nombre de jours	0	4	8	11	14	18	21	25	28	32	34	36
Glucose (g.L^{-1})	3	2,7	2,4	2,1	1,8	1,5	1,2	0,9	0,6	0,3	0	0
CPF (g.L^{-1})	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3	3	3

Les flacons de culture, recouverts de papier aluminium afin d'empêcher toute photodégradation du CPF, ont été incubés à une température moyenne de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation constante.

Cette expérience a duré 36 jours (du 19 mars au 24 avril). Durant cette période, le milieu de culture était, à chaque fois, centrifugé à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15 minutes pour récupérer la biomasse. Cette dernière était ainsi récupérée puis inoculée dans le milieu de culture approprié (concentrations de CPF et glucose ajustées).

2.2.2.2. Sélection des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source

d'azote :

Dans ce cas, la procédure était identique à celle de la sélection des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone, sauf que la concentration en glucose était maintenue constante à 3 g.L^{-1} et la concentration en urée variait de 3 g.L^{-1} à 0 g.L^{-1} comme indiqué dans le tableau II.3.

Tableau II.3: Variation de la concentration de l'urée et du CPF pour la sélection de souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source d'azote.

Nombre de jours	0	4	8	11	14	18	21	25	28	32	34	36
Urée (g.L ⁻¹)	3	2,7	2,4	2,1	1,8	1,5	1,2	0,9	0,6	0,3	0	0
CPF (g.L ⁻¹)	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3	3	3

2.3. Isolement des souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone/azote :

Cette étape permet de mettre en évidence et de purifier les micro-organismes capables de dégrader le CPF en les cultivant sur un milieu de culture solide sélectif.

Pour chaque essai, nous avons prélevé deux gouttes du milieu sélectif (contenant le CPF comme source de carbone/azote que nous avons diluées dans 10 ml d'eau distillée. Ensuite, nous avonsensemencé ces échantillons par étalement sur des boîtes de Pétri contenant le milieu solide sélectif. Ce milieu avait la composition des milieux utilisés au 36^{ème} (Tableaux II.2 et II.3) additionné de 2% (p/v) d'agar pour le solidifier. Trois boîtes de Pétri ont été préparées pour chaque essai. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur. Les boîtes ont ensuite été incubées à 35 °C pendant une durée de 3 à 8 jours.

Afin de vérifier les éventuelles interférences dues à la présence des solvants, deux essais supplémentaires (en triplicata) ont été rajoutés, comme indiqué dans le tableau II.4

Tableau II.4 : Composition des milieux d'isolement

Essais	Composition des milieux d'isolement
Isolement de souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source de carbone	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Milieu minéral M tableau II.1 ❖ 2% [p/v] d'agar. ❖ Urée $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (source d'azote) : 3g/l ❖ CPF dissout dans le solvant (acétone/méthanol) : 3g/l
Isolement de souches microbiennes utilisant le CPF comme unique source d'azote	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Milieu minéral M tableau II.1 ❖ 2% [p/v] d'agar. ❖ Glucose $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (source de carbone) : 3g/l ❖ CPF dissout dans le solvant (acétone/méthanol) : 3g/l
Isolement de souches microbiennes utilisant le solvant (acétone/méthanol) comme unique source de carbone	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Milieu minéral M tableau II.1 ❖ 2% [p/v] d'agar. ❖ Urée $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (source d'azote) : 3g/l ❖ Acétone / méthanol : 10g/l

2.4. Purification des microorganismes :

Après huit jours d'incubation, la purification des cultures était entamée. Cette étape, longue et fastidieuse, permet d'obtenir des cultures pures à partir de diverses colonies isolées. Le choix des colonies repose sur leur aspect macroscopique, à savoir leur couleur, leur forme, leur diamètre, leur opacité, etc. Le repiquage était effectué autant de fois que nécessaire, par la méthode d'ensemencement en surface par stries d'épuisement « méthode des cadrans » (figure II.2), dans des milieux sélectifs appropriés, afin d'obtenir des colonies microbiennes pures, bien différentes et éloignées les unes des autres.

Les boîtes étaient incubées à une température de 35°C pendant une durée de 24-72 heures.

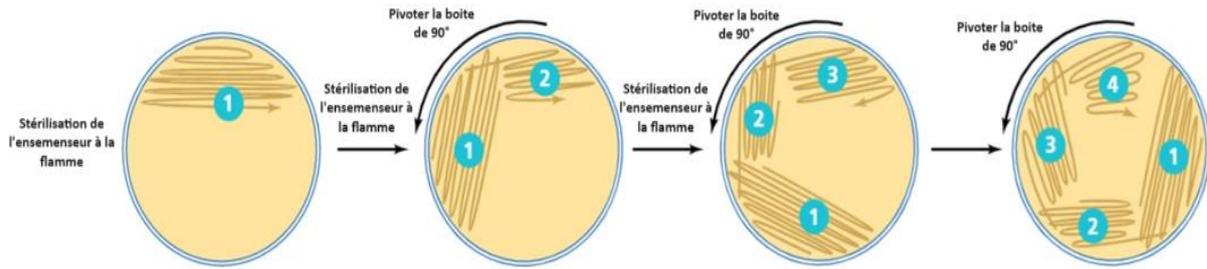


Figure II.2 : Méthode d'ensemencement en surface par stries d'épuisement « méthode des cadrans » [50].

2.5. Identification des microorganismes :

Les souches bactériennes ont été identifiées de la manière suivante :

2.5.1. Étude macroscopique :

La première étape de caractérisation est l'observation de l'aspect macroscopique des colonies, qui fournit une orientation précieuse pour l'identification ultérieure. Les critères d'identification macroscopique incluent :

- **La forme des colonies** : ronde, irrégulière, etc.
- **La taille des colonies** : par la mesure du diamètre.
- **La pigmentation** : la couleur de la colonie.
- **L'élévation** : convexe, concave, plate, etc.
- **L'opacité** : opaque, translucide ou transparente.
- **L'aspect de la surface** : lisse ou rugueuse.
- **La consistance** : grasse, crémeuse, sèche ou muqueuse.
- **L'odeur**.

2.5.2. Étude microscopique :

L'étude microscopique des microorganismes isolés a été effectuée par :

2.5.2.1. Coloration de Gram :

2.5.2.1.1. Principe :

La coloration différentielle la plus importante utilisée en bactériologie est la coloration de Gram, nommée d'après le docteur Hans Christian Gram. C'est un outil essentiel pour la classification et la différenciation des microorganismes car elle permet d'observer les

microorganismes et de distinguer la forme des cellules, le groupement, la présence de spores, etc. Elle permet aussi de diviser les cellules bactériennes en deux grands groupes, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Cette distinction se fait grâce aux deux colorants employés. Le violet de gentiane se fixe initialement sur les composants cytoplasmiques des bactéries, colorant toutes les bactéries en violet. Lorsque l'alcool (ou un mélange d'alcool et d'acétone) est appliqué, il décolore les bactéries à Gram négatif en raison de leur paroi cellulaire riche en lipides, qui permet à l'alcool de pénétrer et d'éliminer la coloration. En revanche, les bactéries à Gram positif conservent la coloration violette car la paroi cellulaire forme une barrière imperméable à l'alcool [50].

2.5.2.1.2. Procédure de la coloration :

Les différentes étapes de la coloration de Gram sont :

1. Réaliser un frottis bactérien et le fixer à la flamme.
2. Appliquer délicatement du cristal violet (violet de gentiane) sur les frottis et laisser agir pendant une minute avant de les rincer doucement à l'eau du robinet.
3. Appliquer délicatement la solution de lugol (iodure de potassium iodée) sur les frottis et laisser agir pendant une minute avant de les rincer doucement à l'eau du robinet.
4. Décolorer avec de l'alcool et laisser agir environ 30 secondes, puis rincer doucement à l'eau du robinet.
5. Contre-colorer avec de la fuchsine pendant une minute, puis rincer doucement à l'eau du robinet.
6. Effectuer un séchage et observer au microscope photonique en utilisant une goutte d'huile à immersion avec un objectif de 100 (grossissement $\times 1000$).

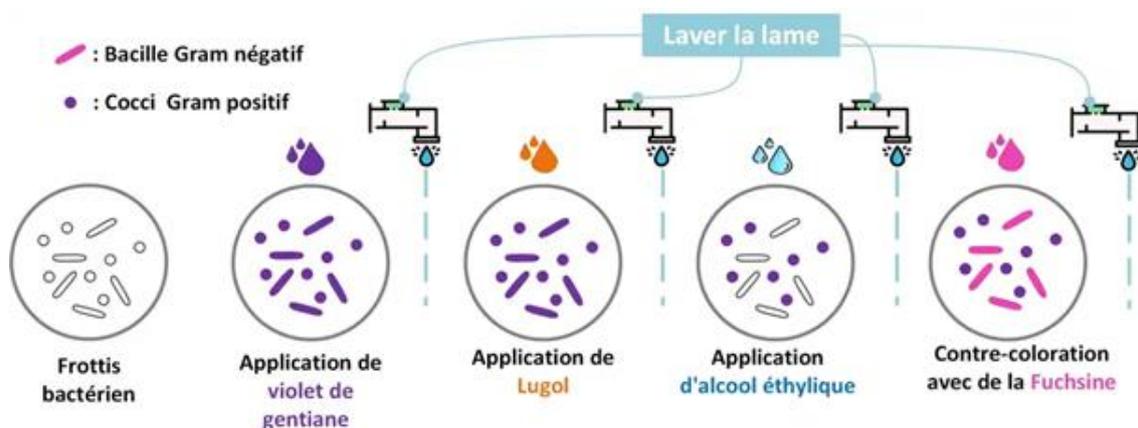


Figure II.3 : Étapes de la coloration de Gram.

Après cette coloration, il est possible de distinguer deux types de bactéries :

- Celles qui apparaissent en violet foncé ; elles ont conservé le violet de gentiane et sont appelées "Gram positif" (figure II.4).
- Celles qui apparaissent en rose ; elles ont perdu le violet de gentiane et sont appelées "Gram négatif".



Figure II.4 Observations microscopiques de bactéries à Gram positif (violette) et bactéries à Gram négatif [51].

2.5.2.2. État frais :

Les laboratoires de bactériologie utilisent fréquemment l'état frais, qui est facile, rapide et permettant de visualiser le nombre, les mouvements et l'agencement des microorganismes (qui restent vivants) sans préparation préalable (ni fixation ni coloration).

La procédure est la suivante :

1. Déposer une goutte de l'échantillon sur une lame (quelques colonies bactériennes dissoutes dans de l'eau physiologique stérile).
2. Recouvrir la goutte avec une lamelle.
3. Laisser reposer sur une surface horizontale pendant environ 3 minutes.
4. Observer l'échantillon au microscope photonique avec un grossissement $\times 40$.

2.5.3. Analyses biochimiques :

2.5.3.1. Test de la catalase :

2.5.3.1.1. Principe :

Ce test permet de déterminer la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries à Gram positif (elle est présente chez toutes les bactéries à Gram positif sauf les genres *Streptococcus*

et *Lactobacillus*). Cette enzyme décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et dioxygène, visualisable à l'œil nu par production de bulles.

La réaction chimique peut être représentée par l'équation (eq. 1) suivante :



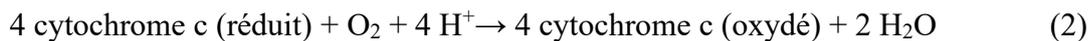
2.5.3.1.2. Procédure :

- Prélever quelques cellules bactériennes à l'aide d'une pipette Pasteur. Et les déposer sur une lame de microscope stérile.
- Ajouter une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% sur les cellules bactériennes.
- Observer immédiatement la formation de bulles. Le résultat est considéré :
 - Positif : Formation de bulles (présence de catalase).
 - Négatif : Absence de bulles (absence de catalase).

2.5.3.2. Test de l'oxydase :

2.5.3.2.1. Principe :

Ce test permet de déterminer la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase. Cette enzyme participe au transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire et réagit avec le réactif présent sur les disques d'oxydase (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) pour produire une coloration.



2.5.3.2.2. Procédure :

- Prélever quelques cellules bactériennes à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Toucher le disque d'oxydase avec les cellules bactériennes.
- Observer le changement de couleur du disque dans les 10 à 30 secondes. Le résultat est considéré :
 - Positif : Disque vire au bleu foncé ou pourpre dans les 10 à 30 secondes (présence de cytochrome c oxydase).
 - Négatif : absence de changement de couleur ou changement après 30 secondes (absence de cytochrome c oxydase).

2.5.3.3. Les méthodes d'identification par les galeries API® :

Le choix des galeries API® à utiliser pour l'identification d'un microorganisme est basé sur les caractéristiques morphologiques et culturelles de ce microorganisme à identifier, ainsi que sur les résultats des tests pour l'identification des enzymes respiratoires (la catalase et l'oxydase).

2.5.3.3.1. Procédure :

2.5.3.3.1.1. Préparation des galeries :

- Les fonds et couvercles des boîtes d'incubation sont réunis, et de l'eau distillée est répartie en quantité suffisante dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide.
- La galerie est déposée dans la boîte d'incubation, en travaillant en environnement stérile.

2.5.3.3.1.2. Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir une ampoule contenant le milieu de culture *API suspension medium*.
- Des colonies pures sont prélevées du milieu gélosé à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Réaliser une suspension bactérienne d'une turbidité d'environ 0,5 sur l'échelle de Mc Farland.

Après inoculation des galeries, celles-ci sont incubées à 37°C pendant 24H. Selon la galerie sélectionnée, certains tests nécessitent l'addition de réactifs particuliers.

2.5.3.3.1.3. Détermination du profil numérique :

Les puits sont organisés en triplets. Pour chaque triplet :

- Si le premier test est positif, le puits reçoit la valeur 1 ; sinon, il reçoit la valeur 0.
- Si le second test est positif, le puits reçoit la valeur 2 ; sinon, il reçoit la valeur 0.
- Si le troisième test est positif, le puits reçoit la valeur 4 ; sinon, il reçoit la valeur 0.

La somme des valeurs attribuées aux puits de chaque triplet est calculée. L'ensemble des valeurs obtenues constitue le profil numérique utilisé pour l'identification.

2.5.3.3.1.4. Identification des souches microbiennes :

L'identification des souches microbiennes est réalisée à l'aide du :

- Tableau d'identification fourni avec la notice de la galerie API sélectionnée,
- Logiciel APIWEB.

- Logiciel d'identification en ligne de l'UPBM disponible sur le site : <http://lab.upbm.org/>

2.5.3.3.2. Galeries API utilisées :

2.5.3.3.2.1. Galerie API Staph :

La galerie API Staph permet d'identifier 23 espèces de cocci à Gram positif. Ce système se compose de 19 micro-ampoules qui contiennent des substrats déshydratés et/ou des milieux nutritifs (Figure II.5). Ces tests sont importants dans la différenciation des *Staphylococcus*, des *Kocuria* et des *Micrococcus* [52].

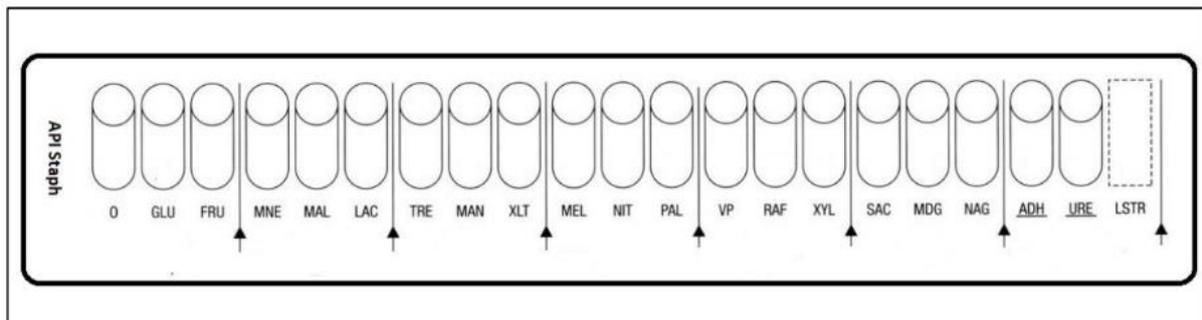


Figure II.5 : Présentation de la galerie API Staph.

2.5.3.3.2.2. Inoculation de la galerie :

Les puits de la galerie API Staph sont remplis avec la suspension bactérienne comme suit :

- Remplir les tubules des tests ADH et URE et remplir leurs cupules avec l'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose.
- Remplir uniquement les tubules des tests restants.

La galerie est incubée à 37°C pendant 24H.

2.5.3.3.2.3. Lecture de la galerie API Staph :

Les résultats de certains tests sont lus directement, d'autres, nécessitent l'addition de réactifs comme suit :

- Addition d'une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 au test NIT.
- Addition d'une goutte des réactifs ZYM A et ZYM B au test PAL.
- Addition d'une goutte des réactifs VP 1 et VP 2 au test VP.

Après l'ajout des réactifs, attendre 10 minutes avant d'observer les virages de couleurs et de lire les résultats à l'aide du tableau II.5 [53].

Tableau II.5: Tableau de lecture de la galerie API Staph

Tests	Composant actif	QTE (mg/cup.)	Réactions/Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
0	Aucun		Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose (témoin positif)	1,56	Témoin positif (D-GLUcose)	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	1,4	Acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	Acidification (D-MaNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	Acidification (D-MALtose)		
LAC	D-lactose	1,4	Acidification (D-LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	Acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	Acidification (D-MANnitol)		
XLT	D-xylitol	1,4	Acidification (D-XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	Acidification (D-MELibiose)		
NIT	Nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITares en nitrites	NIT 1 + NIT 2 /10min	
				Incolore-rose pale	Rouge
PAL	β -naphtylphosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	ZYM A + ZYM B /10 min	
				Jaune	Violet
VP	Sodium pyruvate	1,904	Priduction d'acétyl méthyl-carbino (voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 /10 min	
				Incolore-rose pale	Violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	Acidification RAFinose)	Rouge	Jaune
XYL	D-xylose	1,4	Acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	Acidification (SACcharose)		
MDG	Méthyl- α D-Glucopyranoside	1,28	Acidification (Méthyl- α D-Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl glucosamine	1,28	Acidification (N-Acétyl Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	Jaune	Orange-rouge
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	Rouge-violet

2.5.3.4. Gélose Chapman :

La gélose Chapman est un milieu sélectif pour les staphylocoques. C'est un milieu qui permet la croissance des souches du genre *Staphylococcus* qui apparaissent sous forme de colonies jaunes après fermentation du mannitol (source de carbone) contenu dans le milieu et virage du rouge de phénol (indicateur de pH) ; S'il y a fermentation, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune du milieu en présence de rouge de phénol. Sinon ce dernier maintient à sa teinte basique rouge. Sa forte teneur en NaCl inhibe la croissance de la plupart des autres souches [54].

2.5.3.5. Identification de *Bacillus cereus* :

Plusieurs tests sont préconisés pour l'identification de *Bacillus cereus*.

2.5.3.5.1. Identification biochimique de *Bacillus cereus*

Pour l'identification biochimique de *Bacillus cereus*, des tests biochimiques préliminaires doivent être effectués. Il s'agit de :

2.5.3.5.1.1. Test de la catalase :

Bacillus cereus est catalase positive.

2.5.3.5.1.2. Test d'hémolyse :

Pour réaliser le test d'hémolyse chez *Bacillus*, on utilise une gélose au sang. La culture de *Bacillus* est inoculée sur la surface de la gélose au sang frais, en striant la surface de la gélose avec une boucle d'inoculation stérile. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Après l'incubation, les résultats sont observés en fonction de l'apparence de la zone autour des colonies bactériennes. Une hémolyse bêta (β) se manifeste par une zone claire et transparente autour des colonies, indiquant une lyse complète des globules rouges. Une hémolyse alpha (α) se caractérise par une zone verdâtre et partiellement claire, indiquant une lyse partielle des globules rouges. L'absence de changement dans la gélose autour des colonies indique une hémolyse gamma (γ), signifiant qu'il n'y a pas de lyse des globules rouges. *Bacillus cereus* présente une β -hémolyse sur gélose au sang.

2.5.3.5.2. Ensemencement du milieu MEYP

La norme ISO 7932:2004 spécifie une méthode pour l'isolement et l'identification des *Bacillus cereus* et d'autres espèces de *Bacillus* en utilisant des méthodes biochimiques.

Le protocole expérimental peut être résumé comme suit : les microorganismes sont ensemencés sur milieu MEYP (*Mannitol Egg Yellow Polymyxin*) (communément appelé milieu

de Mossel) adapté à la croissance des *Bacillus*, avec incubation à 30°C (selon la norme). La tryptone et l'extrait de viande, présents dans ce milieu, favorisent la croissance de *Bacillus cereus*. Le jaune d'œuf, utilisé comme additif sous forme d'émulsion stérile, permet de mettre en évidence la présence d'une lécithinase (enzyme présente au niveau de la plupart des souches de *Bacillus cereus*) grâce aux produits insolubles, résultant de la dégradation du jaune d'œuf par la lécithine bactérienne, qui s'accumulent autour des colonies pour former un précipité blanchâtre. La présence de mannitol permet de différencier les microorganismes contaminants qui le fermentent (*Bacillus cereus* ne fermente pas le mannitol). Ils sont identifiés par le virage au jaune du rouge de phénol. La polymyxine, qui est un antibiotique, permet d'inhiber la presque totalité de la microflore secondaire lorsque l'échantillon à tester est fortement contaminé. Après incubation, les colonies suspectes de *Bacillus cereus*, apparaissent typiquement en rose avec une zone d'opacité entourant la colonie. Elles mesurent, généralement, entre 2 et 5 mm et présentent des bords « effilochés ».

Chapitre III : Résultats et discussion

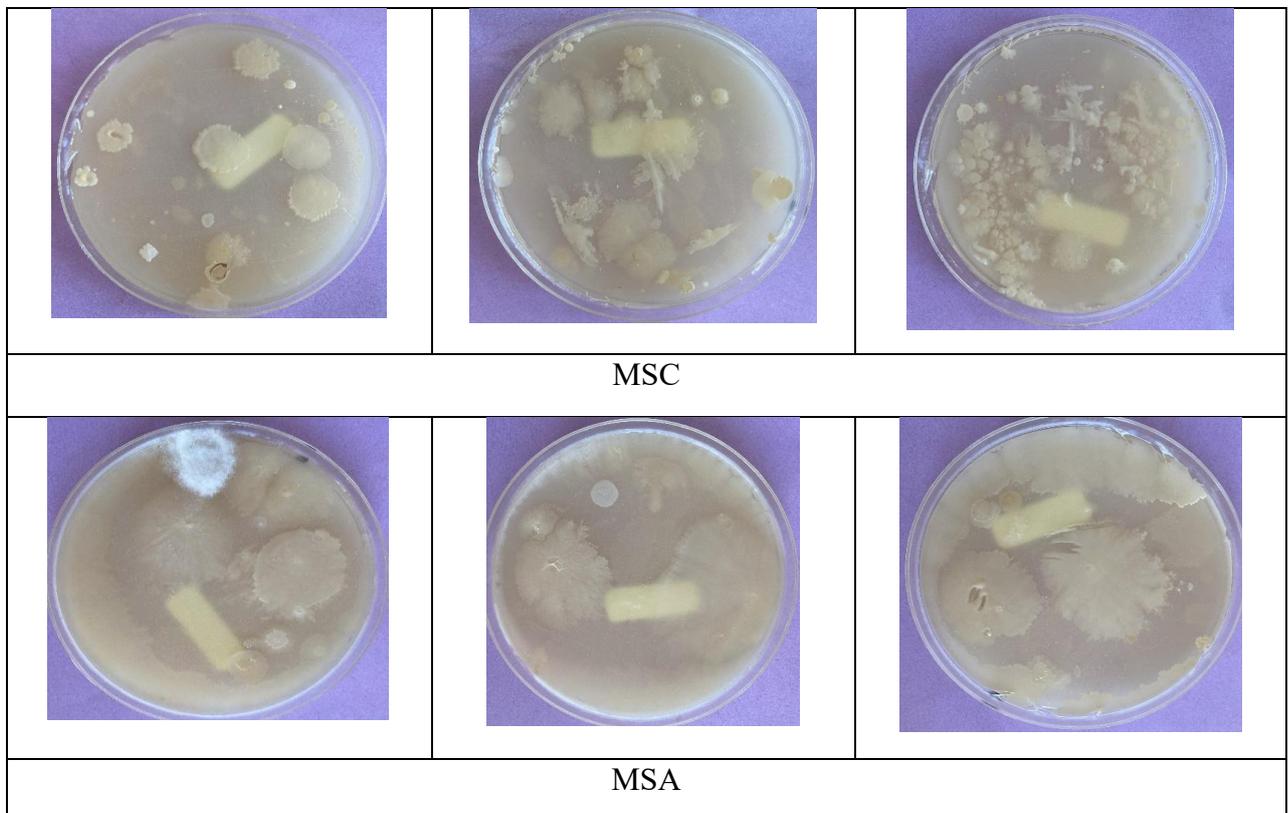
1. Isolement des souches bactériennes sur milieu sélectif :

Après la phase d'acclimatation, nous avons procédé à l'ensemencement des solutions diluées 10 fois dans les six milieux sélectifs différents préparés et nommés :

- ASA pour CPF dissous dans l'acétone et utilisé comme source d'azote,
- ASC pour CPF dissous dans l'acétone et utilisé comme source de carbone,
- MSA pour CPF dissous dans le méthanol et utilisé comme source d'azote,
- MSC pour CPF dissous dans le méthanol et utilisé comme source de carbone,
- ASO pour acétone utilisé comme source de carbone,
- MSO pour acétone utilisé comme source de carbone.

Ces milieux sélectifs enrichis avec 2% d'agar (poids/volume) ont été, ensuite, coulés dans des boîtes de Pétri. Les boîtes, ainsi préparées en triplicata, ont été incubées à 35°C pendant 7 jours.

Les résultats de cette incubation sont présentés dans la Figure III.1.



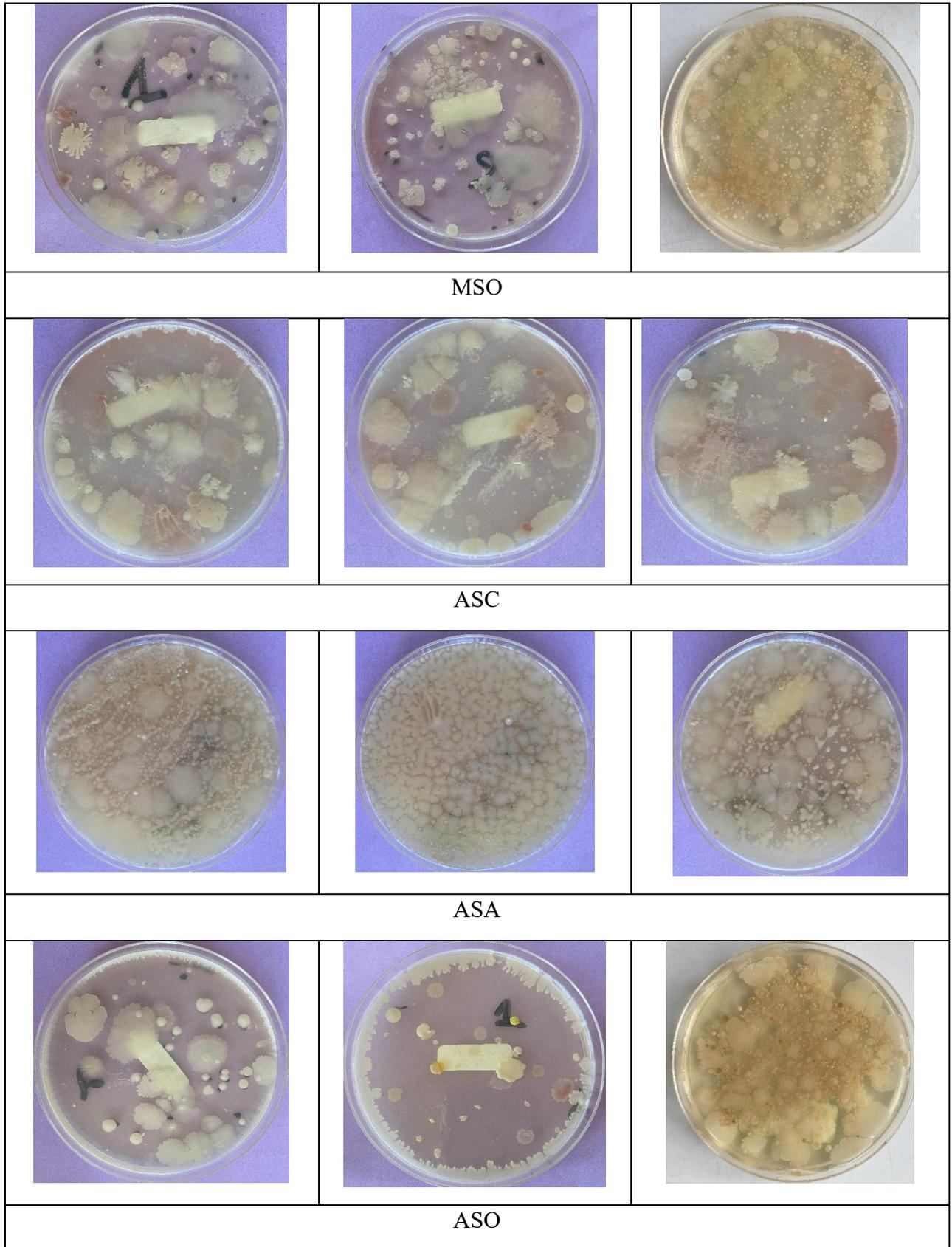


Figure III.1 : Observation des colonies bactériennes sur les milieux sélectifs après 7 jours de culture.

2. Purification des souches

Plusieurs repiquages ont été effectués, par la méthode d'ensemencement en surface par stries d'épuisement « méthode des cadrans », afin d'isoler et d'assurer la pureté des souches microbiennes. Quatre souches microbiennes pures (figure III.2) ont été sélectionnées pour la poursuite de l'étude. Ces souches purifiées ont été nommées comme suit :

- La souche b1 a été isolée à partir du milieu sélectif MSA.
- La souche b2 a été isolée à partir du milieu sélectif MSC.
- La souche c1 a été isolée à partir du milieu sélectif MSA.
- La souche b13 a été isolée à partir du milieu sélectif ASC.

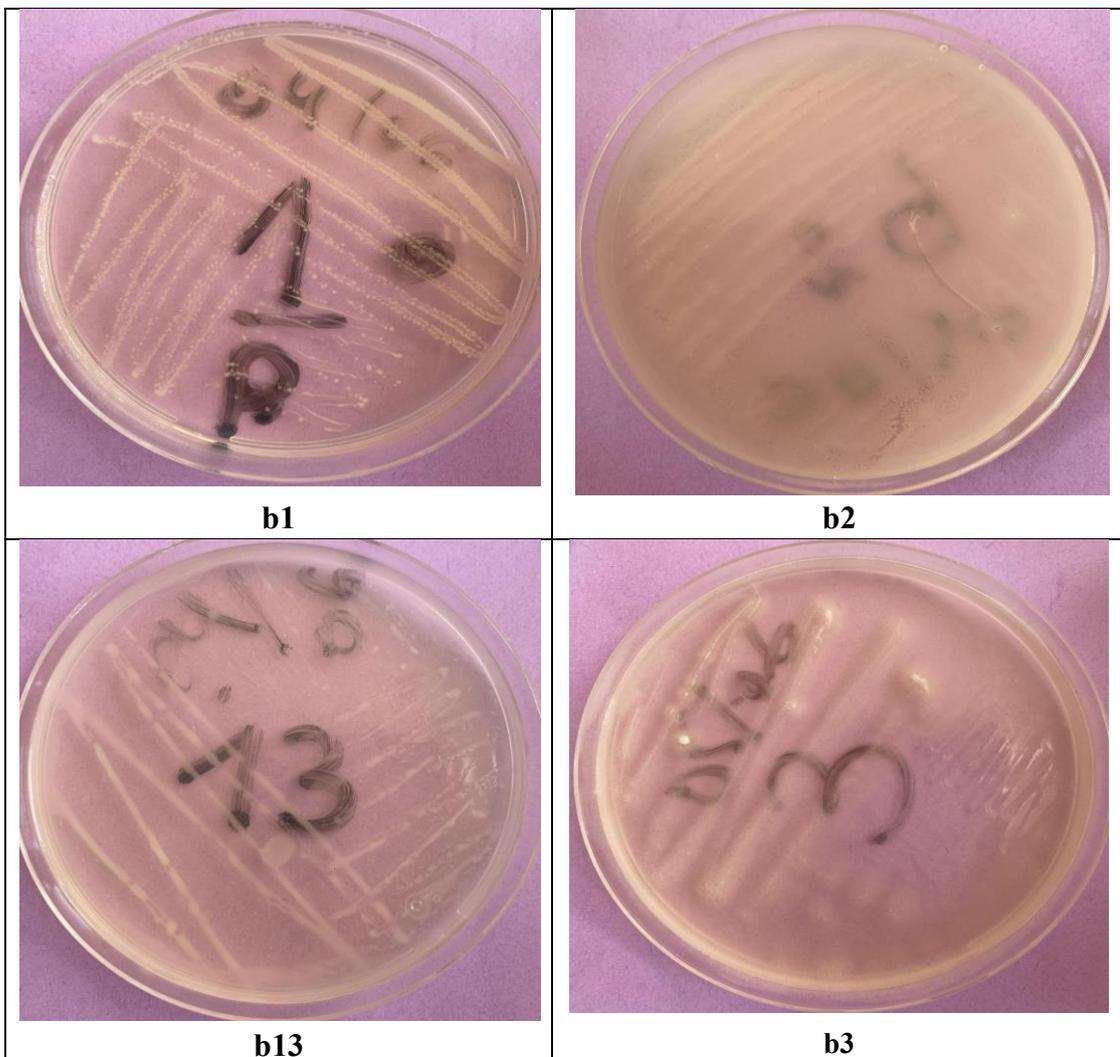


Figure III.2 : Souches purifiées à partir des milieux sélectifs

3. Caractères macroscopiques des souches isolées :

Les caractères macroscopiques des 4 souches isolées sont résumées dans le tableau III.1.

Tableau III.1. : Caractérisation macroscopique des souches isolées

	Souches			
	b1	b2	b3	b13
Aspect	Lisse	Rugueuse	Rugueuse	Lisse
Bord	Irréguliers	Irréguliers	Régulier	Irrégulier
Consistance	Crémeuse	Sèche et adhérente	Crémeuse	Muqueuse
Couleur	Beige	Incolore	Jaune	Blanche
Élévation	Plate	Plate	Plate	Convexe
Forme	Ronde	Irrégulière	Irrégulière	Irrégulière
Opacité	Opaque	Translucide	Opaque	Opaque
Taille (mm)	1	Colonies confluentes	4	3
Odeur	Aucune odeur caractéristique			

4. Identification des souches :

4.1. Coloration de Gram :

Une coloration de Gram a été effectuée sur tous les isolats obtenus (figure III.3), ce qui a permis de mettre en évidence la structure de la paroi chez les bactéries, ainsi que de déterminer leur morphologie et leur mode de groupement.

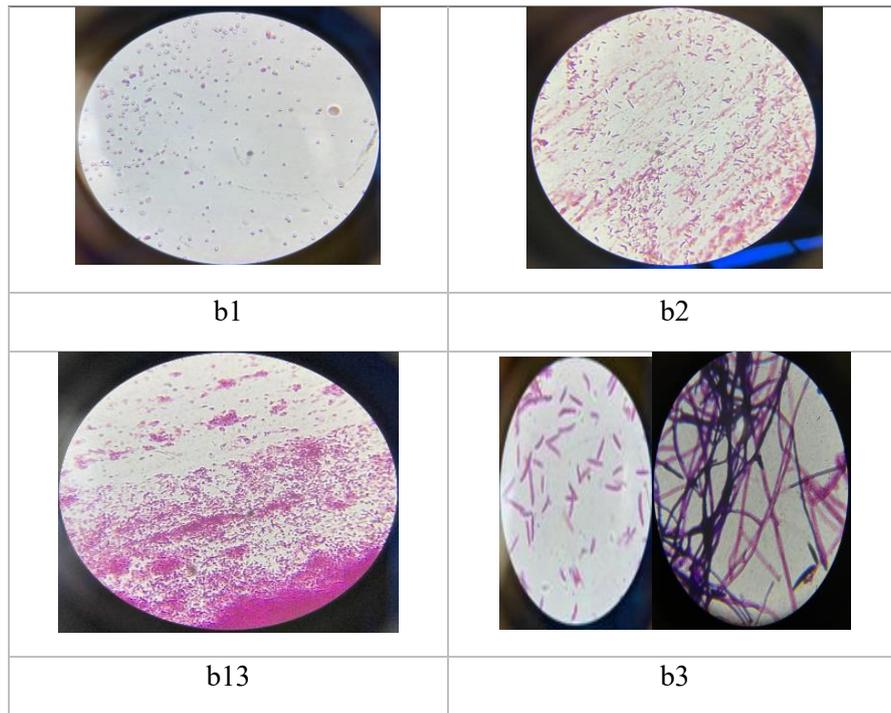


Figure III.3 : Observation sous microscope photonique des souches isolées après coloration de Gram (grossissement x400)

Les résultats de cette coloration sont résumés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Résultats de la coloration de Gram.

Souche	Type de Paroi	Morphologie	Mode de groupement
b1	Gram positif	Cocci	Amas irréguliers
b2	Gram positif	Bacilles	Chaînettes
b13	Gram positif	Bacilles	Chaînettes
b3	Gram positif	Filaments épais, avec apparition des chlamydo-spores et vésicules intercalaires, de taille irrégulière. Absence de microconidies. Présence de macroconidies à extrémité arrondie et contient en moyenne 3 logettes.	/

La coloration de Gram a permis, entre-autres, de mettre d'évidence la présence de quatre souches bactériennes (b1, b2 et b13) et d'une souche fongique (b3).

4.2. État frais :

L'observation microscopique des isolats à l'état frais permet de déterminer leur forme et de confirmer les résultats obtenus lors de la coloration de Gram. De plus, elle permet d'évaluer leur mobilité, étant donné que ce test est réalisé sur des microorganismes vivants. Les résultats de cette observation à l'état frais (figure III.4) sont résumés dans le tableau III.3.

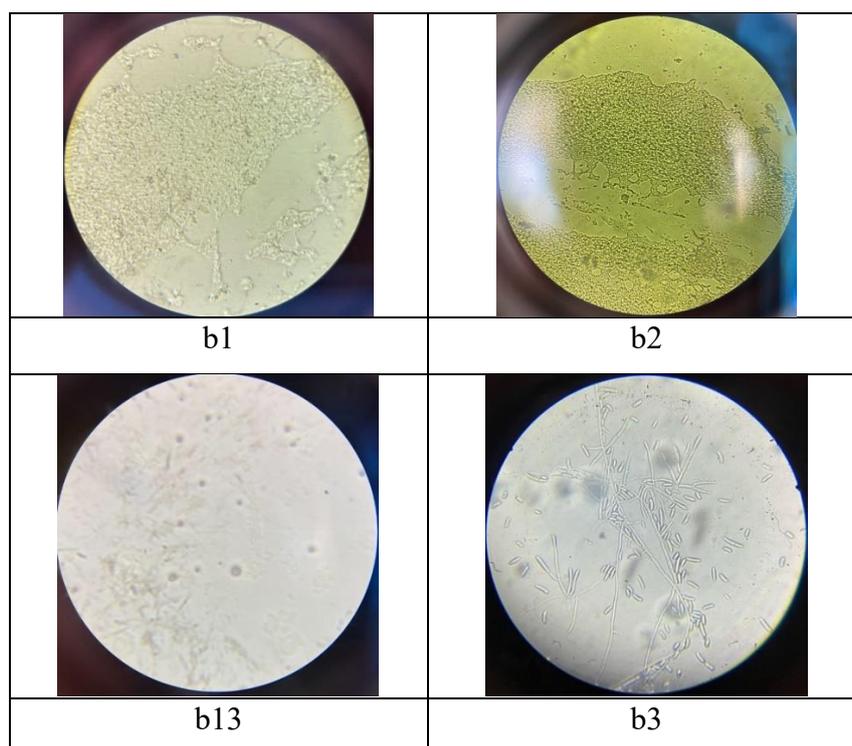


Figure III.4: Observation de l'état frais des souches isolées.

Tableau III.3 : Résultats de l'observation à l'état frais des souches isolées.

Souches	Mobilité	Morphologie	Mode de groupement
b1	Immuable	Cocci	Chainettes
b2	Mobile	Bacille	Isolées
b13	Immuable	Bacille	Isolées
b3	Immuable	Champignon	/

4.3 Recherche des enzymes respiratoires :

4.3.1 Test de la catalase :

Le test de la catalase a été réalisé sur les souches b1, b2, b3 et b13. Ces souches microbiennes sont à Gram positif. Le test de la catalase aide à orienter la recherche comme suit :

- Vers les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* lorsqu'il s'agit de Cocci possédant la catalase (catalase positifs).
- Vers le genre *Streptococcus* lorsqu'il s'agit de Cocci ne possédant pas la catalase (catalase négatifs).
- Vers les genres *Corynebacterium* et *Bacillus* lorsqu'il s'agit de bacilles pourvus de catalase (catalase positifs).

Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultats du test de la catalase.

Souche bactérienne	Catalase
b1	+
b2	+
b13	+
b3	+

Les bactéries b1, b2 et b13 sont toutes catalase positives, cela permet d'orienter l'identification de souches sélectionnées dans la présente étude vers :

- Le genre *Staphylococcus* ou le genre *Micrococcus* pour la souche b1.
- Le genre *Corynebacterium* ou le genre *Bacillus* pour les souches b2 et b13.

4.3.2 Test de l'oxydase :

Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : Résultats du test de l'oxydase.

Souche bactérienne	Oxydase
b1	-
b2	-
b13	-
b3	-

Toutes les souches sont oxydase Négative.

4.4 Identification de la souche b1 :

L'examen microscopique de souche bactérienne b1 a montré que celle-ci présente des caractéristiques morphologiques suggérant une affiliation possible aux genres *Staphylococcus* et *Micrococcus*. Il s'agit de Cocci en amas à Gram positives catalase positive et oxydase négative.

Pour confirmer cette identification initiale, la bactérie a été cultivée sur gélose Chapman ; ce dernier étant un milieu sélectif pour les staphylocoques. Après incubation, la croissance observée ainsi que la couleur caractéristique jaune de la souche b1 confirment son appartenance, très probable, au genre *Staphylococcus*.

Afin de confirmer cette étape préliminaire d'identification et de préciser la taxinomie de cette bactérie, la galerie API Staph a été employée.

L'identification par la galerie API Staph a été réalisée par ensemencement de la souche bactérienne b1 dans le milieu de culture approprié (*API suspension medium*) à 0,5 Mc Farland. Cette suspension bactérienne a servi à l'inoculation de la galerie API Staph. Après incubation à 37°C pendant 24H, certains tests ont nécessité l'addition de réactifs particuliers comme suit :

- Ajout d'une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 au test NIT. Ce test permet de vérifier la capacité de la souche testée à réduire les nitrates en nitrites.
- Ajout d'une goutte des réactifs ZYM A et ZYM B au test PAL. Ce test permet de vérifier la capacité de la souche testée à synthétiser la phosphatase alcaline.
- Ajout d'une goutte des réactifs VP 1 et VP 2 au test VP. Ce test permet d'indiquer la capacité de la souche testée à produire l'acétyl méthyl-carbinol.

Après 10 min de réaction, les résultats (Figure III.5) ont été lus et interprétés suivant le tableau de lecture disponible sur la fiche technique de la galerie Api Staph (tableau II.5).



Figure III.5: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat b1.

L'interprétation des résultats des tests réalisés par la galerie API Staph pour l'identification la souche b1 est résumée dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Résultats des tests réalisés sur la souche b1 avec la galerie API Staph.

Tests	Substrats	Résultat	Interprétation
0	Aucun (témoin négatif)	Le milieu est resté rouge	Pas de modifications dans le milieu
GLU	D-glucose (témoin positif)	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-glucose
FRU	D-fructose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-fructose
MNE	D-mannose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-mannose
MAL	D-maltose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-maltose
LAC	D-lactose	Le milieu est resté rouge	Pas de modifications dans le milieu
TRE	D-tréhalose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-lactose
MAN	D-mannitol	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-mannitol
XLT	D-xylitol	Le milieu est resté rouge	Pas de modifications dans le milieu
MEL	D-mélibiose	Le milieu est resté rouge	Pas de modifications dans le milieu
NIT	Nitrate de potassium	Le milieu est resté incolore	Pas de modifications dans le milieu
PAL	β -naphtylphosphate	Le milieu a viré au Violet	Dégradation de β -naphtylphosphate
VP	Sodium pyruvate	Le milieu a viré au marron	Production d'acétyl méthyl-carbino
RAF	D-raffinose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-raffinose
XYL	D-xylose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-xylose
SAC	D-saccharose	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du D-saccharose
MDG	Méthyl- α D-glucopyranoside	Le milieu est resté rouge	Pas de modifications dans le milieu
NAG	N-acétyl glucosamine	Le milieu a viré au jaune	Dégradation du N-acétyl glucosamine
<u>ADH</u>	L-arginine	Le milieu est resté jaune	Pas de modifications dans le milieu
URE	Urée	Le milieu est resté jaune	Pas de modifications dans le milieu
Profil numérique			6334650

L'identification de la souche b1 à l'aide du profil numérique obtenu indique qu'elle appartient à l'espèce *Staphylococcus xylosus* avec un pourcentage de fiabilité de 100%.

4.5 Identification des souches b2 et b13 :

Après observation au microscope, les deux bactéries b2 et b13, ont été identifiées comme des bacilles. La culture dans le milieu MEYP (Mossel) a été effectuée car ce milieu est connu pour être favorable à la croissance des *Bacillus cereus*.

Les résultats obtenus (figure III.6) ont été les suivants :

- En présence de la souche b2, le milieu MEYP a présenté une couleur rose caractéristique et une zone claire et transparente autour des colonies sur la gélose au sang frais, indiquant une lyse complète des globules rouges ce qui indique que cette souche appartient à l'espèce *Bacillus cereus*.
- En présence de la souche b13 le milieu MEYP a présenté une teinte jaune distincte, et une zone verdâtre et partiellement claire indiquant que cette souche appartient bien au genre *Bacillus* elle a été identifiée comme étant *Bacillus* spp.



Figure III.6 : Résultats du test d'incubation des bactéries b2 et b13 dans le milieu MEYP (Mossel) rajoutez la légende

4.6 Identification de la souche b3 :

La souche b3 présente une morphologie typique de champignon selon l'observation microscopique. Pour identifier cette souche, nous l'avons envoyée à un laboratoire de contrôle de qualité. Les experts du laboratoire ont réalisé plusieurs analyses, comprenant des tests morphologiques ainsi que potentiellement d'autres tests biochimiques spécifiques. À la suite de ces analyses, ils ont déterminé que la souche isolée correspondait à *Epidermophyton floccosum*.

5. Test de l'utilisation du CPF comme source de carbone/azote par les souches sélectionnées :

Dans la présente étude, nous avons isolé des souches capables d'utiliser le CPF comme seule source de carbone ou comme seule source d'azote à partir de milieux sélectifs contenant le milieu minéral M avec le CPF dissout dans un solvant approprié (méthanol ou acétone). Le choix du solvant a été dicté par sa capacité à solubiliser le pesticide testé. Différents essais en parallèle ont été menés et les résultats ont permis de sélectionner des plusieurs souches microbiennes capables de métaboliser le CPF en l'utilisant comme seule source de carbone ou comme seule source d'azote

Nous nous sommes proposées de réaliser un essai supplémentaire pour vérifier si une même souche microbienne pouvait utiliser le CPF, en même temps, comme seule source de carbone et comme seule source d'azote. Pour ce faire, à partir de De plus, nous avons ensemencé les quatre souches (b1, b2, b3 et b13) dans un milieu solide contenant uniquement le milieu minéral M et le CPF (sans solvant) ; en absence de toute autres sources de carbone ou d'azote. Les résultats ont montré que les quatre souches ont réussi à croître dans ce milieu également.

6. Interprétation et discussion des résultats :

La présente étude a permis d'isoler des souches microbiennes capables d'utiliser le CPF comme seule source de carbone/azote pour leur croissance. Cela a été réalisé après une période d'acclimatation des souches au CPF qui a duré 36 jours, en augmentant progressivement la concentration de CPF jusqu'à atteindre une concentration finale de 3 g.L⁻¹ et en diminuant progressivement la concentration de glucose ou de la source d'azote, selon les essais, jusqu'à atteindre une concentration finale nulle.

Finalement, quatre microorganismes capables de métaboliser le CPF ont été isolés à l'issue de cette étude. Parmi eux, trois souches bactériennes appartenant à différentes espèces ont été identifiées, ainsi qu'un champignon.

Selon la littérature, de nombreuses études ont été menées pour isoler des bactéries capables de métaboliser le CPF, avec l'objectif de les utiliser potentiellement dans la bioremédiation des sols et des eaux contaminés par ce composé. Certaines de ces bactéries appartiennent aux mêmes genres que les isolats obtenus dans cette étude, tels que les genres *Bacillus* et *Staphylococcus*.

Les souches appartenant au genre *Bacillus* sont fréquemment retrouvées dans le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote. On peut aussi retrouver des *Bacillus* dans des denrées alimentaires.

De nombreuses études ont démontré que les souches du genre *Bacillus* ont la capacité de dégrader le CPF, telles que *Bacillus megaterium*, *Bacillus soli* souche R, *Bacillus drentensis* et *Bacillus koreensis* [55].

A titre d'exemple, dans une étude menée par Shweta et al., *Bacillus megaterium* a été cultivé avec succès à deux températures d'incubation différentes, 27 °C et 37 °C, et a montré une tolérance à des concentrations croissantes (allant de 200 à 800 mg.L⁻¹) de CPF ajouté à un milieu minéral. Les résultats ont indiqué que *Bacillus megaterium* peut tolérer toutes les concentrations testées de CPF, et avec une croissance optimale maintenue pour des concentrations en CPF allant jusqu'à 600 mg.L⁻¹. L'analyse comparative des schémas de croissance sous les deux températures n'a révélé aucune différence significative, suggérant que cette bactérie est de nature mésophile. Les résultats globaux indiquent que la bactérie *Bacillus megaterium* pourrait être utilisée efficacement pour des études ultérieures en raison de sa capacité à tolérer des concentrations relativement élevées de CPF [56].

Une autre étude menée par Ambreen et Yasmin, a permis d'examiner la dégradation du CPF par la souche *Bacillus thuringiensis* MB497, isolée de champs agricoles de Mianwali (Pakistan). Cette souche a réussi à éliminer près de 99,9 % du CPF (la concentration initiale était de 200 mg.L⁻¹) dans le bouillon M-9, dépourvu de source de carbone supplémentaire, en seulement 9 jours. De plus, cette étude a permis de montrer que cette bactérie est capable de tolérer des concentrations très élevées de CPF, allant jusqu'à 8 g.L⁻¹ [57].

Des études ont été menées pour isoler des souches de *Bacillus thuringiensis* dégradant le CPF à partir d'échantillons contaminés par ce dernier. Le taux de dégradation du CPF en culture liquide a été estimé pendant 48 heures d'incubation pour cet isolat. Plus de 50 % de la concentration initiale a été dégradée en 12 heures et 88,9 % après 48 heures [58].

Les souches appartenant au genre *Bacillus* (b2 et b13), isolées dans la présente étude, ont démontré une capacité à tolérer des concentrations élevées de CPF, allant jusqu'à 3 g.L⁻¹. par contre, il est à noter que nous n'avons pas testé de concentrations de CPF plus élevées. Ces microorganismes possèdent une capacité intrinsèque à tolérer de fortes concentrations de CPF.

En outre, cela indique le potentiel significatif de ces souches pour la bioremédiation des sols ou eaux contaminés par ce pesticide.

Une étude menée par Liu et al., a montré que *Bacillus cereus*, isolé d'un sol en Chine, est capable de dégrader le CPF (100 mg.L⁻¹) avec un taux de dégradation de 74 % en 7 jours. Liu et ses collègues (2011) ont également démontré que les conditions optimales pour cette dégradation sont une température de 30 °C, un pH de 7,0 et une concentration de CPF inférieure à 100 mg.L⁻¹ [59].

La bioremédiation du CPF dans le sol a été évaluée dans une étude menée par Farhan et al., utilisant *Bacillus cereus* Ct3, une souche isolée d'un sol et identifiée par ribotypage (ARNr 16S). En 8 jours et à un pH de 8, la souche *B. cereus* Ct3 a démontré une résistance au CPF allant jusqu'à 125 mg.L⁻¹ et a réussi à dégrader 88 % du CPF. Elle a prouvé sa capacité à supporter des températures comprises entre 30 et 40 °C. Selon l'étude, le CPF a été transformé en acide diéthylthiophosphate DETP et en 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) sans production de sous-produits toxiques (figure III.7). Une voie de biodégradation a été proposée (figure III.5), où le CPF se décompose en acide diéthylthiophosphate DETP et en 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) par hydrolyse ; le TCP étant ensuite minéralisé. Pour identifier les facteurs influençant cette dégradation, les chercheurs ont utilisé des plans expérimentaux comme Plackett-Burman et des méthodes de réponse de surface, découvrant que la concentration de CPF et la taille de l'inoculum étaient critiques. *Bacillus cereus* Ct3 s'est révélé être capable de dégrader le CPF sans produire de métabolites toxiques, ce qui le rend utile pour la bioremédiation des sols contaminés. Cette recherche soutient que *Bacillus cereus* Ct3 est très efficace pour traiter les sols contaminés par le CPF. En outre, *Bacillus cereus* Ct3 a montré une résistance maximale jusqu'à 175 mg.L⁻¹ de CPF.

Les recherches futures visent à séquencer le génome complet de cette bactérie, à identifier les gènes et les enzymes impliqués dans la biodégradation [60].

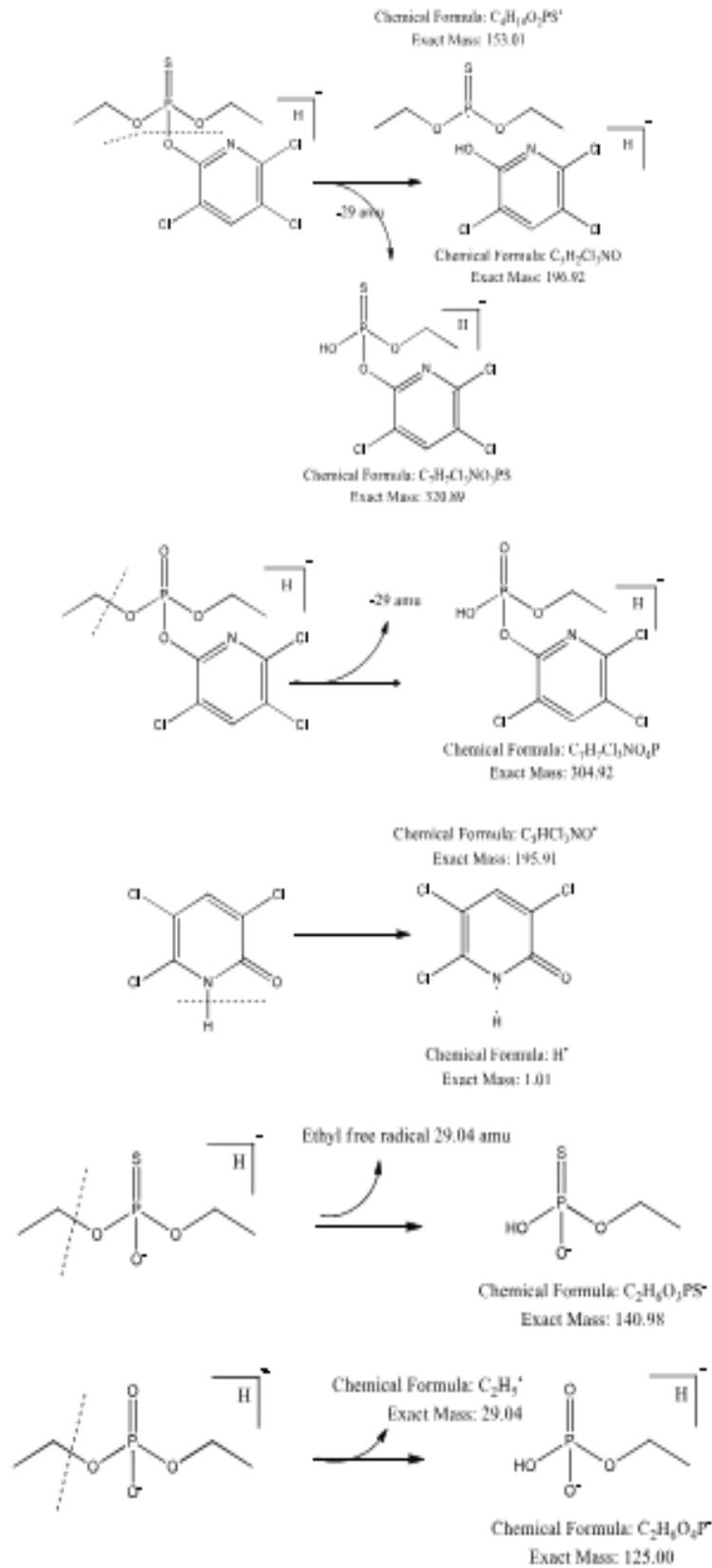


Figure III.7. Voies de dégradation du chlorpyrifos proposées [60].

Selon une recherche menée par Duraisamy et al., *Bacillus cereus* MCAS 02, isolé du sol agricole, est capable de dégrader le CPF. Dans une culture faite à un pH de 7,5, à une température de 32 °C et avec une agitation à 90 tours par minute, *B. cereus* a atteint une dégradation maximale de 89 % du CPF pour une concentration initiale de 2,5 g.L⁻¹. En présence de CPF et dans un milieu minéral, *B. cereus* a réussi à décomposer le CPF en 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) et en DETP. Cette bactérie produit également l'enzyme Organophosphate Hydrolase (OPH), qui participe à la dégradation de ces composés. Les résultats montrent que l'exposition au CPF induit chez *B. cereus* une voie métabolique permettant de décomposer le CPF et son produit d'hydrolyse, le TCP, en métabolites polaires [61].

D'autres genres de bactéries ont été indiqués comme étant capables de dégrader le CPF comme c'est le cas du genre *Staphylococcus*.

Une étude a mis en évidence la dégradation du CPF par l'espèce *Staphylococcus* sp. Isolée du sol rhizosphérique de la plante *Calotrophis gigatica* préalablement exposée au CPF [62]

Selon une autre étude réalisée sur la croissance et la dégradation du CPF par les isolats dans un milieu de sel minéral (MSM) enrichi à 0,5% de CPF. L'isolat *Staphylococcus aureus* a démontré son efficacité en dégradant 80 % du composé total du milieu en seulement 2 semaines d'incubation. Cette étude suggère que *Staphylococcus aureus* est une option prometteuse pour la bioremédiation des sols contaminés par ce pesticide [63].

Dans une étude réalisée par Suman et ses collègues, où la souche *Staphylococcus aureus* a été cultivée dans un milieu minéral contenant le CPF en tant que seule source de carbone (de 50 à 1000 µg/ml), il a été constaté que *S. aureus* atteignait son maximum de croissance le 12ème jour. Par ailleurs, une analyse par HPLC a été réalisée afin de déterminer le taux de CPF résiduel après 12 jours d'incubation, montrant que *S. aureus* était capable de dégrader 99% du pesticide à une concentration de 1000 µg/ml [64].

Dans notre recherche, nous avons identifié une souche appartenant à l'espèce *Staphylococcus xylosus*. Selon Dordet-Frisoni, *S. xylosus* est une souche halophile Gram-positive qui se trouve généralement comme commensale sur la peau et les muqueuses humaines et animales [65].

Bien que *Staphylococcus xylosus* n'est pas une espèce très étudiée dans la littérature pour sa capacité à dégrader le CPF, du moins pas dans les études principales et bien établies sur le sujet. D'autres espèces de *Staphylococcus* ou d'autres genres bactériens sont souvent étudiés pour leur capacité à dégrader ce pesticide (*Staphylococcus warneri*) [66], [67].

Cependant, *Staphylococcus xylosus* a été étudié pour la remédiation des métalloïdes. Les résultats montrent que *S. xylosus* peut tolérer et accumuler jusqu'à 26,39 mM (6598,66 µg/ml) de tellurite de potassium dans le milieu. Ces observations suggèrent que la résistance au tellurite et la forte capacité de réduction de *S. xylosus* pourraient avoir des applications prometteuses dans l'industrie pour la dépollution des environnements contaminés [68].

En outre, *Staphylococcus xylosus* a également démontré sa capacité à dégrader des composés aromatiques tels que le 1,2-dichlorobenzène (1,2-DCB), le 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP) et le 4-Cl-m-crésol [69]. Cette bactérie est également utilisée dans la bioremédiation pour éliminer des métaux lourds comme le Cr (V) et le Cd (II) [70].

Staphylococcus xylosus a aussi été étudié pour sa capacité à produire des lipopeptides. Les résultats montrent que cette souche, isolée d'un sol contaminé par de l'huile moteur, produit un biosurfactant complexe de protéines et de lipides capable d'émulsifier divers hydrocarbures. Ces observations suggèrent que les biosurfactants naturels de *S. xylosus* pourraient avoir des applications prometteuses dans l'industrie, en utilisant des souches bactériennes efficaces et des substrats peu coûteux pour produire ces composés en grandes quantités et de meilleure qualité que les produits synthétiques [71].

Les chercheurs ont aussi étudié la dégradation du CPF par des champignons. Dans une étude menée par Chen et al., un champignon a été isolé et identifié comme *Cladosporium cladosporioides*, a montré une forte capacité à dégrader le CPF, à une concentration de 50 mg·L⁻¹, et n'utilisant comme seule source de carbone. Il s'est avéré que ce microorganisme pouvait tolérer des concentrations allant jusqu'à 500 mg·L⁻¹. Les conditions optimales de dégradation étaient de 26,8°C et pH 6,5, ce qui a permis à ce champignon de métaboliser complètement le CPF en cinq jours. Les cinétiques de dégradation du CPF et du TCP ont suivi un modèle du premier ordre [72].

Divers champignons ont été identifiés comme aptes à dégrader le CPF. C'est le cas de *Phanerochaete chrysosporium* [73], *Verticillium* sp. DSP [74], *Acremonium* sp. GFRC-1 [75],

Ganoderma sp. JAS4 [76], *Trichoderma sp.* [77], *Trichosporon sp.*, *Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* [78].

Aussi ; nous n'avons trouvé qu'aucune étude sur la capacité d'*Epidermophyton floccosum* à dégrader le CPF. Par contre, *Epidermophyton floccosum* a été étudié pour sa capacité à utiliser les trois principaux composés de la méthylxanthine comme seule source de carbone et d'azote. Les résultats ont montré qu'*E. floccosum* pouvait croître efficacement en utilisant ces composés comme seule source de carbone et d'azote [79].

Conclusion générale & Perspective

Les pesticides organophosphorés ont été largement utilisés pour lutter contre les ravageurs en agriculture. Ces composés ont été impliqués dans plusieurs maladies nerveuses et musculaires chez les humains. La fabrication et la manipulation à grande échelle d'insecticides organophosphorés ont entraîné la contamination mondiale des sols, de l'air et des eaux. La dégradation de ce type de pesticide un domaine de recherche de plus en plus important ces dernières années. L'accent est actuellement mis sur le développement de technologies rentables et respectueuses de l'environnement pour traiter les environnements pollués. La biodégradation a offert une option efficace et économique pour ce processus de décontamination. De même, la biodégradation a également été le principal mécanisme pour éliminer les résidus de CPF, en particulier dans le traitement des eaux usées rejetées par les divers processus de production de CPF.

Dans cette étude, nous avons isolé et sélectionné quatre souches microbiennes capables de biodégrader le CPF. Ces souches ont été purifiées et ont démontré leur capacité à dégrader le CPF tout en l'utilisant comme source de carbone et d'azote. Étant donné leur potentiel de métabolisation du CPF, ces souches peuvent être envisagées pour la bioremédiation des sols et des eaux contaminés par ce pesticide. Cependant, avant de procéder à des essais de bioremédiation, plusieurs études complémentaires sont nécessaires :

- Identification génomique des souches via le séquençage de l'ARN 16S.
- Détermination des conditions optimales de dégradation et évaluation de l'impact de la concentration de CPF sur la biodégradation.
- Évaluation de l'efficacité de la biodégradation pour chaque souche individuellement et en consortium, ainsi que l'identification des produits intermédiaires et finaux formés pendant la dégradation du pesticide.
- Extraction et identification des enzymes responsables de cette dégradation, et évaluation de la capacité des isolats à dégrader d'autres pesticides de type organophosphorés.
- Étude de l'ajout d'autres sources nutritionnelles supplémentaires au CPF pour évaluer leur influence sur la biodégradation.
- Immobilisation des souches et des enzymes dans des matrices pour étudier leur impact sur leurs performances de biodégradation dans des milieux contaminés.
- Étude de la capacité de ces souches à produire des biosurfactants.

Les perspectives de recherche identifiées ouvrent la voie à de nouvelles avancées dans la compréhension et l'optimisation des processus de biodégradation, offrant des solutions innovantes pour relever le défi de la contamination par les pesticides.

Annexes

1. Fiche de données de sécurité du chlorpyrifos [80]

2. IDENTIFICATION DES DANGERS

Classification

Statut réglementaire de l'OSHA

Ce produit est considéré comme dangereux selon la norme sur la communication des renseignements à l'égard des matières dangereuses d'OSHA (29 CFR 1910.1200)

Toxicité aiguë - orale	Catégorie 3
Toxicité aiguë - inhalation (poussières/brouillards)	Catégorie 4
Liquides inflammables	Catégorie 4

Éléments d'étiquetage SGH, y compris les conseils de prudence

VUE D'ENSEMBLE DES PROCÉDURES D'URGENCE

Danger

Mentions de danger

H301 - Toxique en cas d'ingestion

H332 - Nocif par inhalation

H277 - Liquide combustible

H400 - Très toxiques pour les organismes aquatiques

H410 - Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme

Dangers physiques

H277 - Liquide combustible

Liquide combustible



Conseils de prudence - Prévention

P264 - Se laver les mains soigneusement après manipulation

P270 - Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant le produit

P261 - Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols

P271 - Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé

P210 - Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. - Ne pas fumer

P280 - Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P273 - Éviter le rejet dans l'environnement

Conseils de prudence - Réponse

P304 + P340 - EN CAS D'INHALATION : Transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer

P311 - Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin

P301 + P310 - EN CAS D'INGESTION : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin

P330 - Rincer la bouche

P391 - Recueillir le produit répandu

Conseils de prudence - Entreposage

P405 - Garder sous clef

P403 + P235 - Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais

Conseils de prudence - Élimination

P501 - Éliminer le contenu/récipient selon les directives de l'étiquette

HNOC (danger non classé autrement)

Non classés ne étaient pas autrement dangers identifiés.

Autres informations

Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme. Peut être nocif par contact cutané.

Références Bibliographiques

- [1] Désiré, N. M. A., Denis, N. A. M. J., Véronique, N. N. A., Norbert, N. K. T. W., Bekolo, N. N., & Hortense, N. B. E. (2021). Effect of pesticides on microbial diversity on agricultural soil in the locality of Akonolinga in the Centre Region - Cameroon. *Magna Scientia Advanced Research And Reviews*, 2(1), 028 039. <https://doi.org/10.30574/msarr.2021.2.1.0031>
- [2] Thorat, T., Patle, B. K., Wakchaure, M., & Parihar, L. (2023). Advancements in techniques used for identification of pesticide residue on crops. *Journal of Natural Pesticide Research*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100031>
- [3] Mali, H., Shah, C., Patel, D. H., Trivedi, U., & Subramanian, R. B. (2022). Degradation insight of organophosphate pesticide chlorpyrifos through novel intermediate 2,6-dihydroxypyridine by *Arthrobacter* sp. HM01. *Bioresources And Bioprocessing*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00515-5>
- [4] Gensch, L., Jantke, K., Rasche, L., & Schneider, U. A. (2024). Pesticide risk assessment in European agriculture : Distribution patterns, ban-substitution effects and regulatory implications. *Environmental Pollution*, 348, 123836. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123836>
- [5] Yadav, M., Shukla, A. K., Srivastva, N., Upadhyay, S. N., & Dubey, S. K. (2015). Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos : a review. *Critical Reviews In Biotechnology*, 36(4), 727 742. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1015958>
- [6] Kalanov, T. (2019). Biodegradation of Organophosphorous Pesticide : Chlorpyrifos. *Scientific Review*, 51. <https://doi.org/10.32861/sr.51.8.18>
- [7] Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., Ifemeje, J. C., & Patrick-Iwuanyanwu, K. C. (2020b). Pesticides, History, and Classification. Dans Elsevier eBooks (p. 29 42). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819304-4.00003-8>
- [8] Boudet, C. (2020). Pesticides : Diversité des sources d'information et effet sur la perception des risques. *Environnement Risques Santé*, 19(2), 81-81. <https://doi.org/10.1684/ers.2020.1409>
- [9] Suwanaruang, T. (2024). Pesticides, Toxicity and Its Effects on Human Health and Environment. <https://doi.org/10.9734/bpi/mono/978-81-969435-6-1>
- [10] Bhat, A., Bhagat, D., Chavan, M., Deshmukh, S., Pawar, R., & Chavan, V. (2023). Effects Of Pesticides On Human Health And Environment.
- [11] Stănescu, M. D. (2014). Pesticides: Synthesis, Activity and Environmental Aspects. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3434.6007>

- [12] Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation : A comprehensive review. *Frontiers In Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>
- [13] Campos, E. V. R., De Oliveira, J. L., Pascoli, M., De Lima, R., & Fraceto, L. F. (2016). Neem Oil and Crop Protection : From Now to the Future. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01494>
- [14] Yadav, R., Singh, S., & Singh, A. N. (2022). Biopesticides : Current status and future prospects.
- [15] Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., Singh, G., Barnwal, R. P., & Singla, N. (2020). Global trends in pesticides : A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 201, 110812. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110812>
- [16] Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. <https://www.researchgate.net/publication/313445102>
- [17] Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S., & Khan, I. (2019). Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*, 8(03), 1889-1897. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.224>
- [18] Zacharia, J. T. (2011). Identity, physical and chemical properties of pesticides. *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis*, 21, 1-8. <https://doi.org/10.5772/17513>
- [19] Testud, F., & Grillet, J. (2007). Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. EMC. *Pathologie Professionnelle et de L'environnement/EMC Pathologie Professionnelle et de L'environnement*, 2(2), 1-24. [https://doi.org/10.1016/s1155-1925\(07\)71836-0](https://doi.org/10.1016/s1155-1925(07)71836-0).
- [20] Gupta, R. (2014). Carbamate pesticides. Dans Elsevier eBooks (p. 661-664). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00106-8>.
- [21] Song, J. H., Nagata, K., Tatebayashi, H., & Narahashi, T. (1996). Interactions of tetramethrin, fenvalerate and DDT at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain research*, 708(1-2), 29-37. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01239-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01239-7)
- [22] WHO. (2019). Classification OMS recommandée des pesticides en fonction des dangers qu'ils présentent et Lignes directrices pour la classification 2019. <http://apps.who.int/bookorders>.

- [23] Zacharia, J. T. (2011). Identity, physical and chemical properties of pesticides. *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis*, 21, 1-8. <https://doi.org/10.5772/17513>
- [24] Kulkarni, A. G., & Kaliwal, B. B. (2017). Bioremediation of Methomyl by *Escherichia coli*. Dans *Methods in pharmacology and toxicology* (p. 75 86). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7425-2_4.
- [25] (PDF) Blanchoud, H., Barriuso, E., Chevreuril, M., Guery, B., Moreau-Guigon, E., Schott, C., & Tournebize, J. (2011). Les pesticides dans le bassin de la Seine.
- [26] Ghazi, R. M., Yusoff, N. R. N., Halim, N. S. A., Wahab, I. R. A., Latif, N. A., Hasmoni, S. H., Zaini, M. A. A., & Zakaria, Z. A. (2023). Health effects of herbicides and its current removal strategies. *Bioengineered*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21655979.2023.2259526>.
- [27] Dawson, A. H., Eddleston, M., Senarathna, L., Mohamed, F., Gawarammana, I., Bowe, S. J., Manuweera, G., & Buckley, N. A. (2010). Acute Human Lethal Toxicity of Agricultural Pesticides : A Prospective Cohort Study. *PLoS Medicine*, 7(10), e1000357. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000357>.
- [28] P. Aktions-Netzwerk eV, “Protect humanity and the environment from pesticides. Promote alternatives.” [Online]. Available: www.pan-germany.org,
- [29] Stoytcheva, M. (Ed.). (2011). *Pesticides in the modern world: Risks and benefits*. BoD–Books on Demand.
- [30] Sayen, S., & Guillon, E. (2010). Transfert des produits phytosanitaires : Du sol à l’eau. *Physique Chimie*, 33(0). <https://doi.org/10.51257/a-v1-af6820>
- [31] Derkaoui, A., Elbouazzaoui, A., Elhouari, N., Achour, S., Labib, S., Sbaï, H., & Kanjaa, N. (2011). Severe acute poisoning by organophosphorus pesticides: report of 28 cases. *The Pan African medical journal*, 8, 16-16.
- [32] Bhattu, M., Verma, M., & Kathuria, D. (2021). Recent advancements in the detection of organophosphate pesticides : A review. In *Analytical Methods* (Vol. 13, Numéro 38). <https://doi.org/10.1039/d1ay01186c>
- [33] Xiong, S., Deng, Y., Zhou, Y., Gong, D., Xu, Y., Yang, L., Chen, H., Chen, L., Song, T., Luo, A., Deng, X., Zhang, C., & Jiang, Z. (2018). Current progress in biosensors for organophosphorus pesticides based on enzyme functionalized nanostructures : a review. *Analytical Methods*, 10(46), 5468 5479. <https://doi.org/10.1039/c8ay01851k>.

- [34] Soares, S., Rosado, T., Barroso, M., Vieira, D. N., & Gallardo, E. (2019). Organophosphorus pesticide determination in biological specimens : bioanalytical and toxicological aspects. *International Journal Of Legal Medicine*, 133(6), 1763-1784. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02119-9>.
- [35] Salerno, A. (2016). Évaluation de l'efficacité de dégradation et de décontamination cutanée du CeO₂ vis-à-vis d'un composé organophosphoré, le Paraoxon (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
- [36] Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428-471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>.
- [37] Worek, F., Wille, T., Koller, M., & Thiermann, H. (2016). Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Archives Of Toxicology*, 90(9), 2131-2145. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1772-1>.
- [38] Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*, 128(1-3), 215-228.
- [39] Dash, D. M., & Osborne, W. J. (2020). Rapid biodegradation and biofilm-mediated bioremoval of organophosphorus pesticides using an indigenous *Kosakonia oryzae* strain -VITPSCQ3 in a Vertical-flow Packed Bed Biofilm Bioreactor. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 192, 110290. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110290>.
- [40] USEPA. (2011). Revised chlorpyrifos preliminary registration review drinking water assessment. United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.
- [41] George, N., Chauhan, P. S., Sondhi, S., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Biodegradation and Analytical Methods for Detection of Organophosphorus Pesticide: Chlorpyrifos. In *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology* (Vol. 20, Numéro 2, p. 79-94). www.ijopaasat.in
- [42] Thapar, A., Zalawadia, A., Pokharkar, O. V., & Satam, S. S. (2015). Classification of pesticides and its damaging effects: A review. 1. <https://doi.org/10.17812/blj.2016.412>
- [43] Kumar, P., Arshad, M., Gacem, A., Soni, S., Singh, S., Kumar, M., Yadav, V. K., Tariq, M., Kumar, R., Shah, D., Wanale, S. G., Mesfer, M. K. M. A., Bhutto, J. K., & Yadav, K. K. (2023). Insight into the Environmental Fate, hazard, Detection, and Sustainable Degradation Technologies of Chlorpyrifos - An Organophosphorus Pesticide. *Research Square* (Research Square). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3059508/v1>.

- [44] Mackay, D., & Mackay, D. (2006). Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. CRC/Taylor & Francis.
- [45] USEPA, U.S. EPA. (1997, January 14). U.S. EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Review of chlorpyrifos poisoning data, Memorandum, 14 January (1997).
- [46] Giesy, J. P., & Solomon, K. R. (2014). Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in North America. Springer Nature.
- [47] Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W. C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., & Spencer, P. S. (2008). Review of the Toxicology of Chlorpyrifos with an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Critical Reviews In Toxicology*, 38(sup2), 1-125. <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>.
- [48] Chawla, N., Suneja, S., & Kukreja, K. (2013). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CHLORPYRIPHOS DEGRADING BACTERIA. In *Indian J. Agric. Res* (Vol. 47, Numéro 5, p. 381-391). www.arccjournals.com
- [49] Salah-Tazdaït, R., Tazdaït, D., Berrahma, R., Abdi, N., Grib, H., & Mameri, N. (2017b). Isolation and characterization of bacterial strains capable of growing on malathion and fenitrothion and the use of date syrup as an additional substrate. *International Journal Of Environmental Studies*, 75(3), 466-483. <https://doi.org/10.1080/00207233.2017.1380981>.
- [50] Cappuccino, J., & Welsh, C. (2018). *Microbiology, a laboratory manual*. In Pearson Education Limited.
- [51] Hayette, M. P., Huynen, P., & Meex, C. (2014). Travaux pratiques de microbiologie generale. *Journal of microbiology*, 20(1), 1-62.
- [52] BioMérieux SA Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés. Fiche technique galerie API Staph
- [53] Smith, H., & Brown, A. E. (2022). *Benson's microbiological laboratory manual*. McGraw Hill LLC.
- [54] Benhidi Issame. (2017). Compte-rendu de travaux pratiques de Bactériologie. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24820.22402>
- [55] Ahirwar, U., Kollah, B., Dubey, G., & Mohanty, S. R. (2019). Chlorpyrifos biodegradation in relation to metabolic attributes and 16S rRNA gene phylogeny of bacteria in a tropical vertisol. *SN Applied Sciences*, 1(3), 228.

- [56] Shweta, N., Kamal, J., & Keshavkant, S. (2023). Chlorpyrifos Mediated Amendment in Protein Profiling of *Bacillus* spp. *Journal Of Ravishankar University*, 36(1), 1-11. <https://doi.org/10.52228/jrub.2023-36-1-1>
- [57] Ambreen, S., & Yasmin, A. (2021). Novel degradation pathways for Chlorpyrifos and 3, 5, 6-Trichloro-2-pyridinol degradation by bacterial strain *Bacillus thuringiensis* MB497 isolated from agricultural fields of Mianwali, Pakistan. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, 172, 104750. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104750>
- [58] Wu, S., Peng, Y., Huang, Z., Huang, Z., Xu, L., Ivan, G., Guan, X., Zhang, L., & Zou, S. (2015). Isolation and characterization of a novel native *Bacillus thuringiensis* strain BRC-HZM2 capable of degrading chlorpyrifos. *Journal of Basic Microbiology*, 55(3), 389-397. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300501>
- [59] Liu, Z. Y., Chen, X., Shi, Y., & Su, Z. C. (2011). Bacterial Degradation of Chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Advanced Materials Research*, 356-360, 676-680. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.356-360.676>
- [60] Farhan, M., Ahmad, M., Kanwal, A., Butt, Z. A., Khan, Q. F., Raza, S. A., Qayyum, H., & Wahid, A. (2021). Biodegradation of chlorpyrifos using isolates from contaminated agricultural soil, its kinetic studies. *Scientific Reports*, 11(1), 10320. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88264-x>
- [61] Duraisamy, K., Muthusamy, S., & Balakrishnan, S. (2018). An eco-friendly detoxification of chlorpyrifos by *Bacillus cereus* MCAS02 native isolate from agricultural soil, Namakkal, Tamil Nadu, India. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.001>
- [62] Jespa, J. P. (2015). Research Article Biodegradation of Chlorpyrifos Using *Staphylococcus* sp., Isolated From the Rhizosphere of *Calotropis gigantea* r. Br.
- [63] Hamsavathani, V., Aysha, O. S., & Ajith, A. R. (2017). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CHLORPYRIFOS DEGRADING BACTERIA FROM AGRICULTURAL SOIL. *International Journal of Advanced Research*, 5(5), 1209-1221. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/4234>
- [64] Suman, S., Singh, T., Swayamprabha, S., & Singh, S. (2020). Biodegradation of Pesticide Chlorpyrifos by Bacteria *Staphylococcus aureus* (Accession no. CP023500.1) Isolated from Agricultural Soil. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, 20(1 & 2), 21-26. <https://doi.org/10.18311/jeoh/2020/25042>
- [65] Dordet-Frisoni, E. (2007). *Staphylococcus xylosum*: cartographie du génome et diversité génétique (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I)

- [66] John, E. M., Sreekumar, J., & Jisha, M. S. (2016). Optimization of Chlorpyrifos Degradation by Assembled Bacterial Consortium Using Response Surface Methodology. *Soil & Sediment Contamination*, 25(6), 668-682. <https://doi.org/10.1080/15320383.2016.1190684>
- [67] John, E. M., Varghese, E. M., & Shaik, J. M. (2020). Plasmid-Mediated Biodegradation of Chlorpyrifos and Analysis of Its Metabolic By-Products. *Current Microbiology*, 77(10), 3095-3103. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02115-y>
- [68] Soleimani Sasani, M., Heidarzadeh, S., Zolfaghari, M. R., Soleimani, M., & Serajian, S. (2020). High potential of tellurite bioremediation by moderately halophilic *Staphylococcus xylosus*. *SN Applied Sciences*, 2(8), 1338. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3149-6>
- [69] Ziagova, M. G., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2010). Comparative studies on the degradation of three aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(8), 1017-1025. <https://doi.org/10.1080/10934521003772444>
- [70] Varjani, S. J., Agarwal, A. K., Gnansounou, E., & Gurunathan, B. (Eds.). (2018). *Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7485-1>
- [71] Keskin, N. O. S., Han, D., Ozkan, A. D., Angun, P., Umu, O. C. O., & Tekinay, T. (2015). Production and structural characterization of biosurfactant produced by newly isolated *Staphylococcus xylosus* STF1 from petroleum contaminated soil. *Journal of Petroleum Science & Engineering*, 133, 689-694. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2015.07.011>
- [72] Chen, S., Liu, C., Peng, C., Liu, H., Hu, M., & Zhong, G. (2012). Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol by a New Fungal Strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. *PLoS ONE*, 7(10), e47205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047205>
- [73] Bumpus, J. A., Kakar, S. N., & Coleman, R. D. (1993). Fungal degradation of organophosphorous insecticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39-40(1), 715-726. <https://doi.org/10.1007/bf02919030>
- [74] Fang, H., Xiang, Y. Q., Hao, Y. J., Chu, X. Q., Pan, X. D., Yu, J. Q., & Yu, Y. L. (2008). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(4), 294-303. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.10.001>
- [75] Kulshrestha, G., & Kumari, A. (2010). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched

- red agricultural soil. *Biology And Fertility Of Soils*, 47(2), 219–225.
<https://doi.org/10.1007/s00374-010-0505-5>
- [76] Silambarasan, S., & Abraham, J. (2013). Efficacy of *Ganoderma* sp. JAS4 in bioremediation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP from agricultural soil. *Journal Of Basic Microbiology*, 54(1), 44–55.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201200437>
- [77] Bhagobaty, R. K., Joshi, S. R., & Malik, A. (2006, 31 décembre). Microbial Degradation of Organophosphorous Pesticide : Chlorpyrifos (Mini-Review). <https://ispub.com/IJMB/4/1/7764>
- [78] Xu, G., Li, Y., Zheng, W., Peng, X., Li, W., & Yan, Y. (2007). Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. *Biotechnology Letters*, 29(10), 1469–1473.
<https://doi.org/10.1007/s10529-007-9444-0>
- [79] Hussein, A. A., & Al-Janabi, S. (2009). The Ability of Dermatophytes to Utilize Methylxanthine as Sole Source of Carbon and Nitrogen. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 1(3), 163–167.
[http://maxwellsci.com/print/crjbs/\(3\)163-1](http://maxwellsci.com/print/crjbs/(3)163-1)
- [80] « FICHE DE DONNÉES DE SECURITÉ Nufos 4E FDS n° : FO002059-A 1. IDENTIFICATION DU PRODUIT ET DE LA SOCIÉTÉ », 2018.