

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Ecole Nationale Polytechnique
Département de Génie de l'Environnement
Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement

Thèse de Doctorat en Génie de l'Environnement

Option : Biotechnologie

Présentée par :

Mr. TAZDAÏT Djaber

Magister en Biotechnologie de l'E.N.P.
Ingénieur en Génie Biologique de l'U.S.T.H.B.

Intitulée

Traitement d'un pesticide par voie biologique

Soutenue publiquement le : 04/03/2014

devant le jury composé de :

Président :	Mr. AHMED ZAID Toudert	Professeur	E.N.P.
Directrice de thèse :	Mme. ABDI-HAIDER Nadia	Professeur	E.N.P.
Examineurs :	Mme. SALEM Zineb	Professeur	U.S.T.H.B.
	Mr. KHALAF Hussein	Professeur	U.S.D.B.
	Mme. KEBBOUCHE-GANA Salima	Maître de Conférences/A	U.M.B.B.
Invité :	Mr. LOUNICI Hakim	Professeur	U.A.M.O.B.

ENP 2014

ملخص

في إطار هذا العمل تم التطرق إلى دراسة التهديم الحيوي للمبيد الحيوي "ملتيون" وذلك باستعمال أحوال منشطة، ثم تم النظر كذلك في مفعول تركيز الملتيون على عملية التهديم. فضلا عن ذلك، تم القيام بتجريب مفعول الجلكو، ودبس السكر وعصير التمر على عملية تحطيم المبيد الحيوي، ومن جهة أخرى، تم النظر في إمكانية استعمال المبيد الحيوي كمصدر وحيد للفوسفور والكبريت. قمنا في إطار اخر، بتجريب تهديم المبيد وذلك باستعمال ثلاث أصناف من القواعد من بينها حطام نوى الزيتون لأجل تثبيت الكائنات الحية المجهرية التي تشكل الأحوال المنشطة. وكانت النتائج المتحصل عليها تثبت أن الأحوال المنشطة المستعملة في إطار هذا العمل بإمكانها تهديم الملتيون، كما أن استعمال دبس السكر مكن من تهديم المبيد ومن جهة أخرى، مكن عصير التمر من تهديم المبيد بنسبة 89% في ظرف 110 سا ذات تركيز 60 مغ/ل بنسبة 92% وذلك في ظرف 75 سا، وقد أبرزنا كذلك أن الأحوال بإمكانها استعمال المبيد كمصدر وحيد للفوسفور خلال نموها لكن ليس لديها القدرة على استعماله كمصدر وحيد للكبريت. وأخيرا، أبرزت النتائج المتعلقة باستعمال القواعد ارتفاع في نسبة تهديم الملتيون مقارنة بالنسب المتحصل عليها عند استعمال الأحوال المنشطة بالصيغة العادية أي بدون تثبيت. استعمال حطام نوى الزيتون سمح بالتهديم التام للملتيون ذات التركيز 10 مغ/ل وذلك في ظرف 12 سا فقط.

الكلمات المفاتيح : أحوال منشطة، تهديم حيوي، دبس السكر، عصير التمر، قواعد، ملتيون.

Résumé

Dans le cadre de ce travail, on a étudié la biodégradation du malathion par des boues activées. L'effet de la concentration initiale du pesticide sur le processus de dégradation a été également étudié. L'effet de trois substrats organiques additionnels (glucose, mélasse et moût de dattes) sur la dégradation du pesticide a été considéré. Par ailleurs, l'élimination du malathion en présence de ce dernier soit comme unique source de phosphore ou bien comme unique source de soufre a été étudiée. La faisabilité du traitement du pesticide par les boues activées adsorbées sur trois supports différents, a également été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que les boues activées utilisées étaient capables de dégrader le malathion. En présence de mélasse, 92 % de la concentration initiale du malathion (60mg/l) a été éliminée après 75h d'incubation et en présence de moût de dattes, un taux d'élimination de 89% a été obtenu après 110h d'incubation. Par ailleurs, Les boues activées utilisées testés étaient capables d'utiliser le malathion comme leur unique source de phosphore mais pas comme leur unique source de soufre. Enfin, l'utilisation des grignons d'olives comme support a permis l'élimination complète du malathion, testé à la concentration de 10 mg/l et ce, au bout de 12 h d'incubation.

Mots clés : boues activées; dégradation; malathion; mélasse; moût de dattes ; support.

Abstract

In this study, the biodegradation of malathion using batch activated sludge was studied. The effect of initial malathion concentration on the degradation process was investigated. In addition, three kinds of additional carbon sources, i.e., glucose, molasses, and date juice were tested to choose a favourite carbon source for malathion biodegradation. The ability of mixed microbial community to use malathion as a source of phosphorus and sulphur nutrition was also evaluated. Packed Bed Reactor (PBR) using three kinds of biofilm carriers was employed for efficient degradation of malathion. Results showed that local activated sludge used in this study could effectively degrade malathion. In the presence of molasses, 92% of the initial dose of insecticide (60mg/l) was degraded within 75h. Date juice permitted a maximum malathion removal of 89% after 110h incubation. The activated sludge was found to be able to use the malathion as the sole phosphorus source. In contrast, the degradation ability of the activated sludge was lost when the pesticide was used as the sole source of sulphur. The degradation capacity of the PBR was higher than the performance obtained with the batch reactor. Reactor packed with crushed olive kernels exhibited the best performance allowing a total removal of malathion (10 mg/l) within 12h.

Keywords: activated sludge; carrier; date juice; degradation; malathion; molasses.

Sommaire

Remerciements	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Introduction générale	1
Partie I : Etude bibliographique	4
1. Généralités sur les pesticides	4
1.1. Définition	4
1.2. Historique	5
1.3. Classification des pesticides	6
1.3.1. Selon leurs utilisations	6
1.3.1.1. Herbicides	6
1.3.1.2. Insecticides	7
1.3.1.3. Fongicides	7
1.3.2. Selon leurs usages	7
1.3.3. Selon la nature chimique	8
1.4. Toxicité des pesticides	8
1.4.1. Toxicité aiguë	9
1.4.2. Toxicité chronique	10
1.5. Normes réglementaires régissant l'emploi des pesticides	10
1.6. Les pesticides en Algérie	11
1.7. Les pesticides dans le monde	11
1.8. Impacts des pesticides sur l'environnement et la santé	12
1.9. Pollutions engendrées par les pesticides	13
1.9.1. Contamination de l'air	13
1.9.2. Contamination des sols	14
1.9.3. Contamination des eaux	14
1.10. Malathion	15
1.10.1. Propriétés physico-chimiques du malathion	15
1.10.2. Fabrication	16
1.10.3. Utilisation	16

1.10.4. Mode d'action	16
1.10.5. Toxicité.....	16
2. Méthodes de traitement des pesticides.....	17
2.1. Dégradation abiotique.....	18
2.1.1. Adsorption sur charbon actif en poudre (CAP)	18
2.1.2. Adsorption sur charbon actif en grain (CAG)	18
2.1.3. Ozonation.....	18
2.1.4. La nanofiltration.....	18
2.1.5. La photodégradation.....	19
2.2. La dégradation biotique.....	20
2.2.1. Mécanismes microbiens de la dégradation.....	21
2.2.1.1. Le métabolisme direct.....	21
2.2.1.2. Le cométabolisme.....	22
2.2.2. Principales réactions de biodégradation des pesticides.....	23
2.2.2.1. Réaction d'hydrolyse.....	23
2.2.2.2. Réaction d'oxydation.....	24
2.2.2.3. Réaction de réduction.....	25
2.2.3. Enzymes impliqués dans la dégradation des pesticides.....	26
2.2.3.1. Cinétique de dégradation.....	27
3. Généralités sur les eaux usées.....	27
3.1. Classification des eaux usées.....	28
3.1.1. Eaux domestiques.....	28
3.1.2. Eaux industrielles.....	28
3.1.3. Eaux usées de ruissellement.....	29
3.2. Mesure de la pollution des eaux usées.....	29
3.3. Epuration des eaux usées.....	29
4. Méthode des plans d'expériences.....	33
4.1. Table ou matrice d'expériences.....	34
4.2. Les différents types de facteurs.....	34
Partie II : Cinétique de biodégradation du malathion et utilisation de la mélasse, du moût de rebuts de dattes et du glucose comme substrats additionnels.....	36
1. Matériel et méthodes.....	36
1.1. Matériel biologique.....	36
1.2. Le milieu de culture.....	37

1.3. Procédure d'adaptation des boues activées au malathion.....	38
1.4. Biodégradation du malathion.....	38
1.4.1. Effet de la concentration initiale du malathion sur sa propre dégradation et modélisation du processus de biodégradation.....	38
1.4.2. Effet de sources de carbone additionnelles sur le processus de dégradation du malathion ainsi que sur la croissance cellulaire	39
1.4.2.1. Effet du glucose et de la mélasse sur la croissance cellulaire et sur la biodégradation du malathion.....	39
1.4.2.2. Effet du glucose et du moût de rebuts de dattes sur la croissance cellulaire et sur la biodégradation du malathion.....	40
1.4.2.2.1. Préparation du moût de dattes.....	41
1.5. Méthodes analytiques.....	42
1.5.1. Détermination de la concentration de la biomasse.....	42
1.5.2. Dosage du malathion.....	43
1.5.3. Calcul de la densité du malathion.....	44
1.5.4. Analyse physico-chimique du moût de dattes.....	44
1.5.4.1. Dosage des sucres réducteurs.....	44
1.5.4.2. Détermination de la matière sèche.....	46
1.5.4.3. Détermination du taux de cendre.....	46
1.5.4.4. Détermination du taux d'humidité.....	46
1.5.4.5. Mesure du pH.....	46
1.5.5. Analyse statistique.....	46
1.5.6. Etude microbiologique.....	46
1.5.7.1. Recherche et dénombrement des coliformes.....	47
1.5.7.2. Recherche et dénombrement des entérocoques.....	48
1.5.7.3. Recherche et dénombrement des salmonelles.....	49
1.5.7.4. Recherche et dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
1.5.7.5. Recherche et dénombrement des staphylocoques.....	51
1.5.7.6. Recherche et dénombrement des sulfitoréducteurs.....	53
1.5.8. Analyse des produits de dégradation du malathion par GC-MS.....	53
2. Résultats et discussion.....	56
2.1. Effet de la concentration initiale du malathion sur sa propre biodégradation.....	56
2.2. Modélisation de la cinétique de biodégradation du malathion.....	58

2.3. Effet du glucose et de la mélasse sur la cinétique de dégradation du malathion et sur celle de la croissance cellulaire.....	60
2.4. Caractérisation physico-chimique de la solution mère de moût de dattes.....	63
2.5. Effets du moût de dattes et du glucose sur le processus de dégradation du malathion ainsi que sur la croissance cellulaire.....	63
2.6. Dénombrement des principaux groupes microbiens présents dans les boues activées.....	68
2.7. Analyse et identification des produits de dégradation du malathion.....	69
Partie III : Utilisation du malathion comme source de phosphore et de soufre et sa	
biodégradation sur colonne.....	73
1. Matériel et méthodes.....	73
1.1. Composition du milieu de culture.....	73
1.2. Description du dispositif expérimental.....	73
1.3. Supports utilisés.....	74
1.4.ensemencement du réacteur.....	75
1.5. Alimentation du réacteur.....	75
1.6. Méthodes analytiques.....	75
1.6.1. Détermination de la concentration du malathion.....	75
1.6.2. Estimation de la concentration de biomasse.....	75
1.6.3. Estimation de la quantité de biomasse adsorbée.....	75
1.6.4. Analyse de la surface des supports.....	75
1.6.5. Etude microbiologique.....	76
1.6.5.1. Recherche et dénombrement des germes mésophiles totaux.....	76
1.6.5.2. Recherche et dénombrement des champignons (levures et moisissure).....	77
1.6.5.3. Recherche et dénombrement des coliformes.....	77
1.6.5.4. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux.....	78
1.6.5.5. Recherche et dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> « Test de Mackenzie ».....	79
1.6.5.6. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux.....	79
1.6.5.7. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	80
1.6.5.8. Recherche et dénombrement de clostridies sulfito-réductrices.....	81
1.6.5.9. Recherche et dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
1.6.6. Analyse statistique.....	82
2. Résultats et discussion.....	82
2.1. Biodégradation du malathion utilisé comme unique source de phosphore.....	82
2.2. Biodégradation du malathion utilisé comme unique source de soufre.....	83

2.3. Dégradation du malathion sur colonne.....	84
2.4. Estimation de la biomasse adsorbée.....	85
2.5. Analyse de la surface des supports.....	87
2.6. Etude microbiologique.....	88
Partie IV : Etude de l'effet de quelques paramètres expérimentaux sur la biodégradation du malathion et sur la croissance cellulaire.....	90
1. Matériel et méthodes.....	90
1.1. Composition du milieu de culture.....	90
1.2. Description du plan d'expérience utilisé.....	90
1.3. Méthodes analytiques.....	91
1.3.1. Détermination de la concentration du malathion.....	91
1.3.2. Estimation de la concentration de biomasse.....	91
2. Résultats et discussion.....	91
Partie V : Application de différents modèles cinétiques d'inhibition dans le traitement du malathion par les boues activées.....	97
1. Matériel et méthodes.....	97
1.1. Composition du milieu de culture.....	97
1.2. Description des différents modèles cinétiques testés.....	98
1.6. Méthodes analytiques.....	100
1.6.1. Détermination de la concentration du malathion.....	100
1.6.2. Estimation de la concentration de biomasse.....	100
1.6.3. Méthode de résolution des modèles testés.....	101
2. Résultats et discussion.....	101
2.1. Cinétique de la biodégradation du malathion.....	101
Conclusion.....	107
Références bibliographiques.....	109
Annexes.....	119

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été menés au sein de l'Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement (URIE) à l'ENP.

Mes plus vifs remerciements vont aux personnes qui ont contribué au bon déroulement et à l'aboutissement de cette thèse.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame ABDI-HAIDER Nadia, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour avoir accepté d'être la Directrice de cette thèse. Je retiens ses conseils très avisés et la disponibilité constante dont elle a toujours fait preuve. Je la remercie, aussi, pour ses grandes qualités humaines et son soutien permanent.

Je suis extrêmement reconnaissant envers Monsieur LOUNICI Hakim, Professeur à l'Université Akli Mohand OULHADJ de Bouira, pour avoir su me guider dans mon travail et pour m'avoir soutenu dans mes différentes initiatives. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour le temps accordé à la relecture de ma thèse et à la patience dont il a fait preuve.

Je tiens également à remercier Monsieur GRIB Hocine, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour les moyens qu'il a mis à ma disposition, permettant ainsi l'avancée de mes travaux dans les meilleures conditions qui soient.

J'exprime ainsi toute ma reconnaissance à Monsieur AHMED ZAID Toudert, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à Madame SALEM Zineb, Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari BOUMEDIENE, Monsieur KHALAF Hussein, Professeur à l'Université Saad DAHLEB de BLIDA et Madame KEBBOUCHE-GANA Salima, Maître de Conférences A à l'Université M'Hamed BOUGARA de BOUMERDES d'avoir accepté d'examiner mon travail et pour leurs remarques pertinentes qui vont me permettre d'apporter de nouvelles pistes de réflexion.

Cette thèse est dédiée à ma famille.

Liste des abréviations

ARC : Anneaux de Raschig en Céramique.

ARP : Anneaux de Raschig en Polytétrafluoroéthylène.

DBO : Demande Biologique en Oxygène.

DBO₅ : Demande Biologique en Oxygène au bout de 5 jours.

DCO : Demande Chimique en Oxygène.

DMDTP : DiMéthyl DiThioPhosphate.

GC-MS : *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).

Glp A : Glycerol 3-phosphate déshydrogénase A.

Glp B : Glycerol 3-phosphate déshydrogénase B.

GO : Grignons d'Olives.

MEBE : Microscopie Electronique à Balayage Environnemental.

MES : Matière En Suspension.

MVS : Matière Volatile Soluble.

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NPP : Nombre le Plus Probable.

ONPG : Ortho-NitroPhényl-β-Galactoside.

Opd : *Organophosphate degradation gene* (Gène de dégradation des organophosphates).

OPH : *OrganoPhosphorus-Hydrolyzing protein* (Protéine hydrolysant les organophosphorés).

PdeA : Gène de la Phosphodiesterase A.

PEH : Phosphonate Ester Hydrolase.

PehA : Gène de la Phosphonate ester hydrolase A.

Phn : Gène de l'utilisation du phosphonate.

MUG : *4-MethylUmbelliferyl-β-D-Glucopyranosiduronic acid* (Acide 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucopyranosiduronque).

SIM : *Selected Ion Monitoring* (Suivi d'ions sélectionnés).

UFC : Unité Formant Colonie.

Liste des figures

Figure 1 : Composantes des pesticides.....	5
Figure 2 : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement.....	13
Figure 3 : Les processus impliqués dans la photolyse directe.....	19
Figure 4 : Comparaison entre la dégradation par métabolite directe et la dégradation par co-métabolisme.....	22
Figure 5 : Clivage enzymatique du malathion.....	24
Figure 6 : Schéma général d'épuration des eaux usées.....	32
Figure 7 : Bassin d'aération de la station d'épuration d'Ain Benian.....	37
Figure 8 : Les différentes étapes de la méthode de dosage du malathion.....	43
Figure 9 : Réaction de réduction du D.N.S.....	45
Figure 10 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des coliformes.....	48
Figure 11 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des entérocoques.....	49
Figure 12 : Mode opératoire de recherche et de dénombrement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Figure 13 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des staphylocoques.....	52
Figure 14 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des bactéries sulfite-réductrices.....	53
Figure 15 : Les étapes d'extraction des métabolites du malathion pour l'analyse GC-MS...55	55
Figure 16 : Effet de la concentration initiale du malathion (5-140mg/l) sur sa propre biodégradation (concentration initiale de biomasse égale à 2000 mg/l).....	57
Figure 17 : Taux de dégradation spécifiques du malathion pour différentes concentrations du pesticide.	59
Figure 18 : Variation de la concentration du malathion avec le temps en l'absence ou en la présence des substrats organiques additionnels (glucose et mélasse) testés séparément.....	61
Figure 19 : Variation de la concentration de la biomasse (MVS) avec et sans glucose et mélasse (5000 mg/l).....	62
Figure 20 : Effet de sources additionnelles de carbone sur la croissance cellulaire.....	65
Figure 21 : Biodégradation du malathion (60 mg/l) en présence et en absence de différentes concentrations initiales de glucose ou de moût de dattes (0,5 g/l – 30 g/l).....	66
Figure 22 : Chromatogramme de GC-MS en mode SIM.....	71
Figure 23 : Schéma du dispositif expérimental utilisé.....	74

Figure 24: Utilisation du malathion (10mg/l) comme la seule source de phosphore. Cinétique de croissance des boues activées (1000 mg/l) et biodégradation du malathion.....	83
Figure 25 : Utilisation du malathion (10 mg/l) comme la seule source de soufre. Cinétique de croissance des boues activées (1000 mg/l) et biodégradation du malathion.....	84
Figure 26 : Suivi de la biodégradation du malathion à différents points de prélèvement sur le réacteur avec différents débits (la concentration initiale du malathion est de 10 mg/l).....	86
Figure 27 : Observation de la surface des supports testés au M.E.B.E.....	87
Figure 28 : Diagramme de Pareto de l'effet linéaire standardisé des facteurs considérés sur la production de biomasse.....	93
Figure 29 : Diagramme de Pareto de l'effet linéaire standardisé des facteurs considérés sur l'élimination du malathion.....	95
Figure 30 : Variation des valeurs expérimentales et celles prédites par les différents modèles testés du taux spécifique de dégradation à différentes concentrations du malathion.....	102

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents diagnostics cliniques liés à certaines familles des pesticides.....	10
Tableau II : Utilisation de pesticides en agriculture (ingrédients actifs) dans quelques pays de l'OCDE et variation des quantités de la période 1990-1992 à la période 2000-2002.....	12
Tableau III : Propriétés physicochimiques du malathion.....	15
Tableau IV : Modes de dégradation de quelques pesticides et les microorganismes impliqués.....	21
Tableau V : Les principaux groupes chimiques des molécules pesticides pouvant être réduits.....	25
Tableau VI : Quelques exemples de gènes codant pour les enzymes de dégradation des organophosphorés.....	27
Tableau VII : Principales activités d'application des plans d'expériences.....	58
Tableau VIII : Quelques caractéristiques chimiques du concentrât de moût de dattes.....	63
Tableau IX : Résultats du dénombrement de la microflore dominante.....	68
Tableau X : Formules chimiques des métabolites du malathion.....	70
Tableau XI : Caractéristiques des supports utilisés.....	74
Tableau XII : Résultats de l'analyse microbiologique des boues activées avant et après traitement par le malathion.....	88
Tableau XIII : Les niveaux -1 et +1 des facteurs utilisés dans le plan fractionnaire appliqué.....	91
Tableau XIV : Plan d'expérience fractionnaire construit à partir de quatre variables indépendantes ou facteurs (X_1 à X_4) et les valeurs expérimentales obtenues des deux réponses (Y_1 et Y_2).....	92
Tableau XV : Effet des paramètres opératoires sur la production de biomasse associé aux valeurs de t et p obtenues selon le plan d'expérience fractionnaire à deux niveaux.....	92
Tableau XVI : Effet des paramètres opératoires sur l'élimination du malathion associé aux valeurs de t et p obtenues selon le plan d'expérience fractionnaire à deux niveaux.....	94
Tableau XVII : Les coefficients de détermination et les valeurs p inhérents aux différents modèles cinétiques appliqués à la dégradation du malathion.....	104
Tableau XVIII : Valeurs estimées des paramètres cinétiques associés aux différents modèles cinétiques utilisés.....	105

Introduction générale

La pollution générée par l'activité de l'homme (rejets industriels et agricoles) constitue un problème environnemental d'actualité. En effet, ces rejets non traités renferment une variété de composés chimiques dangereux pour la santé humaine et dommageables pour l'environnement. Ainsi, outre des protéines, des hydrates de carbone, des huiles et des composés gras, et autre urée, ces rejets bruts renferment un grand nombre de composés organiques synthétiques issus des activités commerciales et industrielles dont une large majorité reste non identifiée.

Dans un contexte mondial marqué par le libre-échange et où la concurrence est de rigueur, on assiste à un accroissement des exigences et la diversification des défis imposés à l'agriculture pour répondre aux besoins des marchés de consommation et donc à ceux des populations. Les exploitants en général et les agriculteurs en particulier ont de plus en plus recours à l'utilisation intensive de fertilisants et autres produits phytosanitaires afin de garantir des rendements satisfaisants tant sur le plan qualitatif que quantitatif. Cependant, l'utilisation massive de ces produits dans les régions agricoles pose de sérieuses questions sur la qualité de notre environnement ainsi que sur les problèmes de santé qui peuvent en découler.

Si les pesticides sont d'abord apparus bénéfiques, leurs effets secondaires avérés pour l'homme et l'environnement ont été rapidement mis en évidence. En effet, leur action toxique ne se limite pas aux organismes qu'on souhaite éliminer (insectes, mauvaises herbes) mais affectent « également des organismes non cibles (mammifères, poisson, etc.). Face aux dangers récurrents que cause l'usage irrationnel des pesticides sur l'environnement et plus particulièrement sur la santé humaine, l'utilisation de ces derniers est devenue très réglementée et surveillée, mais cette mesure demeure insuffisante.

De nos jours, les pesticides les plus couramment employés appartiennent au groupe des organophosphorés (tel que le malathion) qui sont des neurotoxiques utilisés comme insecticides et ayant pour action la diminution de l'activité des neurotransmetteurs induisant ainsi des effets irréversibles sur le système nerveux. Ils ont supplanté, progressivement, les organochlorés car ces derniers, présentent un certain nombre d'inconvénients liés notamment, à leur toxicité élevée et à leur persistance dans les différents milieux écologiques. Par ailleurs, les agriculteurs trouvent ces pesticides utiles parce qu'ils offrent un vaste choix de produits efficaces pour lutter contre les divers parasites, mais ils demeurent relativement toxiques, notamment pour l'homme.

Pour tenter de limiter ces problèmes, de nombreuses recherches ont été mises en œuvre, d'une part pour diminuer le pouvoir polluant des pesticides utilisés, et d'autre part

pour traiter les eaux polluées de façon efficace. A l'heure actuelle, il existe de nombreuses techniques pour traiter ces eaux chargées en pesticides. Il s'agit souvent de traitement abiotique (adsorption sur divers supports dont le charbon actif, photodégradation, ozonation, incinération, oxydation avancée, etc.). Toutefois ces méthodes sont coûteuses et ne sont que très peu mises en œuvre.

En revanche, des procédés peu onéreux ont été conçus et appliqués. Le traitement biologique (bioremédiation), notamment, répond à cette contrainte, il est simple, bon marché et d'une bonne efficacité. En effet, aux cours des vingt dernières années, on a assisté à une augmentation spectaculaire de l'intérêt pour des mécanismes de traitement biologique orientés vers la protection de l'environnement et qui consiste à utiliser des organismes supérieurs (végétaux), des microorganismes (bactéries et microalgues) et parfois des enzymes spécifiques extraites à partir de ces mêmes microorganismes pour dégrader les pesticides organiques toxiques. Ces microorganismes peuvent jouer un rôle extraordinaire à l'égard de la biodégradation des polluants organiques. En effet, leur capacité à métaboliser les substances toxiques permet de réduire la charge polluante d'une eau usée en les dégradant en métabolites secondaires non dommageables car dénués d'effet toxique.

Le cométabolisme est une technique d'importance avérée qui a récemment émergé et qui est utilisée dans le biotraitement des composés polluants récalcitrants. En effet, selon la quantité d'énergie utilisée par les microorganismes durant le processus de biotransformation, on regroupe les polluants organiques biodégradables en deux catégories distinctes :

- l'oxydation des substrats primaires (substrats de croissance) et
- la dégradation des substrats secondaires (substrats de non croissance).

Dans certains cas, le substrat de non croissance ne peut être utilisé ni comme source de carbone ni comme source d'énergie. Sa transformation requiert de manière absolue la présence du substrat de croissance, un phénomène appelé cométabolisme. En plus de servir comme source de carbone et d'énergie pour soutenir la croissance, le substrat de croissance sert également de donneur d'électrons favorisant ainsi la dégradation du substrat de non croissance.

L'objectif général de notre travail consiste en la dégradation du malathion par des boues activées préalablement acclimatées au pesticide.

Pour cela, nous avons abordé :

- l'étude, en mode batch, de l'influence de la concentration initiale du malathion sur sa propre dégradation ;
- l'étude de l'effet de certains substrats carbonés (glucose, mélasses et moût de rebuts de dattes) sur le rendement de dégradation ;
- l'identification de ou des produit(s) de dégradation du malathion par le biais d'une analyse par chromatographie gazeuse combinée à un spectromètre de masse.
- l'étude de la possibilité de l'utilisation du malathion, par les microorganismes des boues activées, comme source de phosphore ou source de soufre.
- l'étude des performances de l'élimination du malathion sur colonne garnie de trois types de supports différents (ARC, ARP et GO) servant à fixer les microorganismes des boues activées.
- l'étude de l'influence de quelques paramètres expérimentaux sur la biodégradation du pesticide ainsi que sur la croissance cellulaire.

Partie I:
Etude
bibliographique

1. Généralités sur les pesticides

1.1. Définition

Le mot pesticide a été créé en anglais, sur le modèle des nombreux mots se terminant par le suffixe *-cide* (latin *-cida*, du verbe latin *caedo, caedere*, « tuer »), et sur la base du mot anglais *pest* (animal ravageur, insecte ou plante nuisible), lequel provient (comme le français *peste*) du latin *pestis* qui désignait notamment un animal nuisible.

Selon la **FAO (2003)**, un pesticide est toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs (y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales) et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites.

Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance des plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport. Ainsi, l'observatoire français des résidus de pesticides (**ORP, 2010**), a choisi de retenir pour ses travaux une définition plus large, visant à couvrir l'intégralité des substances « pesticides ». Au-delà des produits à usages agricoles ou des produits destinés à l'entretien des espaces verts et des jardins amateurs (produits phytopharmaceutiques), certains produits biocides et des antiparasitaires humains et vétérinaires sont également pris en compte. Ces différentes composantes sont indiquées ci-dessous dans la figure 1.

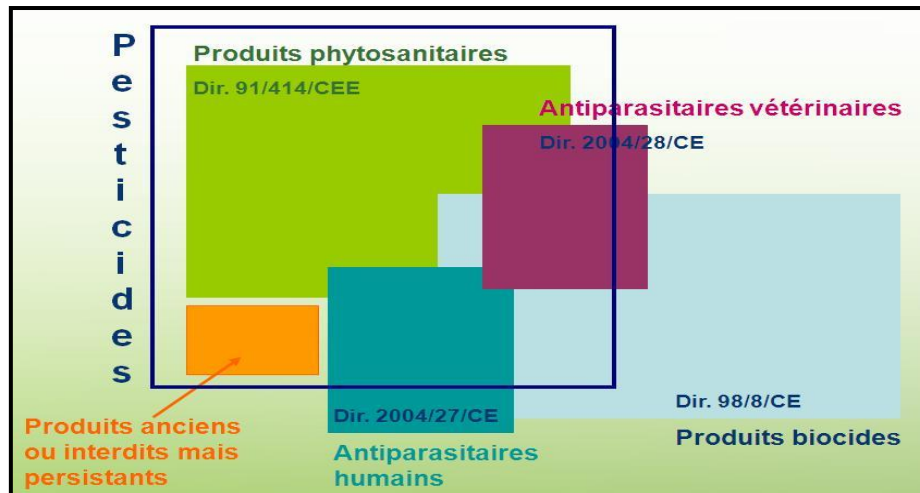


Figure 1 : Composantes des pesticides selon l'ORP (2010).

1.2. Historique

Le développement des pesticides a connu une succession d'étapes aussi enrichissantes que constructives. Les travaux menés par différents scientifiques ont permis d'apporter un certain nombre d'idées et de conclusions pertinentes qui au fil des décennies ont permis de franchir d'importants paliers et de réaliser des bonds qualitatifs dans la découverte, le diagnostic ainsi que la détermination des différents champs d'utilisation des pesticides, principalement dans le domaine de l'agriculture. Mais aujourd'hui, les interrogations sont principalement portées sur les conséquences de l'utilisation abusive de ces pesticides sur l'environnement et par conséquent sur les différents êtres vivants (Calvet, 2005).

Les premières méthodes utilisées dans la protection des produits agricoles remontent à l'antiquité. Autrefois, les agriculteurs utilisaient des méthodes plutôt physiques telles que la destruction des œufs des différents insectes nuisibles, l'arrachage et la destruction de plantes malades et autres formes de désherbage manuel. C'est vers la fin du dix-septième siècle que des éléments chimiques ont commencé à être utilisés, c'est ainsi que Jean De La Quintinie (1626 – 1688) a découvert les propriétés toxiques de l'arsenic et en a recommandé l'usage (Calvet, 2005).

On date de 1763 le premier essai de lutte chimique par des arboriculteurs qui ont aspergé avec succès leur pêchers envahis de pucerons avec du jus de tabac. Le chlorure mercurique a été proposé au dix-huitième siècle pour protéger les bois. La lutte chimique s'est développée à partir du milieu du dix-neuvième siècle, avec des produits d'origine naturelle comme la roténone (extraite des racines de Derris) et le pyrèthre (mélange d'esters contenu dans les fleurs de deux variétés de chrysanthèmes). On date de 1930 les débuts de l'ère des

produits phytosanitaires organiques, avec les thiocyanates d'alkyle (insecticides), l'anilide salicylique (fongicide, 1931), les dithiocarbamates (fongicides, 1934). En 1939, P. Muller découvre les propriétés insecticides du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) (**Fournier, 1987**).

La seconde guerre mondiale a généré à travers les recherches engagées pour la mise au point de gaz de combat, la famille des organophosphorés qui, depuis 1945, a vu un développement considérable encore de mise aujourd'hui pour certains tel le malathion. En 1950-1955 se développent aux Etats-Unis les herbicides de la famille des urées substituées (linuron, diuron) (**Nicolino et Veilerette, 2006**).

A partir de 1974, se développent les pyréthrinoïdes de synthèse comme la deltaméthrine (insecticide), et en 1977, apparaît le phoséthyl-aluminium. Ce fongicide offre un nouveau type de lutte : sans action contre le champignon et sans action sur une plante saine, il stimule la production de substances fongitoxiques par la plante infestée. Depuis les années 1980, sont apparus un grand nombre de fongicides appartenant à la famille des triazoles connus pour bloquer la biosynthèse de l'ergostérol (**Fournier, 1987**).

1.3. Classification des pesticides

En général, les pesticides sont classés selon leurs utilisations (propriétés biologiques), selon leurs usages, et enfin selon leur nature chimique.

1.3.1. Selon leurs utilisations

On peut trouver les sous-classes suivantes :

1.3.1.1. Herbicides

Le terme «herbicide» est un synonyme du mot «désherbant», ce sont des substances actives ou préparations ayant pour propriétés de tuer les végétaux. Les herbicides sont principalement employés pour lutter contre des adventices ou mauvaises herbes, ils sont aussi destinés à détruire ou à limiter la croissance des végétaux qu'ils soient herbacés ou ligneux (**Harir, 2008**).

Ils peuvent être utilisés, selon leurs modes d'action, en pré ou post-levée. On distingue :

- les désherbants sélectifs ;
- les débroussaillants et désherbants totaux ;

- les défanants qui détruisent la partie aérienne des végétaux ;
- les anti-germes, qui empêchent le démarrage de la végétation.

1.3.1.2. Insecticides

Ce sont des substances actives ou préparations ayant les propriétés de neutraliser les insectes, leurs modes d'actions sont basés sur :

- la perturbation du système nerveux ;
- la perturbation de la respiration ;
- l'interférence de la mise en place de la cuticule.

1.3.1.3. Fongicides

Les fongicides sont des substances actives ou préparations ayant les propriétés de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries. Les fongicides peuvent agir comme :

- Inhibiteurs respiratoires ;
- Inhibiteurs de la division cellulaire ;
- Perturbateurs de la biosynthèse des acides aminés ou des protéines ;
- Perturbateurs du métabolisme des glucides.

1.3.2. Selon leurs usages

La classification des pesticides selon leurs usages donne six sous-classes comme suit (Calvet, 2005) :

- **les cultures** : Ce sont les pesticides utilisés en agriculture pour maintenir un bon état sanitaire des sols et des végétaux ;
- **les bâtiments d'élevages** : Il s'agit surtout d'insecticides et de bactéricides ;
- **les locaux de stockage des produits végétaux** : Ce sont des insecticides et des fongicides ;
- **les zones non agricoles** : Il s'agit principalement d'herbicides utilisés pour désherber les voies de circulation routières et ferrées, les airs d'aéroport et les airs industrielles ;
- **les bâtiments d'habitation** : Ce sont des insecticides, des rodenticides, des bactéricides et des fongicides ;

- **l'homme et les animaux** : Il s'agit d'insecticides et de fongicides utilisés pour l'hygiène humaine et vétérinaire.

1.3.3. Selon la nature chimique

La classification des pesticides selon leur nature chimique permet de dégager les sous-classes indiquées ci-dessous (**Martin, 2000**) :

- **pesticides inorganiques ou minéraux** : composés de différents éléments toxiques tels que l'arsenic, le cuivre et le mercure ;
- **pesticides organiques de synthèse** ;
- **pesticides organométalliques synthétiques** : ce sont des fongicides (organomercuriels) ;
- **phénols** : ce sont des fongicides utilisés pour la conservation du bois et d'autres substrats organiques ;
- **organochlorés** : le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et ses dérivés, le HCH (hexachlorocyclohexane), l'Aldrine et le Toxaphène ;
- **organophosphorés** : ce sont des produits utilisés comme insecticides, acaricides ou nématicides. Ils ont une faible persistance dans le sol ;
- **carbamates** : ce sont des insecticides et quelques herbicides. La plupart sont des esters de l'acide N-méthylcarbonique. De nos jours, il en existe une quarantaine parmi lesquels on peut citer : le Carbaryl, l'Aldicarbe ;
- **pyréthrinoïdes de synthèse** : Permethrine, Deltaméthrine, Cyperméthrine ;
- **triazines** : Simazine, Atrazine ;
- **amides** : Diphénamide, Napropamide, Propyzamide.

1.4. Toxicité des pesticides

Selon l'OMS (2004), on estime que le nombre annuel des intoxications par les pesticides se situe entre 1 et 5 millions, dont plusieurs milliers de cas mortels. La plupart des intoxications touchent les zones rurales des pays en développement où les mesures de protection sont souvent inadéquates voire totalement absentes. Les pays en développement qui n'utilisent que 25 % des pesticides produits dans le monde, enregistrent 99 % des décès dus à ce type d'intoxication.

Pour déterminer la toxicité d'un pesticide, on utilise généralement les paramètres suivants :

- **La DL₅₀** : C'est la dose d'une substance provoquant 50% de décès chez une population déterminée après un temps d'application et une durée d'observation déterminée. Elle s'exprime en mg/kg ou g/kg de poids vif de l'animal expérimental.
- **La dose sans effet (DSE)** : C'est la dose maximale de substance active qui, ingérée quotidiennement durant toute la vie d'un animal sensible, n'entraîne pas l'apparition de symptôme de toxicité. La DSE s'exprime en mg/kg de poids vif par jour.
- **La dose journalière administrée (DJA)** : C'est la quantité de produit pouvant être quotidiennement absorbée au cours de la vie de l'homme sans manifestation d'effets secondaires. Elle est exprimée en mg/kg du poids corporel (**Dictionnaire environnement, 2010**).
- **Limite maximale des résidus (LMR)** : Elle représente les résidus acceptables sur le plan toxicologique, elle est fondée sur les données des bonnes pratiques agricoles et est destinée à être appliquée dans le commerce international. C'est la concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées alimentaires restent commercialisables, elle s'exprime en mg/kg de produit alimentaire (**Cluzeau et al., 2000**).
- **La Concentration Maximale Admissible (CMA)** : Elle indique la concentration maximale admissible dans l'atmosphère des lieux de travail.

On peut distinguer deux types de toxicité :

1.4.1. Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë se manifeste immédiatement ou peu de temps (quelques minutes, quelques heures, quelques jours) après une exposition unique ou de courte durée à un pesticide. Le délai d'apparition varie en fonction de la toxicité intrinsèque du produit utilisé, de la dose reçue, de la voie d'absorption et de la sensibilité de la personne. Le tableau I montre les principaux diagnostics cliniques liés à certaines familles des pesticides.

Tableau I : Les différents diagnostics cliniques liés à certaines familles de pesticides (Lauwergs, 1992).

Familles des pesticides	Diagnostics cliniques
Organochlorés	<ul style="list-style-type: none"> – Troubles digestifs (diarrhées). – Troubles neurologiques.
Organophosphorés	<ul style="list-style-type: none"> – Troubles digestifs (crampes abdominales, nausées, vomissements, diarrhées). – Troubles respiratoire (œdèmes pulmonaires). – Troubles cardiovasculaires. – Troubles neuromusculaires.
Pesticides divers	<ul style="list-style-type: none"> – Troubles de la vision, salivation, coma, convulsion, anxiété, et vertiges. – Dermite de contact et irritation. – Lésions cutanées.

1.4.2. Toxicité chronique

L'intoxication chronique survient généralement suite à l'absorption répétée de faibles doses de pesticides pendant une longue durée. Le délai avant l'apparition de symptômes ou de maladies peut être très long. L'évaluation des effets toxiques à long terme est complexe car de nombreux paramètres entrent en jeu comme la nature des composés et leurs propriétés toxicodynamiques. Les principaux effets d'une exposition chronique aux pesticides sont des effets sur la reproduction, le développement, les systèmes immunitaire et endocrinien voire des effets cancérogènes (Rumeau, 2005).

1.5. Normes réglementaires régissant l'emploi des pesticides

L'emploi parfois abusif des pesticides à des fins économiques au cours des dernières années conjugué à un impact fortement négatif sur l'écosystème et l'environnement, a conduit les administrations publiques à mettre en place différentes batteries de normes et de règles de développement et d'utilisations des pesticides.

Les pouvoirs publics en Algérie ont pris conscience de l'impact environnemental des produits phytosanitaires. Les grands principes qui déterminent la réglementation en matière de protection de l'environnement sont assurés par les textes suivants :

- La loi n° 83-03 du 05/02/1983, relative à la protection de l'environnement dont les dispositions de certains articles ont pour objet la lutte contre la pollution des eaux.

Il existe pour les pesticides des normes internationales, nationales et régionales. La réglementation algérienne concernant l'utilisation et le contrôle de produits phytosanitaires est d'introduction récente. Le contrôle des pesticides est régi par :

- La loi numéro 87-17 du 1 août 1987 relative à la protection phytosanitaire.
- Le décret exécutif numéro 95-405 du 02-décembre 1995 relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole. A ce titre, il couvre les activités de commercialisation et d'homologation (**JORA, 2006**).

1.6. Les pesticides en Algérie

En Algérie, la formulation, la commercialisation et le développement des produits phytosanitaires à usage agricole et d'hygiène publique est assurée par l'entreprise publique économique ALGERIENNE DES PHYTOSANITAIRES dénommée en abrégé ALPHYT. L'entreprise se compose de deux unités de production (Béni-Mered et Baraki) et de trois unités à vocation commerciale (Alger, Oran, Annaba).

En 2005, l'entreprise a produit 1.000.000 litres de pesticides liquides et 3.528.000 Kg de pesticides en poudre (**Alphyt, 2013**).

Par ailleurs, l'Algérie a importé en 2011 près de 81600 tonnes de pesticides et elle en a exporté seulement 0,06 tonnes (**FAO, 2013a**).

1.7. Les pesticides dans le monde

L'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) a établi une comparaison des quantités de pesticides utilisés ou vendus en agriculture de la période 1990-1992 à la période 2000-2002 dans divers pays membres. Les données concernant l'utilisation d'ingrédients actifs dans quelques pays de l'OCDE figurent dans le tableau II (**OCDE, 2004**).

Tableau II : Utilisation de pesticides en agriculture (ingrédients actifs) dans quelques pays de l'OCDE et variation des quantités de la période 1990-1992 à la période 2000-2002 (OCDE, 2004).

	Tonnes de Matières actives	
	1990/92	2000/02
Pologne	6507	9366
Turquie	11967	17129
Grèce	8193	11365
Portugal	12457	15461
Canada	33964	41980
Italie	69550	79408
Espagne	36849	39883
Union Européenne des 15	324544	342949
Mexique	36000	38037
Irlande	2043	2124
Etats Unis	325226	332181
Corée	28097	27838
Slovaquie	3694	3596
France	85281	92263
Nouvelle Zélande	3490	3368
Royaume Uni	34060	32873
Belgique	10264	9386
Allemagne	32629	29248
Suède	1897	1700
Japon	89112	73618
Finlande	1727	1401
Autriche	4206	3348
Suisse	2120	1555
République Tchèque	6699	4460
Norvège	912	573
Danemark	4948	2931
Pays Bas	17744	9199
Hongrie	18544	6711

1.8. Impacts des pesticides sur l'environnement

Les pesticides employés pour lutter contre les organismes nuisibles peuvent se retrouver dans l'environnement, ils risquent alors d'engendrer une contamination ponctuelle ou diffuse. Cette pollution diffuse semble être la source dominante d'apport de pesticides vers les eaux de surface et souterraines (**Gilliom et al., 2006**). Celle-ci peut être associée à plusieurs mécanismes de transport qui permettent aux pesticides de quitter la parcelle agricole et de se retrouver dans l'environnement. Ces mécanismes sont représentés sur la figure 2.

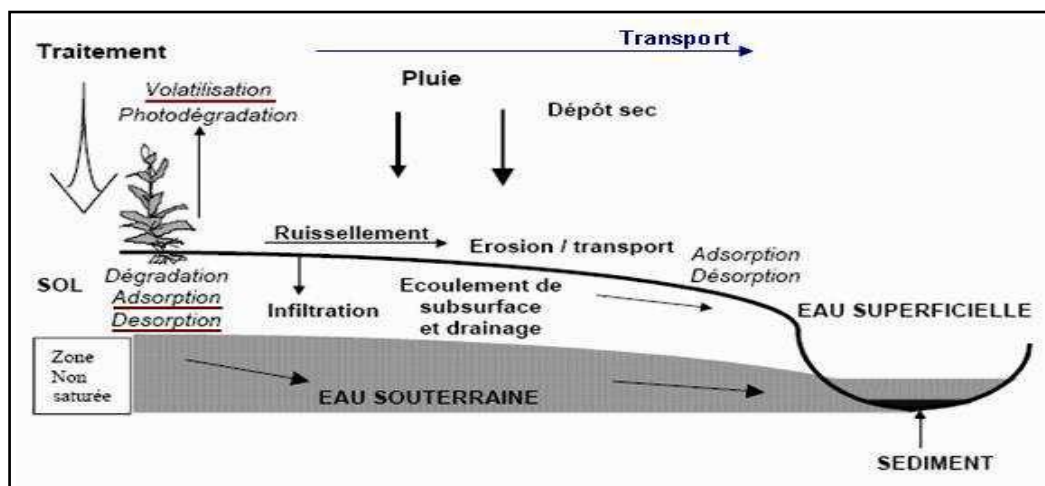


Figure 2 : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (Gouzy et Farret, 2005).

Les principaux mécanismes de transport des pesticides vers les eaux de surface et souterraines sont le ruissellement (pesticide sous forme dissoute ou lié à des particules de sols) et le lessivage. Les caractéristiques physicochimiques propres à chacun des pesticides - telles la persistance, l'adsorption, la pression de vapeur et la solubilité du pesticide - influencent sa tendance à quitter la parcelle.

Les caractéristiques du sol et de la nappe d'eau souterraine, les précipitations, le travail du sol, les méthodes d'application, les pratiques culturales et le choix du pesticide jouent également un rôle important sur les pertes de pesticides par ruissellement et lessivage. Le drainage du surplus d'eau qui s'infiltré dans les sols agricoles par les canaux de drainage souterrains entraîne aussi les pesticides vers les eaux de surface (**Ludvigsen, 2006**). Les pesticides peuvent aussi être transportés par l'air. Lors de l'application, la dérive des gouttelettes de pesticides fait en sorte que des produits peuvent se retrouver à l'extérieur de la parcelle. Le phénomène de la dérive est influencé, entre autres, par la taille des gouttelettes pulvérisées, la vitesse du vent, le type d'équipement utilisé et la hauteur de la pulvérisation (**Gilliom et al., 2006**).

1.9. Pollutions engendrées par les pesticides

1.9.1. Contamination de l'air

La présence de pesticides est observée dans toutes les couches atmosphériques en concentrations variables dans le temps (avec parfois un caractère saisonnier, en lien avec les périodes d'application) et dans l'espace (selon la proximité des sources). Dans le cas d'une utilisation en serre à des concentrations élevées, des contaminations sévères ont pu être

observées juste après l'application. Ces concentrations peuvent rester à un niveau significatif pendant plusieurs jours après le traitement (**Camard et Magdalaine, 2010**).

Des études menées en France ont montré qu'au moins un pesticide est présent dans 94% des foyers ; en premier lieu les insecticides (93% des cas), notamment les pyréthriinoïdes (88,5%) et les organophosphorés (39%), suivis par les fongicides pour plantes (30% des cas) et les herbicides (32% des cas). Parmi les pesticides les plus fréquemment retrouvés dans l'air figure le lindane (dans 88% des logements) (**Bouvier et al., 2006**).

1.9.2. Contamination des sols

La contamination des sols par différentes substances, dont les pesticides, a été reconnue comme l'une des principales menaces. Les pesticides dans les sols peuvent provenir des activités agricoles mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend de son humidité, du taux de matière organique, du pH ainsi que du pesticide.

A l'heure actuelle, les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement ; par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent stables, ils sont les premiers responsables des contaminations des sols.

D'autres sources de contamination proviennent des industries produisant et/ou procédant au stockage des substances phytosanitaires (**Merhi, 2008**).

1.9.3. Contamination des eaux

La contamination des eaux résulte des systèmes de culture et des pratiques agricoles, de leur contexte pédoclimatique et de mécanismes complexes, physiques, chimiques et biologiques. Les pollutions résultantes peuvent présenter un caractère ponctuel, souvent même accidentel ou, au contraire diffus (**CORPEN, 1993**).

Après l'épandage des pesticides, une partie est volatilisée dans l'atmosphère et se retrouve, entre autre, dans l'atmosphère, dans les eaux de pluies ; une autre est absorbée par les végétaux, le sol en retient également et une biodégradation y transforme la substance active initiale en divers métabolites. La partie de ces produits non retenue dans le sol atteint enfin par lixiviation, la nappe souterraine (**Sculhof, 1999**).

1.10. Malathion

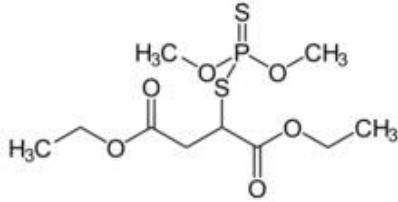
Le malathion est un organophosphoré qui se fixe irréversiblement à la cholinestérase (Clark et Qazi, 1979). C'est un insecticide neurotoxique. Si sa toxicité humaine est relativement basse, le produit de décomposition du malathion, le malaoxon est très toxique.

Le malathion était commercialisé sous le nom Carbophos en ancienne URSS, Maldison en Nouvelle-Zélande et en Australie, et Mercaptothion en Afrique du Sud (ICSC, 1995). En Algérie, le malathion est commercialisé sous le nom de Malatox 50 où il est essentiellement utilisé comme insecticide foudroyant pour la lutte anti acridienne (Alphyt, 2013).

1.10.1. Propriétés physico-chimiques du malathion

Les propriétés physico-chimiques du malathion sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Propriétés physicochimiques du malathion (WHO, 2003 ; WHO, 2004).

Formule brute	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$
Formule développée	
Nom commun	Malathion
Nom chimique	S-[1,2-di(éthoxycarbonyl)éthyl]-diméthylphosphorothiothionate.
Apparence	Liquide clair de couleur jaunâtre
Masse moléculaire	330,36
Point d'ébullition	60°C
Logarithme du coefficient de partage octanol-eau	2,36-2,89
Point de fusion	-20°C
Pression de vapeur	5×10^{-3} Pa à 30°C
Température de décomposition	174°C à 100 kPa
Solubilité dans l'eau	145 mg/l à 25°C

1.10.2. Fabrication

La fabrication du malathion est basée sur une méthode chimique axée sur la polymérisation du maléate. Le malathion est le résultat de la réaction de l'O,O-diméthylhydrogène-phosphordithioate avec le maléate diéthylénique en présence de triéthylamine comme catalyseur et d'hydroquinone afin de prévenir la polymérisation du maléate.

En 1983, la production du malathion était assurée en quasi-totalité par les USA avec plus de 91% de la production mondiale, le reste était produit par l'Inde.

1.10.3. Utilisation

Le malathion est principalement utilisé dans l'agriculture comme produit antiparasitaire (insecticide et acaricide) à large spectre, et surtout dans la lutte contre les insectes suceurs.

Le malathion est très toxique pour les insectes, y compris les insectes utiles, comme les abeilles. L'épandage de malathion sur les zones aquatiques provoque également au déclin des populations d'amphibiens.

En 1999, toute la région de New York a été traitée au malathion par avion pour éradiquer le virus du Nil occidental. Au Canada, le malathion est employé depuis des décennies à Winnipeg contre les moustiques (**Manuel sur l'environnement, 1996**).

1.10.4. Mode d'action

Une fois adsorbé par les insectes (que ce soit par contact, ingestion ou inhalation), le malathion est rapidement oxydé en malaaxon. Le malaaxon, métabolite actif du malathion, est un inhibiteur efficace de l'acétylcholinestérase.

Chez les mammifères et les oiseaux, le malathion est rapidement dégradé par les carboxyestérases ; il est de ce fait bien moins toxique pour ces organismes que pour les insectes (**Tomlin, 1996**).

1.10.5. Toxicité

Le malathion se décompose en malaaxon, qui est 60 fois plus toxique que le malathion. Pour cette raison, si le malathion est employé dans un espace confiné, il peut sérieusement empoisonner les personnes vivant ou travaillant dans cet environnement.

Le malathion présent dans l'eau non traitée est converti en malaaxon pendant la phase de chloration du traitement de l'eau, il ne devrait donc pas être retrouvé dans les eaux servant de source d'eau potable (**INSPQ, 2002**).

L'Apport Quotidien Acceptable (AQA) du malathion pour l'homme a été calculé par la FAO l'OMS comme suit (Equation1) : **(FAO/OMS, 1972)**

$$AQA = ((0,23 \text{ mg/kg p.c. par jour}) / 10) = 0,02 \text{ mg/kg p.c. par jour} \quad (1)$$

Où :

- 0,23 mg/kg p.c. (poids corporel) par jour est la dose sans effet nocif observé obtenue au cours d'études réalisées chez des volontaires.
- 10 est le facteur d'incertitude.

La Concentration Maximale Acceptable (CMA) de malathion dans l'eau potable a été calculée à partir de l'AQA comme suit (Equation 2) : **(FAO/OMS, 1977)**.

$$CMA = ((0,02 \text{ mg/kg p.c. par jour} \times 70 \text{ kg} \times 0,2) / 1,5 \text{ l/jour}) = 0,19 \text{ mg/l} \quad (2)$$

Où :

- 0,02 mg/kg p.c. par jour est l'AQA établi par la FAO et l'OMS.
- 70 kg est le poids corporel moyen d'un adulte.
- 0,20 est la proportion de l'apport quotidien de malathion attribuée à l'eau potable (la consommation quotidienne réelle est évaluée à 0,06% de l'AQA)
- 1,5 l/jour est la consommation moyenne quotidienne d'eau potable d'un adulte.

2. Méthodes de traitement des pesticides

La dégradation des pesticides est un processus clé de leur devenir dans le sol, et joue un rôle important dans leur dissipation et élimination des milieux naturels. La dégradation est due à de nombreuses transformations chimiques qui modifient la composition et la structure des molécules apportées au sol. Ces modifications peuvent être limitées à l'élimination d'un groupe fonctionnel ou aller jusqu'à la dégradation complète des substrats. Des molécules intermédiaires peuvent être produites, ces dernières n'ont pas la même rétention et la même toxicité que les molécules initiales mais ne sont pas aussi nécessairement moins polluantes, ce qui impose une identification et une connaissance de leurs propriétés et leur devenir dans l'environnement.

Les transformations chimiques responsables de la dégradation sont de natures abiotiques et biotiques (**Calvet, 2005**).

2.1. Dégradation abiotique

La dégradation abiotique des pesticides est due à des réactions chimiques qui ne sont pas catalysées par des systèmes enzymatiques. Elle comprend des réactions d'oxydations, d'hydrolyses et de photoréactions.

Parmi les méthodes utilisées pour l'élimination des pesticides, on peut citer :

2.1.1. Adsorption sur Charbon Actif en Poudre (CAP)

Pour permettre d'augmenter le temps de contact, donc le taux d'abattement des pesticides, le CAP est injecté sous forme de barbotine (**Gendrault, 2004**).

2.1.2. Adsorption sur Charbon Actif en Grain (CAG)

Il est utilisé de préférence pour traiter les pollutions chroniques ou durables. Le traitement s'effectue par simple percolation de l'eau à travers le CAG dans les filtres ouverts ou fermés. La capacité d'adsorption d'un CAG est fonction de sa granulométrie (0,7 à 1mm) et du temps de contact (12 à 15 min) (**Gendrault, 2004**).

2.1.3. Ozonation

L'ozonation est un traitement chimique par oxydation. L'utilisation de réactifs chimiques oxydants pour le traitement des eaux a visé au départ la stérilisation de l'eau ou, plus exactement, la destruction des germes pathogènes.

L'ozone a l'avantage de permettre des actions complémentaires dans la destruction d'un grand nombre de micropolluants et dans l'amélioration des goûts, des odeurs et dans la destruction des couleurs.

Cette méthode consiste à transformer chimiquement les pesticides par oxydation directe avec de l'ozone moléculaire. Le traitement s'effectue au sein d'une ou plusieurs cuves de contact en mélangeant l'eau à traiter avec de l'air asséché et ozoné (**Bottomley et Baker, 1989**).

2.1.4. La nanofiltration

La nanofiltration est une filtration qui utilise des membranes partiellement perméables, pour séparer préférentiellement différents fluides ou ions. Elle permet de concentrer des solutions de constituants ayant un poids moléculaire supérieur à 1000 Da (**Gendrault, 2004**).

Une étude menée sur l'élimination de pesticides à l'échelle semi-industrielle et plus particulièrement l'élimination de l'atrazine et la simazine par nanofiltration a clairement

démontré l'influence des matières organiques naturelles sur la rétention de ceux-ci (**Agbekodo et al., 1996**). Plus récemment, une étude a montré les performances de deux membranes de nanofiltration industrielles utilisées pour la rétention de trois pesticides (diuron, atrazine, simazine) testés séparément ou en association (**Musbah et al., 2013**).

L'élimination du malathion par nanofiltration a également fait l'objet de nombreuses études (**Zhang et Pagilla, 2010 ; Sorour et Shaalan, 2013**)

2.1.5. La photodégradation

Les réactions photochimiques impliquant les pesticides peuvent avoir lieu en tout endroit exposé à la lumière solaire : dans l'air, dans les eaux de surface, sur les couverts végétaux et à la surface du sol.

La photodégradation directe des pesticides par les rayons solaires met en jeu trois processus distincts : l'homolyse, l'hétérolyse et la photoionisation (Figure 3) (**Burrows et al., 2002**).

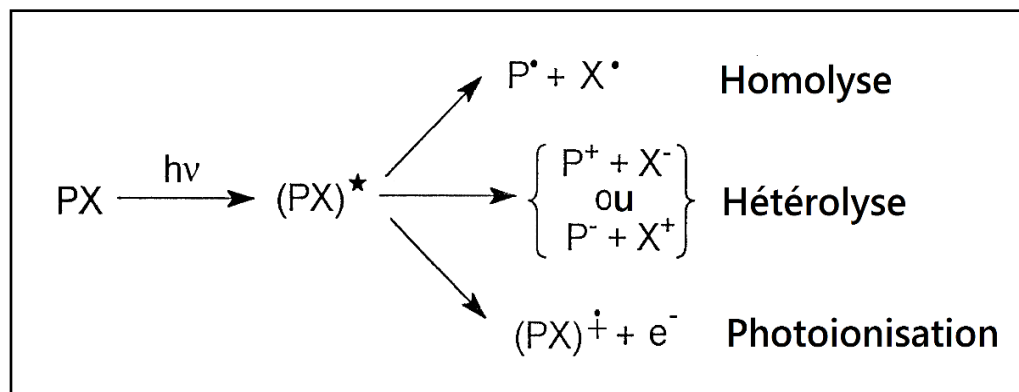


Figure 3 : Les processus impliqués dans la photolyse directe (**Burrows et al., 2002**).

-L'homolyse correspond à la rupture d'une liaison covalente entre deux fragments ; chacun retenant l'un des deux électrons du doublet d'électrons liants, pour former deux radicaux (**P• + X•**) ;

-L'hétérolyse est la rupture d'une liaison covalente dans une molécule neutre générant un anion et un cation. Dans cette réaction, les deux électrons qui formaient la liaison covalente se retrouvent dans un seul fragment de la molécule, celui dont l'électronégativité est la plus élevée (**P⁺ + X⁻** ou **P⁻ + X⁺**) ;

-La photoionisation peut être réalisée par des rayonnements de longueur d'onde suffisante pour éjecter un électron périphérique (**PX^{•+} + e⁻**)

Les réactions photochimiques sont très variées ; elles conduisent à des composés dont l'activité biologique est généralement différente de celle des molécules initiales. Dans certaines conditions la transformation peut aller jusqu'à la minéralisation du pesticide (**Calvet, 2005**).

1.2.2. La dégradation biotique

La dégradation biotique est due à l'action de divers organismes vivants. Elle résulte de transformations chimiques dues à des systèmes enzymatiques. Elle a lieu dans les milieux naturels ; le sol, les sédiments et les eaux, mais elle peut aussi se produire dans les organismes végétaux et animaux. Quand les êtres vivants sont responsables de la dégradation on parle plutôt de détoxification.

La microflore à l'origine de la dégradation biotique regroupe les champignons, les algues, les protozoaires et les bactéries. Les microorganismes qui dégradent les pesticides sont en majorité des bactéries et des champignons.

La microflore impliquée dans la dégradation des pesticides n'est généralement pas limitée à une seule espèce. Son activité dans le processus de dégradation dépend à la fois de son patrimoine enzymatique qui détermine la nature des réactions chimiques et de son environnement qui exerce une influence sur son développement et sur sa survie.

Les microorganismes peuvent être impliqués dans la dégradation des pesticides selon les mécanismes suivants :

- **Le métabolisme direct** : qui fait des pesticides une source d'énergie utilisée pour la croissance des microorganismes.
- **Le cométabolisme** : il s'agit de transformations chimiques des pesticides mais ils ne sont pas une source d'énergie pour les microorganismes.

Le tableau IV montre les modes de dégradation de quelques pesticides et les microorganismes correspondants.

Tableau IV : Modes de dégradation de quelques pesticides et les microorganismes impliqués (Singh et Walker, 2006).

Composés	Microorganismes	Mode de dégradation
Parathion	<i>Pseudomonas diminuta.</i>	Co-métabolique
	<i>Arthrobacter sp.</i>	Catabolique(C)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Catabolique (C, N)
Coumaphos	<i>Flavobacterium sp.</i>	Co-métabolique
	<i>Nocardia souche B-1.</i>	Catabolique (C)
Diazinon	<i>Flavobacterium sp.</i>	Catabolique (P)
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Co-métabolique
	<i>Arthrobacter spp.</i>	Co-métabolique
Glyphosate	<i>Bacillus megaterium</i> 2BLW	Catabolique (P)
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Catabolique (N)

C: carbone, P: phosphore, N : azote

2.2.1. Mécanismes microbiens de la dégradation

2.2.1.1. Le métabolisme direct

Les microorganismes ont besoin d'éléments nutritifs (C, N, P, S), d'eau et d'énergie pour leur croissance et le maintien de leur activité. D'un point de vue biochimique, la production d'énergie résulte d'échanges d'électrons entre les composés donneurs organiques et inorganiques et les accepteurs d'électrons (oxygène moléculaire, nitrate, sulfate).

Beaucoup de pesticides peuvent être des sources d'éléments d'énergie pour les microorganismes par la mise en œuvre de diverses réactions chimiques cataboliques catalysées par les enzymes.

En général les bactéries sont les plus capables d'effectuer ces réactions chimiques de la molécule initiale aux molécules inorganiques finales. Certaines bactéries sont incapables de dégrader toute la molécule ; elles n'effectuent qu'une partie ce qui nécessite l'intervention de plusieurs espèces pour obtenir la minéralisation (Calvet, 2005).

-Caractéristiques générales du métabolisme direct

Le métabolisme direct est la conséquence de l'utilisation des pesticides comme source d'énergie, il a fait l'objet de nombreux travaux (Bollag et Liu, 1990 ; Fournier, 1996).

Des caractères généraux ont été énoncés basés sur l'observation effectuée à propos de la minéralisation des acides phénoxy alcanœiques (Fournier, 1996) :

- la cinétique présente une phase de latence précédant une phase de minéralisation ;
- l'application ultérieure de pesticides fait disparaître la phase de latence ;

- un sol où se produit la minéralisation contient des bactéries spécifiques capables de l'effectuer ;
- la vitesse de minéralisation est accrue par des applications successives.

La minéralisation se déroule suivant une chaîne de réactions chimiques dont la première d'entre-elles est l'hydrolyse, l'oxydation, la réduction, ou la substitution, suivie par d'autres types de transformations.

2.2.1.2. Le cométabolisme

-Définition : C'est un processus au cours duquel des microorganismes assurent leur maintenance et leur multiplication aux dépens d'un substrat organique tout en dégradant des pesticides sans que ceux-ci soient pour eux une source d'énergie ou d'éléments nutritifs. Il est très fréquent et beaucoup de microorganismes peuvent y participer (Singh et Seth, 1989). La comparaison entre le métabolisme direct et le co-métabolisme est illustrée dans la figure 4.

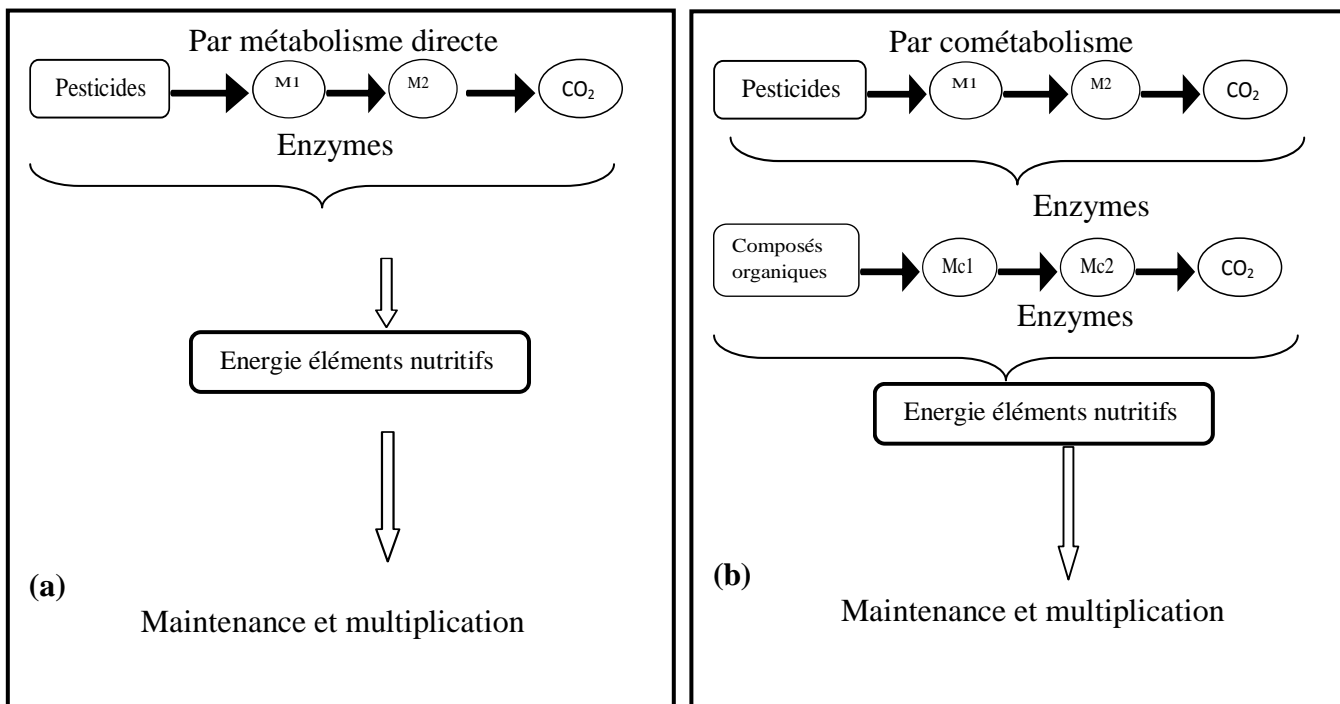


Figure 4 : Comparaison entre la dégradation par métabolite directe et la dégradation par co-métabolisme. (a) métabolisme direct, (b) métabolisme indirect (co-métabolisme) (Calvet, 2005).

Le pesticide est dégradé en divers métabolites (M_1 , M_2 , etc.) jusqu'à la production de molécules inorganiques. Les enzymes nécessaires pour la dégradation peuvent être produites par une ou plusieurs souches microbiennes.

La maintenance et la multiplication des microorganismes sont assurées par la minéralisation de composés organiques différents du pesticides et qui met en jeu des enzymes. La dégradation du pesticide en métabolites (M_1 , M_2 , etc.) différents où identiques au cas précédent est due à d'autres enzymes, et se déroule parallèlement à celle des composés organiques.

Ces métabolites peuvent éventuellement être minéralisés.

-Caractéristiques générales

- Les champignons sont particulièrement impliqués dans ce type de dégradation en raison de l'abondance de leurs systèmes enzymatiques.

- Le cométabolisme ne conduit généralement pas à une dégradation très poussée des pesticides quand une seule souche est concernée, et produit des métabolites qui sont des molécules plus au moins transformées comparées à la molécule initiale du pesticide. Cependant, il est possible que plusieurs souches interviennent en séquence pour accomplir la dégradation et produire des métabolites, voir même en utiliser certains comme substrat énergétiques et les minéraliser.

- Les métabolites formés ont des propriétés différentes de celles du pesticide initial, en particulier celles relatives à son transport et à sa toxicité. Ils sont souvent plus polaires et plus solubles dans l'eau et parfois plus toxique (**Fournier, 1996**).

2.2.2. Principales réactions de biodégradation des pesticides

Toutes les réactions chimiques qui rentrent dans le mécanisme de la biodégradation des pesticides ont une caractéristique commune : elles sont toutes catalysées par des enzymes, généralement intracellulaires. Les principales réactions sont la réaction d'hydrolyse, la réaction d'oxydation et la réaction de réduction.

2.2.2.1. Réaction d'hydrolyse

Ce type de réaction fait intervenir des enzymes comme les estérases, les phosphatases, les lyases et les carboxyesterases. Les pesticides qui contiennent des groupes esters, éthers, et amides peuvent être hydrolysés et donner généralement des métabolites moins toxiques (**Munneck et al., 1982**). L'hydrolyse des organophosphates, des phénylcarbammates et des

thiocarbamates conduit à une perte importante de leur toxicité (Calvet, 2005). La figure 5 montre le clivage enzymatique par hydrolyse du malathion.

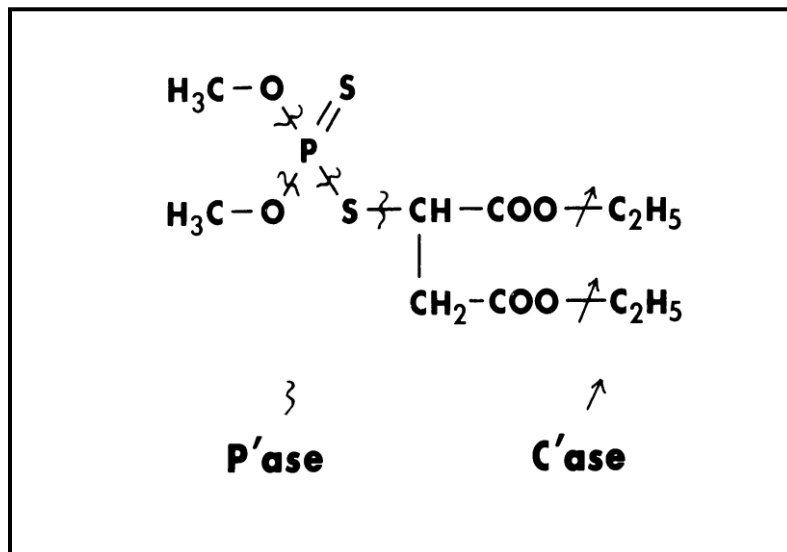


Figure 5 : Clivage enzymatique du malathion (*P'ase*: phosphatase ; *C'ase*: carboxyestérase) (Bourquin, 1975).

De nombreuses études ont traité la dégradation du malathion par des microorganismes permettant sa métabolisation en divers produits finaux. L'activité carboxyestérasique est la voie métabolique majeure, elle conduit à la production de deux métabolites que sont le malathion monoacide et le malathion diacide (Matsumura et Boush, 1966). L'activité phosphatasique constitue également une voie métabolique chez un grand nombre de microorganismes (Bourquin, 1975)

Il existe des microorganismes et notamment des champignons qui secrètent des enzymes qui ont des propriétés hydrolytiques et agissent à l'extérieur des corps microbiens (Calvet, 2005).

2.2.2.2. Réaction d'oxydation

Très fréquente dans le métabolisme des microorganismes, les réactions biochimiques d'oxydation sont catalysées par diverses enzymes telles que les oxygénases et les peroxydases.

Dans les milieux naturels oxygénés, l'oxygène moléculaire (O₂) n'est pas très réactif. Il doit être transformé en oxydant plus efficace et cela demande de l'énergie et l'intervention d'enzymes, comme les oxygénases, et de coenzymes, comme le NADP. Quand deux atomes

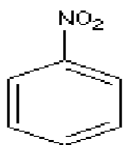
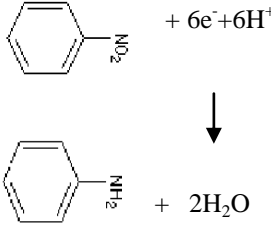
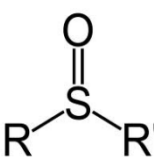
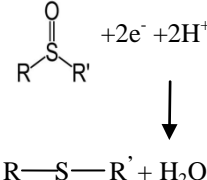
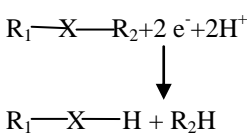
d'oxygène provenant de l'oxygène moléculaire participent à la réaction, l'enzyme impliquée est une dioxygénase. Par contre, lorsqu'un seul atome d'oxygène est impliqué, l'enzyme effectrice est une monooxygénase.

La dégradation du malathion par désulfuration oxydative et par déméthylation sont deux exemples de réactions d'oxydation qui sont, par ailleurs, deux voies métaboliques mineures chez les microorganismes (**Matsumura et Boush, 1966 ; Christie, 1969 ; Mostafa et al., 1972**)

2.2.2.3. Réaction de réduction

La réduction est aussi une voie possible de dégradation des pesticides. Ces derniers doivent contenir les groupes cités dans le tableau V. Une autre réaction relevant de la réduction, est la déshalogénéation réductive observée pour les organochlorés (**Calvet, 2005**).

Tableau V : Les principaux groupes chimiques des molécules pesticides pouvant être réduits (Larson et Weber, 1994).

Groupes réduits dans les conditions des milieux naturels		
Nom	Réaction de réduction	Exemples
Groupe nitro aromatique 		Dérivés du nitrobenzène Méthyl-parathion Trifluraline
Groupe sulfoxyde 		Oxydéméton-méthyl
Groupe alkyl $R_1 - X - R_2$ X=N, O ou S		Déalkylation réductive de l'atrazine

2.2.3. Enzymes impliqués dans la dégradation des pesticides

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser des réactions chimiques ; elles agissent sur la vitesse des réactions. Leur variété est due à leur spécificité de substrat et de réaction. Leurs activités dépendent aussi de plusieurs facteurs : le pH, la force ionique et la température. Ces facteurs influencent de façon directe la cinétique de dégradation notamment celle des pesticides.

Le sol renferme un grand nombre d'enzymes en raison de la diversité des microorganismes qui sont la principale source d'enzymes. Elles sont présentes en faible quantité dans la solution du sol. On les trouve aussi à l'extérieur du corps microbien adsorbées sur les minéraux ou même complexées par les substances humiques. Pour agir, les enzymes intracellulaires (endoenzymes) nécessitent que les molécules organiques du substrat soient absorbées, par contre les enzymes extracellulaires (exoenzymes) catalysent des transformations dans la solution du sol ou plus souvent en phase adsorbée.

Cette différence a des conséquences sur la cinétique de dégradation. Toutes les enzymes nécessaires à la dégradation des pesticides sont rarement présentes dans une seule espèce microbienne, ce qui implique l'intervention de plusieurs espèces formant un consortium (**Fournier, 1996**).

La dégradation des pesticides fait intervenir de nombreuses enzymes qui ne sont pas spécifiques aux microorganismes et qui sont impliquées dans les transformations chimiques de composés organiques naturels, ces derniers sont codés par des gènes, dont quelques exemples sont illustrés dans le tableau VI (**Singh et Walker, 2006**).

Cependant, beaucoup de pesticides ont une structure différente de celle du substrat naturel et leur dégradation nécessite une évolution enzymatique des microorganismes. Cette dernière est possible grâce à une modification génétique des enzymes.

Dumas et al. (1989) et Shimazu et al. (2001) ont montré que la détoxification de différents pesticides organophosphorés dans l'environnement est réalisée par les carboxyesterases. En général, l'hydrolyse d'une liaison phosphoester réduit la toxicité des organophosphorés selon **Serdar (1996) et Horne et al. (2002)**. Les différents groupes de ces enzymes ont été trouvés dans les bactéries, les plus largement étudiées d'entre elles sont les OPH, ces derniers issus des bactéries sont les plus favorables pour la bioremédiation des insecticides organophosphorés (**Horne et al., 2002**).

Tableau VI : Quelques exemples de gènes codant pour les enzymes de dégradation des organophosphorés (Singh et Walker, 2006).

Gène	Microorganisme	Localisation	Enzyme
Opd	- <i>Pseudomonas diminuta</i> .	- Plasmide.	- OPH
	- <i>Pseudomonas sp.</i>	- Plasmide.	- OPH
Phn	- <i>Escherichia coli</i> .	- Chromosome.	- Phosphatase.
Glp A et B	- <i>Pseudomonas pseudomallei</i> .	- Chromosome.	- C-P lyase
PehA	- <i>Burkholderia caryophilli</i>	- Chromosome	- PEH
PdeA	- <i>Delftia acidovorans</i>	- Chromosome	- Phosphodiesterase

2.2.3.1. Cinétique de dégradation

Les vitesses de biodégradation des composés organiques apportés au sol sont déterminées par la vitesse des réactions enzymatiques et la vitesse de la croissance microbienne. La cinétique est l'effet de la décroissance de la quantité de substrat à dégrader et de la croissance microbienne, deux processus qui ne dépendent pas du temps de la même façon. C'est pourquoi les cinétiques ne sont pas des fonctions linéaires du temps et qu'elles se présentent sous deux formes :

- L'exponentielle négative est généralement observée pour les composés organiques facilement dégradables et avec une grande biomasse microbienne initiale qui n'augmente pas ou qui augmente peu en fonction du temps.
- La fonction sigmoïdale est observée pour les substrats lentement dégradables avec une petite biomasse initiale qui augmente avec la dégradation du substrat (Calvet, 2005).

3. Généralités sur les eaux usées

L'eau est une source vitale pour l'humanité. De multiples usages font appel à ce milieu complexe et fragile : besoins alimentaires, utilisations domestiques, industrielles, agricoles et touristiques. La croissance démographique et une gestion souvent incontrôlée des ressources en eaux conduisent néanmoins à une situation inquiétante de la pollution des eaux ce qui engendre un nouveau terme appelé effluent ou eau usée.

En d'autres termes ces eaux ne peuvent être rejetées dans la nature sans conséquences nocives, compte tenu du danger de pollution qu'elle représente.

Aujourd'hui, la réutilisation des eaux usées est un enjeu politique et socio-économique. Elle représente une ressource alternative en eau permettant de limiter les

pénuries et de mieux préserver les ressources naturelles en limitant les prélèvements d'eau dans les milieux fragilisés.

3.1. Classification des eaux usées

L'origine, la composition et la quantité des déchets sont fonction de mode de vie d'où on distingue trois sources principales.

3.1.1. Eaux domestiques

Elle correspond à l'eau qu'on utilise au quotidien dans les habitations, on distingue deux catégories :

- les eaux ménagères des salles de bain et des cuisines qui sont généralement chargées de substances biodégradables (graisses, savon, etc.), de détergents de produits nettoyants et d'autres désinfectants ;
- les eaux vannes s'appliquent aux rejets des toilettes. Elles sont chargées de diverses matières organiques azotées et de germes fécaux.

3.1.2. Eaux industrielles

Les activités industrielles génèrent selon le ou les types de fabrication des rejets polluants continus ou discontinus d'une extrême diversité (**Boeglin, 1999**).

Les principaux polluants transitant dans les eaux usées d'origine industrielle sont :

- les toxines organiques ;
- les métaux toxiques ;
- les matières colorées ;
- les huiles et graisse ;
- les sels ;
- les micropolluants organiques.

Dès lors, une politique d'assainissement des eaux résiduaires industrielles est importante car les effluents chargés en pollution ne sont pas toujours compatibles avec le système d'épuration public destiné à l'assainissement des effluents urbains.

Enfin, la présence d'éléments indésirables peut dégrader la qualité des boues d'épuration et interdire leur valorisation en agriculture. Certaines d'entre-elles nécessitent un prétraitement de la part de l'industriel avant d'être rejetées dans les collectes.

3.1.3. Eaux usées de ruissellement

Les eaux de ruissellement (eaux pluviales, eaux d'arrosage et de lavage des voies publiques). Les eaux qui ruissellent sur les toitures, les cours, les jardins, les espaces verts et les marchés entraînent toutes sortes de déchets minéraux et organiques : de la terre, des limons, des boues, des sables, des déchets végétaux (herbe, pailles, feuilles, graines, etc.) et toutes sortes de micropolluants (hydrocarbures, pesticides, détergents) (**Desjardins, 1997**).

3.2. Mesure de la pollution des eaux usées

Trois principaux paramètres mesurent les matières polluantes des eaux usées domestiques :

- Les MES exprimées en milligramme par litre. Ce sont les matières non dissoutes contenues dans l'eau. Elles comportent à la fois des éléments minéraux et organiques.
- La DBO exprimée en mg d'oxygène par litre : elle exprime la quantité de matières organiques biodégradables présente dans l'eau. Plus précisément, ce paramètre mesure la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction des matières organiques grâce aux phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Pour mesurer ce paramètre, on prend comme référence la quantité d'oxygène consommé au bout de cinq jours ; c'est la DBO₅.
- La DCO représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder les substances organiques et inorganiques dégradables dans un échantillon (**Dictionnaire environnement, 2010**).

3.3. Epuration des eaux usées

Le traitement des eaux usées devient de plus en plus important afin de protéger l'environnement et en particulier la ressource en eau douce de notre planète.

Le traitement des eaux usées a pour objet de diminuer leur charge en matières organiques et minérales, avant leur déversement dans le milieu naturel (**Bouziane, 2000**).

En Algérie, les eaux usées sont généralement déversées à l'état brut, soit directement à la mer, soit vers les oueds, avec dans les deux cas des problèmes de pollution biologique et chimique. Les cours d'eau fortement pollués traversent ou passent à proximité d'agglomérations urbaines et de zones industrielles majeures (Oued El-harrach à Alger, Oued Soummam à Bejaia, Oued Rhumel à Constantine, Oued Seybouse à Annaba). Les oueds véhiculent de fortes charges polluantes et leur capacité de dilution et d'autoépuration ne suffit plus à résorber la charge polluante. Ils se sont transformés, pour la plupart, en égouts à ciel ouvert, notamment en été où leur débit baisse naturellement (**Metiche, 2004**).

En effet, pour un taux de couverture du réseau d'assainissement de l'ordre de 85 %, seules 20% des eaux usées collectées en Algérie sont traitées (**Medkour, 2003**).

En général, le traitement des eaux usées se fait en plusieurs étapes comme suit :

-Le traitement préliminaire

Le traitement préliminaire consiste en l'enlèvement des solides grossiers et d'autres grands fragments de l'eau usée brute (**FAO, 2003**).

-Le traitement primaire

Le traitement primaire consiste en l'enlèvement des solides organiques et inorganiques sédimentables ainsi que les matériaux flottants (**FAO, 2003**). Les procédés de traitement primaire sont physiques (par exemple, décantation plus au moins poussée) ou éventuellement physico-chimiques, et produisent des boues primaires.

-Le traitement secondaire

Le traitement secondaire de nature biologique a pour but d'éliminer les pollutions carbonées, azotées et phosphorées. Il utilise la capacité auto-épuratrice de microorganismes.

De nombreux procédés peuvent être utilisés : boues activées (très largement utilisées), lit bactérien, lagunage, biofiltration ou disques biologiques.

- Traitement de la pollution carbonée :

Cette pollution est éliminée à l'aide de bactéries hétérotrophes en milieu aérobie et est utilisée comme source d'énergie en présence d'oxygène. Ces réactions engendrent une augmentation de la biomasse. Elle doit être extraite régulièrement du réacteur afin de conserver un état d'équilibre.

- Traitement de la pollution azotée :

Le traitement des composés azotés se déroule en deux étapes. La première phase est la nitrification en milieu aérobie (formation de nitrites puis de nitrate à partir de l'azote organique et ammoniacal). Dans une seconde phase en conditions anoxiques, les nitrates sont réduits en azote moléculaire en présence de carbone.

- Traitement de la pollution phosphorée :

Le phosphore ne pouvant être rejeté dans l'atmosphère à l'état gazeux, il doit être concentré dans les boues où il peut être assimilé biologiquement (**Comeau et al., 1986**).

-Traitement tertiaire

Ce type de traitement a pour but d'améliorer certains paramètres spécifiques de la qualité des rejets dans un milieu naturel vulnérable.

Parmi ces traitements, les plus importants sont les suivants :

- la désinfection lorsque le rejet a lieu dans un milieu aquatique à usage balnéaire, pour diminuer les risques de contamination (eau potable, conchyliculture.) ou pour réduire les risques liés aux perturbateurs endocriniens. L'oxydation par les UV ou par l'ozone est la plus utilisée actuellement ;
- le traitement de finition afin de diminuer au maximum les MES, la DBO₅, la DCO (filtre à sable), les teneurs en phosphore (précipitation chimique).
- le traitement sur charbon actif utilisé pour éliminer par adsorption les molécules résistantes aux traitements biologiques. Ce traitement élimine également couleurs et odeurs des rejets (Pons et al., 2008).

Les différentes étapes du traitement des eaux usées sont illustrées dans la figure 6.

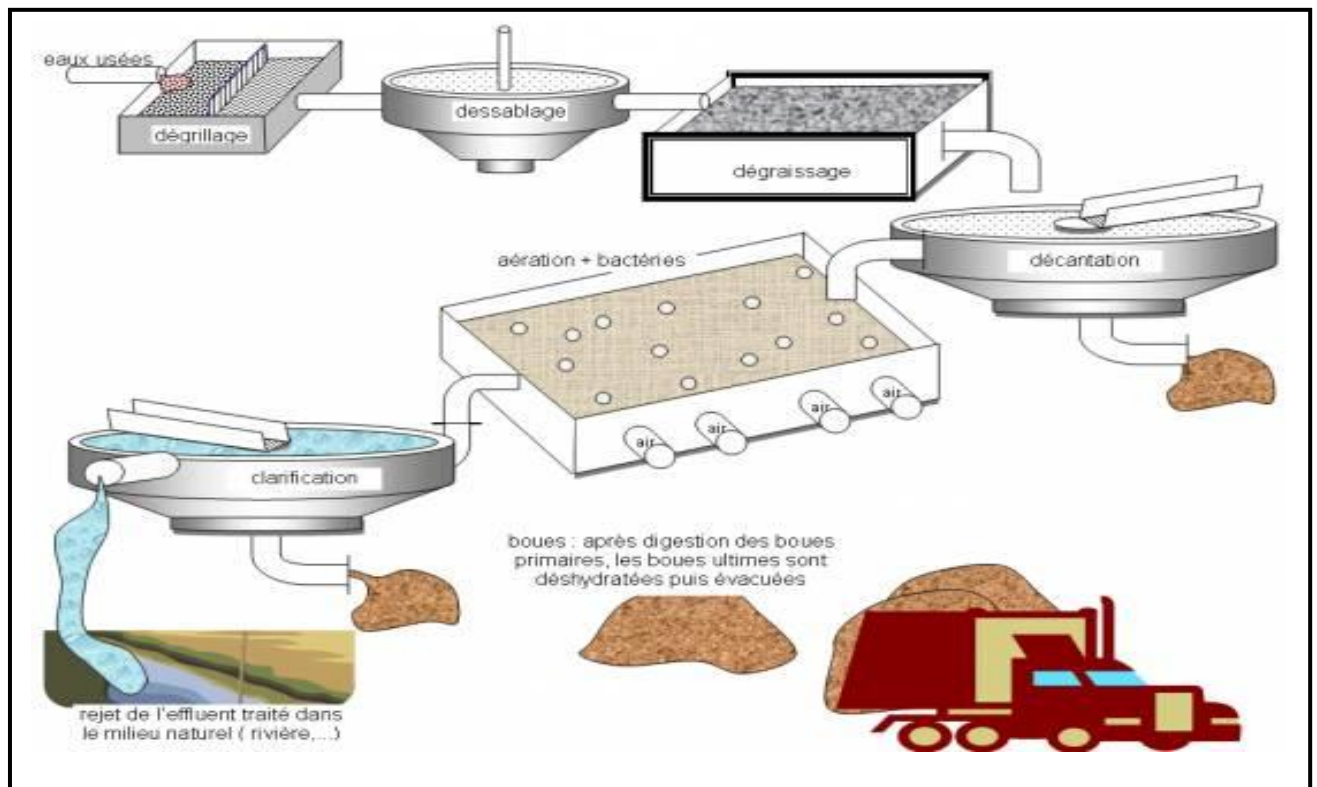


Figure 6 : Schéma général d'épuration des eaux usées (Pons et al., 2008).

La quasi-totalité des procédés d'épuration des eaux résiduaires qu'ils soient physico-chimiques ou biologiques, conduisent à la concentration des polluants sous la forme de suspensions aqueuses ou de boues qui représentent des déchets volumineux (**Boeglin, 1999**).

Les boues de station d'épuration désignent l'ensemble des résidus de l'activité biologique des micro-organismes vivant dans les stations d'épuration, qui transforment les matières transportées par les eaux usées pour qu'elles puissent en être extraites. Elles sont constituées essentiellement d'eau, de sels minéraux et de matière organique. Elles sont réparties selon les familles suivantes :

- Boues primaires : qui proviennent du traitement primaire par décantation.
- Boues biologiques : biomasse en excès qui provient du traitement biologique secondaire.
- Boues mixtes : mélange de boues primaires et de boues biologiques.
- Boues physico-chimiques : proviennent de la décantation après traitement avec un réactif (**Dictionnaire environnement, 2010**).

La forme liquide des boues et leur forte charge en matières organiques hautement fermentescibles rend leur évacuation difficile d'où l'existence d'un certain nombre de traitements spécifiques qui consiste en :

- L'épaississement : c'est une simple décantation, les boues sédimentent au niveau de l'épaississeur. Ce qui permet la réduction de leur volume.
- La stabilisation : pour empêcher ou réduire les problèmes de fermentation et d'éviter ainsi les nuisances olfactives. La stabilisation peut être biologique par voie aérobie (compostage), anaérobie (méthanisation) ou chimique (chaulage ou autres traitements).
- La déshydratation : elle a pour objectif de réduire leur volume par épaississement et/ou par déshydratation pour faciliter par la suite le transport et le stockage (**Amir, 2005**).

4. Méthode des plans d'expériences

Depuis bien longtemps, l'observation et l'expérimentation sont deux outils essentiels de l'avancement des sciences. L'observation permet d'acquérir une première connaissance des phénomènes de la nature, au sens le plus large, et d'en déduire des hypothèses, qui doivent ensuite être vérifiées et, éventuellement précisées ou amendées.

A l'époque actuelle, bon nombre de procédés de fabrication ou d'expériences en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de

variables difficiles à régler intuitivement. Une telle problématique est primordiale dans le milieu industriel où minimiser le nombre d'expériences à réaliser est synonyme de gain de temps et de productivité. Réaliser des productions de la meilleure qualité possible au coût le plus bas est de plus une quête universelle pour tous les fabricants (**Tinsson, 2010**).

Un plan d'expériences peut être défini comme une organisation raisonnée d'essais permettant d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Les plans d'expériences s'appliquent à de nombreuses disciplines et à toutes les industries dès lors que l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt donnée, et des variables qui y sont associées (**Goupy, 2006**).

Les plans d'expériences testent plusieurs facteurs à des niveaux différents à la fois pour chaque essai selon une procédure programmée, qui permet une approche sûre, fine et rentable du phénomène étudié, contrairement à la démarche expérimentale classique « variation du niveau d'un seul facteur à la fois », qui est longue et coûteuse.

4.1. Table ou matrice d'expériences

Une table (ou matrice) d'expériences est un tableau dans lequel chaque ligne correspond à un essai expérimental indiquant les niveaux que doivent prendre les facteurs étudiés (**Sabre, 2007**).

L'étude d'un phénomène revient souvent à s'intéresser à une grandeur particulière comme la biodégradation d'un substrat donné ou la croissance cellulaire. Cette grandeur dépend d'un grand nombre de variables. La biodégradation d'un substrat donné est fonction de sa concentration initiale, de la concentration initiale de biomasse, de la température, du pH, du taux d'aération, etc.

Sous une forme mathématique, on peut écrire que la grandeur d'intérêt, y , est une fonction de plusieurs variables x_i . On a :

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k)$$

L'étude du phénomène se ramène à déterminer la fonction $f(\)$ qui lie la réponse y aux différents facteurs x_1, x_2, \dots, x_k .

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y , porte le nom de réponse. Les variables qui sont susceptibles de modifier la réponse sont appelées facteurs. On parle donc des facteurs qui influent sur une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences (**Goupy et Creighton, 2006**).

1.4.2. Les différents types de facteurs

La construction des plans et l'interprétation des résultats dépendent en grande partie des types de facteurs rencontrés dans l'étude. On distingue plusieurs types de facteurs. Nous citerons les types de facteurs suivants : les facteurs continus, les facteurs discrets, les facteurs ordonnables, les facteurs booléens.

- ***Facteurs continus***

La pression est un exemple de facteur continu. Dans un intervalle de pression donné, on peut choisir toutes les valeurs possibles. Il en est de même d'une concentration ou d'une température. Les valeurs prises par les facteurs continus sont donc représentées par des nombres continus.

- ***Facteurs discrets***

Les facteurs discrets ne peuvent prendre que des valeurs particulières. Ces valeurs ne sont pas forcément numériques : on peut représenter un facteur discret par un nom, une lettre, une propriété ou même par un nombre qui n'a alors en soi aucune valeur numérique mais qu'une signification de repère. Par exemple, on peut s'intéresser aux couleurs d'un produit : bleu, rouge et jaune sont des facteurs discrets.

- ***Facteurs ordonnables***

Il s'agit de facteurs discrets que l'on peut mettre dans un ordre logique. Par exemple, grand, moyen, petit, ou encore premier, deuxième, troisième et quatrième.

- ***Facteurs booléens***

Les facteurs booléens sont des facteurs discrets qui ne peuvent prendre que deux valeurs : haut ou bas, ouvert ou fermé, blanc ou noir, etc. (**Goupy et Creighton, 2006**).

Partie II:
Cinétique de biodégradation
du malathion
et
utilisation de la mélasse,
du moût de rebuts de dattes
et du glucose
comme
substrats additionnels

La majorité des travaux portant sur la biodégradation du malathion mettent en œuvre des cultures pures (Kamal et al., 2008 ; Goda et al., 2010 ; Singh et al., 2012). Il y a très peu d'informations disponibles concernant la dégradation du pesticide par des cultures mixtes, notamment par les boues activées (Barik et al., 1984 ; Kanazawa, 1987). Dans le cadre de ce chapitre, nous avons étudié le traitement du malathion testé à différentes concentrations par des boues activées locales préalablement adaptées au pesticide. Dans une seconde étape, nous avons effectué via l'analyse par GC-MS, l'identification du ou des produit(s) de dégradation du malathion. Nous avons également procédé à la recherche et l'identification des principaux groupes bactériens présents dans les boues activées utilisées à l'issue du traitement par le pesticide à 60mg/l.

A la lumière des contraintes économiques associées aux différents modes de traitement des pesticides, l'emploi de sous-produits bon marché comme co-substrats peut contribuer à réduire considérablement le coût de leur traitement biologique.

Sachant que la dégradation des polluants organiques peut être améliorée en présence de substrats de croissance additionnels, nous avons testé séparément l'effet du glucose, de la mélasse (sous-produit de la fabrication du sucre) et du moût de rebuts de dattes (sous-produit de la culture dattière) sur l'élimination du malathion.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel biologique

Dans notre cas, le matériel biologique est constitué par des boues activées dont nous avons effectué la collecte au niveau de la station d'épuration de Beni-Messous localisée en bord de mer, plus précisément à Ain Benian à l'ouest d'Alger. Les boues ont été prélevées au niveau du bassin d'aération (Figure 7) et ont subi plusieurs lavages successifs afin d'éliminer toutes les impuretés et ce, avant leur mise en culture. Cette dernière a été réalisée dans un bioréacteur de 9 litres agité et aéré contenant un milieu de culture dont la composition est détaillée dans le paragraphe ci-après.



Figure 7: Bassin d'aération de la station d'épuration d'Ain Benian.

1.2. Le milieu de culture

Afin d'assurer l'entretien des boues activées, nous avons utilisé le milieu de culture proposé par **Barik et al. (1982)**, et qui a la composition suivante :

- Pour 1 litre d'eau distillée : K_2HPO_4 (0,1g), $MgSO_4$ (0,2g), $FeSO_4$ (0,001g), $(NH_4)_2SO_4$ (1g), NaCl (1g), Na_2MoO_4 (0,0033g), Glucose (2,5g).

Le malathion utilisé, nous a été fourni par l'entreprise Alphyt de Baraki. Il s'agit d'un liquide plus ou moins visqueux de couleur légèrement jaunâtre et contenant 95% de matière active.

La partie minérale du milieu susmentionné a servi pour les besoins des essais qui concernent l'utilisation de la mélasse et du glucose comme seconde source de carbone en présence de malathion à 60mg/l.

Ces expérimentations ont été réalisées comme suit :

- température : ambiante ($25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$) ;
- volume réactionnel de 500 ml ;
- aération à l'aide d'un diffuseur d'air ;
- pH compris entre 5,8 et 6,3 et ajusté au besoin avec de l'hydroxyde de sodium (1N) ou avec de l'acide chlorhydrique (0,5N).

Le milieu minéral utilisé dans les essais portant sur l'utilisation du moût de rebuts de dattes a la composition suivante : $MgSO_4 (7H_2O)$ 0,4g, $(NH_4)_2SO_4$ 7g, $FeSO_4$ 13,66mg, $MnCl_2 (4H_2O)$ 3,14mg, $ZnSO_4 (7H_2O)$ 4,4mg, $CuSO_4 (5H_2O)$ 0,79mg et $CaCl_2$ 55,43mg dissous dans 1000ml d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 6.0 grâce à la solution tampon de Sorensen de composition suivante : KH_2PO_4 7,93g, $Na_2HPO_4 (2H_2O)$ 1,48g, dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le milieu minéral ainsi constitué est stérilisé par autoclavage à $121^{\circ}C$ pendant 15 min.

1.3. Procédure d'adaptation des boues activées au malathion

Ce processus a consisté en la culture des boues activées sur un milieu minéral contenant deux sources de carbone (glucose et malathion). La concentration du glucose a été réduite progressivement de 2500mg/l jusqu'à la valeur de zéro sur une période d'un mois parallèlement à l'augmentation progressive de la concentration du malathion. Le but de cette procédure est de permettre aux microorganismes de s'adapter à leur nouvel environnement (présence de malathion) en leur permettant de synthétiser ou de réactiver les enzymes nécessaires à la dégradation du pesticide.

1.4. Biodégradation du malathion

1.4.1. Effet de la concentration initiale du malathion sur sa propre dégradation et modélisation du processus de biodégradation

Les cinétiques de fermentation sont habituellement décrites soit par le modèle de la croissance cellulaire (μ_x) soit par celui de la consommation du substrat (r_s). Dans la présente étude, le modèle cinétique de Haldane (**Edwards, 1970**) (Equation 3) basé sur le taux de consommation spécifique du substrat a été appliqué avec des concentrations du malathion comprises entre 5mg/l et 140mg/l. L'équation du modèle a été résolue par la méthode de régression non linéaire par le biais du logiciel Statistica Release 7.0 (StatSoft Inc.). La concentration résiduelle du malathion a été déterminée à différents intervalles de temps.

Equation de Haldane (**Edwards, 1970**) (Equation 3) :

$$r_s = r_{s \max} \frac{S K_i}{(K_s + S)(S + K_i)} \quad (3)$$

Où : K_s , K_i , r_s , $r_{s \max}$ et S sont respectivement la constante de demi saturation (mg/l), la constante d'inhibition (mg/l), le taux spécifique de consommation du substrat (1/h), le taux spécifique maximum de consommation du substrat (1/h) et la concentration du substrat (mg/l).

Les valeurs du taux spécifique de consommation du malathion r_s (1/h) ont été calculées selon l'équation suivante (Equation 4) :

$$r_s = - \frac{dS}{X dt} \quad (4)$$

X et S correspondent aux concentrations de biomasse et de malathion à l'instant t .

1.4.2. Effet de sources de carbone additionnelles sur le processus de dégradation du malathion ainsi que sur la croissance cellulaire

Dans la perspective d'améliorer le rendement du traitement du malathion, nous avons entrepris d'étudier l'effet de sources de carbone additionnelles sur la croissance cellulaire d'une part, et sur le taux de dégradation du malathion d'autre part. Pour cela, trois sources de carbone que sont le glucose le moût de rebuts de dattes et la mélasse à la concentration de 5000 mg/l ont été choisies et testées séparément en présence du malathion à 60mg/l.

Les valeurs du taux spécifique de croissance des microorganismes μ_x ont été calculées durant la phase exponentielle de la croissance selon la formule suivante (Equation 5) :

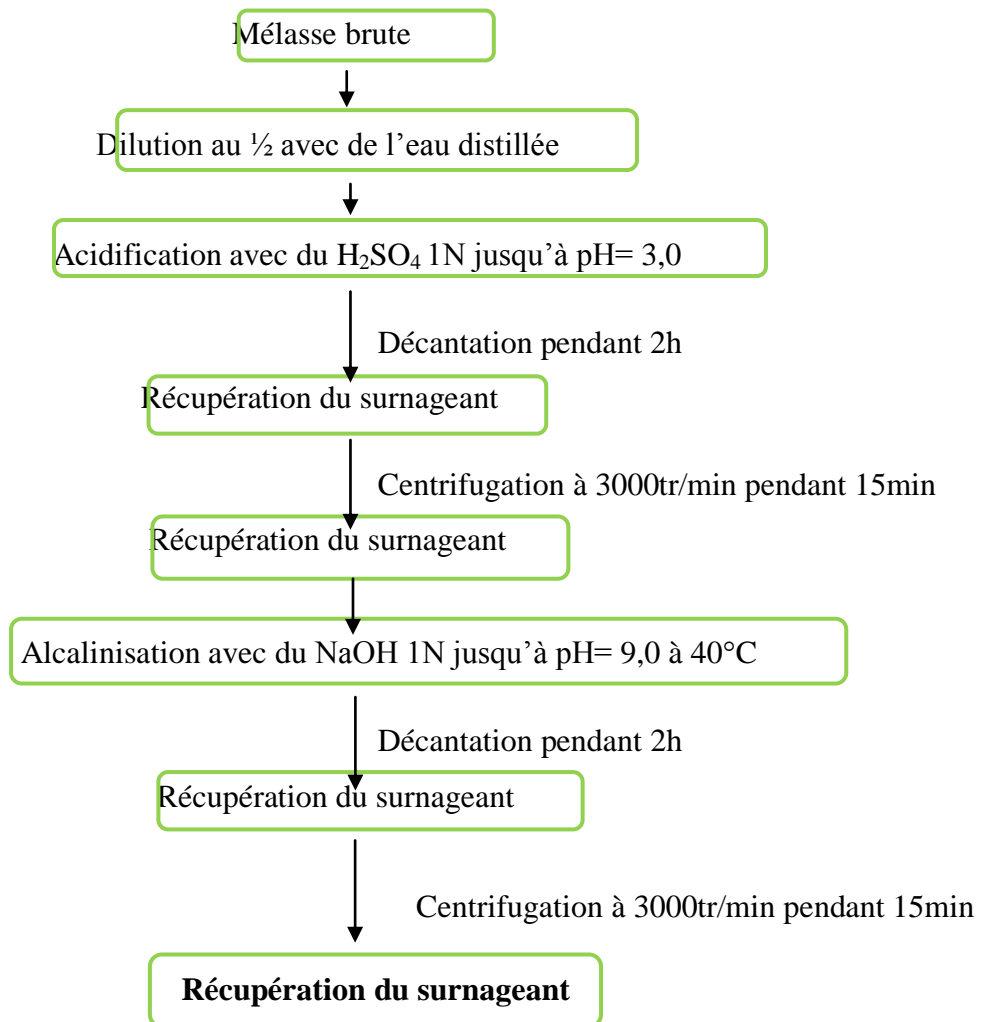
$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_x t \quad (5)$$

Avec X_0 , X sont les valeurs de la concentration de la biomasse en début d'expérimentation (à t_0) et à l'instant t , respectivement.

1.4.2.1. Effet du glucose et de la mélasse sur la croissance cellulaire et sur la biodégradation du malathion

La mélasse utilisée nous a été fournie par l'usine de levure boulangère sise à Oued-Smar. La concentration initiale de biomasse est de 2000mg/l et celle des sources de carbone additionnelles est de 5000mg/l. Les essais ont été incubés à température ambiante ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) sous agitation magnétique (200tr/min) pendant 4 jours. Le pH a été maintenu aux alentours de 6,0 par addition manuelle d'une solution d'hydroxyde de sodium 1M et d'une solution d'acide sulfurique 0,5M. La concentration résiduelle du malathion ainsi que la concentration de biomasse ont été déterminées à différents intervalles de temps.

L'utilisation de la mélasse nécessite comme préalable un prétraitement physico-chimique qui consiste en :



Ce prétraitement vise l'élimination des métaux lourds et les autres boues susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire.

1.4.2.2. Effet du glucose et du moût de rebuts de dattes sur la croissance cellulaire et sur la biodégradation du malathion

La datte est un fruit sucré produit par le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Originnaire des oasis des déserts d'Afrique du nord, du sud-ouest asiatique et du Moyen-Orient. La datte est considérée comme l'un des fruits les plus anciennement cultivés. La production mondiale de ce fruit est estimée à 7,3 millions de tonnes en 2011, dont 724894 tonnes produites en Algérie (FAO, 2013b). Selon El-Sharnouby et al. (2007), sur la base du poids sec, la datte est constituée de 62 à 75% de glucides, de 2,2 à 2,7% de protéines, de 5 à 8% de fibres, de 0,4 à 0,7% de lipides et de 30 à 50mg/100g d'acide ascorbique.

Le moût de datte est très nutritif, il constitue par ailleurs, un substrat très appréciable pour la fermentation par les microorganismes (**Nancib et al., 2005; Gupta et Kushwaha, 2011**).

En Algérie, une large quantité (60000tonnes/an) de rejets constitués de dattes mures, impropres à la consommation humaine, est malheureusement non exploitée et perdue (**Nancib et al., 1997**). Ces rejets qui sont issus des plantations de palmiers dattiers ou bien encore de l'industrie de conditionnement des dattes, constituent un substrat attractif pour les procédés biotechnologiques.

Un mélange de rebuts de dattes («H'Chef») et des écarts de tris de dattes a été gracieusement mis à notre disposition par un exploitant local d'une palmeraie de la wilaya de Laghouat. Le choix de ce rejet a été motivé par sa faible valeur marchande, sa richesse en sucres et sa large disponibilité. Le moût qui en est extrait, constitue de par sa richesse en sucres simples un milieu favorable pour le développement des microorganismes.

1.4.2.2.1. Préparation du moût de dattes

La préparation du moût de dattes a été effectuée selon le protocole suivant : après triage manuel des rebuts et des écarts de tris de dattes pour éliminer les particules tels que, les cailloux et autres débris végétaux, ils sont lavés à l'eau du robinet puis à l'eau distillée. Après égouttage et dénoyautage, les pulpes ont été découpées. Elles sont ensuite immergées dans de l'eau distillée à 75-80° C, à raison de 1kg de pulpes de rebuts de dattes pour 4 litres d'eau distillée pendant 45 minutes, sous agitation continue (**Ould El Hadj, 2001**). Dans le but de séparer les débris cellulosiques de la phase liquide riche en sucres, le moût ainsi obtenu a été filtré à l'aide d'un tissu gaze puis pressuré. Les concentrations en sucres réducteurs testées dans cette partie de l'étude ont été obtenues par dilution appropriée du concentré du moût avec de l'eau distillée.

Les essais de biodégradation du malathion par la culture microbienne mixte sont menés dans des volumes réactionnels de 200ml comprenant 100ml de milieu minéral contenant du malathion à 60mg/l additionnés de moût de dattes ou de glucose aux concentrations suivantes : 0,5 ; 5 ; 10 ; 20 et 30g/l et inoculés avec 100ml de boues activées à la concentration de 400mg/l. La concentration finale de biomasse est de 200mg/l. Les essais sont recouverts de papier aluminium (pour éviter la photodégradation du malathion) avant leur incubation pendant 110 heures à 28°C ± 1°C sous agitation mécanique (110tr/min) et sous aération. Cette dernière étant assurée par un diffuseur d'air avec un débit de 2,5l/min/l.

Un essai témoin est réalisé sans substrats additionnels dans les mêmes conditions expérimentales.

1.5. Méthodes analytiques

1.5.1. Détermination de la concentration de la biomasse

La détermination de la concentration de la biomasse au cours des différentes cultures a été effectuée par mesure des MVS. C'est la différence entre les MES et la masse de matière minérale récupérée après incinération. Le protocole choisi correspond à la méthode est le suivant :

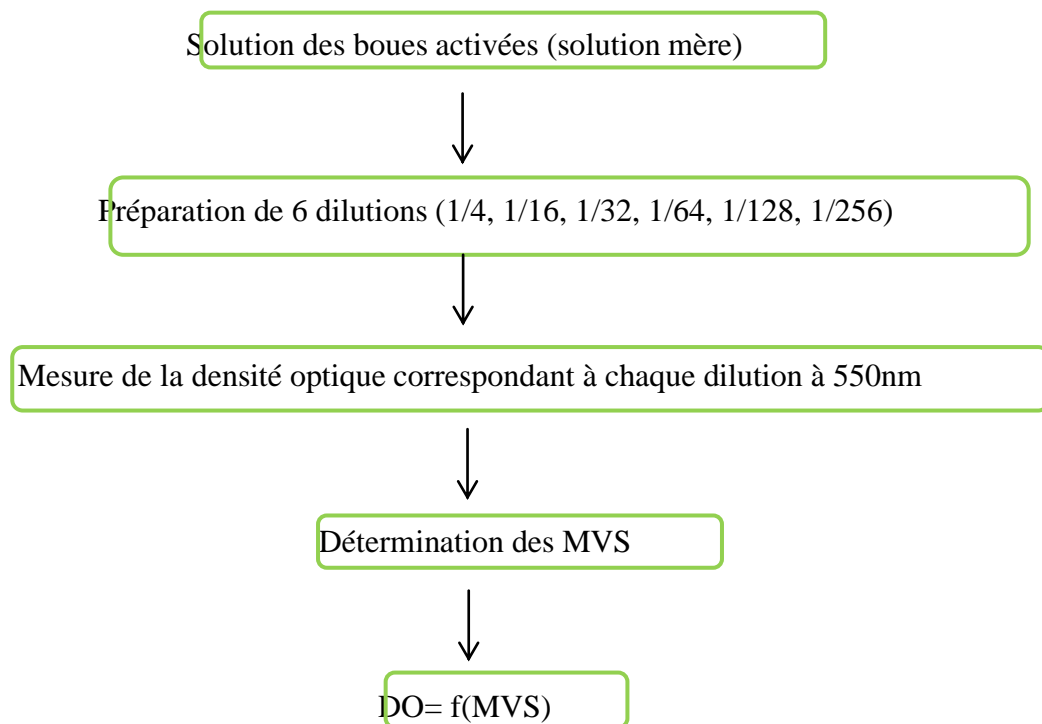
A l'issue de la mesure de MES (filtration suivie d'un séchage à 105°C pendant 2h), placer le filtre dans un four à moufle à 550°C jusqu'à ce que la masse du filtre ne varie plus.

La valeur des MVS est alors obtenue en faisant le calcul suivant (Equation 6) :

$$MVS \text{ (mg/l)} = (MES - \text{masse}_{\text{finale après incinération}} - \text{masse}_{\text{filtre}}) / \text{volume d'échantillon} \quad (6)$$

L'erreur relative estimée : $\pm 10\%$.

Pour les besoins de l'établissement d'une courbe étalon $DO = f(MVS)$, nous avons procédé comme suit :



Pour établir la courbe d'étalonnage propre à la biomasse utilisée, il suffit de porter les valeurs de DO correspondant à chaque dilution en fonction des valeurs de MVS correspondant à ces mêmes dilutions (Annexe1).

1.5.2. Dosage du malathion

La méthode de dosage choisie est celle développée par **Naidu, et al. (1990)**. Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique basée sur l'hydrolyse alcaline du malathion dissout dans du tétrachlorure de carbone en DMDTP et fumarate. Le DMDTP en se combinant à l'heptamolybdate d'ammonium donne un complexe stable de couleur bleutée dosé par spectrophotométrie à 825nm. La figure 8 illustre de manière exhaustive les différentes étapes de la méthode.

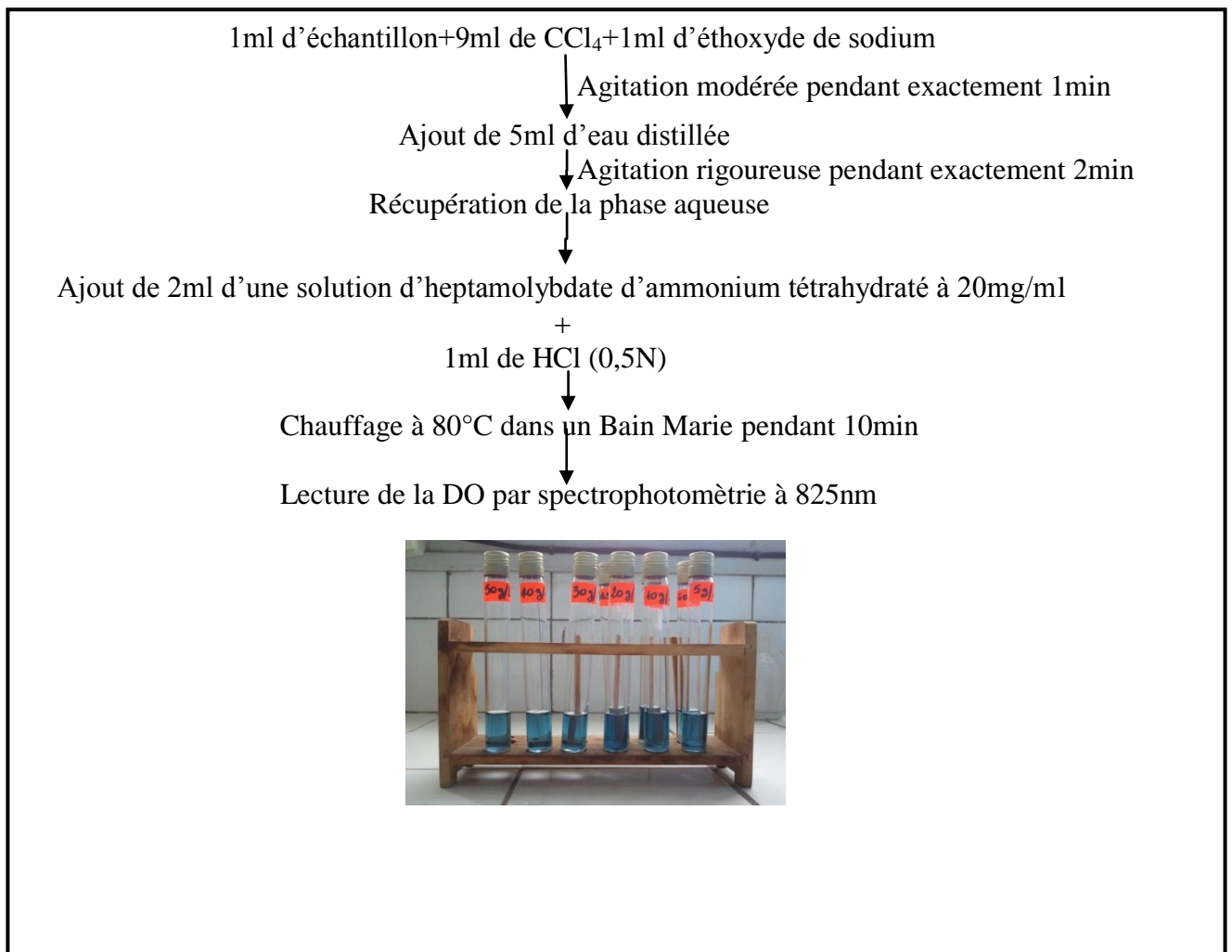


Figure 8 : Les différentes étapes de la méthode de dosage du malathion.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée exprimant l'absorbance en fonction de différentes concentrations du pesticide (Annexe 2).

1.5.3. Calcul de la densité du malathion

La densité du malathion a été calculée en utilisant un pycnomètre d'un volume égal à 10ml, après avoir effectué les mesures suivantes :

- masse du pycnomètre rempli de malathion jusqu'au trait de jauge (m_L);
- masse du pycnomètre rempli d'eau jusqu'au trait de jauge (m_e);
- masse du pycnomètre vide et sec (m_v).

La masse de malathion contenu dans le pycnomètre se déduit par différence (Equation 7) :

$$M_L = m_L - m_v \quad (7)$$

De même, nous pouvons exprimer la masse d'eau contenue dans le pycnomètre (Equation 8) :

$$M_e = m_e - m_v \quad (8)$$

D'où :

$$Densité = M_L / M_e \quad (9)$$

Le but de la détermination de la densité relative du malathion étant de permettre le calcul des volumes à prélever à partir de la solution mère de malathion correspondant aux différentes concentrations massique à tester.

1.5.4. Analyse physico-chimique du moût de dattes

1.5.4.1. Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont constitués par l'ensemble des sucres à fonction cétonique ou aldéhydique. Le dosage des sucres réducteurs du concentré de moût de dattes préparé a été effectué par la méthode à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) (Miller, 1959) dont le principe est le suivant :

En milieu alcalin et à chaud, le 3,5-DNS jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (Figure 9).

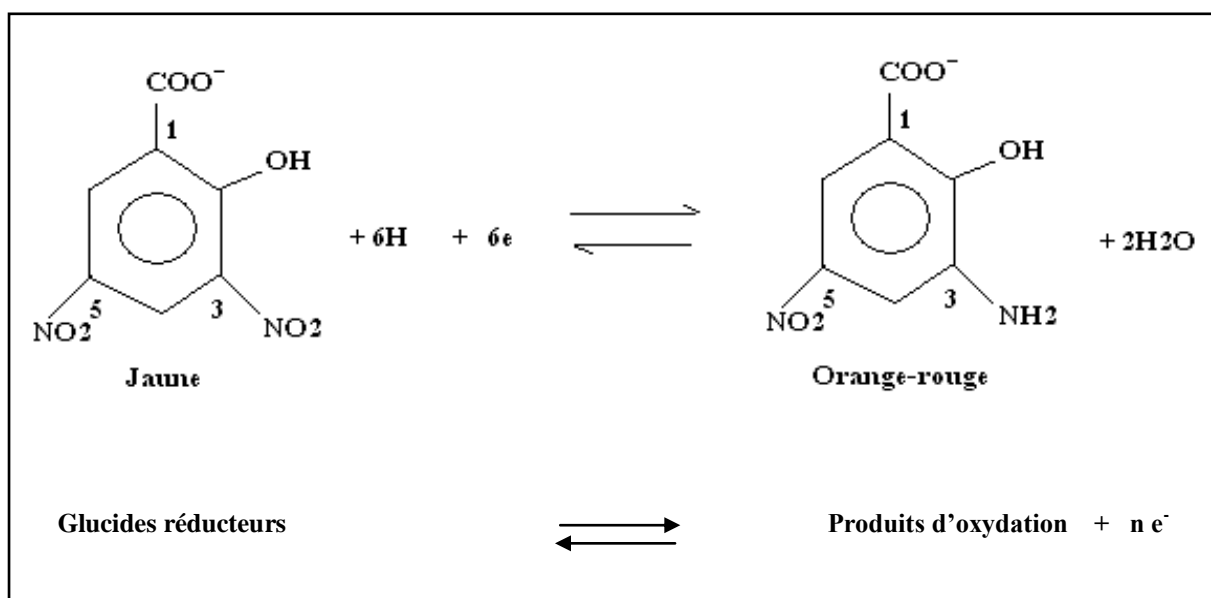


Figure 9 : Réaction de réduction du D.N.S.

La chimie de la réaction est complexe et la réaction d'oxydoréduction avec les glucides n'est pas stœchiométrique, les courbes d'étalonnage ne passent pas toujours par l'origine.

Le réactif au DNS est un mélange de deux solutions :

Solution 1 : 300g de tartrate de potassium dissous dans 500ml d'eau distillée.

Solution 2 : 10g de DNS dissous dans 200ml de soude à 2N.

Mélanger extemporanément les solutions 1 et 2 et compléter à 1litre avec de l'eau distillée.

Gamme d'étalonnage :

Dans une série de six tubes à essai :

- Introduire 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1ml de solution étalon à 0,45g/l de glucose.
- Compléter à 1ml avec de l'eau distillée.
- Ajouter 2ml de réactif au 3,5-dinitrosalicylate.

Tous les tubes, bouchés, sont portés au bain-marie bouillant en même temps pendant exactement cinq minutes, puis sont refroidis dans un bain d'eau glacée. On complète chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée. On homogénéise et on laisse reposer 15 minutes à température ambiante.

Les lectures des densités optiques sont réalisées à 540nm contre le blanc réactif.

1.5.4.2. Détermination de la matière sèche

La matière sèche, exprimée en pourcentage, a été déterminée par dessiccation d'une prise d'essai dans une étuve à 105°C pendant 24 heures jusqu'à obtention d'un poids constant.

1.5.4.3. Détermination du taux de cendre

La quantité de cendre totale, exprimée en pourcentage, a été déterminée par incinération. Un étuvage à 105°C pendant 24 heures des échantillons est suivi par une calcination au four à moufle (1 heure à 600°C).

1.5.4.4. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité a été obtenu par la relation suivante :

Taux d'humidité=(Poids initial de l'échantillon–Poids de la matière sèche)/Poids initial de l'échantillon

1.5.4.5. Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre.

1.5.5. Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en duplicata. L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée par le biais du test de Student. Les valeurs de la probabilité p inférieures à 0,05 ont été considérées comme étant statistiquement significatives.

1.5.6. Etude microbiologique

L'analyse microbiologique des boues activées a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie affilié à la Société des Eaux et de l'Assainissement d'Alger (SEAAL).

Cette étude avait pour objectif l'identification, après traitement avec le malathion, des grands groupes bactériens présents dans les boues activées utilisées qui seraient impliqués dans le processus de dégradation du pesticide.

L'analyse a porté sur la recherche et le dénombrement des groupes bactériens suivants :

les coliformes ;	les enterocoques ;	les salmonelles ;
les pseudomonas ;	les staphylocoques ;	les sulfitoréducteurs.

La composition des milieux de cultures utilisées dans le cadre de cette analyse est donnée en annexe 3.

1.5.7.1. Recherche et dénombrement des coliformes

Nous avons entrepris l'identification et le dénombrement des coliformes ainsi que l'espèce *Escherichia coli* par la méthode de Colilert[®]- 18 (les laboratoires IDEXX) qui a été certifiée par AFNOR sous la référence IDX 33/01-11/09 et qui est basé sur la combinaison de substrat chromogénique et fluorogénique qui permet la détection de la quantité totale de coliformes et la présence de la bactérie *E. coli*.

- Les coliformes utilisent la bêtagalactosidase pour métaboliser l'ONPG qui vire alors de l'incolore au jaune.
- La bactérie *E. coli* utilise la bêtaglucuronidase pour métaboliser le MUG et produire une fluorescence qui traduit la présence de cette bactérie dans notre échantillon analysé. Les résultats sont lus sous lumière ultraviolette. Le mode opératoire est illustré dans la figure 10.

Etape1 : Ajouter le réactif à l'échantillon et mélanger soigneusement.



Etape2 : Verser dans Quanti-try (dont les puits sont numérotés de 1 à 50).



Etape3 : Sceller avec le conditionneur Quanti-try et placer dans une étuve à 35°C pendant 18 heures.



Etape4 : Lire les résultats.
Puits jaunes = coliformes totaux.
Puits jaunes/fluorescents = *E. coli*.



Figure 10 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des coliformes.

1.5.7.2. Recherche et dénombrement des entérocoques

Aussi de manière quantitative, nous avons procédé au dénombrement des entérocoques intestinaux par la méthode EnterolertTM-E conforme à la norme **ISO 7899-1 (1998)**, qui est basée sur l'utilisation de substrat fluorogénique qui permet la détection de la quantité totale d'entérocoque.

- Les entérocoques utilisent leur enzyme la bêtaglucosidase pour métaboliser le MUG et produire une fluorescence, les résultats sont là aussi lus sous lumière ultraviolette. Les étapes du mode opératoire sont illustrées dans la figure 11.

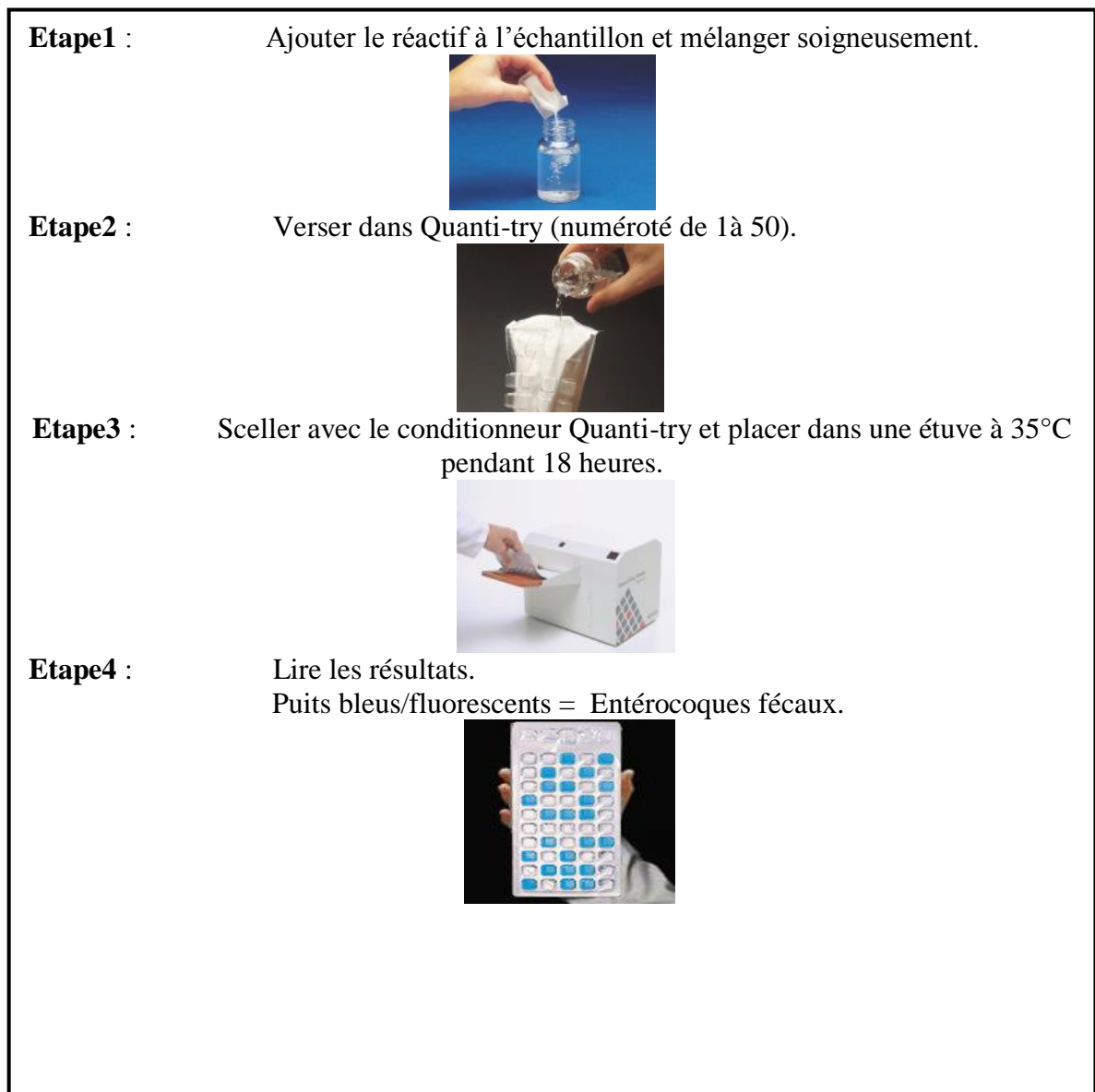


Figure 11 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des entérocoques.

1.5.7.3. Recherche et dénombrement des salmonelles

Le mode opératoire choisi est celui du **Standing Committee of Analysts (2006)**. Il consiste en la recherche et le dénombrement des salmonelles par la méthode de filtration selon les étapes suivantes :

Etape1 : le préenrichissement

Consiste à régénérer notre échantillon en le déposant dans l'eau peptonée tamponnée (prélever 1ml de l'échantillon à partir de la dilution 10^{-2} et le mettre dans 9ml d'eau peptonée tamponnée), et l'incuber à 37°C pendant 18h.

Etape2 : l'enrichissement

Il s'effectue sur deux milieux sélectifs différents :

- milieu de Rappaport Vassiliadis ;
- milieu sélénite cystine.

Cette étape d'enrichissement consiste à inoculer 1ml en double à partir du tube de préenrichissement dans les deux milieux cités préalablement.

- le premier tube de Rappaport est incubé à 37°C, 24h ;
- le deuxième tube de Rappaport est incubé à 42°C, 24h ;
- le premier tube de sélénite-cystine est incubé à 37°C, 24h ;
- le deuxième tube de sélénite-cystine est incubé à 42°C, 24h.

Etape3 : Isolement

Chaque tube a fait l'objet d'un isolement sur un milieu gélosé (gélose Hektoen) après filtration sur membrane. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

Etape4 : la lecture

Seules les colonies de salmonelle se présentant en gris-noir seront prises en considération.

1.5.7.4. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*

Cette analyse consiste à la détection et le dénombrement de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane conforme à la norme **NF EN 12780 (2002)**. Le mode opératoire est illustré dans la figure 12.

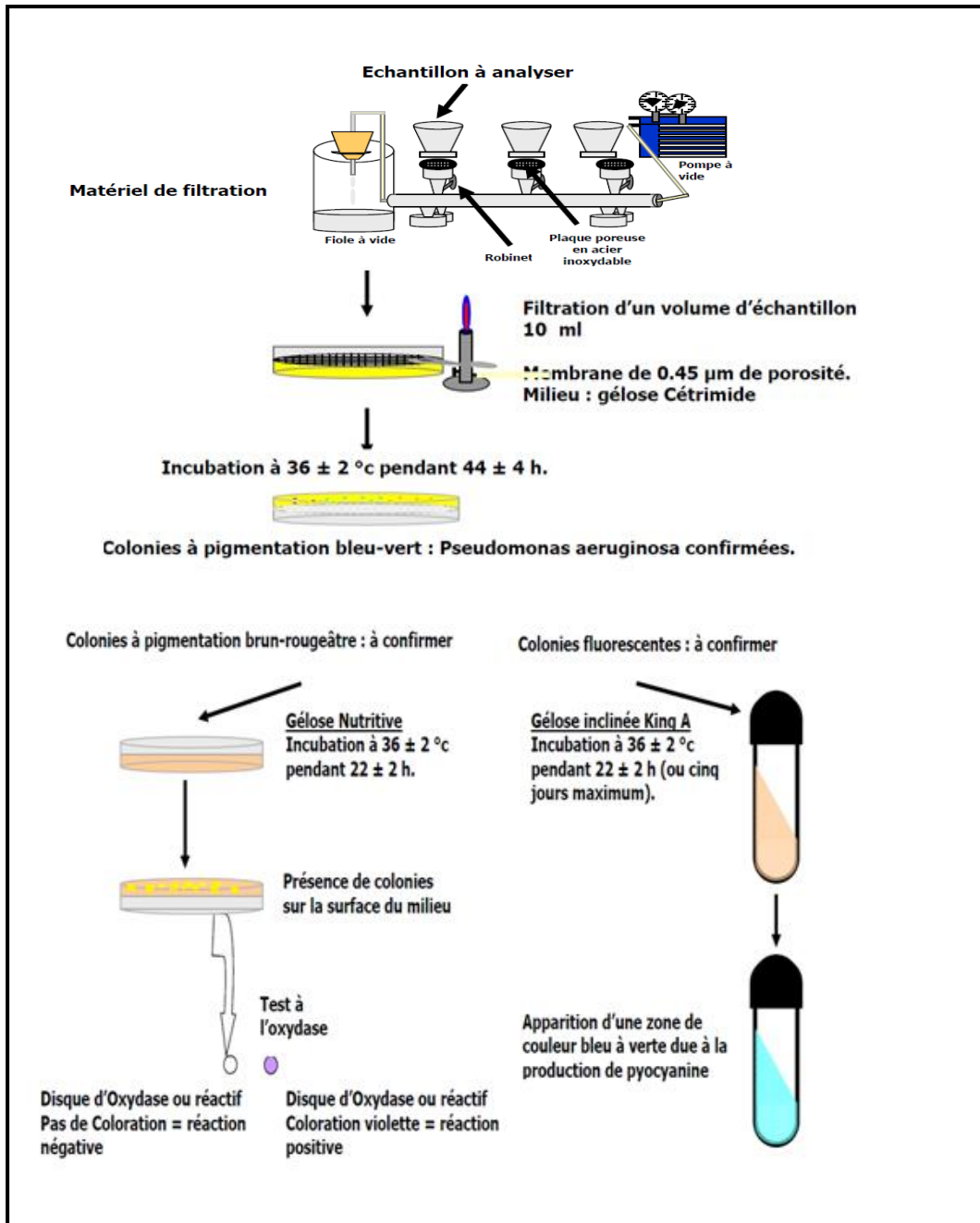


Figure 12 : Mode opératoire de recherche et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5.7.5. Recherche et dénombrement des staphylocoques

La méthode utilisée est une méthode interne de l'organisme SEAAL. Elle consiste en la recherche et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par la méthode de filtration sur membrane. Le détail du mode opératoire est indiqué dans la figure 13.

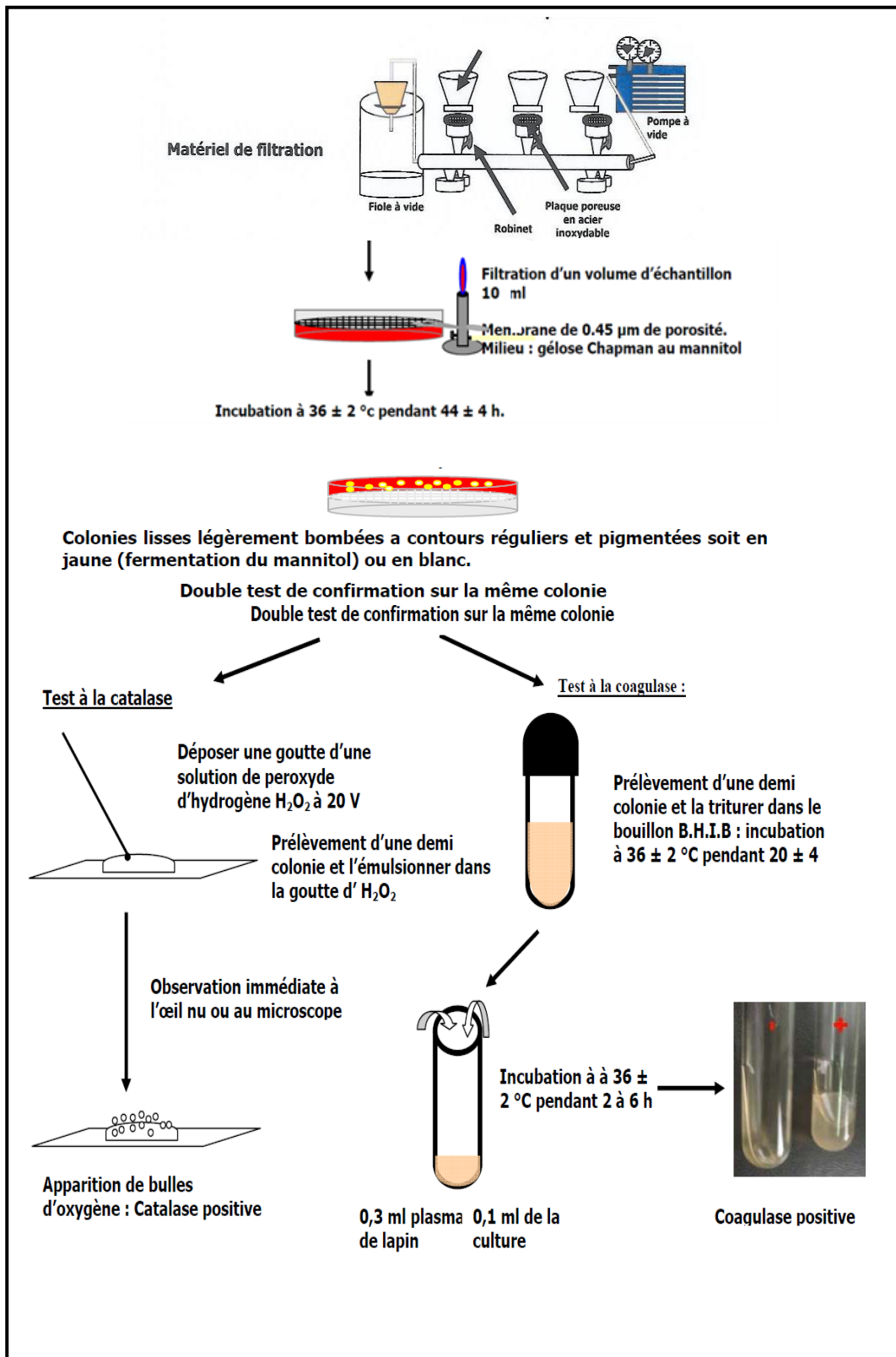


Figure13 : Mode opératoire d'identification et de dénombrement des staphylocoques.

1.5.7.6. Recherche et dénombrement des sulfitoréducteurs

L'analyse est basée sur la recherche et le dénombrement des spores de clostridies anaérobies sulfito-réductrices par la méthode de filtration sur membrane, conforme à la norme **ISO 6461-2 (1986)**. Voir le mode opératoire décrit dans la figure 14.

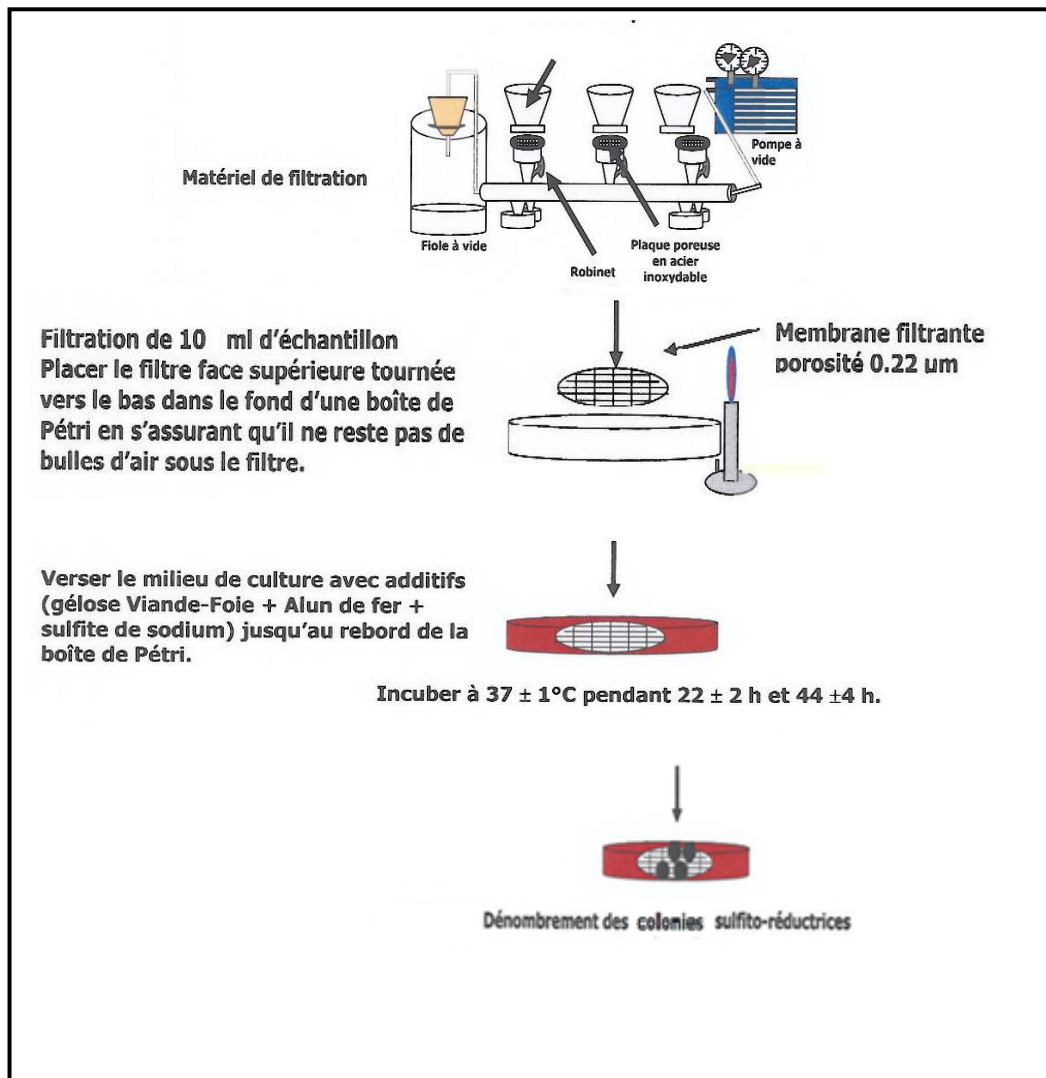


Figure 14: Mode opératoire d'identification et de dénombrement des clostridies sulfito-réductrices.

1.5.8. Analyse des produits de dégradation du malathion par GC-MS

On s'est proposé d'identifier les éventuels métabolites du malathion en fin de culture par GC-MS. Les conditions opératoires sont les suivantes:

Appareil GC : type HP (*Agilent technologies*) 6800 plus.

- Injecteur : température : 250°C
 - Mode d'injection : SplitLESS
 - Volume injecté : 1µl
- Colonne : type : hp-5ms
 - Dimensions : longueur 30m ; diamètre interne 0,25 mm ; épaisseur du film 0,32µm
 - Phase stationnaire : diphényle (5%) - diméthylarylésiloxane (95%)
 - Température du four : 90°C, palier 10°C par minute, T° finale= 250°C, pendant 15min
 - Gaz vecteur : Hélium pur à 99,9998%
 - Débit : 1,0 ml/min

Appareil MS : type HP (*Agilent technologies*) MSD 5973

- Détecteur de masse :
- Mode d'analyse : sim (Selected Ion Monitoring)
- Température de l'interface : 280°C
- Type d'ionisation : électronique
- Intensité du filament : 70 eV
- Type de l'analyseur de masse : Quadripole
- Température du quadripole : 150°C
- Température de la source : 230°C

L'analyse est précédée d'une étape qui consiste en l'extraction du malathion et des sous-produits de sa dégradation. le protocole d'extraction choisi est celui proposé par **Kaur et al. (1997)** dont les étapes sont explicitées dans la figure 15.

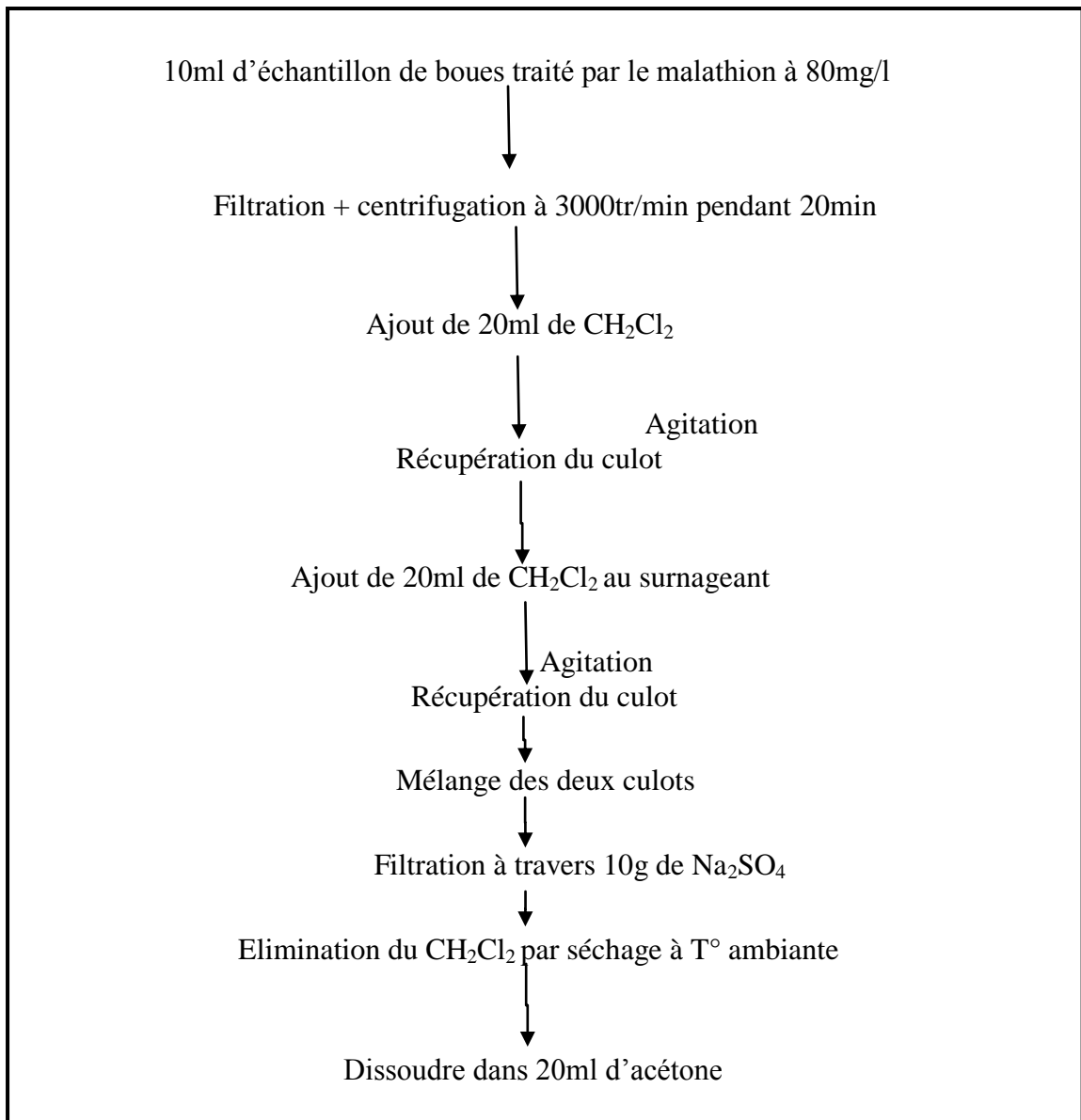


Figure 15: Les étapes d'extraction des métabolites du malathion pour l'analyse GC-MS (Kaur et al., 1997).

2. Résultats et discussion

2.1. *Effet de la concentration initiale du malathion sur sa propre biodégradation*

Huit essais en batch avec différentes concentrations initiales de malathion, comprises entre 5 et 140mg/l, ont été réalisés avec une concentration initiale de biomasse d'environ 2000mg/l. Les variations de ces différentes concentrations en fonction du temps sont montrées dans la figure 16. Les résultats obtenus montrent, en premier lieu, que la culture mixte utilisée s'est avérée apte à dégrader le pesticide en milieu liquide. On remarque, par ailleurs, que la dégradation du pesticide ne débute pas directement mais passe d'abord par une phase de transition. Ceci peut être expliqué par le fait que les microorganismes formant les boues activées doivent, dans un premier temps, s'adapter à leur environnement immédiat pendant une certaine période, avant d'entamer la phase exponentielle de croissance qui est concomitante à la dégradation du substrat organique (le malathion). Cette période, appelée phase de latence, a une durée variable (de 18 à 55 heures dans notre étude), et c'est au cours de cette phase, que les enzymes impliquées dans le métabolisme du malathion sont réactivées ou synthétisées. Durant cette même phase, le nombre de cellules vivantes demeure approximativement le même ou augmente légèrement (**Prats et al., 2008**). On notera, par ailleurs, que la durée de cette phase est importante (55 heures) pour une concentration initiale du pesticide égale à 140mg/l.

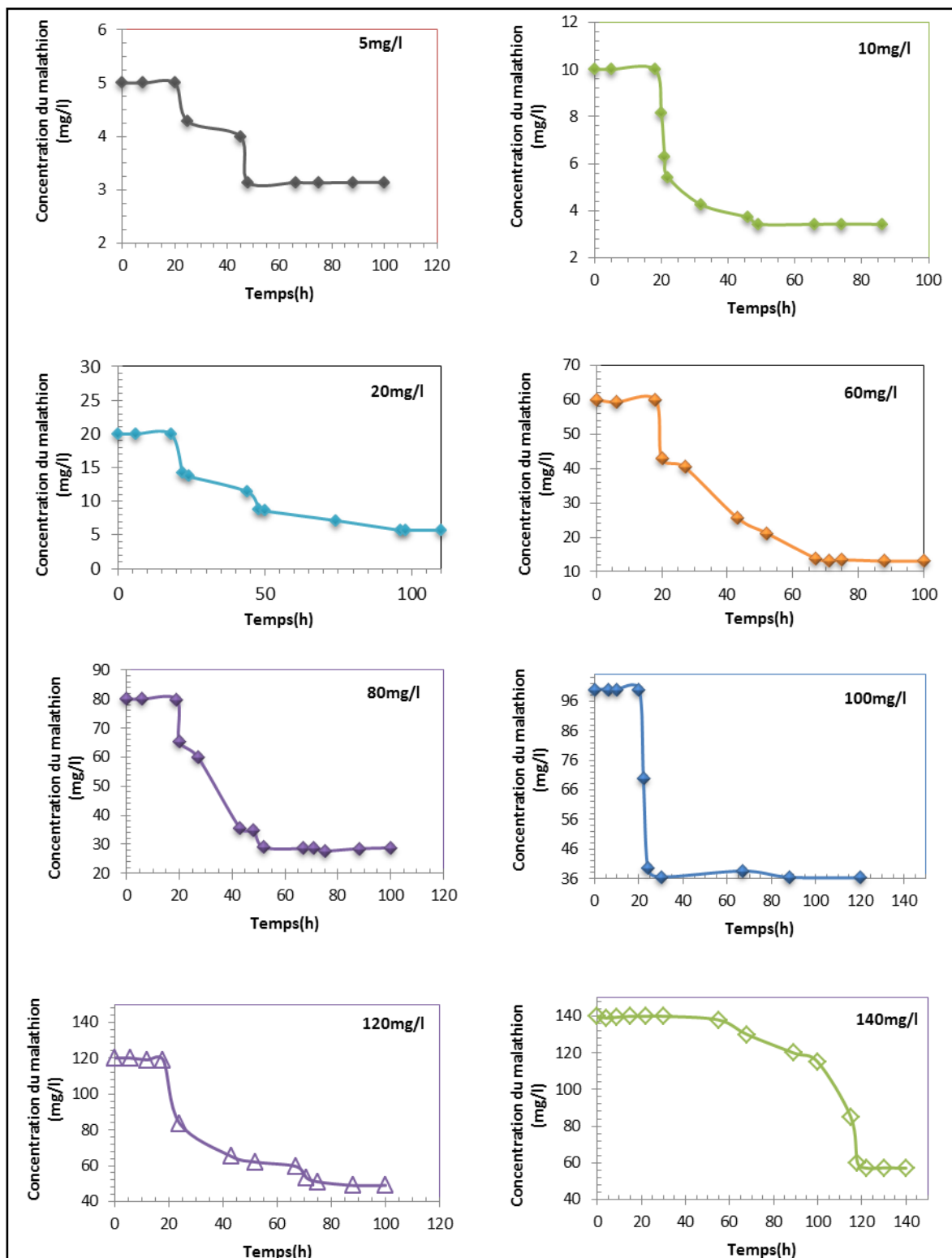


Figure 16 : Effet de la concentration initiale du malathion (5mg/l-140mg/l) sur sa propre biodégradation (Concentration initiale de biomasse=2000mg/l, pH=6, température ambiante ($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$)).

Le tableau VII indique les rendements maximaux de dégradation du pesticide pour les différentes concentrations testées ainsi que les temps nécessaires pour y atteindre ces maxima.

Les résultats obtenus montrent que les essais entrepris n'ont pas permis d'obtenir une dégradation complète du pesticide. Les pourcentages maximaux de dégradation ainsi que les temps nécessaires pour les atteindre semblent par ailleurs dépendre de la charge initiale du pesticide, en particulier pour la teneur initiale en malathion de 140mg/l, le temps nécessaire pour y atteindre le taux maximal de dégradation du malathion est substantiellement long (122h). Ceci serait en rapport avec un effet inhibiteur exercé par le pesticide sur la biomasse à une telle concentration.

Des observations similaires ont été rapportées par **Saravanan et al. (2009)** concernant la croissance d'une culture mixte en présence du m-crésol. Nos résultats indiquent, par ailleurs, que le taux de dégradation le plus élevé (77%) est obtenu pour une concentration initiale de malathion de 60mg/l et ce, après 67 heures de culture. Ceci nous permet de déduire que ladite concentration peut être considérée comme étant la concentration optimale pour la croissance de la culture mixte utilisée dans notre étude.

Tableau VII : Les taux maximums de dégradation du malathion à différentes concentrations initiales (5-140mg/l) ainsi que le temps requis pour atteindre ces taux.

Concentration initiale du malathion (mg/l)	Taux de dégradation maximal du malathion (%)	Temps requis pour atteindre le taux de dégradation maximal du malathion (heures)
5	37	48
10	66	49
20	71	96
60	77	67
80	64	52
100	63	30
120	59	88
140	59	122

2.2. Modélisation de la cinétique de biodégradation du malathion

Dans cette partie de l'étude, nous avons entrepris de déterminer les paramètres cinétiques $r_{s\ max}$, K_s et K_i et ce, à partir du modèle de Haldane décrit précédemment (Equation 3). La figure 17 représente la variation du taux de dégradation spécifique du malathion (r_s) exprimé en 1/h en fonction de la concentration de ce dernier exprimée en mg/l, inhérente aux résultats expérimentaux obtenus à température ambiante et à pH égal à 6, d'une part, et à ceux prédits en appliquant l'équation 3.

Nous pouvons relever à partir des résultats expérimentaux obtenus que pour les faibles concentrations de malathion comprises entre 5 et 100mg/l, la valeur du r_s augmente avec l'augmentation de la concentration du pesticide et atteint une valeur maximale de 0,114 1/h correspondant à 100mg/l du pesticide. Cependant, quand la concentration du pesticide dépasse cette valeur seuil, on assiste à une baisse drastique de la valeur du r_s qui atteint les valeurs de $0,046 \cdot 10^{-2}$ et $0,034 \cdot 10^{-2}$ 1/h correspondant aux concentrations initiales du malathion de 120 mg/l et 140mg/l, respectivement. Ceci serait le résultat d'un effet inhibiteur exercé par le malathion sur sa propre biodégradation. Par ailleurs, les valeurs des paramètres cinétiques obtenus sont équivalents à $0,24 \cdot 10^{-2}$ 1/h, 192mg/l et 192mg/l, et correspondent respectivement à $r_{s \max}$, K_s et K_i avec un coefficient de détermination R^2 de 0,76.

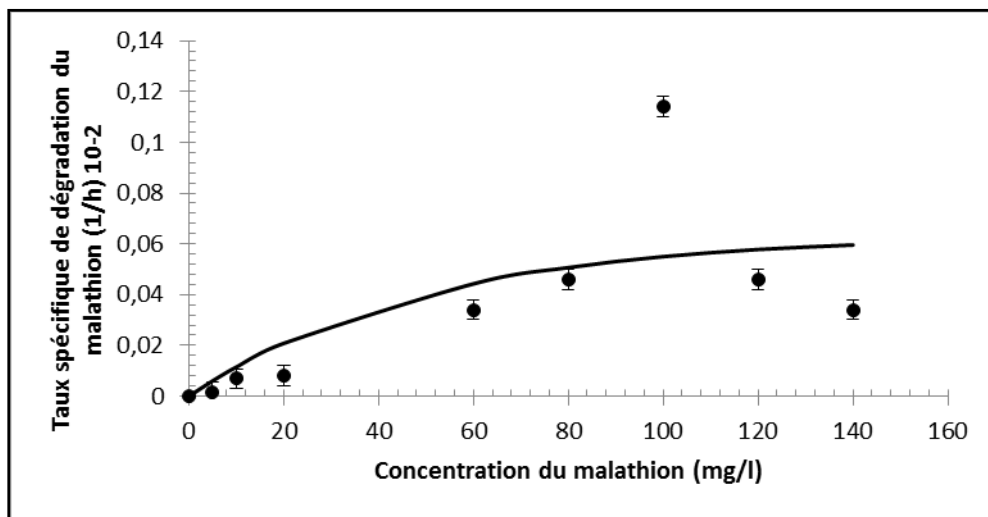


Figure 17 : Taux de dégradation spécifiques du malathion pour différentes concentrations du pesticide (5mg/l-140mg/l) (Concentration initiale de biomasse=2000mg/l, pH=6, température ambiante (25°C±2°C)).

(●) Valeurs expérimentales. (—) Valeurs prédites par le modèle de Haldane.

Les résultats indiquent que les boues activées peuvent utiliser le malathion comme seule source de carbone et d'énergie. La concentration critique du pesticide (100mg/l) indique, par ailleurs, que la population bactérienne formant les boues activées présente une tolérance élevée vis-à-vis du malathion. Les valeurs du taux de dégradation spécifique du malathion propres aux concentrations relativement élevées du pesticide (120 et 140mg/l) semblent faibles. La raison en serait que l'addition du malathion à des concentrations supérieures à 100mg/l semble inhiber les enzymes impliquées dans les différentes étapes de sa dégradation. Ce résultat corrobore celui obtenu par **Singh et Seth (1989)** dont l'étude a porté

sur la biodégradation du malathion par la souche *Pseudomonas sp. M-3* isolée à partir d'effluents industriels. Ces auteurs ont montré une baisse du taux de dégradation du pesticide lorsque ce dernier est testé à des concentrations élevées.

Dans cette partie de l'étude, on a considéré les critères statistiques de significativité suivants à savoir la valeur de p et celle du coefficient de détermination R^2 . Si l'on considère les valeurs de p inférieures ou égales à 0,05, il est possible d'affirmer suivant le modèle mathématique choisi que les valeurs des variables indépendantes (les concentrations du malathion dans notre cas) peuvent être utilisées pour prédire celles des variables dépendantes (le taux de dégradation spécifique du malathion dans le cas présent).

Les valeurs du R^2 proches de l'unité indiquent que le modèle considéré est susceptible de bien décrire la relation entre les variables indépendantes et dépendantes. Les valeurs du p et R^2 obtenues dans notre étude (0,025 et 0,76, respectivement) permettent de conclure que le modèle cinétique de Haldane expliquerait l'élimination du malathion par les boues activées utilisées.

Il est à noter que la valeur du R^2 obtenue n'est pas très élevée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le modèle appliqué dans la présente étude est plus approprié pour les monocultures, et non pour les cultures mixtes telles que les boues activées et les substrats complexes tel que le malathion. L'autre raison serait due à la gamme de concentrations du pesticide testées.

2.3. Effet du glucose et de la mélasse sur la cinétique de dégradation du malathion et sur celle de la croissance cellulaire

Nous avons entrepris d'étudier l'effet de la présence des substrats organiques additionnels (glucose et mélasse) sur la biodégradation du malathion. L'étude a été menée avec une concentration initiale du pesticide de 60mg/l, une concentration initiale de biomasse exprimée en MVS de 2000mg/l et une concentration initiale de glucose ou de mélasse égale à 5000mg/l. La variation de la concentration du malathion en fonction du temps en présence de glucose ou de mélasse et en leur absence est montrée dans la figure 18. Il en ressort que le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire de dégradation du malathion ne varie pas énormément. Il est, en effet, de 71 heures en présence de malathion seul et de 75 heures en présence de glucose ou de mélasse. Le taux de dégradation du pesticide utilisé comme seule source de carbone et d'énergie est de 78%. Ce taux atteint, respectivement les valeurs de 84% et 92% en présence de glucose et de mélasse.

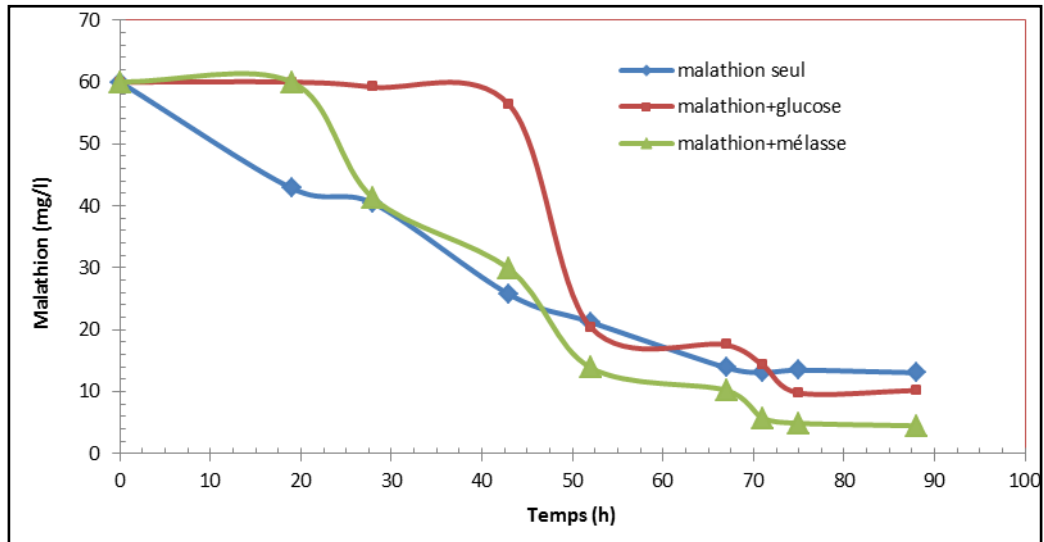


Figure 18 : Variation de la concentration du malathion avec le temps en l'absence ou en la présence des substrats organiques additionnels (glucose et mélasse) testés séparément (concentration en malathion = 60mg/l, concentration en glucose et en mélasse = 5000mg/l, concentration initiale de biomasse=2000mg/l, pH=6, température=25°C±2°C)).

La variation de la concentration de la biomasse au cours du temps, et ce, sous les mêmes conditions opératoires (concentration initiale du malathion de 60mg/l, concentration initiale de biomasse de 2000mg/l et concentration initiale des sources de carbone additionnelles (glucose et mélasse) de 5000mg/l) est représentée dans la figure 19. Ces résultats montrent clairement que l'adjonction de glucose ou de mélasse entraîne une amélioration du taux spécifique de croissance (μ_x). En effet la valeur de ce dernier est de $2 \cdot 10^{-4}$ 1/h en présence du malathion seul et atteint les valeurs de $1,1 \cdot 10^{-3}$ 1/h et $7,5 \cdot 10^{-3}$ 1/h en présence de glucose et de mélasse, respectivement.

Les effets d'une source de carbone additionnelle dans le processus du co-métabolisme peuvent être résumés comme suit :

- le premier c'est de stimuler la croissance cellulaire et d'améliorer la biodégradation du substrat récalcitrant ;
- le second effet est que le substrat additionnel agit comme co-substrat dans le métabolisme du composé récalcitrant par induction de certaines réactions enzymatiques (Xie et al., 2009).

Les résultats obtenus ont montré que les boues activées utilisées sont aptes à métaboliser le malathion et que les sources de carbone additionnelles testées sont susceptibles de stimuler la croissance cellulaire. Par ailleurs, l'adjonction de la mélasse à 5000mg/l a induit une amélioration significative du taux de dégradation du malathion ($p < 0,05$) par

rapport au témoin (en absence de glucose et de mélasse). Cependant, l'augmentation de ce taux en présence de glucose s'est révélée être non significative ($p > 0,05$).

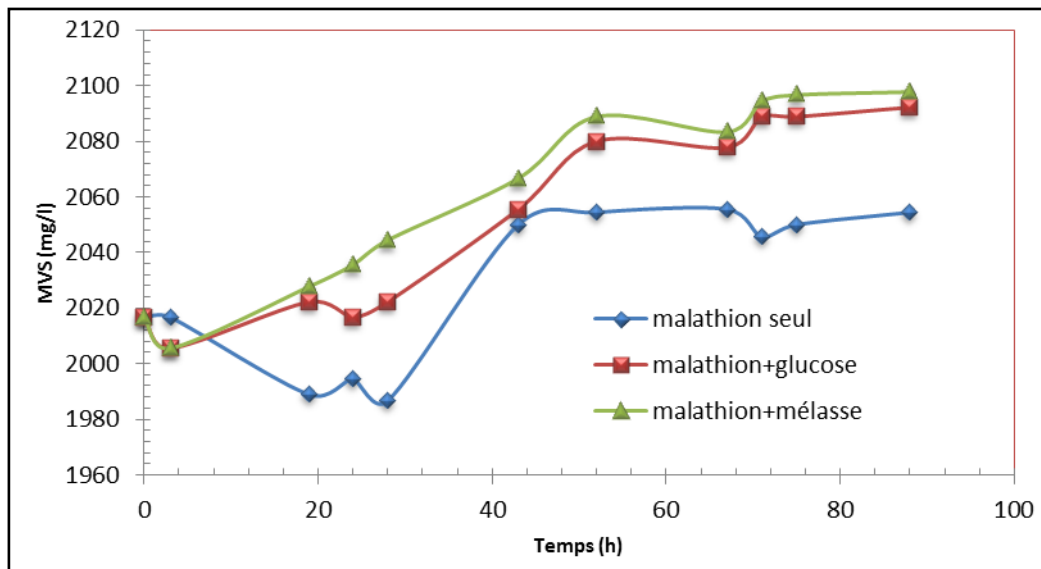


Figure 19 : Variation de la concentration de la biomasse (MVS) avec et sans glucose et mélasse (5000mg/l). Concentrations initiales du malathion (60mg/l), concentration initiale de biomasse=2000mg/l, pH=6, température ($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$).

L'adjonction de mélasse fournit donc à la biomasse une source de carbone de choix favorisant sa croissance et conséquemment la dégradation du malathion. Le taux de biodégradation du malathion obtenu en présence de mélasse est significativement plus important que celui obtenu en présence de glucose ($p < 0,05$). Ceci serait dû à la composition même de la mélasse.

En effet, étant un sous-produit complexe, la mélasse est riche en sucres (glucose, fructose, raffinose, etc.) et en vitamines (biotine et thiamine, notamment), autant de composés susceptibles de favoriser la croissance cellulaire et, par là même, la dégradation du malathion. Des résultats similaires ont été rapportés par **Barik et al. (1984)**. Ces derniers ont montré que des souches isolées à partir de boues activées étaient capables d'utiliser le malathion comme seule source de carbone et d'énergie. De plus, ces mêmes auteurs ont également montré que l'addition du glucose à la culture mixte de boues activées avait pour effet d'améliorer le taux de dégradation du pesticide. Par ailleurs, **Singh et Seth (1989)** ont montré que la dégradation du malathion par la souche *Pseudomonas sp. M-3* n'était possible qu'en présence de co-substrat, l'éthanol en l'occurrence. Ceci nous amène à dire que dans le cas des cultures mixtes ; les boues activées dans notre cas, la manière dont la culture est réalisée (les

conditions de culture) détermine le type d'espèces intervenant dans la dégradation du substrat récalcitrant.

2.4. Caractérisation physico-chimique de la solution mère de moût de dattes

Les résultats en rapport avec la caractérisation physico-chimique du moût de dattes préparé sont rapportés dans le tableau VIII. De ces résultats il est à indiquer que le moût préparé contient une faible proportion en sucres réducteurs qui n'est seulement que de 6% et ce, en comparaison avec la valeur obtenue par **Zohri et Etnan (2000)**. Ces auteurs ont, en effet rapporté une teneur relativement élevée en sucres réducteurs (17%) de rebuts de dattes récoltés dans la région d'Al-Ahsa (Arabie Saoudite). Cette différence dans les teneurs peut être attribuée à la différence de variétés d'une part, et d'autre part au rapport eau/pulpes de rebuts de datte lors de la préparation qui affecte grandement le rendement d'extraction des éléments solubles (**El-Sharnouby et al., 2009**). Par ailleurs, la valeur du pH obtenue qui est de 4,83 est similaire à la valeur mesurée (4,9) pour le concentré de moût de dattes de la variété « Reziz » (**El-Sharnouby et al., 2009**) mais inférieure à la valeur mesurée pour le moût de dattes de la variété « Deglet Nour » (**Masmoudi et al., 2008**).

Tableau VIII : *Quelques caractéristiques chimiques du concentrât de moût de dattes.*

Paramètre	Valeur
Matière sèche (%) ^a	25,31 ±0,125
Teneur en humidité (%) ^a	74,67 ±0,125
Taux de cendre (%) ^a	2,34 ±0,05
Sucres réducteurs (%) ^a	5,93 ± 2,72
pH	4,83 ± 0,015

^a Résultats exprimés en pourcentage du poids frais.

2.5. Effets du moût de dattes et du glucose sur le processus de dégradation du malathion ainsi que sur la croissance cellulaire

Les effets de deux sources de carbone additionnelles (glucose et moût de rebuts de dattes) sur la croissance cellulaire d'une part et sur la biodégradation du malathion d'autre part ont été étudiés. Pour ce faire, des essais en batch avec différentes concentrations desdites sources de carbone allant de 0,5g/l à 30g/l, ont été menés sous des conditions aérobies.

Les résultats obtenus, montrés dans la figure 20 révèlent que la croissance cellulaire sur le milieu témoin, contenant du malathion à 60 mg/l comme seule source de carbone et

d'énergie présente un taux de croissance spécifique de 0,048 1/h ($R^2= 0,88$). Par ailleurs, les cinétiques de croissance de la culture mixte en présence des substrats additionnels sont significativement différentes ($p < 0,05$) de celle du témoin. La figure 20a illustre les profils de croissance de la culture mixte avec différentes concentrations initiales de sucres réducteurs de moût de rebuts de dattes (0,5g/l – 30g/l) en présence de malathion (60mg/l).

Les résultats obtenus indiquent que durant la fermentation, les profils de la croissance cellulaire inhérents aux différents essais montrent une absence de phase de latence, la croissance cellulaire débute directement par une phase exponentielle de croissance. Les valeurs du taux spécifique de croissance est de 0,07 1/h ($R^2=0,86$) pour la concentration initiale de moût de dattes de 0,5g/l et de 0,084 ($R^2=0,94$) pour les concentrations initiales comprises entre 5g/l et 30g/l. La concentration cellulaire atteint la valeur de 1600mg/l au bout de 24 heures d'incubation pour ce même intervalle de concentrations alors qu'elle n'est que de 670mg/l pour l'essai correspondant au témoin (présence du malathion comme seule source de carbone) pour la même période d'incubation.

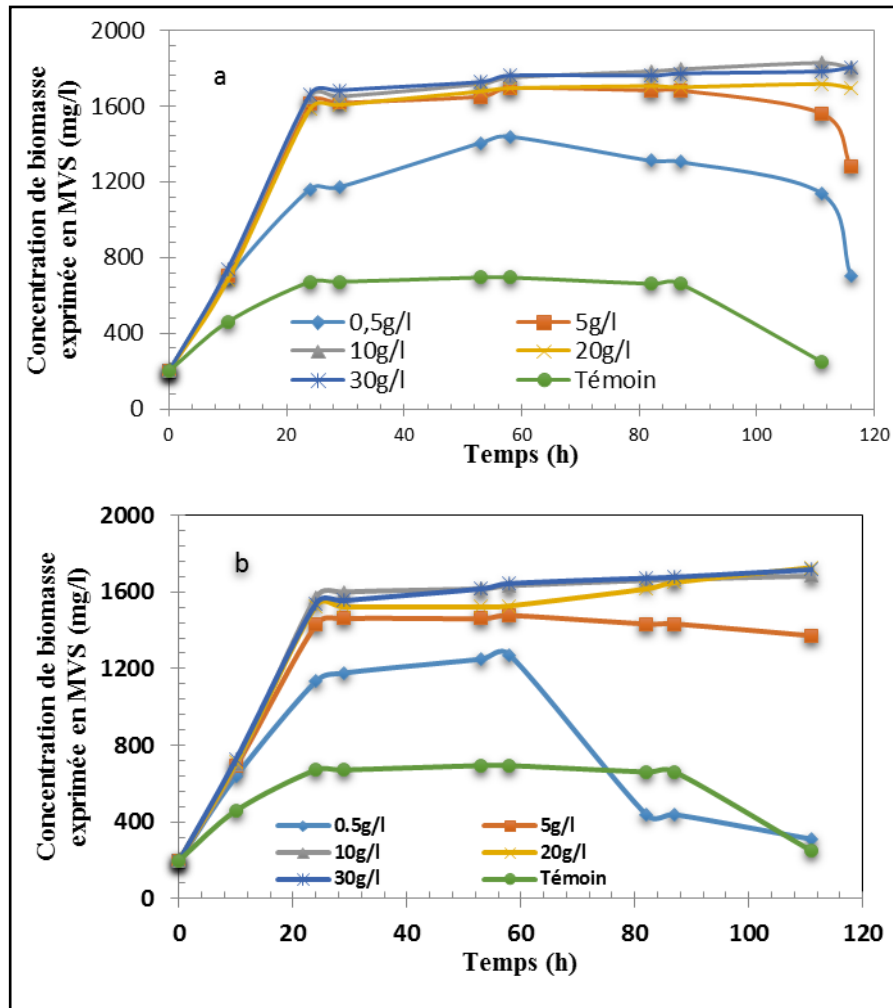


Figure 20: Effet de sources additionnelles de carbone sur la croissance cellulaire: (a) en présence de différentes concentrations de moût de dattes (0,5g/l-30g/l) (b) en présence de différentes concentrations de glucose (0,5g/l-30g/l) (Concentration initiale de biomasse=200mg/l, pH=6, température=28°C±1°C).

La figure 20b illustre les profils de la croissance cellulaire en présence de différentes concentrations de glucose (0,5g/l - 30g/l) et en présence du malathion à 60mg/l. La croissance de la culture ne présente, là encore, pas de phase de latence, elle commence directement par une phase exponentielle de croissance et ce pour tous les essais, y compris le témoin. La valeur calculée du taux spécifique de croissance est de 0,034 1/h ($R^2=0,7$) pour la concentration de glucose de 0,5g/l, et atteint 0,069 1/h ($R^2= 0,91$) pour les concentrations comprises entre 5g/l et 30g/l. Par ailleurs, la concentration cellulaire en fin de phase stationnaire de croissance est inférieure à celle déterminée en présence de moût de dattes ($p < 0,05$) mais elle est plus élevée comparée à celle relevée pour le témoin. D'autre part, à la concentration de glucose de 0,5g/l, la croissance tend à décroître après 60 heures d'incubation

entamant ainsi la phase de déclin. Ceci est vraisemblablement dû à l'épuisement du milieu de culture en éléments nutritifs et/ou à l'accumulation des sous-produits métaboliques toxiques.

La figure 21 montre les pourcentages de biodégradation du malathion à 60mg/l mesurés après 110 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de moût de dattes et de glucose. Les résultats révèlent que la biodégradation du malathion n'est pas significativement améliorée en présence de glucose comme substrat additionnel ($p > 0,05$). Cependant, l'adjonction du moût de rebuts de dattes comme source de carbone additionnelle pour la croissance cellulaire a induit une amélioration significative de la biodégradation du malathion indiquant l'influence de ce sous-produit sur le catabolisme du pesticide. En effet, à $p < 0,05$ le taux d'élimination du malathion est plus important en présence de moût de dattes comparé à celui obtenu pour le témoin. Après 110 heures d'incubation, le taux de biodégradation du malathion obtenu pour les concentrations de moût inférieures à 20g/l, est de 82%. Il atteint son maximum (89%) pour les essais traités avec 20g/l et 30g/l, soit supérieur de 19 % au taux mesuré pour le témoin.

Il est à noter, par ailleurs, que la concentration de l'un ou de l'autre des deux substrats additionnels utilisés n'a pas d'effet significatif sur le taux de biodégradation du pesticide ($p > 0,05$).

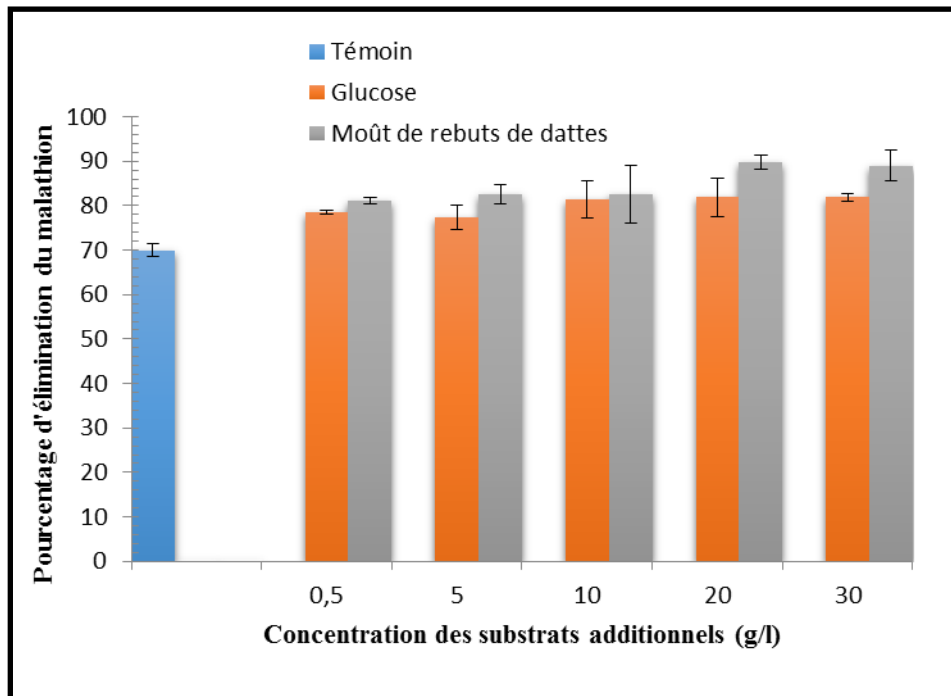


Figure 21 : Biodégradation du malathion (60mg/l) en présence et en absence de différentes concentrations initiales de glucose ou de moût de dattes (0,5g/l – 30g/l) (Concentration initiale de biomasse=200mg/l, pH=6, température=28°C±1°C).

L'utilisation de substrats organiques additionnels s'est révélée intéressante à plus d'un titre dans l'élimination des composés récalcitrants par les procédés biologiques conventionnels. Le principe de cette technique repose sur l'emploi de substrats organiques dits primaires ou substrats de croissance tels que des sucres simples, des acides aminés ou bien encore des acides organiques, et ce dans le but de stimuler la croissance cellulaire. Ceci aura pour effet l'amélioration de la dégradation du substrat dit secondaire (substrat récalcitrant).

Dans cette étude, la capacité de la culture mixte utilisée à croître en présence de malathion serait due au processus de sélection des microorganismes qui s'est déroulé durant la période d'adaptation. De plus, on note l'absence de la phase de latence dans l'ensemble des cinétiques de croissance menées. Cette observation vient confirmer l'efficacité de la procédure d'adaptation menée dans ce travail, procédure au cours de laquelle les enzymes impliquées dans le catabolisme du malathion sont réactivées ou exprimées. Il est en effet bien établi que la dégradation des polluants organiques par les cultures pures ou mixtes se voit améliorée par la phase d'adaptation (Saravanan et al., 2009 ; Abhilash et al., 2011). Les résultats obtenus montrent qu'en présence de malathion seul, la valeur du taux spécifique de croissance des microorganismes testés est faible. Ceci serait dû à la faible concentration de

pesticide testée (60mg/l) ou bien encore au fait que le malathion à l'instar des autres xénobiotiques est un substrat difficilement assimilable comparé aux substrats carbonés simples tel que le glucose. **Buitron et al. (1998)** rapportent la même observation pour la dégradation de composés phénoliques par des boues activées préalablement adaptées.

Par ailleurs, la présence de glucose ne semble pas favoriser la biodégradation du malathion. Ce résultat ne corrobore pas l'observation faite par **Xie et al. (2009)**. Ces auteurs ont montré que l'addition du glucose comme source de carbone additionnelle avait pour effet d'améliorer significativement l'élimination du malathion dans des conditions aérobies.

L'adjonction de moût de dattes semble, au contraire, améliorer significativement le taux de biodégradation du malathion. Ceci pourrait s'expliquer par la composition riche de ce sous-produit agricole. En effet, en plus de contenir des sucres simples (glucose et fructose), le moût de dattes est riche en composés non-glucidiques (acides aminés, lipides, vitamines, acides organiques, etc.) qui sont autant d'éléments susceptibles de favoriser la croissance cellulaire et la biodégradation du malathion. Il est à indiquer qu'il n'existe pas de données expérimentales en rapport avec l'utilisation du moût de dattes comme co-substrat dans l'élimination des polluants organiques. La plupart des études disponibles dans la littérature ne font état que de l'emploi de sources de carbone conventionnelles (glucose, fructose, peptone, extrait de levure, citrate, succinate, etc.) (**Sahinkaya et Dilek, 2005; Xie et al., 2009; Navacharoen et Vangnai, 2011**). Cependant, **Wen et al. (2011)** ont rapporté l'efficacité de l'emploi de sources de carbone complexes : fécula de maïs, son de blé, sciure de bois dans l'élimination du pyrène par une souche de *Pseudotrametes Gibosa*.

2.6. Dénombrement des principaux groupes microbiens présents dans les boues activées

Nous avons procédé à l'analyse microbiologique des boues activées, et ce, après traitement avec du malathion à 60mg/l utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats de la dite analyse sont rapportés dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats du dénombrement de la microflore dominante.

Coliformes (NPP/ml)	4010
Enterocoques (NPP/ml)	401000
Staphylocoques à coagulase négative (UFC/ml)	45000
Clostridies sulfito-réductrices (UFC/ml)	42000
Salmonelles (UFC/ml)	52000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/ml)	72000
<i>Penicillium sp.</i> (UFC/ml)	1

D'après ces résultats, il est, tout d'abord, intéressant de signaler que les entérocoques constituent un groupe majoritaire parmi les groupes recherchés, ils représentent à eux seuls 65% de la flore microbienne présente dans les boues activées testées. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* représente, elle, 12% de la masse. Cependant, il est à noter que les coliformes représentent moins de 0,7% de la flore microbienne.

Par ailleurs, les clostridies sulfito-reductrices représentent 7% de la flore totale. Etant anaérobies, ces bactéries ne sont vraisemblablement pas impliquées dans la biodégradation du malathion dans les conditions aérobies de la présente étude, car dans de telles conditions, ces bactéries adoptent une forme sporulée incapable de métaboliser le malathion. Les résultats inhérents au dénombrement des salmonelles et staphylocoques à coagulase négative indiquent que ces derniers représentent, respectivement, 8% et 7% de la flore totale viable. Notons enfin l'absence de champignons dans l'échantillon des boues activées analysées à l'exception de la mise en évidence d'une seule colonie de champignon qui s'est révélée être une colonie du genre *Penicillium*.

Les résultats du dénombrement des germes présents dans les boues activées utilisées dans le cadre de la présente étude montrent clairement la prédominance des entérocoques. Parmi les différentes espèces et souches bactériennes isolées à partir de différents biotopes et capables de dégrader le malathion, aucune n'a été décrite comme appartenant au groupe des entérocoques. Cette observation mérite d'amples études pouvant conduire à démontrer l'implication des entérocoques dans la dégradation du malathion. Par ailleurs, on notera avec intérêt que la mise en évidence de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* dans les boues utilisées nous amène à considérer que cette espèce serait impliquée dans la dégradation du malathion.

En effet, selon plusieurs études rapportées dans la littérature, de nombreuses souches de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ont été décrites comme étant capables de métaboliser le malathion et de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie (**Matsumura and Boush, 1966 ; Barik et al., 1984 ; Goda et al., 2010**).

2.7. Analyse et identification des produits de dégradation du malathion

A l'issue de la culture d'une durée de 3 jours en présence de malathion à 60mg/l testé comme la seule source de carbone et d'énergie, l'analyse de la formation éventuelle de produits de dégradation du pesticide a été réalisée par GC-MS.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 22a sous forme d'un chromatogramme. Parmi l'ensemble des métabolites possibles du malathion indiqués dans le tableau X, l'un d'entre eux a été identifié et désigné par « métabolite X : pic 15,83 min ». Le spectre de masse de ce métabolite montre des pics de fragments ioniques à *m/z* 113, 125, 143 et 211 correspondant à la formule moléculaire suivante : C₈H₁₅O₆PS₂ (Acide monocarboxylique du malathion) (Figure 22b). Signalons enfin que la biomasse utilisée dans la présente étude n'est pas productrice de malaaxon, analogue toxique du malathion.

Tableau X : Formules chimiques des métabolites du malathion (Bourquin, 1975).

Nom	Structure chimique	Nom	Structure chimique
Malaaxon		Diméthyl phosphorodithioate de potassium	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{O} - \text{P} = \text{S} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 - \text{O} - \text{P} - \text{S} - \text{K} \end{array}$
Acide monocarboxylique du malathion		Diméthyl phosphorothioate de potassium	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{O} - \text{P} = \text{S} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 - \text{O} - \text{P} - \text{O} - \text{K} \end{array}$
Acide dicarboxylique du malathion		Diéthyl-malate	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH} - \text{COOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$
O-déméthylmalathion de potassium		Mercaptosuccinate Diéthyl-succinate	$\begin{array}{c} \text{HS} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{COOH} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{COOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$

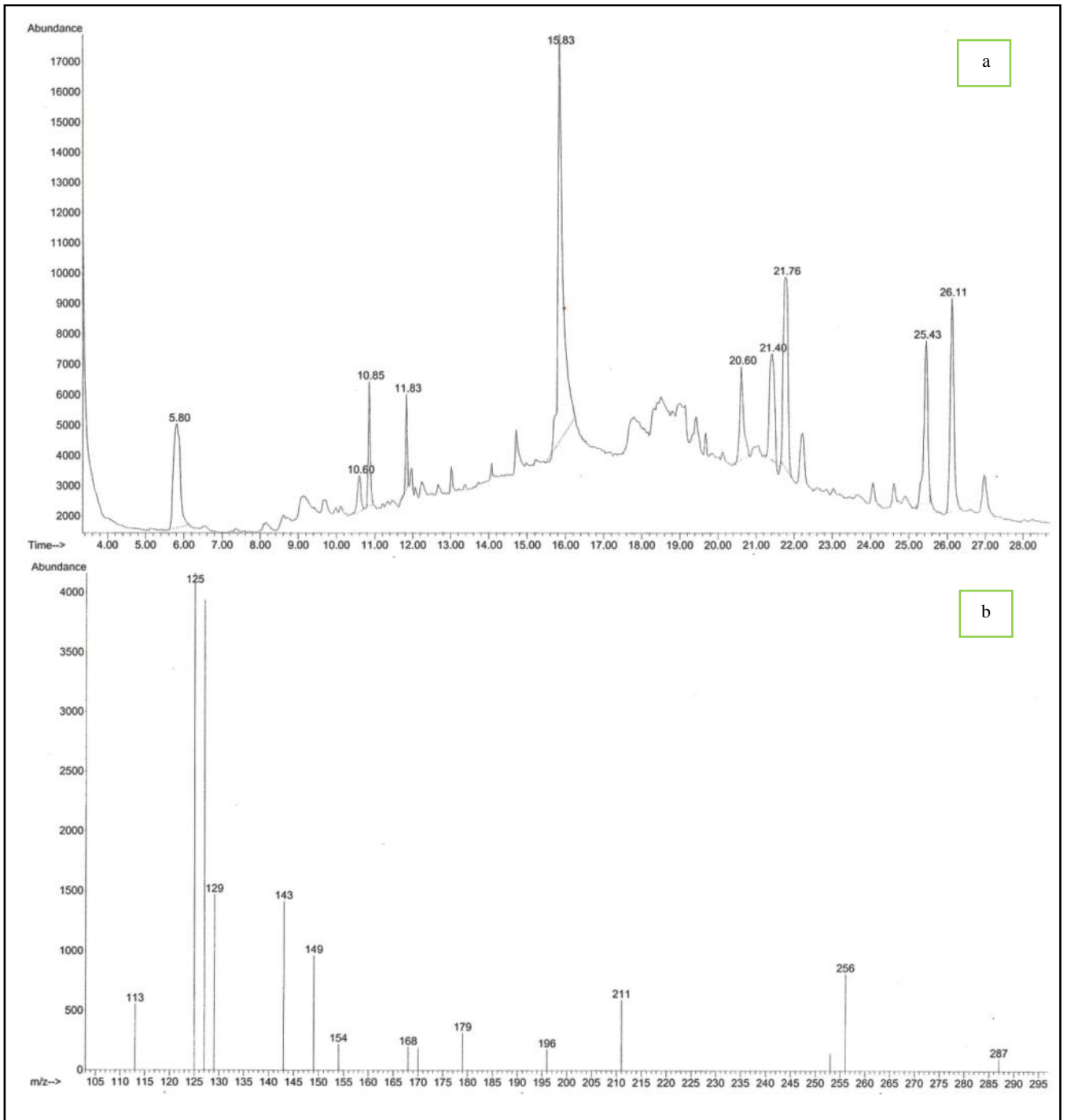


Figure 22 : Chromatogramme de GC-MS en mode SIM (a) Chromatogramme ionique total correspondant aux métabolites du malathion (b) Spectre de masse correspondant au métabolite X.

Plusieurs microorganismes ont été décrits comme pouvant métaboliser le malathion et produire ses divers métabolites (**Matsumura et Boush, 1966; Singh et Seth, 1989 ; Kamal et al., 2008**). L'activité de la carboxylestérase, enzyme dégradant le malathion en ses formes mono et diacide, est considérée comme la voie de dégradation majeure du pesticide. La désulfuration oxydative et la déméthylation semblent, pour leur part, être des voies métaboliques mineures (**Matsumura et Boush, 1966**).

Le fait que le malathion monoacide, mis en évidence dans notre étude, soit le seul métabolite du malathion suggère que les microorganismes testés empruntent préférentiellement la voie métabolique impliquant l'hydrolyse du malathion par la carboxylestérase. Ce constat ne corrobore pas tout à fait les observations de **Matsumura et Boush (1966)**. Ces derniers ont, en effet, rapporté que divers microorganismes (*Pseudomonas sp.* et *Trichoderma viride*) isolés à partir du sol dégradaient activement le malathion aussi bien par hydrolyse carboxylestérasique que par déméthylation.

Partie III:

**Utilisation du malathion
comme source de
phosphore et de
soufre et sa
biodégradation sur colonne**

Les travaux rapportés dans la littérature traitant de la biodégradation des organophosphorés en général, et celle du malathion en particulier, sont focalisés essentiellement sur l'utilisation de ces derniers comme source de carbone et d'énergie, mais leur utilisation comme source de phosphore ou de soufre n'est que très peu considérée.

Les procédés d'élimination par immobilisation des microorganismes sur supports inertes possèdent des avantages par rapport aux procédés à cultures libres, liés notamment aux rendements d'élimination intéressants obtenus ainsi qu'à la résistance des microorganismes fixés à la toxicité liée aux fortes concentrations des composés à éliminer.

Dans cette partie de notre travail, nous avons considéré dans un premier temps, la dégradation du malathion par la culture mixte de microorganismes (boues activées) en utilisant le pesticide soit comme unique source de phosphore ou bien comme unique source de soufre. Dans une seconde étape, nous avons étudié les performances de l'élimination du malathion sur colonnes garnies de trois types de supports différents (ARC, ARP et GO) servant à fixer les microorganismes.

1. Matériel et méthodes

1.1. Composition du milieu de culture

Le milieu de culture choisi a la composition suivante : glucose 2500mg, KH_2PO_4 0,038 g, MgSO_4 0,05g, CaCl_2 0,05g et urée 0,2g, le tout dissout dans 1000ml d'eau distillée (**Kargi et Konya 2007**). Dans les essais où le malathion a été testé comme la seule source de carbone et d'énergie, la source de phosphore ou source de soufre, le glucose, le KH_2PO_4 et le MgSO_4 ont été exclus.

1.2. Description du dispositif expérimental

L'essai de traitement a été effectué dans un dispositif expérimental constitué d'une colonne (tube en Polychlorure de vinyle d'un diamètre interne de 2cm, d'une épaisseur de 3mm, d'une hauteur de 100cm et muni de 9 points de prélèvement) garni de support à 90% (volume de 314ml) et relié à un bac d'alimentation contenant la solution synthétique à traiter. Le réacteur biologique est représenté sur la figure 23. Il est alimenté en flux ascendant grâce à une pompe péristaltique.

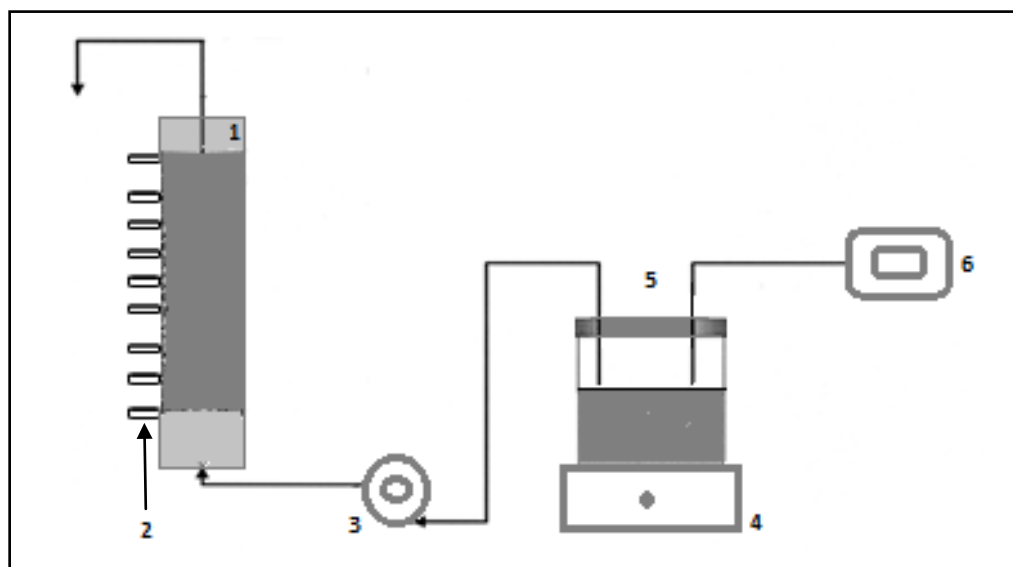


Figure 23 : Schéma du dispositif expérimental utilisé.

1 – colonne garnie avec le support, 2 – points de prélèvement, 3 – pompe péristaltique, 4 – agitateur magnétique, 5 – bac d'alimentation, 6 – pompe à air.

1.3. Supports utilisés

Les supports utilisés, présentés dans le tableau XI, sont de trois types : ARC (Chrysty[®] Catalytics), ARP (Sigma-Aldrich[®]) et des GO sous-produits de l'industrie oléicole. Les ARC et les ARP sont chimiquement et thermiquement stables, résistants à la dégradation microbienne et sont recyclables.

Tableau XI : Caractéristiques des trois supports utilisés.

	ARC	ARP	GO
Forme	Cylindrique	Cylindrique	Fragments irréguliers
Masse volumique apparente (g/ml)	0,9 ± 0,04	0,65 ± 0,02	0,51 ± 0,0069
Poids (g)	0,329 ± 0,037	0,483 ± 0,026	0,048 ± 0,0145
Longueur (cm)	0,85 ± 0,05	0,85 ± 0,05	0,45 ± 0,15
Diamètre externe (cm)	0,5 ± 0,05	0,675 ± 0,025	/
Diamètre interne (cm)	0,275 ± 0,025	0,375 ± 0,025	/
Epaisseur (cm)	0,225 ± 0,075	0,3 ± 0,05	0,15 ± 0,05
Surface (cm ²)	4,76 ± 1,26	8,28 ± 0,7	0,6 ± 0,02
Surface spécifique (cm ² /ml)	10,25 ± 1,75	8,91 ± 0,25	24,83 ± 4,17

1.4.ensemencement du réacteur

La fixation des microorganismes sur les différents supports a été effectuée par passage en circuit fermé d'une solution contenant des boues activées préalablement adaptées au pesticide.

1.5. Alimentation du réacteur

L'alimentation du réacteur a été effectuée avec une solution synthétique contenant du malathion à la concentration de 10mg/l. Afin d'étudier l'influence de la vitesse d'alimentation sur l'efficacité du dispositif, différentes valeurs de débit ont été testées dans une gamme allant de 0,2ml/min à 2ml/min.

1.6. Méthodes analytiques

1.6.1. Détermination de la concentration du malathion

La détermination de la concentration du malathion a été réalisée par la méthode de **Naidu et al. (1990)** (voir partie II).

1.6.2. Estimation de la concentration de biomasse

La détermination de la concentration cellulaire a été effectuée par la mesure de la MVS exprimée en mg/l (voir partie II).

1.6.3. Estimation de la quantité de biomasse adsorbée

Dans le but d'estimer le potentiel d'adsorption de chacun des supports utilisés, nous avons mesuré la quantité de biomasse adsorbée sur chacun des supports testés, et ce, en fin d'expérimentation. Pour le GO et l'ARP, cette mesure a été effectuée selon la procédure citée par **Brányik et al. (2001)**. Pour l'ARC, la quantité de biomasse adsorbée a été calculée comme étant la différence entre la masse du support mesurée avant et après combustion à 600°C pendant 2h.

Les quantités de biomasse adsorbées sont exprimées en $g_{\text{biomasse}}/g_{\text{support}}$.

1.6.4. Analyse de la surface des supports

L'analyse de la surface des trois supports testés à l'état vierge a été réalisée au MEBE (Philips XL-30) sans traitement préalable des échantillons.

1.6.5. Etude microbiologique

Les analyses microbiologiques des boues activées utilisées dans cette partie de l'étude ont été effectuées au niveau du Centre Algérien de Contrôle de Qualité et Emballage (C.A.C.Q.E.). Cette étude a porté sur l'identification de certains groupes microbiens ainsi que quelques espèces bactériennes présentes dans les boues activées utilisées avant et après traitement avec le malathion : Le but étant de déterminer, d'une part, d'éventuelles variations qualitatives et quantitatives de la flore utilisée, dues à la présence du malathion et de savoir, d'autre part, parmi les germes recherchés ceux qui seraient impliqués dans la dégradation du pesticide.

Germes recherchés :

- germes mésophiles totaux ;
- levures et moisissures ;
- coliformes totaux, coliformes fécaux, *Escherichia coli* ;
- entérocoques fécaux ;
- clostridies sulfito-réductrices ;
- *Staphylococcus aureus* ;
- *Pseudomonas aeruginosa*.

Mode opératoire :

Préparation des dilutions décimales

La première dilution (10^{-1}) est préparée en prélevant 1ml de la solution mère (boue activée) avec une pipette graduée stérile et en l'introduisant dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Ainsi, pour la préparation de la seconde dilution (10^{-2}), on prélève 1ml de la dilution précédente (10^{-1}) avec une nouvelle pipette graduée stérile et qu'on introduit dans un autre tube à essai contenant également 9ml d'eau physiologique stérile. On procède de la même manière pour la préparation des autres dilutions (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}),

La composition des milieux de culture utilisés est donnée en annexe 3.

1.6.5.1. Recherche et dénombrement des germes mésophiles totaux

Cette flore comporte tous les germes ayant le pouvoir de pousser sur un milieu gélosé non sélectif à une température de 30°C après 72 heures d'incubation (**Guiraud, 1998**),

La méthode d'analyse utilisée est conforme à la norme **ISO 6222 (1999)**, elle consiste à ensemercer en profondeur dans des conditions aseptiques 1 ml de chacune des dilutions

suivantes : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} en utilisant le milieu gélosé PCA, puis on incube à 30°C pendant 72 heures.

Lecture

Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse.

Dénombrement

Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussées sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies.
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution.
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

1.6.5.2. Recherche et dénombrement des champignons (levures et moisissures)

Ils regroupent en réalité deux types de micro-organismes : les levures et les moisissures. La méthode d'analyse utilisée à leur recherche est conforme à la norme **ISO 7954 (1987)**, elle consiste à ensemercer en profondeur dans des conditions aseptiques 1 ml de chacune des trois premières dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) sur milieu gélosé OGA auquel on additionne un antibiotique : l'oxytétracycline à raison de 20ml par 250ml de milieu de culture (pour inhiber la croissance des bactéries).

Lecture

- Les colonies de levures sont rondes, molles, opaques, plus au moins bombées et brillantes.
- Les moisissures ont un aspect velouté et elles sont plus grandes et pigmentées.

Dénombrement

On utilise la même méthode de dénombrement utilisée pour les germes mésophiles totaux.

1.6.5.3. Recherche et dénombrement des coliformes

Ce sont des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme β -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 35°C. Les coliformes sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau car ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale (**Edberg et al., 2000**).

La méthode d'analyse utilisée est conforme à la norme **ISO 9308-2 (1990)**, elle consiste à ensemercer dans des conditions aseptiques :

- 50ml de la dilution 10^{-1} dans un flacon contenant 50ml du milieu de culture bouillon lactosé.
- 10ml de la même dilution dans cinq tubes à essai contenant chacun 10ml du milieu de culture bouillon lactosé.
- On incube à 37°C pendant 48 heures.

Lecture

Les tubes présumés positifs sont ceux présentant des troubles du milieu et des gaz dans la cloche de Durham.

La cloche de Durham permet le recueil des gaz révélant la présence de coliformes, à condition que le milieu ait été agité correctement pour que les bactéries soient bien réparties, y compris sous la cloche. Le trouble du milieu et la production de gaz sont dues à la fermentation du lactose par les coliformes.

Dénombrement

Le nombre des coliformes est exprimé par le NPP selon le tableau des indices NPP (annexe 4).

1.6.5.4. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C, L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (Edberg et al., 2000).

La méthode d'analyse utilisée est conforme à la norme **ISO 9308-2 (1990)**, elle consiste à ensemercer dans des conditions aseptiques 1 ml d'inoculum prélevé à partir de chaque tube utilisé pour la recherche des coliformes totaux présumé positif dans des tubes contenant le milieu BLBVB avec cloche de Durham, puis on incube à 44°C pendant 24 heures à 48 heures.

Lecture

Les tubes présumés positifs sont ceux présentant des troubles du milieu et des gaz dans la cloche de Durham.

Dénombrement

On utilise la méthode du NPP.

1.6.5.5. Recherche et dénombrement d'Escherichia coli « Test de Mackenzie »

Pour confirmer la présence d'*Escherichia coli*, on pratique le test de Mackenzie qui consiste à ensemencer dans des conditions aseptiques 1ml d'inoculum prélevé à partir de chaque tube utilisé pour la recherche des coliformes fécaux présumé positif dans des tubes à essai contenant le milieu d'eau peptonée exempte d'indole, puis on incube à 44°C pendant 24 à 48 heures, et on rajoute quelques gouttes du réactif d'Ehrlich-Kovacs.

Lecture

La production d'indole se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge.

Dénombrement

On utilise la méthode du NPP.

1.6.5.6. Recherche et dénombrement des Enterocoques fécaux

La recherche des enterocoques fécaux : Streptocoques du groupe D de la classification de « Lancefield » appel à 2 tests consécutifs selon la norme **ISO 7899 (1984)**.

Test de présomption

Permet de rechercher les entérocoques, il consiste à ensemencer dans des conditions aseptiques :

- 50 ml de la dilution 10^{-1} dans un flacon contenant 50 ml du milieu Roth.
- 10 ml de la même dilution dans cinq tube à essai contenant chacun 10ml du même milieu de culture.
- On incube à 37°C pendant 48 heures.

Lecture

Les tubes positifs présentent un trouble.

Test de confirmation

Chaque tube de Roth positif fera l'objet d'un repiquage sur boîtes de Petri contenant le milieu de culture gélosé BEA.

Addition de quelques gouttes d'eau oxygénée H₂O₂.

Lecture

Les entérocoques se présentent sous forme de petites colonies translucides entourées d'un halo noir et leur présence est confirmée par l'effervescence lors de l'ajout de H₂O₂.

Dénombrement

On utilise la même méthode de dénombrement utilisée pour les germes mésophiles totaux.

1.6.5.7. Recherche et dénombrement de Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (staphylocoque doré) est l'espèce la plus pathogène des staphylocoques.

Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques).

La méthode d'analyse utilisée est conforme à la norme **ISO 6888 (1999)**, elle consiste à ensemercer en surface dans des conditions aseptiques 0,1 ml de chacune des trois premières dilutions (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) sur milieu gélosé Baird Parker.

- On incube à 37°C pendant 48 heures.
- On procède à l'enrichissement sur bouillon cœur cerveau pendant 24h à 37°C.

Lecture

Staphylococcus aureus forment en aérobiose des colonies crémeuses, pigmentées (typiquement jaune d'or), qui tournent autour de 4 mm de diamètre et opaques.

Dénombrement

On utilise la même méthode de dénombrement utilisée pour les germes mésophiles totaux.

1.6.5.8. Recherche et dénombrement de clostridies sulfite-réductrices

Les clostridies sulfite-réductrices sont un groupe important de bactéries Gram positives, anaérobies, qui forment des spores. Ces dernières peuvent survivre de longues

périodes dans les fèces, le sol, la poussière et l'eau. Leur présence dans l'eau peut être utilisée pour détecter une pollution fécale ancienne ou intermittente. Ils sont capables de réduire les sulfites en sulfures.

La méthode d'analyse utilisée est conforme à la norme **ISO 15213 (2003)**, elle consiste à ensemercer dans cinq tubes à essai 5ml d'inoculum prélevés à partir de chacune des trois premières dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Les tubes sont ensuite mis dans un bain Marie à 80°C pendant 10min, puis refroidis avec de l'eau du robinet dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder les formes sporulées. Quinze ml de gélose viande foie sont ensuite rajoutés dans chaque tube, auxquels on a additionné préalablement une ampoule de sulfite de sodium et une ampoule d'alun de fer, puis on incube à 46°C pendant 16 à 24 heures.

Lecture

La première lecture doit se faire impérativement 16 heures après l'incubation, car les colonies de clostridies sont envahissantes auquel cas, on se trouvera devant un tube complètement noir, rendant ainsi l'interprétation difficile, voire impossible et l'analyse serait à refaire, aussi il faut repérer toute colonie noire ayant poussée en masse et d'un diamètre supérieur à 0,5mm.

Dénombrement

Le nombre de colonies trouvées est multiplié par l'inverse de la dilution.

1.6.5.9. Recherche et dénombrement de Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Plusieurs études ont rapporté que l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est impliquée dans la dégradation du malathion (**Bourquin, 1975**).

La méthode d'analyse utilisée est conforme à la norme **ISO 8360-1 (1998)**, elle consiste à ensemercer en surface 0,1ml d'inoculum de la dilution 10^{-1} sur milieu gélosé Cétrimide.

Incubation à 42°C pendant 3 à 4 jours.

Lecture

Pseudomonas aeruginosa sécrète un pigment jaune-vert fluorescent, s'il y a des colonies à pigmentation bleue-verte, alors la présence de *Pseudomonas aeruginosa* est confirmée.

Dénombrement

Le nombre de colonies trouvées est multiplié par l'inverse de la dilution.

1.6.6. Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en duplicata, L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée par le biais du test de Student. Les valeurs de la probabilité p inférieures à 0,05 ont été considérées comme étant statistiquement significatives.

2. Résultats et discussion

2.1. Biodégradation du malathion utilisé comme unique source de phosphore

L'étude des cinétique de croissance de la biomasse des boues activées adaptées et de biodégradation du malathion a été menée dans un milieu de culture de base additionné de malathion à 10mg/l utilisé comme seule source de phosphore avec une concentration initiale de biomasse égale à 1000mg/l. Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure 24. Ces résultats montrent que la croissance cellulaire est corrélée à la dégradation du malathion avec un taux spécifique de croissance de 0,0024 1/h. La même figure indique, par ailleurs, que 80% du pesticide sont éliminés après 48 h d'incubation.

Ces résultats indiquent clairement que les boues activées testées sont en mesure d'utiliser le malathion comme seule source de phosphore au cours de leur croissance. Ceci suggère que ces microorganismes possèdent les enzymes nécessaires (phosphoesterases) pour arracher l'atome de phosphore du pesticide et de le métaboliser. **Subramanian et al. (1994)**, ont rapporté des résultats similaires quant à l'utilisation du malathion par *Aulosira fertilissima* ARM 68 comme seule source de phosphore.

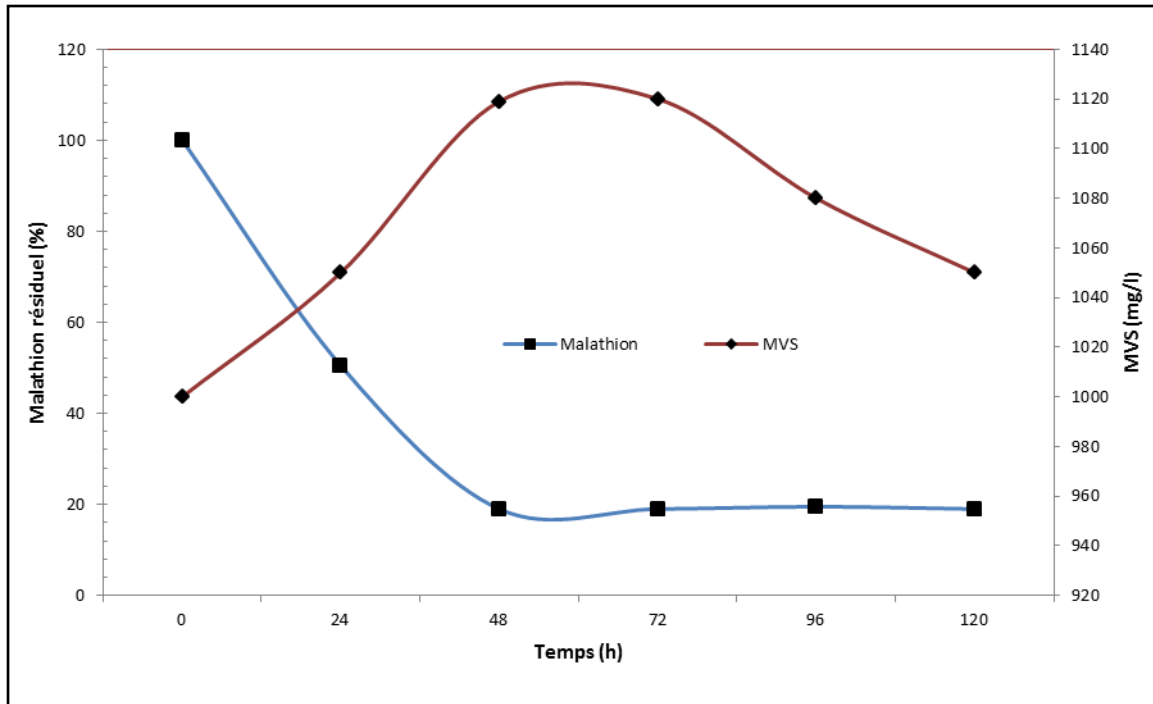


Figure 24 : Utilisation du malathion (10mg/l) comme seule source de phosphore. Cinétique de croissance des boues activées (Concentration initiale de biomasse=1000 mg/l) et de biodégradation du malathion (pH=6, température (25°C±1°C)).

2.2. Biodégradation du malathion utilisé comme unique source de soufre

Nous avons entrepris de tester le malathion à 10mg/l comme seule source de soufre dans la croissance des boues activées adaptées au pesticide. La concentration initiale de la biomasse a été de 1000mg/l. Les résultats expérimentaux obtenus montrent une absence de croissance de la biomasse et une baisse drastique de la concentration de cette dernière à partir de 72 heures d'incubation (Figure 25). De plus, la concentration du malathion au cours de l'essai est demeurée pratiquement inchangée.

Ces résultats suggèrent que les microorganismes testés dans notre étude, ne disposent pas de la combinaison d'enzymes requise pour libérer les atomes de soufre à partir de la molécule de malathion.

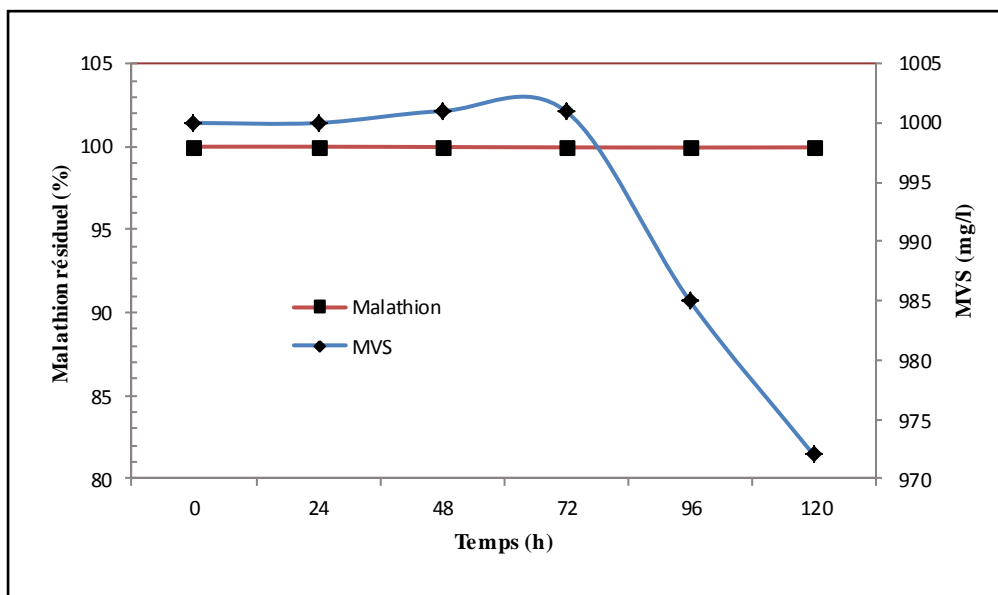


Figure 25 : Utilisation du malathion (10mg/l) comme seule source de soufre. Cinétique de croissance des boues activées (Concentration initiale de biomasse=1000mg/l) et biodégradation du malathion (pH=6, température (25°C±1°C)).

2.3. Dégradation du malathion sur colonne

Trois supports différents (ARC, ARP et GO) servant pour l'immobilisation de la biomasse ont été testés. L'effet du débit sur la dégradation du malathion a été également considéré. Le malathion a été testé comme seule source de carbone et d'énergie avec une concentration initiale de 10mg/l. La concentration du pesticide a été déterminée à chaque point de prélèvement le long de la colonne pour chaque valeur de débit testée. Les résultats montrés dans la figure 26 montrent que l'élimination du malathion est influencée par le débit de l'écoulement de la solution à traiter ($p < 0,05$).

En effet, la figure 26a représente l'influence du débit d'écoulement sur la biodégradation du malathion pour le réacteur garni d'ARC. On remarque que le pourcentage de dégradation du pesticide augmente avec la diminution du débit d'écoulement appliqué. Des résultats similaires sont observés pour le réacteur garni d'ARP (Figure 26b) ($p > 0,05$). Ceci serait dû au fait que l'augmentation du débit d'écoulement induit une diminution du temps de séjour de la solution à traiter à l'intérieur du réacteur réduisant ainsi le temps de contact entre la biomasse et le composé à éliminer (Tepe et Dursun, 2008). L'autre raison serait liée à la vitesse de passage à l'intérieur de la colonne qui détermine le rendement cellulaire et la densité du biofilm ; c'est-à-dire la résistance vis-à-vis des forces de détachement (Michaud, 2001).

Concernant le réacteur chargé de GO (Figure 26c), on notera avec intérêt qu'on est parvenu à obtenir l'élimination complète du pesticide, et ce, pour les débits de 0,2ml/min et 0,6ml/min. Ceci peut être attribué à la forte concentration de biomasse adsorbée sur ce support organique.

2.4. Estimation de la biomasse adsorbée

La capacité d'adsorption de la biomasse par les trois supports testés a été estimée, Les résultats obtenus montrent que la quantité de biomasse adsorbée sur le GO est de loin la plus élevée ($0,077 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{biomasse}}/\text{g}_{\text{support}}$), $0,0037 \pm 0,00054 \text{ g}_{\text{biomasse}}/\text{g}_{\text{support}}$ et $0,00139 \pm 0,00016 \text{ g}_{\text{biomasse}}/\text{g}_{\text{support}}$, pour le ARC et le ARP, respectivement, probablement dû aux propriétés de surface du GO et au fait que ce dernier offre une surface spécifique plus importante (Tableau XI).

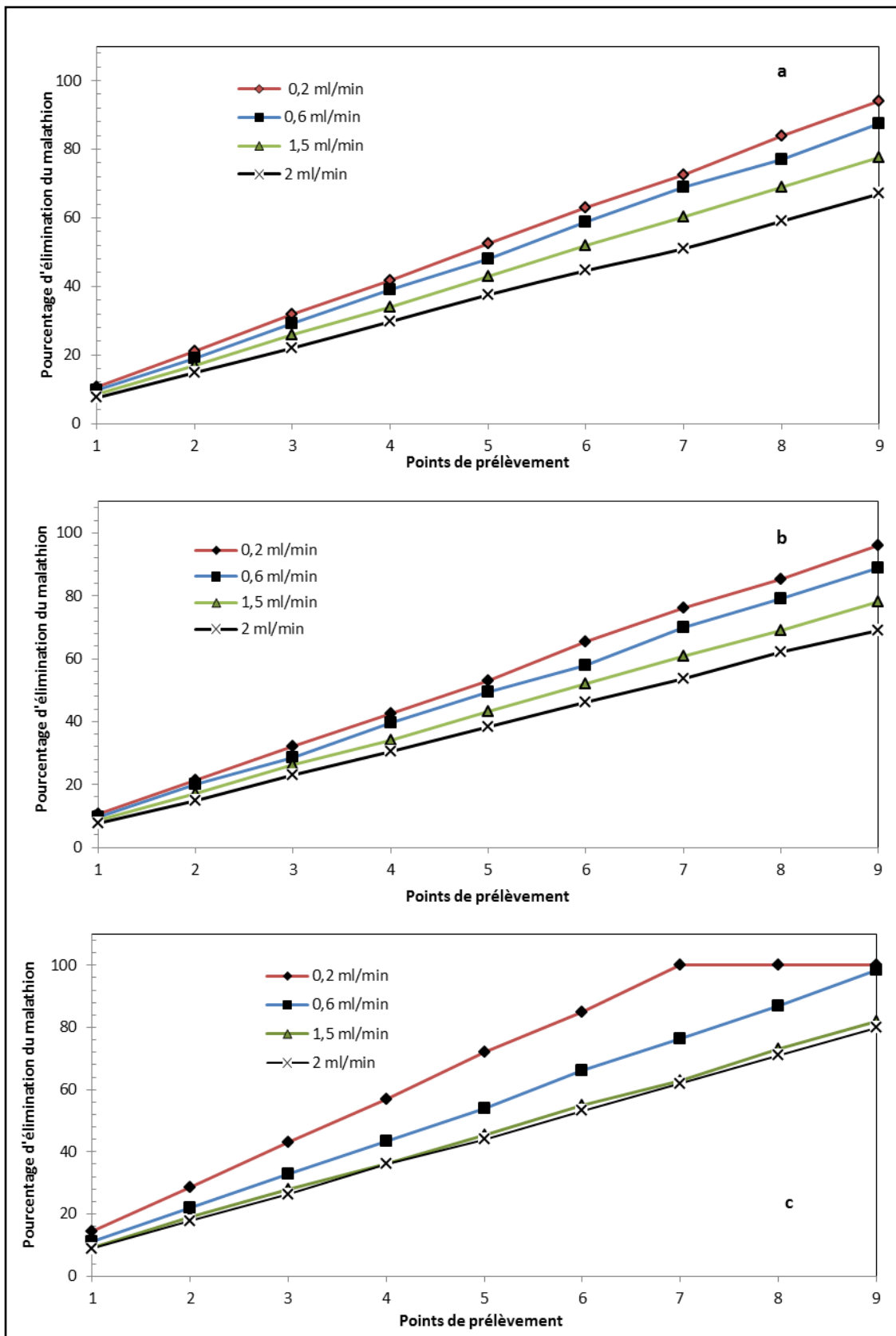


Figure 26 : Suivi de la biodégradation du malathion à différents points de prélèvement sur le réacteur avec différents débits (la concentration initiale du malathion est de 10mg/l). (a) Colonne garnie avec l'ARC. (b) Colonne garnie avec l'ARP. (c) Colonne garnie avec le GO.

2.5. Analyse de la surface des supports

Les résultats de l'analyse au MEBE des trois supports avant et après leur colonisation par la biomasse sont montrés dans la figure 27. Les figures 27a, 27b et 27c montrent les images des supports ARC, ARP et GO, respectivement à l'état vierge. On remarque que les supports diffèrent considérablement en termes de morphologie de surface. En effet, le GO présente une surface profondément sculptée alors que l'ARC présente une surface moins sculptée avec un degré d'aspérités moindre. La surface de l'ARP présente, par ailleurs, une surface très lisse.

Les figures 27d, 27e et 27f montrent les images des supports ARC, ARP et GO, respectivement colonisés par la biomasse. Il est à noter que les trois supports testés ont la capacité d'adsorber les microorganismes.

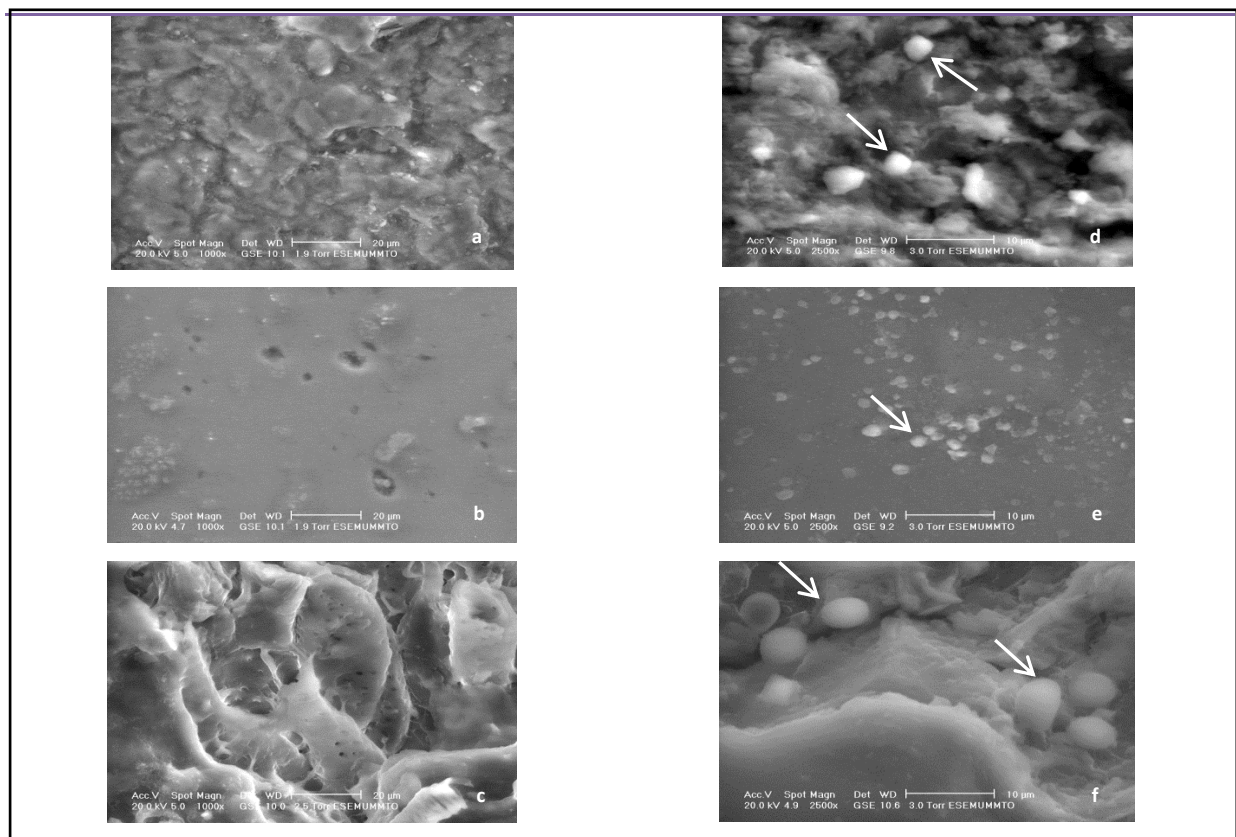


Figure 27: Observation de la surface des supports testés au M.E.B.E. Supports vierges: (a) ARC, (b) ARP, (c) GO (G x 1000). Supportsensemencés : (d) ARC, (e) ARP et (f) GO (G x 2500). Les microorganismes attachés sont indiqués par des flèches.

2.6. Etude microbiologique

Les résultats de l'étude microbiologique obtenus (Tableau XII) montrent clairement que les boues activées utilisées pour notre étude renferment une flore microbienne variée.

Tableau XII : Résultats de l'analyse microbiologique des boues activées avant et après traitement par le malathion,

Germes recherchés	Nombre de germes dans la boue avant traitement par le malathion	Nombre de germes dans la boue après traitement par le malathion
Germes mésophiles totaux (UFC/ml)	$4 \cdot 10^6$	indénombrable
Levures et moisissures (UFC/ml)	$2,23 \cdot 10^3$	indénombrables
Coliformes totaux (NPP/100ml)	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
Coliformes fécaux (NPP/100ml)	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
<i>Escherichia coli</i> (NPP/100)	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
Enterocoques fécaux (UFC/ml)	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
Clostridies sulfito-réductrices (UFC/ml)	$1,8 \cdot 10^3$	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/ml)	$16 \cdot 10^3$	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/ml)	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$

Nous constatons que le nombre de germes de chaque genre ou espèce recherchés peut augmenter ou diminuer après traitement des boues activées avec le malathion, ceci s'explique par la capacité des microorganismes, dont le nombre a augmenté après traitement, de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie pour assurer leur maintenance et leur multiplication tels que les levures, moisissures et *Pseudomonas aeruginosa*, prouvant ainsi leur implication dans sa dégradation et ce, grâce aux systèmes enzymatiques dont ils seraient dotés. On remarque par ailleurs, la disparition des clostridies sulfito-réductrices et de *Staphylococcus aureus* après traitement avec le malathion. Ceci pourrait être dû soit, à l'incapacité de ces germes à dégrader le pesticide en raison de l'absence d'enzymes adéquats, soit à un effet bactéricide exercé par le pesticide sur les germes en question. On relève enfin, que le nombre de certains germes n'a pas varié après le traitement avec le malathion, c'est le cas d'*Escherichia coli* et des entérocoques fécaux.

Ce constat peut être expliqué par un éventuel effet bactériostatique qu'exercerait le malathion sur ces derniers. Beaucoup d'études ont été réalisées visant l'identification des souches bactériennes dégradant le malathion et plusieurs chercheurs ont rapporté que *Pseudomonas sp.* est capable de dégrader le malathion (Bourquin, 1975 ; Goda et al., 2010) grâce notamment à l'hydrolase (Matsumura et Boush, 1966). Ceci a été vérifié dans notre

étude, en effet, le nombre de germes de *Pseudomonas aeruginosa* est passé de $2 \cdot 10^4$ germes/ml avant traitement par le pesticide à $5 \cdot 10^4$ germes /ml après traitement.

Partie IV:

**Etude de l'effet de
quelques paramètres
expérimentaux sur la
biodégradation du
malathion et sur la
croissance cellulaire**

Dans le cadre de cette partie de notre travail, nous avons entrepris l'étude de l'effet sur la croissance de la biomasse (utilisant le malathion comme substrat de croissance) et sur la dégradation du malathion des quatre paramètres suivants :

- La température de culture.
- La vitesse d'agitation.
- Le débit d'aération.
- La concentration initiale de la biomasse.

Nous avons, pour ce faire, fait appel à la méthode des plans d'expérience et appliqué un plan fractionnaire à deux niveaux qui permet de diminuer considérablement le nombre d'essais nécessaires et, d'ignorer les effets d'interactions de sorte que les effets principaux puissent être calculés correctement.

1. Matériel et méthodes

1.1. Composition du milieu de culture

Le milieu minéral employé est celui utilisé dans la partie II (essais portant sur l'utilisation des rebuts de dattes).

1.2. Description du plan d'expérience utilisé

Pour déterminer les effets de différents paramètres susceptibles de contrôler à la fois la biodégradation du malathion et la croissance cellulaire, nous avons utilisé la méthodologie des plans d'expérience fractionnaires qui permettent une grande économie d'expériences. En effet, un plan fractionnaire à deux niveaux permet de cribler les paramètres opératoires importants parmi ceux choisis dans le cadre de ce travail et ce en rapport avec leur effet sur la biodégradation du malathion et sur la croissance de la biomasse. Quatre paramètres ou facteurs ($k = 4$) ont été sélectionnés. Pour chaque paramètre, deux niveaux ont été testés : niveau -1 qui correspond à la valeur minimum du paramètre et niveau +1 qui correspond à sa valeur maximale (Tableau XIII). Au total, huit combinaisons expérimentales ont été réalisées pour une durée d'incubation de 4 jours à l'issue de laquelle les deux réponses que sont le taux d'élimination du malathion (Y_1) et la croissance cellulaire (Y_2) ont été déterminées. Les résultats ont été analysés par le biais du logiciel *Statistica Release 7.0* (StatSoft Inc.).

Il est important de retenir que le plan expérimental des réponses étudiées n'est valide que dans les domaines des variations choisies des facteurs contrôlés.

Tableau XIII : Les niveaux -1 et +1 des facteurs utilisés dans le plan fractionnaire appliqué.

Variable	Facteur	Niveau -1	Niveau +1
X ₁	Température (°C)	20 (-1)	37 (+1)
X ₂	Concentration initiale de biomasse (g/l)	0,2 (-1)	0,9 (+1)
X ₃	Vitesse d'agitation (tr/min)	58 (-1)	105 (+1)
X ₄	Débit d'aération (l/min/l)	0,3 (-1)	2,54 (+1)

1.3. Méthodes analytiques

1.3.1. Détermination de la concentration du malathion

La détermination de la concentration du malathion a été réalisée par la méthode de **Naidu et al. (1990)** (voir partie II).

1.3.2. Estimation de la concentration de biomasse

La détermination de la concentration cellulaire a été effectuée par la mesure de la MVS exprimée en mg/l (voir partie II).

2. Résultats et discussion

Dans la perspective d'améliorer le processus de traitement du malathion, nous avons entrepris d'examiner l'effet des paramètres opératoires sur la biodégradation du pesticide ainsi que sur la production de biomasse. Pour ce faire, un plan d'expérience fractionnaire à deux niveaux a été choisi, car ce dernier offre la possibilité d'explorer ces effets avec un minimum d'essais expérimentaux.

Au total, huit essais expérimentaux ont été réalisés dans les conditions indiquées dans le tableau XIV. Deux réponses désignées par Y₁ et Y₂ ont été considérées. La première correspond à la production de biomasse exprimée en (g/l) et la seconde exprime le taux d'élimination du malathion en (%). Les valeurs obtenues inhérentes aux deux réponses sont indiquées dans le même tableau. D'après ce tableau, on notera que la valeur maximale de la production de biomasse correspond à l'essai 8 et la valeur minimale correspond à l'essai 3. Par ailleurs, les valeurs maximale et minimale associées au pourcentage d'élimination du malathion correspondent respectivement aux essais 7 et 4.

Tableau XIV : Plan d'expérience fractionnaire construit à partir de quatre variables indépendantes ou facteurs (X_1 à X_4) et les valeurs expérimentales obtenues des deux réponses (Y_1 et Y_2).

Essai	Température (°C) (X_1)	Concentration Initiale de biomasse (g/l) (X_2)	Vitesse d'agitation (tr/min) (X_3)	Débit d'aération (l/min/l) (X_4)	Production de biomasse (g/l) (Y_1)	Elimination du malathion (%) (Y_2)
1	20(-1)	0,2(-1)	50(-1)	0,3(-1)	0,0988	89,16
2	20(-1)	0,2(-1)	110(+1)	2,54(+1)	0,111	86,66
3	20(-1)	0,9(+1)	50(-1)	2,54(+1)	0,094	87,68
4	20(-1)	0,9(+1)	110(+1)	0,3(-1)	0,311	94,96
5	20(+1)	0,2(-1)	50(-1)	2,54(+1)	0,144	76,46
6	37(+1)	0,2(-1)	110(+1)	0,3(-1)	0,1	85,22
7	37(+1)	0,9(+1)	50(-1)	0,3(-1)	0,132	63,26
8	37(+1)	0,9(+1)	110(+1)	2,54(+1)	0,44	83,74

Les quatre variables ou facteurs étudiés ont été criblés, sur la base de leur effets, au seuil de confiance de 95%. Les résultats rapportés dans le tableau XV montrent que la variation des quatre paramètres expérimentaux dans les limites choisies a une influence significative sur la production de biomasse ($p < 0,05$). Cette influence est hautement significative pour les facteurs concentration initiale de biomasse et la vitesse d'agitation pour lesquels $p \approx 0$. Par ailleurs, il est à relever que l'ensemble de ces facteurs semblent exercer un effet positif sur la réponse. Ceci qui signifie que l'augmentation de la valeur de ces facteurs induit une augmentation de la concentration de la biomasse produite.

Tableau XV : Effet des paramètres opératoires sur la production de biomasse associé aux valeurs de t et p obtenues selon le plan d'expérience fractionnaire à deux niveaux.

Paramètre	Effet	Erreur Standard	t	p^a
Constante	0,172233	0,001748	98,53082	0,000002
Température (°C)	0,050300	0,004282	11,74755	0,001326
Concentration initiale de biomasse (g/l)	0,130800	0,004282	30,54830	0,000077
Vitesse d'agitation (tr/min)	0,123300	0,004282	28,79668	0,000092
Débit d'aération (l/min/l)	0,036800	0,004282	8,59463	0,003311

^a Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

Les valeurs numériques de l'effet linéaire standardisé des quatre facteurs sur la production de la biomasse sont illustrées dans le diagramme de Pareto (Figure 28).

D'après ce diagramme, on remarque que l'effet linéaire le plus important (30,5) est exercé par le facteur concentration initiale de biomasse. Ceci implique qu'en moyenne, la concentration de biomasse produite augmente de 0,13g/l lorsqu'on passe de la valeur minimale de la concentration initiale de biomasse (0,2g/l) à sa valeur maximale (0,9g/l) avec $p \approx 0$. De même, la valeur de l'effet linéaire positif (28,8) que semble exercer la vitesse d'agitation sur la production de biomasse, signifie que cette dernière augmente de près de 0,12g/l lorsque la vitesse d'agitation passe de sa valeur minimale (50tr/min) à sa valeur maximale (110tr/min). Par ailleurs, les facteurs température et débit d'aération semblent, pour leur part, exercer un effet linéaire modéré (11,7 et 8,6, respectivement). L'augmentation respective de la production de biomasse est de 0,05g/l et 0,037g/l, lorsque ces deux facteurs passent de leur valeur minimale (20°C, 0,3l/min/l) à leur valeur maximale (37°C, 2,54 l/min/l).

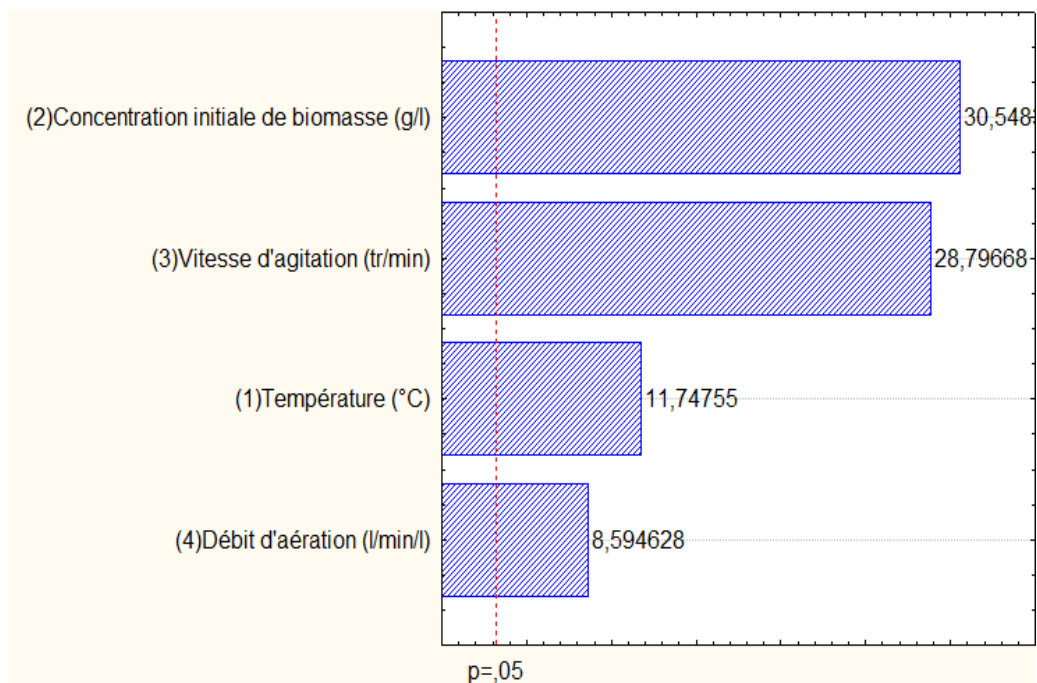


Figure 28 : Diagramme de Pareto de l'effet linéaire standardisé des facteurs considérés sur la production de biomasse.

Au regard de l'élimination du malathion, les résultats obtenus dans le tableau XVI, indiquent clairement qu'à l'inverse du facteur débit d'aération dont l'effet est statistiquement non significatif ($p > 0,05$), l'effet linéaire exercé par les trois autres facteurs est très hautement significatif ($p \approx 0$). Par ailleurs, on remarque que l'effet linéaire inhérent aux facteurs

température et concentration initiale de biomasse s'avère négatif. Ceci signifie, en termes pratiques, que l'augmentation de la température et de la concentration initiale de biomasse aurait pour effet de réduire la biodégradation du malathion. S'agissant des facteurs vitesse d'agitation et débit d'aération, ces derniers semblent avoir un effet positif sur l'élimination du malathion. Autrement dit, l'augmentation de la valeur de ces deux paramètres aurait pour conséquence l'amélioration du taux d'élimination du pesticide.

Tableau XVI : Effet des paramètres opératoires sur l'élimination du malathion associé aux valeurs de *t* et *p* obtenues selon le plan d'expérience fractionnaire à deux niveaux.

Paramètre	Effet	Erreur Standard	<i>t</i>	<i>p</i> ^a
Constante	85,9450	0,072648	1183,028	0,000000
Température (°C)	-12,4450	0,177951	-69,935	0,000006
Concentration initiale de biomasse (g/l)	-1,9650	0,177951	-11,042	0,001591
Vitesse d'agitation (tr/min)	8,5050	0,177951	47,794	0,000002
Débit d'aération (l/min/l)	0,4850	0,177951	2,725	0,072216

^a Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

Les valeurs numériques de l'effet linéaire standardisé des facteurs sur le pourcentage d'élimination du malathion sont rapportées dans le diagramme de Pareto (Figure 29).

Au regard de ces valeurs, on constate que l'effet en valeur absolue exercé par le facteur température sur la biodégradation du malathion est le plus important par rapport à l'effet exercé par les autres facteurs. La valeur négative de cet effet signifierait que le taux de dégradation du malathion baisserait de près de 12,5%, lorsque le facteur température passe de la valeur minimale (20°C) à la valeur maximale (37°C).

La vitesse d'agitation semble également exercer un effet linéaire important sur l'élimination du pesticide. Son effet est positif et est de près de 47,8. Cela indiquerait que le taux d'élimination du pesticide augmente de 8,5% quand ce facteur varie de 50tr/min à 110tr/min. Par ailleurs, le facteur concentration initiale de biomasse semble exercer un effet linéaire négatif relativement faible (-11) (6,4 et 4,3 fois moins important en valeur absolue que l'effet de la température et de la vitesse d'agitation, respectivement). En effet, la variation de la concentration initiale de biomasse de 0,2g/l à 0,9g/l n'induirait que 2% de diminution du taux de biodégradation du malathion. L'effet linéaire positif que semble exercer le facteur débit d'aération est très faible (2,7). Cet effet n'induirait que 0,5% d'augmentation du

pourcentage d'élimination du pesticide lorsque l'on passe d'un débit d'aération de 0,3 l/min/l à 2,54 l/min/l.

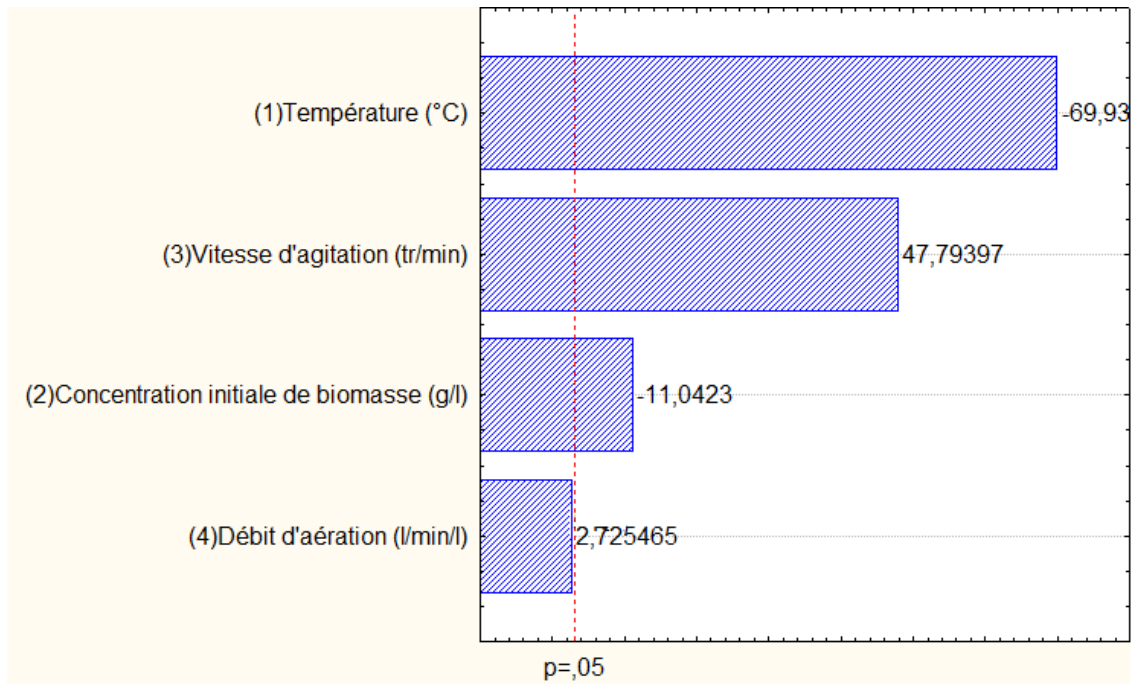


Figure 29 : Diagramme de Pareto de l'effet linéaire standardisé des facteurs considérés sur l'élimination du malathion.

Dans la présente étude, l'influence du pH sur la biodégradation du malathion n'a pas été considérée. La raison en est que l'hydrolyse du malathion dépend en grande partie du pH du milieu. En effet, **Wang (1991)** a rapporté que le malathion est assez stable à pH neutre mais que son hydrolyse devient importante à des pH alcalins. C'est précisément pour cette raison que la valeur du pH a été maintenue à 6, et ce pour l'ensemble des essais de biodégradation menés dans ce travail.

Les conditions physico-chimiques de culture (température, agitation, aération, pH, etc.) peuvent influencer profondément la multiplication et le métabolisme cellulaires. Elles peuvent les empêcher, les inhiber ou les favoriser.

Les résultats décrits précédemment mettent en exergue une corrélation positive entre les quatre facteurs étudiés et la croissance cellulaire. L'effet positif sur la croissance cellulaire, inhérent à l'augmentation de la température, suggère que la culture mixte utilisée dans cette étude serait formée, entre autres, de bactéries mésophiles dont la température de croissance est comprise entre 20°C et 45°C.

La concentration initiale de biomasse semble également influencer considérablement la production de biomasse. Ceci est conforté par de nombreuses études dont celles rapportées par **Wijffels et al. (1994)** et **Wang et al. (2013)**.

L'influence positive de la vitesse d'agitation dans l'intervalle considéré (25°C-37°C) sur la croissance cellulaire, paraît également évidente. Ce paramètre joue, en effet, un rôle très important au cours des cultures bactériennes ; il assure ainsi une oxygénation du milieu, une bonne dispersion des éléments nutritifs et maintient les cellules bactériennes en suspension. Il empêche, par ailleurs, l'accumulation des métabolites toxiques au voisinage des cellules en division. Cependant, d'après **Jafari et al. (2007)**, des vitesses d'agitation élevées peuvent être à l'origine de contraintes de cisaillement mécaniques, susceptibles d'induire une baisse de la concentration de la biomasse dans le milieu de culture.

Le processus de biodégradation des molécules xénobiotiques en général, et celui du malathion en particulier peut être influencé par de nombreux facteurs tels que les interactions entre les microorganismes dans le cas des cultures mixtes, la concentration microbienne dans le milieu, la nature du milieu (liquide ou solide) et les conditions expérimentales de croissance (température, agitation et aération).

Dans notre étude, la corrélation négative qui semble exister entre la température et la biodégradation du malathion implique que l'élimination du pesticide est favorisée par les faibles valeurs de température dans les limites expérimentales choisies, suggérant que les enzymes produites par la culture mixte testée dans la présente étude, impliquées dans le catabolisme du malathion, auraient une température optimale d'activité plutôt basse. La même observation a été récemment rapportée par **Ramadevi et al. (2012)**. Ces derniers ont étudié l'effet de la température (entre 25°C et 45°C), sur la dégradation du malathion par une souche pure d'*Aspergillus niger*, le pourcentage maximum de biodégradation du malathion a été obtenu à 27°C. Il a été constaté, cependant, que l'augmentation de la température de 25°C à 37°C induisait, au contraire, une augmentation du taux de biodégradation du malathion par les microorganismes présents dans l'eau de rivière (**Zheng et Hwang, 2006**).

La vitesse d'agitation semble également influencer grandement le pourcentage d'élimination du malathion. Ce facteur physique agit vraisemblablement, en favorisant le contact du substrat (malathion dans notre cas) avec la surface des cellules bactériennes, augmentant ainsi son taux de dégradation.

Partie V:

**Application de différents
modèles cinétiques
d'inhibition dans le
traitement du malathion
par les boues activées**

L'inhibition exercée par le substrat peut être un facteur limitant dans le traitement des composés toxiques au sein des systèmes de traitement tel que le système par boues activées. Il est donc nécessaire d'évaluer cette inhibition, et surtout, de prévoir son action. Ceci passe par la détermination notamment, de la concentration du substrat au-delà de laquelle la biodégradation cesse.

La modélisation mathématique peut être un outil d'aide à la compréhension du processus de traitement biologique. Différents modèles mathématiques ont été conçus pour tenter de quantifier l'effet inhibiteur exercé par les substrats toxiques sur leur propre transformation, ou bien encore d'exprimer les cinétiques de croissance des microorganismes soumis à l'effet inhibiteur de leur substrat. La majorité de ces modèles ont été calqués sur les modèles décrivant l'inhibition par le substrat des réactions enzymatiques, impliquant la constante d'inhibition K_i .

De nombreuses études ont abordé l'étude cinétique de la dégradation de différents composés toxiques aussi bien par des culture pures que mixtes (Saravanan et al., 2008; Dey et Mukherjee, 2010; Mathura et Majumder, 2010; Salehi et al., 2010; Hasan et al., 2012). Il n'existe cependant pas, à notre connaissance, de travaux réalisés sur l'évaluation des modèles cinétiques portant sur l'effet inhibiteur du malathion sur sa propre biodégradation. L'objectif de ce chapitre est donc de déterminer sur le plan statistique, le modèle cinétique le plus à même de décrire l'inhibition de la biodégradation du malathion en utilisant des boues activées.

1. Matériel et méthodes

1.1. Composition du milieu de culture

Le milieu minéral utilisé pour la croissance de la biomasse contenue dans les boues activées est celui proposé par Barik et al. (1984) dont la composition est décrite dans la partie II de l'étude.

Les différents essais ont été menés dans des volumes de 500ml comprenant 250ml de milieu minéral cité ci-dessus, additionné de malathion à différentes concentrations comprises entre 5mg/l et 140mg/l et inoculés avec 250ml de boues activées à 4000mg/l de biomasse exprimée en MVS. La concentration finale de biomasse est de 2000mg/l.

1.2. Description des différents modèles cinétiques testés

Dans cette partie de notre étude, huit modèles différents ont été appliqués. Ces derniers ont été choisis parmi ceux cités dans la littérature décrivant l'inhibition de la biodégradation par excès de substrat.

L'équation d'Andrews (**Edwards, 1970**) (Equation 10), basée sur le taux spécifique de croissance, est l'un des modèles les plus communément appliqués et ce, en raison notamment de la simplicité de sa formulation mathématique et au fait qu'il décrit le mieux, les cinétiques de l'inhibition de la croissance des microorganismes.

$$\mu_x = \mu_{xmax} \times S / (K_s + S + (S^2 / K_i)) \quad (10)$$

Avec K_s , K_i , μ_x , μ_{xmax} et S désignant respectivement la constante de demi-saturation (mg/l) (constante d'affinité pour le substrat), la constante d'inhibition (mg/l), le taux spécifique de croissance (1/h), le taux spécifique maximum de croissance (1/h) et la concentration du substrat (mg/l). La forme correspondante de l'équation décrivant l'utilisation du substrat s'écrit comme suit (Equation 11) :

$$r_s = r_{smax} \times S / (K_s + S + (S^2 / K_i)) \quad (11)$$

Avec r_s et r_{smax} désignant respectivement le taux de dégradation spécifique du substrat (1/h) et le taux spécifique maximum de dégradation du substrat (1/h).

Webb (**Edwards, 1970**) a proposé une forme modifiée du modèle d'Andrews en dérivant son modèle des cinétiques enzymatiques en intégrant l'effet allostérique sous forme d'une constante adimensionnelle (β) (Equation 12).

$$r_s = r_{smax} \times S ((1 + (\beta \times S / K_i)) / (K_s + S + (S^2 / K_i))) \quad (12)$$

Le modèle élaboré par Teissier (**Edwards, 1970**) se propose de prédire l'effet inhibiteur du substrat mais à de fortes concentrations (Equation 13).

$$r_s = r_{smax} \times (\exp(-S/K_i) - \exp(-S/K_s)) \quad (13)$$

Yano et Koga (1969) proposent un modèle basé sur une étude portant sur la fermentation de substrats en mode continu sujette à une inhibition de la croissance cellulaire induite par les concentrations élevées des substrats limitants tel que le glucose. La formulation du modèle en considérant le taux spécifique de dégradation du substrat est donnée par l'équation 14.

$$r_s = r_{smax} \times (S / (K_s + S + S^2/K_i + (S^3/K_i \times K))) \quad (14)$$

Où K (mg/l) est une constante positive.

Le modèle développé par **Aiba et al. (1968)**, montré dans l'équation 15, est un modèle exponentiel décrivant l'inhibition par le substrat. Il s'agit d'une corrélation empirique entre le taux spécifique de dégradation du substrat et la concentration initiale du substrat. Cependant, les valeurs simulées par le modèle dans les conditions d'inhibition, corroborent assez bien celles obtenues expérimentalement.

$$r_s = (r_{smax} \times S \times \exp(-S/K_i)) / (K_s + S) \quad (15)$$

Luong (1987) a développé un modèle appliqué spécifiquement à l'inhibition de la croissance de la levure *Candida utilis* ATCC 8205 par le butanol. L'expression de ce modèle en considérant le taux spécifique de dégradation du substrat utilisé est montrée dans l'équation 16.

$$r_s = (r_{smax} \times S / (K_s + S)) (1 - (S/S_l))^n \quad (16)$$

Où S_l (mg/l) représente la concentration du substrat au-delà de laquelle on observe un arrêt net de l'utilisation du substrat et n est une constante empirique adimensionnelle.

Han et Levenspiel (1988) proposent un modèle non linéaire généralisé décrivant des cinétiques de croissance de cultures à des concentrations de substrat inhibitrices et intégrant également un effet inhibiteur exercé par le produit (Equation 17).

$$r_s = r_{smax} \times S \times (1 - (S/S_I))^n / (S + K_s \times (1 - (S/S_I))^m) \quad (17)$$

Où n et m sont des constantes empiriques adimensionnelles.

Le modèle d'inhibition élaboré par **Tseng et Wayman (1975)** décrit l'effet de la concentration de différents substrats (alcool éthylique, acide acétique, acétate d'éthyle et le butanol) sur la croissance de deux espèces de *Saccharomyces* en mode batch. L'expression de leur modèle en fonction du taux spécifique de dégradation du substrat est montrée dans l'équation 18.

$$r_s = (r_{smax} \times (S/K_s + S)) - K_i \times (S - S_I) \quad (18)$$

L'ensemble des modèles décrits ci-dessus, considèrent que les substrats testés à de fortes concentrations agissent comme des inhibiteurs de leur propre dégradation et donc de la croissance cellulaire, mais que utilisés à de faibles concentrations, ils activent au contraire leur propre anabolisme et par la même le développement cellulaire.

1.6. Méthodes analytiques

1.6.1. Détermination de la concentration du malathion

La détermination de la concentration du malathion a été réalisée par la méthode de **Naidu et al. (1990)** (voir partie II).

1.6.2. Estimation de la concentration de biomasse

La détermination de la concentration cellulaire a été effectuée par la mesure de la MVS exprimée en mg/l (voir partie II).

1.6.3. Méthode de résolution des modèles testés

Les équations des modèles testés ont été résolues par une méthode de régression non linéaire. Le logiciel *Statistica Release 7.0* (StatSoft Inc.) a été choisi pour analyser les données expérimentales. Ce logiciel utilise la méthode d'estimation non linéaire des moindres carrés (algorithme de Levenberg et Marquardt) pour minimiser la somme des carrés des résidus, autrement dit, les écarts entre les valeurs expérimentales et celles prédites par les différents modèles.

2. Résultats et discussion

2.1. Cinétique de la biodégradation du malathion

Les valeurs expérimentales du taux spécifique de biodégradation du malathion ainsi que celles prédites par les différents modèles sont montrées dans la figure 30. S'agissant d'abord des valeurs expérimentales, il est à noter que le taux spécifique d'élimination du malathion varie en fonction de la concentration initiale de ce dernier. Les valeurs croissantes de ce paramètre pour les concentrations comprises entre 5mg/l et 80mg/l, indiquent une absence d'inhibition de la biodégradation du pesticide. Le taux spécifique maximum de dégradation ($0,046 \cdot 10^{-2}$ 1/h) est obtenu à 80 et 120mg/l de malathion. Cependant, à 140mg/l, le taux spécifique de dégradation diminue clairement, suggérant un effet inhibiteur exercé par le malathion sur sa propre dégradation à cette concentration.

Par ailleurs, parmi l'ensemble des modèles testés, seuls les modèles d'Andrews et, Yano et Koga semblent décrire de façon appropriée les valeurs expérimentales obtenues. Ceci est confirmé par la valeur du R^2 et la valeur p (Tableau XVII). Il est à noter cependant que le modèle de Teissier et celui de Aiba et al. ne semblent pas appropriés.

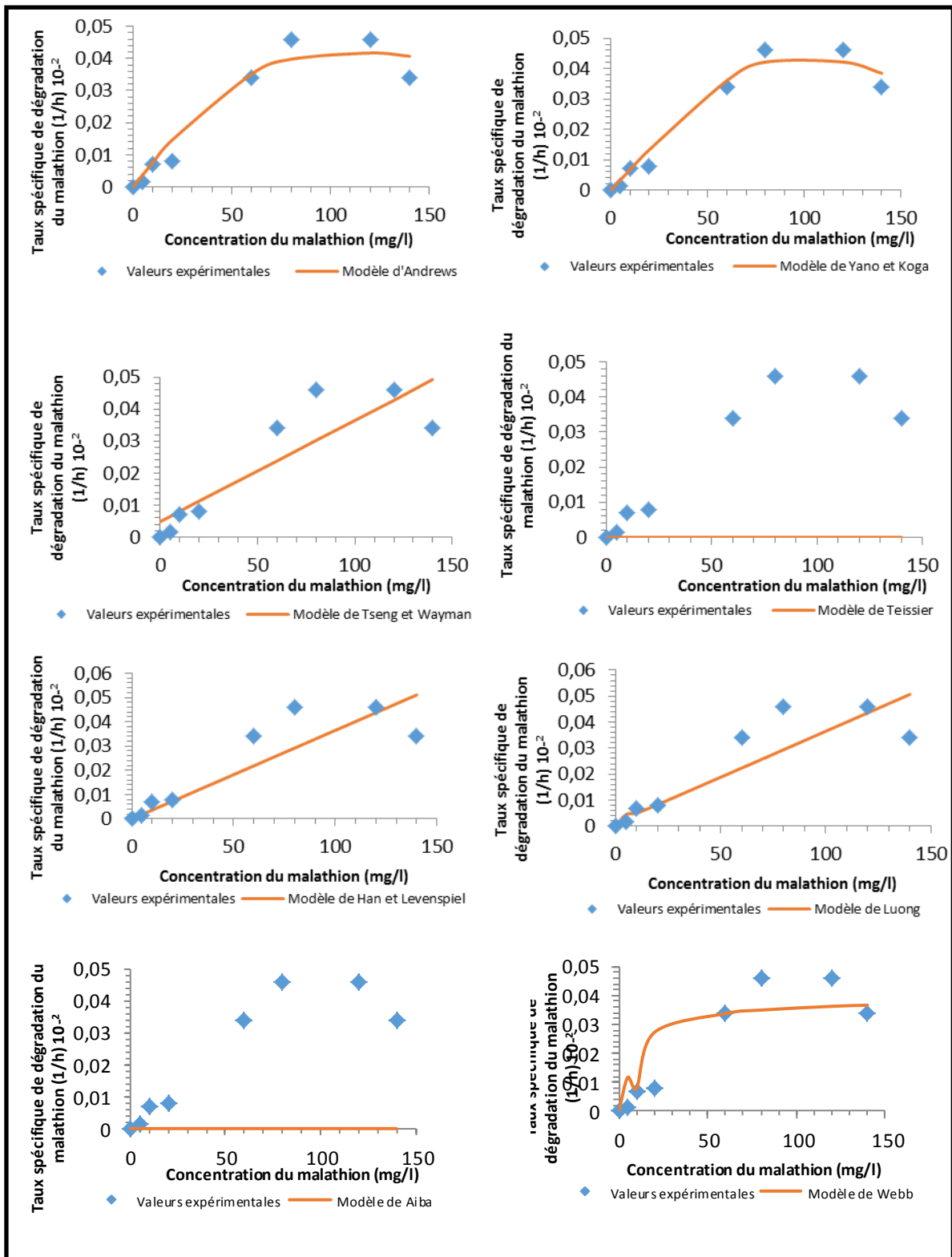


Figure 30 : Variation des valeurs expérimentales et celles prédites par les différents modèles testés du taux spécifique de dégradation à différentes concentrations du malathion (5mg/l-140mg/l) (Concentration initiale de biomasse (2000mg/l), pH=6, température=25°C±1°C).

Les critères statistiques, la valeur p et le coefficient de détermination (R^2) ont été appliqués pour le choix du modèle le plus approprié pour décrire la cinétique de dégradation du malathion. Les valeurs de p inférieures à 0,05 signifient que la variable indépendante (concentrations initiales de malathion) peut être utilisée pour prédire la variable dépendante (taux spécifique de dégradation du malathion). Par ailleurs, les valeurs de R^2 proches de 1 indiquent que le modèle testé est une bonne description de la relation entre les variables indépendantes et dépendantes.

En considérant le coefficient de détermination (R^2), on constate que parmi les différents modèles cinétiques testés, ceux d'Andrews ($R^2 = 0,97$) et de Yano et Koga ($R^2 = 0,98$) sont les plus appropriés dans le sens que les valeurs du taux spécifique de dégradation du malathion prédites par ces deux modèles cinétiques sont les plus proches de celles obtenues expérimentalement. Ce sont donc ceux qui décrivent le mieux l'inhibition de la dégradation du malathion en mode batch par les microorganismes présents dans les boues activées testées.

Par ailleurs, la valeur p inhérente au modèle cinétique d'Andrews est inférieure à celle déterminée pour le reste des modèles. Ceci nous amène à conclure que le modèle cinétique d'Andrews est le plus approprié pour décrire la cinétique de dégradation du malathion par les boues activées.

En se basant sur ces mêmes critères, il est à noter que le modèle cinétique de Teissier et celui de Aiba et al., ne sont pas valides statistiquement pour décrire l'inhibition de la biodégradation du malathion. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux modèles ont été développés et utilisés pour décrire l'effet inhibiteur du substrat sur la croissance de souches microbiennes pures.

Tableau XVII : Les coefficients de détermination et les valeurs p inhérents aux différents modèles cinétiques appliqués à la dégradation du malathion.

Modèle	R^2	p^a
Andrews (Edwards, 1970)	0,97	0,00016
Yano et Koga (1969)	0,98	0,00048
Han et Levenspiel (1988)	0,89	0,0079
Luong (1987)	0,89	0,0072
Tseng et Wayman (1975)	0,9	0,027
Webb (Edwards, 1970)	0,89	0,03
Teissier (Edwards, 1970)	0,00	1
Aiba et al. (1968)	0,00	1

^a Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significatives.

Les valeurs des paramètres cinétiques des différents modèles d'inhibition testés sont listées dans le tableau XVIII. Ces résultats révèlent une différence significative entre les valeurs des paramètres suivants : r_{smax} , K_s , K_i d'un modèle à l'autre. Cette différence peut être due au fait que les modèles cinétiques testés dans la présente étude diffèrent par leur origine de développement. Chacun ayant été appliqué, avec succès, à la croissance d'un type d'organisme donné sous certaines conditions.

Selon le modèle cinétique de Han et Levenspiel, celui de Luong et al. et celui de Tseng et Wayman, les valeurs de la concentration critique d'inhibition (S_i) au-delà de laquelle la biodégradation du malathion cesse sont faibles : 0,11 ; 0,13 et 0,0033mg/l de malathion, respectivement. Dans notre cas, ces valeurs ne reflètent pas la situation réelle de la dégradation du malathion, car comme évoqué dans la partie II, la dégradation du malathion est importante à des concentrations beaucoup plus élevés (60mg/l et 100mg/l, notamment). Ceci vient confirmer l'inapplicabilité de ces trois modèles dans la description de la cinétique d'inhibition de la dégradation du malathion.

Par ailleurs, les valeurs du paramètre K_s inhérentes au modèle d'Andrews et celui de Yano et Koga, indiquent que la biomasse testée présente une faible affinité pour le malathion.

La constante d'inhibition K_i représente la concentration du substrat à laquelle la croissance cellulaire ou la dégradation du substrat sont réduits de 50% par rapport au taux spécifique maximum de croissance ou au taux spécifique maximum de dégradation du

substrat. La valeur de ce paramètre permet d'avoir une idée sur l'ampleur de l'inhibition exercée par le substrat mais aussi, le degré de toxicité du substrat à l'égard des microorganismes en culture. En effet, une faible valeur du K_i indique que les microorganismes présentent une sensibilité élevée à l'inhibition par le substrat. Les valeurs de ce paramètre obtenues par le modèle d'Andrews et celui de Yano et Koga (respectivement 2,72 et 6,25) indiquent que l'effet inhibition du malathion sur sa propre dégradation intervient à de faibles concentrations de ce dernier, suggérant une forte inhibition exercée par le pesticide.

Tableau XVIII : Valeurs estimées des paramètres cinétiques associés aux différents modèles cinétiques utilisés.

Modèle	Valeurs estimées des paramètres cinétiques							
	r_{smax} (1/h) 10^{-2}	K_s (mg/l)	K_i (mg/l)	K (mg/l)	S_l (mg/l)	n	m	β
Andrews (Edwards, 1970)	2,96	2318	2,718	-	-	-	-	-
Yano et Koga (1969)	58,7	87806	6,25	3,6	-	-	-	-
Han et Levenspiel (1988)	0,1	0,1	-	-	0,11	1	1	-
Luong (1987)	0,018	2,89	-	-	0,13	1	-	-
Tseng et Wayman (1975)	0,067	0,16	1,42	-	0,0033	-	-	-
Webb (Edwards, 1970)	1,2	3326	0,78	-	-	-	-	0,05
Teissier (Edwards, 1970)	^a	^a	^a	-	-	-	-	-
Aiba et al. (1968)	^a	^a	^a	-	-	-	-	-

^a Valeurs indéterminées.

Il est à mentionner qu'il n'existe pas d'études portant sur la détermination des paramètres cinétiques liés à la dégradation biologique du malathion. Il y a cependant des études comparant différents modèles cinétiques de l'inhibition exercée par différents substrats. Ainsi, **Carrera et al. (2004)** rapporte que le modèle cinétique d'Aiba est le modèle le plus approprié pour décrire l'inhibition par les ions ammoniums de la réaction de nitritation dans deux systèmes différents (biomasse libre et immobilisée), alors que l'équation de Haldane (similaire à celle d'Andrews) s'avère la plus appropriée pour décrire l'inhibition par les ions nitrites de la réaction de nitrification dans ces mêmes systèmes.

De même, le modèle de Haldane semble également décrire avec succès la cinétique de dégradation du styrène par un système de boues activées d'origine industrielle (**Babaee et al.,**

2010). Par ailleurs, **Agarry et al. (2008)** ont pour leur part, étudié la cinétique de dégradation du phénol par une culture mixte de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Ils ont montré que le modèle de Yano et Koga est le plus adéquat pour décrire la cinétique de biodégradation de ce composé, mais selon **Dey et Mukherjee (2010)**, la cinétique de biodégradation de ce même composé par une culture microbienne mixte de boues activées est expliquée par le modèle de Haldane. Ce même modèle s'avère également le plus adapté pour décrire la biodégradation de l'hydroquinone et le catéchol par des boues activées acclimatées au p-nitrophénol (**Pramparo et al., 2012**). D'autre part, le modèle cinétique de Luong et celui de Han et Levenspiel semblent être les modèles les plus appropriés pour expliquer la biodégradation du *m*-crésol par des boues activées (**Saravanan et al., 2009**).

Conclusion

L'utilisation intensive et parfois abusive des pesticides dans l'agriculture moderne pose de sérieux problèmes pour l'environnement et pour la santé en général. Le contrôle de la pollution générée par ces composés ainsi que leur élimination deviennent donc impératifs. Il est par conséquent important de porter un intérêt tout particulier à leur capacité à être dégradé ainsi qu'aux voies de cette dégradation. Aussi, ce travail a eu pour objectif d'étudier la dégradation du malathion : un organophosphoré très largement utilisé, par des boues activées préalablement acclimatées au pesticide.

Nous avons tout d'abord entrepris l'étude, en mode batch, de l'influence de la concentration initiale du pesticide sur sa propre dégradation et aussi l'effet de substrats carbonés additionnels sur le rendement de dégradation.

La faisabilité du traitement du malathion par cette culture mixte adsorbée sur trois supports différents (ARC, ARP et GO), a également été étudiée.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons montré le potentiel des boues activées utilisées à dégrader le malathion testé à différentes concentrations (5mg/l - 140mg/l). Cependant, les concentrations du pesticide de 120mg/l et 140mg/l semblent avoir un effet inhibiteur sur sa propre biodégradation.

L'adjonction du moût de rebuts de dattes et de la mélasse comme sources de carbone additionnelles a induit une amélioration significative de la biodégradation du malathion, indiquant l'influence de ces sous-produits sur le catabolisme du pesticide. La mélasse semble être la plus indiquée pour l'élimination du pesticide, permettant ainsi d'atteindre un taux d'élimination de 92% au bout de 75h d'incubation.

Des recherches supplémentaires sont, cependant, nécessaires pour établir la faisabilité de l'application de ces deux substrats carbonés dans les stations de traitement des eaux contaminées par le malathion.

L'analyse par GC-MS révèle la présence d'un métabolite unique correspondant au malathion monoacide. Ce dernier résulterait de l'action de la carboxyestérase qui semble être très active chez les microorganismes testés.

Par ailleurs, nous avons noté que les microorganismes testés étaient capables d'utiliser le malathion comme leur unique source de phosphore mais pas comme leur unique source de soufre.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les performances des grignons d'olives (GO) comme adsorbant de la biomasse. En effet, l'utilisation de ce support organique a permis une dégradation complète du pesticide testé à 10mg/l au bout de 12h d'incubation seulement. Ceci serait en rapport avec la quantité relativement élevée de biomasse adsorbée

sur ce support. Les avantages liés à ce sous-produit (disponibilité, gratuité, capacité élevée à fixer la biomasse) font de lui un matériau adsorbant prometteur dans l'élimination du malathion.

L'étude de l'influence des paramètres expérimentaux sur l'élimination du malathion a révélé que les facteurs température, concentration initiale de biomasse et vitesse d'agitation présentaient des effets statistiquement significatifs sur le rendement d'élimination du malathion. L'effet le plus important est associé au facteur température qui semble avoir une influence négative sur l'élimination du pesticide. D'autre part, la production de biomasse semble être influencée par les quatre facteurs testés ; l'effet le plus important est associé au facteur concentration initiale de biomasse qui présente une influence positive sur la réponse considérée.

L'application de différents modèles cinétiques d'inhibition à la biodégradation du malathion a révélé que les modèles cinétiques d'Andrew et, de Yano et Koga, semblent les plus indiqués pour décrire la cinétique d'inhibition de la biodégradation du malathion par l'effet de sa propre concentration.

En guise de perspectives, ce travail gagnerait à être approfondi par :

-L'identification avec précision, par séquençage des gènes des ARN_r 16S, des souches bactériennes impliquées dans la dégradation du malathion.

-L'extraction et la caractérisation des enzymes impliquées dans l'hydrolyse du pesticide.

-L'étude approfondie du phénomène d'inhibition de la dégradation du pesticide mis en évidence dans cette étude.

-L'optimisation et la modélisation du traitement du pesticide par les boues activées, en appliquant la méthode des plans pour surface de réponse.

Références bibliographiques

- **Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N., (2011)**, Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane, *Chemosphere*, **82** , 56-63.
- **Agarry S.E., Solomon B.O., Layokun S.K., (2008)**, Kinetics of batch microbial degradation of phenol by indigenous binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, *African Journal of Biotechnology*, **7**, 2417-2423.
- **Agbekodo K.M., Legube B., Dard S., (1996)**, Atrazine and simazine removal mechanisms by nanofiltration: influence of natural organic matter concentration, *Water Research*, **30**, 2535-2542.
- **Aiba S., Shoda M., Nagalani M., (1968)**, Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, **10**, 845-864.
- **Alphyte, (2013)**, Alphyt.com, formulation et commercialisation de produits phytosanitaires, <http://alphyt.com/?p=chiffre&lang=fr>
- **Amir S., (2005)**, Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Thèse de docteur en Sciences Agronomiques, Institut national polytechnique de Toulouse.
- **Babae R., Bonakdarpour B., Nasernejad B., Fallah N., (2010)**, Kinetics of styrene biodegradation in synthetic wastewaters using an industrial activated sludge, *Journal of Hazardous Materials*, **184**, 111-117.
- **Barik S., Munnecke D. M., Fletcher J. S., (1984)**, Bacterial degradation of three dithioate pesticides, *Agricultural Wastes*, **10**, 81-94.
- **Boeglin J. C., (1999)**, Lutte contre la pollution de l'eau, inventaire des traitements, Technique d'Ingénieur, G1250.
- **Bollag J.M., Liu S.Y., (1990)**, Biological transformation processes in pesticides, in Cheng, H.H., ed., *Pesticides in the soil environment: Processes, impacts, and modeling*: Madison, Wis., Soil Science Society of America, 169-211.
- **Bottomley P., Baker G., (1982)**, Determination of residues of synthetic pyrethroids in fruits and vegetables by gas. liquid and high performance liquid chromatography, *Analyst*, **107**, 206-212.
- **Bouvier G., Blanchard O., Momas I., Seta N., (2006)**, Environmental and biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides: application to occupationally and non-occupationally exposed adult populations. *Journal of exposure Science and Environmental Epidemiology*, **16**, 417-426.
- **Bouziane, (2000)**, L'eau de la pénurie aux maladies par, Edition Iben Kheldoune.

- **Brányik T., Vicente A. A., Machado Cruz J. M., Teixeira J. A., (2001)**, Spent grains- a new support for brewing yeast immobilisation, *Biotechnology Letters*, **23**, 1073-1078.
- **Buitron G., Gonzales A., Lopez-Marin L.M., (1998)**, Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria, *Water Science and Technology*, **37**, 371-378.
- **Burrows H.D., Canle M.L., Santaballa J.A., Steenken S., (2002)**, Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **67**, 71-108.
- **Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.-P., Coquet Y., (2005)**, Les pesticides dans le sol conséquences agronomiques et environnementales, (Eds.), France agricole, Paris.
- **Carmard J.-P., Magdalaine C., (2010)**, Produits phytosanitaires, risques pour l'environnement et la santé, connaissance des usages en zones non agricole, http://www.iauidf.fr/fileadmin/Etudes/etude_672/Produits_phytosanitaires._Risques_pour_l_environnement_et_la_sante_avec_signets.pdf
- **Carrera J., Jubany I., Carvalho L., Chamy R., Lafuente J., (2004)**, Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems, *Process Biochemistry*, **39**, 1159-1165.
- **Christie A.E., (1969)**, Effects of insecticides on algae, *Water Sewage Works*, **116**, 172-176. Cité dans: **Laveglia J., Dahm P.A., (1977)**, Degradation of organophosphorus and carbamate insecticides in the soil and by soil microorganisms, *Annual Review of Entomology*, **22**, 483-513.
- **Cluzeau S., Patunelle M. C., Lhoutellier C., (2000)**, Index phytosanitaire, Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris, 644 p.
- **Comeau Y., Hall K.J., R. E. W. Hancock R.E.W., Oldham W.K., (1986)**, Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal, *Water Research*, **20**, 1511-1521.
- **CORPEN, (1993)**, Programme d'action contre la pollution des eaux par les produits phytosanitaires provenant des activités agricoles, brochure, http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN_1993_10_programme_action_pollution_eau_phyto_resume.pdf
- **Desjardins R., (1997)**, Le traitement des eaux, 2^{ème} édition, Ed. Ecole polytechnique de Montréal, Canada, 303p.
- **Dey S., Mukherjee S., (2010)**, Performance and kinetic evaluation of phenol biodegradation by mixed microbial culture in a batch reactor, *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering*, **2**, 40-49.

- **Dictionnaire environnement (2010)**, <http://www.dictionnaire-environnement.com/>
- **Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques (D.P.V.C.T), (2003)**, Index des produits phytosanitaires à usage agricole, Algérie.
- **Dumas D.P., Caldwell S. R., Wild J. R., Raushel F. M., (1989)**, Purification and properties of then phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *The Journal of Biological Chemistry*, **26**, 19659-19665.
- **Edberg S., Rice E., Karlin R. Allen M., (2000)**, *Escherichi Coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection, *Journal of Applied Microbiology*, **29**, 106-116.
- **Edwards V. H., (1970)**, The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics, *Biotechnology and bioengineering*, **12**, 679-712.
- **El-Sharnouby G.A., Al-Eid S.M., Al-Otaibi M.M., (2009)**, Utilization of enzymes in the production of liquid sugar from dates, *African Journal of Biochemistry Research*, **3**, 41-47.
- **El-Sharnouby G.A., Al-wesali M.S., Al-Shathri A.A., (2007)**, Effect of some drying methods on quality of palm date fruits powder, *The Fourth Symposium on Date Palm in Saudi Arabia*, King Faisal University.
- **Elskens Marc, 2010-** Analyse des eaux résiduaires, mesure de la pollution, Technique d'ingenieur.
- **Environnement Canada, (2001)**, (3 juin 2001). « Les produits antiparasitaires à usage agricole et l'atmosphère », bulletin *science et environnement* dans le site d'Environnement Canada, http://www.ec.gc.ca/science/sandeoct01/article3_f.html (consultation le 31 mars 2006). Cité dans : Tellier S., 2006. Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses, Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 90 p.
- **FAO, (2003)**, Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticide (version révisée), Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, http://www.clcpro-empres.org/fr/pdf/code_gestion_pesticides.pdf
- **FAO, (2013a)**, Food and Agriculture Organization, Statistical databases, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/pesticides/E>
- **FAO, (2013b)**, Food and Agriculture Organization, Statistical databases, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/dates/E>
- **FAO/OMS, (1972)**, Evaluations of some pesticide residues in food, Série de l'OMS sur les résidus de pesticides, n° 2, Organisation mondiale de la santé, Genève.

- **Fournier J., (1988).** Chimie des pesticides. Culture et techniques. Agence de coopération culturelle et technique, Edition Trois moutiers, Vienne.
- **Gendraul S., (2004),** Etude d'un traitement combiné bio-physique-chimique pour la décontamination des eaux polluée en atrazine, Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Lyon, France. N° d'ordre 2004ISAL0045, [en ligne] <http://theses.insa-lyon.fr/publication/2004ISAL0045/these.pdf>
- **Gilliom R.J., Barbash J. E., Crawford C. G., Hamilton P. A., Martin J.D., Nakagaki N., Nowell L. H., Scott J.C., Stackelberg P.E., Thelin G. P., Wolock D. M., (2006),** The Quality of Our Nation's Waters-Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992–2001, U.S. Geological Survey Circular 1291, 172 p., <http://pubs.usgs.gov/circ/2005/1291/pdf/circ1291.pdf>
- **Goda S. K., Elsayed I. E., Khodair T. A., El-Sayed W., Mohamed M. E., (2010),** Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria, *Biodegradation*, **21**, 903-913.
- **Goupy J., (2006),** Les plans d'expériences, *Revue MODULAD*, **34**, 74-116.
- **Goupy J., Creighton L., (2006),** Introduction aux plans d'expériences, 3^{ème} Edition, l'usine nouvelle, Dunod, Paris.
- **Gouzy A., Farret A., (2005),** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Rapport d'étude, N°INERIS-DRC/MECO-CGR-143/2005-AGo [en ligne] http://www.ineris.fr/centredoc/rap_restitution_sphair_1_2.pdf
- **Guiraud J.P., (1998),** Microbiologie alimentaire, Edition Dunod, France.
- **Gupta N., Kushwaha H., (2011),** Date Palm as a Source of Bioethanol Producing Microorganisms, In: Date Palm Biotechnology, Jain S.M., Al-Khayri J.M., Johnson D.V. (Eds.), Springer Science + Business Media BV, 711-727.
- **Han K., Levenspiel O., (1988),** Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition, *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 430-437.
- **Harir M., (2008),** Phototransformation de l'imazox en milieu aqueux par excitation directe et indirecte, étude cinétique et caractérisation des photoproduits. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, Agdal, Rabat, <http://www.sagepesticides.qc.ca/Infos/UtilisationRationnelle.aspx>
- **Hasan S.A., Wietzes P., Janssen D.B., (2012),** Biodegradation kinetics of 4-fluorocinnamic acid by a consortium of *Arthrobacter* and *Ralstonia* strains, *Biodegradation*, **23**, 117-125.

- **Horne I., Sutherland T. D., Harcourt R. L., Russell R. J., Oakeshott J. G., (2002),** Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3371-3376
- **HSDB, (1998),** Hazardous Substances Data Bank. *US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE*. Adresse : CCHST (Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail), Hamilton, Ontario.
- **ICSC, (1995),** Fiches Internationales de Sécurité Chimique, N° ICSC : 0172 N° CAS : 121-75-5.
- **INSPQ, (2002),** Institut National de Santé Publique- Evaluation des risques toxicologiques associés à l'utilisation d'adulticides dans le cadre d'un programme de lutte vectorielle contre la transmission du virus du nil occidental, Canada. <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/bs53199>
- **ISO (1984),** Water quality -- Detection and enumeration of faecal streptococci -- Part 1: Method by enrichment in a liquid medium. International Organization for Standardization 7899-1:1984.
- **ISO (1998),** Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and wastewater. International Organization for Standardization 7899-1:1998.
- **ISO (1987),** Microbiology -- General guidance for enumeration of yeasts and moulds – Colony count technique at 25 degrees C. International Organization for Standardization 7954:1987.
- **ISO (1988),** Water quality -- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* -- Part 1: Method by enrichment in liquid medium. International Organization for Standardization 8360-1:1988.
- **ISO (1990),** Water quality -- Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* -- Part 2: Multiple tube (most probable number) method. International Organization for Standardization 9308-2:1990.
- **ISO (1999),** Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. International Organization for Standardization 6888-1:1999.
- **ISO (1999),** Water quality -- Enumeration of culturable microorganisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. International Organization for Standardization 6222:1999.

- **ISO (2003)**, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. International Organization for Standardization 15213:2003.
- **ISO, (1986)**, Water quality - Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) - Part 2: Method by membrane filtration. International Standard ISO **6461-2**: 1986, International Organization for Standardization, Geneva.
- **Jafari A.R., Sarrafzadeh M.H., Alemzadeh I., Vosoughi M., (2007)**, Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*, *Journal of Biological Sciences*, **7**, 270-275.
- **Journal Officiel de la République Algérienne, (2006)**, Décret exécutif n° 93 – 160 réglementant les rejets d'effluents liquides, 24 Rabie El Aouel 1427-23.
- **Kamal Z. M., Fetyan N. A. H., Ibrahim M. A., El Nagdy S., (2008)**, Biodegradation and detoxification of malathion by of *Bacillus thuringiensis* MOS-5, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **2**, 724-732.
- **Kanazawa J., (1987)**, Biodegradability of pesticides in water by microbes in activated sludge, soil and sediment, *Environmental Monitoring and Assessment*, **9**, 57-70.
- **Kargi F., Konya I., (2007)**, Para-chlorophenol containing synthetic wastewater treatment in an activated sludge unit: effects of hydraulic residence time, *Journal of Environmental Management*, **84**, 20-26.
- **Kaur I., Mathur R. P., Tandon S. N., Dureja P., (1997)**, Identification of metabolites of malathion in plant, water and soil by GC-MS, *Biomedical Chromatography*, **11**, 352-355.
- **Larson R. A., Weber E. J., (1994)**, Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry, CRC Press, Inc.
- **Lauwergs R., (1992)**, Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle, Edition Masson, Paris.
- **Ludvigsen G.H., (2006)**, The Agricultural Environmental Monitoring Program in Norway – JOVA, Nordic workshop on pesticide monitoring in the environment, Uppsala, February 2006, http://www.ust.is/ness/pest/Gro_Hege.pdf
- **Luong J.H.J., (1987)**, Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 242-248.
- **Manuel sur l'Environnement, (1996)**, Catalogue des Normes Antipollution GTZ/BMZ, **3**, <http://www.greenstone.org/greenstone3/nzdl;jsessionid=F5872DCFFB914CBB0306A7659225C310?a=d&c=envl&d=HASH01641ab8b30de64c0b511048&dt=hierarchy&p.a=b&p.s=ClassifierBrowse>.

- **Martin, H., (2000)**, Classe de modes d'action des herbicides. Fiche technique ISSN 1198 7138, N° 00-062, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales de l'Ontario (MAAARO), 2000. <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/00-062.htm>
- **Masmoudi M., Besbes S., Chaabouni M., Robert C., Paquot M., Blecker C., Attia H., (2008)**, Optimization of pectin extraction from lemon by product with acidified date juice using response surface methodology, *Carbohydrate Polymers*, **74**, 185-192.
- **Mathur A.K., C. B. Majumder C.B., (2010)**, Kinetics Modelling of the Biodegradation of Benzene, Toluene and Phenol as Single Substrate and Mixed Substrate by Using *Pseudomonas putida*, *Chemical and Biochemical Engineering. Quarterly*, **24**, 101-109.
- **Matsumura F., Boush G.M., (1966)**, Malathion degradation by *Trichoderma viride* and a *Pseudomonas* species, *Science*, **153**, 1278-1280.
- **Medkour M., (2003)**, Réutilisation des eaux usées épurées. Séminaire sur le secteur de l'eau en Algérie. Ministère des Ressources en eau. 12 p.
- **Merhi M., (2008)**, Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000732/01/merhi.pdf>
- **Metiche M., (2004)**, Environnements : phénomènes de pollution et techniques de protection. Centre universitaire Bechar ; Algérie.
- **Michaud S., (2001)**, Etude hydrodynamique et biologique d'un procédé de méthanisation à biofilm : le réacteur à lit tubulé inversé. Thèse de Doctorat, INSA, Toulouse, 174p.
- **Miller G.L., (1959)**, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- **Mostafa I.Y., Fakhr I.M.L., Bahig M.R.E., E1-Zawahry Y.A., (1972)**, Metabolism of Organophosphorus Insecticides XIII. Degradation of Malathion by *Rhizobium* spp., *Archiv für Mikrobiologie*, **86**, 221-224.
- **Munnecke D. M., Johnson L. M., Talbot H. W., Barik S. (1989)**, In biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants, A. M. Chakrabarty, ed. CRC Press.
- **Musbah I., Cicéron D., Saboni A., Alexandrova S., (2013)**, Retention of pesticides and metabolites by nanofiltration by effects of size and dipole moment, *Desalination*, **313**, 51-56.
- **Naidu U. V., Gangaiah T., Ramadevi P., Sessaiah K., Naidu G. R. K., (1990)**, Photometric determination of malathion with molybdenum, *Talanta*, **37**, 761-762.

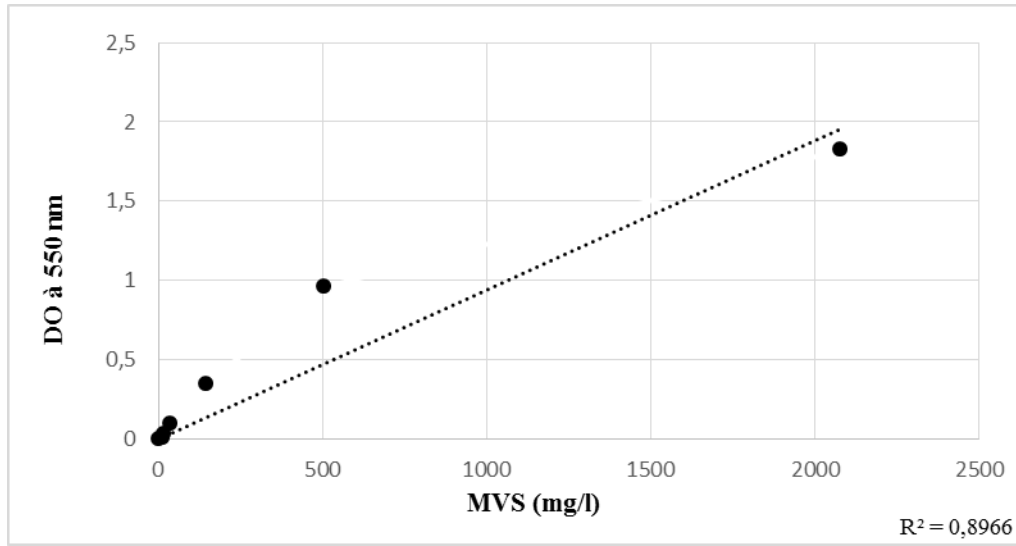
- **Nancib A., Nancib N., Meziane-Cherif D., Boubendir A., Fick M., Boudrant J., (2005),** Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Bioresource Technology*, **96**, 63-67.
- **Nancib N., Nancib A., Boudrant J., (1997),** Use of waste date products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces Cerevisiae*, *Bioresource Technology*, **60**, 67-71.
- **Navacharoen A., Vangnai A.S., (2011),** Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent-tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **65**, 818-826.
- **NF EN, (2002),** Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Method by membrane filtration. European Standards NF EN12780: 2002, European Committee of Standardization.
- **Nicolino F., Veilerette F., (2006).** Pesticides : révélation sur un scandale français, ed. Fayard, Paris, 68p.
- **OCDE, (2004),** Agriculture et environnement : enseignements tirés de dix ans de travaux de l'OCDE, <http://www.oecd.org/fr/croissanceverte/agriculturedurable/indicateursetpolitiquesagro-environnementaux/33914112.pdf>
- **OMS, (2004),** Centre des medias, <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2004/np19/fr/>
- **ORP, (2010),** Observatoire des Résidus de Pesticides, <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=103>
- **Ould El Hadj D. M., (2001),** Etude comparative de la productivité d'alcool brut de dattes selon les variétés. *Recherche Agronomique, INRA*, **9**, 91-99.
- **Pons M. N., Belhani M., Bourgois J., Dupuit E., (2008),** Analyse du cycle de vie, épuration des eaux usées urbaines, *Technique d'Ingénieur*, G 5 820.
- **Pramparo L., Suárez-Ojeda M.E., Pérez J., Carrera J., (2012),** Kinetics of aerobic biodegradation of dihydroxybenzenes by a p-nitrophenol-degrading activated sludge, *Bioresource Technology*, **110**, 57-62.
- **Prats C., Giro A., Ferrer J., Lopez D., Vives-Rego J., (2008),** Analysis and IBM simulation of the stages in bacterial lag phase: Basis for an updated definition, *Journal of Theoretical Biology*, **252**, 56-68.
- **Ramadevi C., Nath M.M., Prasad M.G., (2012),** Mycodegradation of malathion by a soil fungal isolate, *Aspergillus Niger*, *International Journal of Basic and Applied Chemistry Sciences*, **2**, 108-115.

- **Rumeau A., (2005)**, Evaluation des risques sanitaires des pesticides détectés lors de la campagne de mesure, http://www.observatoirepesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/093308867629291609869092558160/ATMO_Auvergne_Risque_sanitaire_2006.pdf
- **Sabre R., (2007)**, Plans d'expériences- Méthode de Taguchi, Techniques de l'Ingénieur, Paris.
- **Sahinkaya E., Dilek F.B., (2005)**, Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge - Evaluation of biokinetic coefficients, *Environmental Research*, **99**, 243-252.
- **Salehi Z., Sohrabi M., Vahabzadeh F., Fatemi S., Kawase Y. (2010)**, Modeling of p-nitrophenol biodegradation by *Ralstonia eutropha* via application of the substrate inhibition concept, *Journal of Hazardous Materials*, **177**, 582-585.
- **Saravanan P., Pakshirajan K., Saha P., (2008)**, Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor, *Bioresource Technology*, **99**, 205-209.
- **Saravanan P., Pakshirajan K., Saha P., (2009)**, Batch growth kinetics of an indigenous mixed microbial culture utilizing m-cresol as the sole carbon source, *Journal of Hazardous Materials*, **162**, 476-481.
- **Sculhof P., (1999)**, Les problèmes posés par les pollutions organiques diffuses. L'exemple des pesticides. Association Scientifique et Technique pour l'Eau et l'Environnement, TSM, n° 2, <http://www.astee.org/publications/tsm/presentation/accueil.php?niv=2.1>
- **Serdar C.M., (1996)**, Hydrolysis of cholinesterase inhibitors using parathion hydrolase. U.S. patent, **5**, 589-386.
- **Shimazu M., A. Mulchandani A., W. Chen W., (2001)**, Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, **76**, 318-324.
- **Singh A. K., Seth P. K., (1989)**, Degradation of malathion by microorganisms isolated from industrial effluents, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **43**, 28-35.
- **Singh B., Kaur J., Singh K., (2012)**, Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* PU, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**, 1133-1141.
- **Singh B.K., Walker A., (2006)**, Microbial degradation of organophosphorus compounds, *FEMS Microbiology Reviews*, **30**, 428-471.
- **Sorour M.H., Shaalan H.F., (2013)**, Removal of malathion using ceramic nanofiltration/adsorption system, *Desalination and Water Treatment*, **51**, 5009-5013.

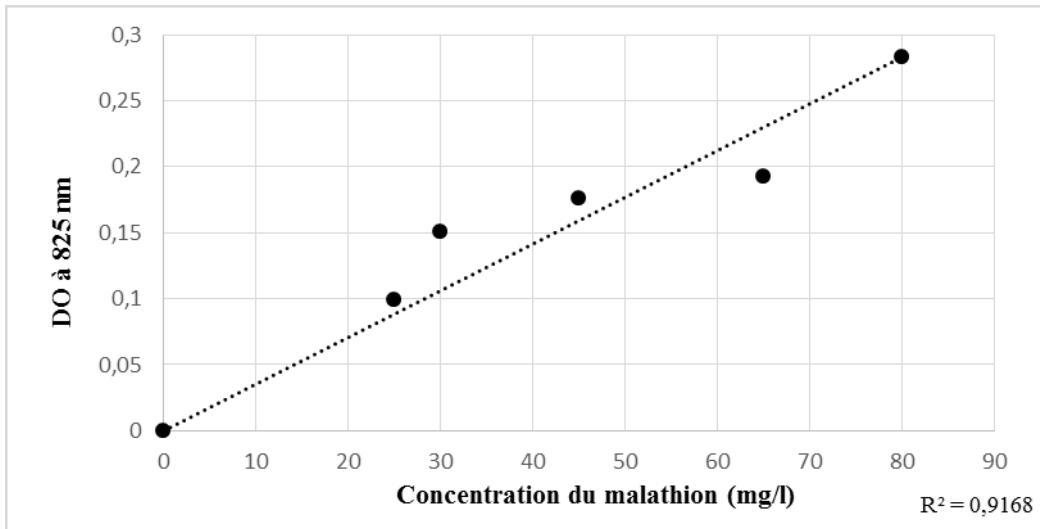
- **Standing Committee of Analysts, (2006)**, The microbiology of Drinking Water - Part 9- methods for the isolation and enumeration of *Salmonella* and *shigella* by selective enrichment membrane filtration and multiple tube-most possible number techniques. Methods for the examination of waters and associated materials, Environment Agency.
- **Subramanian G., Sekar S., Sampooram S., (1994)**, Biodegradation and utilization of organophosphorus pesticides by Cyanobacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **33**, 129-143.
- **Tepe O., Dursun A. Y., (2008)**, Combined effects of external mass transfer and biodegradation rates on removal of phenol by immobilized *Ralstonia eutropha* in a packed bed reactor, *Journal of Hazardous Materials*, **151**, 9-16.
- **Tinsson W., (2010)**, Plans d'expérience : constructions et analyses statistiques, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Tomlin C.D.S., (1997)**, The pesticide manual, a world compendium, the british crop protection council, Farnham, Surrey, UK, 1606 p.
- **Tseng M.M.-C., Wayman M., (1975)**, Kinetics of yeast growth, inhibition-threshold substrate concentrations, *Canadian Journal of Microbiology*, **21**, 994-1003.
- **Wang J., Sommerfeld M.R., Lu C., Hu Q., (2013)**, Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation, *Algae*, **28**, 193-202.
- **Wang T., (1991)**, Assimilation of malathion in the indian river estuary, *florida*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **47**, 238-243.
- **Wen J., Gao D., Zhang B., Liang H., (2011)**, Co-metabolic degradation of pyrene by indigenous white-rot fungus *Pseudotrametes gibbosa* from the northeast China, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **65**, 600-604.
- **WHO, (2003)**, WHO specifications and evaluations for public health pesticides, malathion, http://www.who.int/whopes/quality/en/Malathion_july04.pdf
- **WHO, (2004)**, Malathion in Drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Report WHO/SDE/WSH/03.04/103, WHO, Geneva, Switzerland, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/malathion.pdf
- **Wijffels R.H., Schepers A.W., Smit M., de Gooijer C.D., Tramper J., (1994)**, Effect of initial biomass concentration on the growth of immobilized *Nitrosomonas europaea*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 153-157.
- **Xie S., Liu J. X., Li L., Qiao C. L., (2009)**, Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates, *Journal of Environmental Sciences*, **21**, 76-82.

- **Yano T., Koga S., (1969)**, Dynamic behavior of the chemostat subject to substrate inhibition, *Biotechnology Bioengineering*, **11**, 139-153.
- **Zhang Y., Pagilla K., (2010)**, Treatment of malathion pesticide wastewater with nanofiltration and photo-Fenton oxidation, *Desalination*, **263**, 36-44.
- **Zheng Y., Hwang H.-M., (2006)**, Effects of temperature and microorganisms on malathion transformation in river water, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **76**, 712-719.
- **Zohri A.-N.A., Etnan M.M., (2000)**, Ethanol production from dates in Saudi Arabia on industrial scale, *Mycobiology*, **28**, 76-81.

Annexes



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration de la biomasse.



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration du malathion.

Annexe 3 : Composition des milieux de cultures utilisés

Bouillon nutritif lactosé

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de gélatine 5,0 g
- Extrait de viande 3,0 g
- Lactose 5,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,2

Eau peptonée exempte d'indole

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2

Eau peptonée tamponnée

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique dodécahydraté.....9,0 g
- Phosphate monopotassique1,5 g

Gélose au cétrimide

Pour 1 litre de milieu de base :

- Peptone pancréatique de gélatine 20,0 g
- Cétrimide 0,3 g
- Chlorure de magnésium 1,4 g
- Sulfate de potassium 10,0 g
- Agar agar bactériologique..... 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2

Gélose de Baird Parker

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone..... 10,0 g
- Extrait de viande 5,0 g
- Extrait autolytique de levure 1,0 g
- Pyruvate de sodium 10,0 g
- Glycine..... 12,0 g
- Chlorure de lithium..... 5,0 g
- Agar agar bactériologique..... 15,0 g
- Emulsion de jaune d'œuf 47,0 ml
- Tellurite de potassium à 3,5% 3,0 ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2

Gélose de Chapman au mannitol

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone..... 5,0 g
- Peptone pepsique de viande 5,0 g
- Extrait de viande 1,0 g
- Mannitol 10,0 g
- Chlorure de sodium 75,0 g

- Rouge de phénol 25,0 mg
 - Agar agar bactériologique..... 15,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2

Gélose Hektoen

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande12,0 g
 - Extrait autolytique de levure.....3,0 g
 - Lactose12,0 g
 - Saccharose12,0 g
 - Salicine2,0 g
 - Sels biliaires9,0 g
 - Chlorure de sodium.....5,0 g
 - Thiosulfate de sodium.....5,0 g
 - Citrate ferrique ammoniacal1,5 g
 - Bleu de bromothymol65 mg
 - Fuchsine acide.....40 mg
 - Agar agar bactériologique.....13,5 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2

Gélose King A

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone..... 20,0 g
- Agar purifiée 12,0 g
- K₂SO₄ (anhydre)..... 10,0 g
- MgCl₂ (anhydre).....1,4 g

Gélose nutritive

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone..... 5,0 g
 - Extrait de viande 3,0 g
 - Agar agar bactériologique.....12,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2

Gélose viande foie

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone viande-foie30,0 g
 - Glucose.....2,0 g
 - Amidon soluble2,0 g
 - Sulfite de sodium2,5 g
 - Citrate de fer ammoniacal0,5 g
 - Agar agar bactériologique.....11,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2

Milieu BEA (gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....17,00 g
- Peptone pepsique de viande3,00 g
- Extrait autolytique de levure.....5,00 g

- Bile de bœuf bactériologique10,00 g
 - Chlorure de sodium.....5,00 g
 - Esculine1,00 g
 - Citrate ferrique ammoniacal0,50 g
 - Azide de sodium0,15 g
 - Agar agar bactériologique.....13,00 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,1

Milieu BHIB (Brain-heart infusion broth) : Bouillon cœur-cerveille

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait cœur-cerveille17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique2,5 g
- Glucose.....2,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2

Milieu BLBVB (bouillon lactosé bilié au vert brillant)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....10,0 g
- Bile de boeuf bactériologique.....20,0 g
- Lactose.....10,0 g
- Vert brillant.....13,3 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2

Milieu OGA (Gélose Glucosée à l'Oxytétracycline)

Pour 1,1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure.....5,0 g
- Glucose.....20,0 g
- Oxytétracycline.....0,1 g
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,6 ± 0,2

Milieu PCA (Plate Count Agar)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....2,5 g
- Glucose.....1,0 g
- Agar agar bactériologique.....12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2

Milieu Rappaport Vassiliadis

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone papaïnique de soja4,50 g
- Chlorure de sodium7,20 g
- Phosphate monopotassique1,26 g
- Phosphate dipotassique0,18 g
- Chlorure de magnésium anhydre13,40 g
- Vert malachite (oxalate).....36,0 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,2 ± 0,2

Milieu Roth

Pour 1 litre de milieu :

-Polypeptone	20,0 g
-Glucose	5,0 g
-Chlorure de sodium.....	5,0 g
-Phosphate monopotassique.....	2,7 g
-Phosphate dipotassique.....	2,7 g
-Azide de sodium.....	0,2 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $6,8 \pm 0,2$

Milieu sélénite-cystine

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	5,0 g
- Lactose	4,0 g
- Phosphate disodique	10,0 g
- Hydrogénosélénite de sodium.....	4,0 g
- L-cystine.....	10,0 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$

Annexe 4 : Tableau des indices NPP pour 100ml d'échantillon.

Nombres de tubes positifs		NPP Par 100ml	Limites de confiance à 95%	
1 de 50ml	5 de 10ml		Inférieure	Supérieure
0	0	≤ 1		
0	1	1	<1	4
0	2	2	<1	6
0	3	4	<1	11
0	4	5	±	13
0	5	7	2	17
1	0	2	<1	6
1	1	3	<1	9
1	2	6	±	145
1	3	9	2	21
1	4	16	4	40
1	5	> 18		