

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Ecole Nationale Polytechnique d'Alger

Projet de Fin des Etudes en vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur  
d'Etat en Génie de l'Environnement

Thème :

*Aptitude de dégradation du  
bifenthrine par des souches  
bactériennes isolées localement*

Composition du jury :

Etudié par : Souad Boussaid

Présidente : Y. Djemai-Zoghleche, ENP

Rapporteurs : A. Hellal, ENP

A. Namane, ENP

Examinatrices : O. Kitous, ENP

L. Mouzali, Université de Blida

Année Universitaire : 2006/2007

# Remerciements

*Ce modeste travail a été réalisé au niveau de Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement de l'école Nationale Polytechnique dirigé par:*

- *Madame: A.HELLAL, à qui je tiens à exprimer, ma profonde gratitude de m'avoir prodigué ses précieux conseils, ses aides permanentes, ses idées originales, sa compétence et critiques constructives.*

*Merci Madame HELLAL*

- *Monsieur A.NAMANE, à qui je tiens à remercier vivement pour les aides qui m'a fournies le long de mon travail.*

*Merci monsieur NAMANE*

*Je tiens également à remercier :*

*Mademoiselle Y.DJEMAI-ZOGHLECHE, madame O.KITOUS, madame L.MOUZALI, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mes chers enseignants du département de tout le secteur scolaires et universitaires, ainsi que toute personne ayant contribué à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicaces*

A mes très chères parents, à vous que je ne pourrait assez exprimer mon éternel amour, respect et gratitude. Pour votre amour, vos sacrifices, patiences et tendresse. Je vous dédie ce modeste travail en signe de remerciement pour votre aide précieuse, conseils et encouragement.

Que dieu tout puissant vous garde pour nous.

Je dédie ce modeste travail :

-A mes très chers frères : Abd El Kader, Nabil, et l'Arbi.

-A mes très chères sœurs : - Zoulikha et son mari Rachid et ses enfants :Mahfoud, Mounia, Assma, Aniss.

- Naçéra et son mari Said et ses enfants :Mahy Adine, Amina, Iness Farièle.

- Saliha et son mari Khoudir et ses adorables enfants : Mohamed et Brahim.

- Djamilia pour son aide gentillesse et patience, et qui était toujours prés de moi.

A mes amis : Ibtissem, Noura.

A tous mes amis (e), spécialement ceux de laboratoire.

A toute ma famille.

*Souad*

## ملخص:

تطرقنا في عملنا هذا إلى استخدام سبعة أنواع من البكتيريا المعزولة و المعرفة على مستوى مخبر العلوم والتجارب البيئية، وهذا من أجل تقييم القدرة على التخلص البيولوجي لمبيد الحشرات: بيفنترين الكثير الاستعمال في الجزائر.

أخذنا بعين الاعتبار عنصرين: التركيز الأصغر الموقف (ت أم)، التركيز الأصغر القاتل (ت أ ق).

علاقة متبادلة بين "ت أم" و "ت أ ق" غير محققة.

مفاتيح : مبيد حشرات، بيفنترين، بكتيريا، ت أم، ت أ ق .

## Résumé

L'étude a porté sur sept souches bactériennes isolées et identifiées au niveau du Laboratoire des Sciences et Techniques Environnementales (LSTE) pour l'évaluation de la capacité de biodégradation d'un pesticide largement utilisé en Algérie : la bifenthrine.

Deux paramètres ont été considérés: la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) pour déterminer la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes.

Une corrélation entre la CMI et la CMB ne semble pas être vérifiée.

Mots clés : Pesticide, Bifenthrine, Bactéries, CMI, CMB.

## Abstract:

The study was based on seven bacteria stocks isolated and identified at the Sciences and Technics Environmental Laboratory (STEL) to evaluate the capacity of pesticide bifenthrin degradation using two technics based on two parametres: Minimal inhibitor concentration (MIC) and Minimal bactericide concentration (MBC) to determine the sensitivity and the resistance of the studied bacteria.

Key words: Pesticide, Bifenthrin, Bacrerries, MIC, MBC.

## *Liste des tableaux*

<b>Tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I-1:</b> Répartition des pesticides selon les organismes nuisibles cibles.	3
<b>Tableau I-2 :</b> La répartition des pesticides selon leurs natures chimiques.	4
<b>Tableau I-3 :</b> Description des principaux groupes chimiques de pesticides.	4
<b>Tableau I-4 :</b> Le danger des pesticides pour la santé.	6
<b>Tableau I-5 :</b> La persistance de quelques pesticides dans le sol.	8
<b>Tableau I-6 :</b> Biodégradation des quelques pesticides.	11
<b>Tableau-II-1 :</b> La toxicité de la bifenthrine.	14
<b>Tableau IV-1 :</b> Les matériels utilisés	25
<b>Tableau V-1 :</b> les valeurs de $\mu_{\max}$ des souches bactériennes.	31
<b>Tableau V-2 :</b> les valeurs de CMI des souches bactériennes.	32
<b>Tableau V-3 :</b> Détermination de CI50% de différentes souches.	33
<b>Tableau V-4 :</b> Nombre de survivants après traitement par différentes concentrations en bifenthrine (mg/ml de éthanol).	34
<b>Tableau V-5 :</b> Les CMB des souches bactériennes.	34

## *Liste des figures*

<b>Figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure I-1</b> : Schéma conceptuel des voies d'évolution des pesticides.	7
<b>FigureII-1</b> : Formules développées de bifenthrine.	12-13
<b>FigureIII-1</b> : La courbe de croissance d'une bactérie en milieu liquide.	19
<b>Figure II-2</b> : Représente le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance.	22
<b>Figure II-3</b> : Une bandelette (5x50 mm) imprégnée d'un gradient d'antibiotique.	23
<b>Figure III-4:</b> Détermination de CMI et CMB.	23
<b>FiguresV-1:</b> Les courbes de croissances pour les différentes souches en présence du bifenthrine.	29
<b>FigureV-2</b> : Etude de la sensibilité des souches au bifenthrine en fonction de la concentration.	32

*Sommaire*

## **Chapitre I : Généralités sur les pesticides**

I-1-Définition	2
I-2-Classification des pesticides	2
I-3 Consommation	5
I-4-Pathologie et toxicologie	5
I-4-1-Effets et nuisances	5
I-4-2-Les outils de toxicité	5
I-4-3-Effets sur la santé humaine	6
I-5-Devenir et persistance	7
I-6-Réglementation	8
I-7-Techniques d'élimination des pesticides	8
I-7-1-Les procédés chimiques	9
I-7-1-1-L'oxydation à l'ozone O <sub>3</sub>	9
I-7-1-2-La photolyse	9
I-7-2-Les procédés physiques	9
I-7-2-1-L'adsorption	9
I-7-2-2-La rétention membranaire	10
I-7-3-Biodégradation	11

## **Chapitre : II Bifenthrine**

II-1-Définition	12
II-2-Propriétés physiques et chimiques	12
II-3-La toxicité	14
II-4-Le comportement du bifenthrine dans l'environnement	14
II-4-1-Air	14
II-4-2-Eau:	14
II-4-3-Sol	15

## **Chapitre III : Activité bactérienne de dégradation des pesticides**

III-1-Les besoins de croissance	16
III-1-1-besoins élémentaires	16
III-1-1-Croissance : facteurs physico-chimiques	17
III-2-La croissance microbienne	18
III-2-1-Les réactions de métabolisme	18
III-2-2-Croissance des bactéries	18
III-2-2 -1-Expression mathématique de la croissance	19
III-2-2-2-Courbe de croissance	19
III-3-Le phénomène de résistance bactérienne	21
III-3-1-Définition de la résistance bactérienne	21
III-3-2-La résistance des bactéries aux pesticides	21
III-3-3- techniques classiques de la détermination de CMI et CMB	21

## **Chapitre IV : Matériel et Méthodes**

IV-1-Matériel	24
IV-1-1-Matériel biologique	24
IV-1-2- Milieux de culture	24
IV-1-3-Appareils utilisés	25
IV-2- Méthodes	25
IV.2-1-Préparation de la préculture	25
IV-2-2-Etude de la croissance bactérienne	25
IV-2-3-Détermination de la CMI	26
IV-2-4-Détermination de la CMB	26

## **Chapitre IV : Résultats et discussion**

IV-1-Cinétique de croissance	28
IV-2-Détermination de CMI (la concentration minimale inhibitrice)	31
IV-3-Détermination de CMB	33
Conclusion	

# *Introduction Générale*

# *Introduction Générale*

C'est dans les années quarante que les premiers pesticides de synthèse sont apparus sur le marché, avec des résultats très positifs quant à l'augmentation des rendements agricoles. Vingt ans plus tard, les premières accusations d'atteinte à la santé des gens et à l'environnement se firent entendre [1].

Le débat sur les risques encourus et les bénéfices recueillis de la lutte chimique s'est prolongé depuis et l'on a consacré de très nombreux travaux de recherche à mieux connaître l'impact des pesticides sur l'environnement.

Chaque année, 2,5 millions de tonnes de pesticides sont appliqués sur les cultures de la planète. La part qui entre en contact avec les organismes indésirables cibles est minime. La plupart des chercheurs l'évaluent à moins de 0,3%, ce qui veut dire que 99,7% des substances déversées s'en vont « ailleurs » [1].

Notre pays consomme annuellement 6.000 à 10.000 tonnes de pesticides, principalement les insecticides et les fongicides.

Des analyses effectuées dans le centre d'Alger, plus précisément dans la région de Staouéli ont montré la présence de plusieurs pesticides dépassant les valeurs guides préconisées par l'OMS [2].

L'objectif de ce travail est d'étudier la capacité de dégradation du bifenthrine, insecticide et acaricide de la famille chimique des pyréthroides, par sept souches bactériennes isolées et identifiées au niveau du Laboratoire des Sciences et Techniques Environnementales (LSTE) de notre département. Il s'agit de déterminer deux paramètres qui permettent d'évaluer la toxicité du pesticide sur les bactéries: la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

La bifenthrine est largement utilisée en Algérie dans les cultures agricoles comme la pomme de terre et la tomate et il serait donc susceptible de se retrouver dans le sol où il peut s'accumuler et même s'infiltrer et se retrouver dans les nappes phréatiques s'elle n'est pas dégradée.

*Chapitre I*  
*Chapitre I*

*Généralités sur les pesticides*

## Chapitre I

# Généralités sur les pesticides

### ***I-1-Définition***

Le pesticide vient du mot anglais « Pest » qui signifie animal ou plante nuisible à la culture [3].

Dans le langage courant, le terme « pesticide » est interprété comme « polluant d'origine agricole ». Or, les pesticides, terme générique, constituent un ensemble de substances englobant les différents usages domestiques, urbains ou agricoles [4].

La F.A.O (Food and Agriculture Organisation) définit un pesticide toute substance ou association de substances qui sont destinées à repousser, détruire ou combattre :

- les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales.
- les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, ou qui peuvent être administrées aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites [5].

Le pesticide à usage agricole appelé également produit phytosanitaire, produit phytopharmaceutique, agropharmaceutique ou produit de traitement désigne une substance active ou une préparation commerciale constituée d'une ou plusieurs substances actives [6, 7,8].

### ***I-2-Classification des pesticides***

Les pesticides peuvent être classés selon :

- ***la destination (mode d'action)*** : on distingue plusieurs catégories selon la diversité des problèmes posés par les organismes nuisibles (**tableau I-1**) : insecticides, herbicides, fongicides .....
- ***la nature et la structure chimique (tableaux I-2 et I-3)***: on distingue des produits inorganiques (arséniates de cuivre), des produits organiques (Dichlorodiphényltrichloroéthane : DDT), des produits extraits des plantes comme la

Roténone, des produits de synthèses comme le fluvalinate, des médiateurs chimiques et autres.

- **les activités biologiques** : on parle de composés à action purement physique ou de produits à action physiologique ou biochimique.
- **le mode de pénétration** : on distingue les insecticides d'ingestion, d'inhalation et les systémiques qui sont absorbés par les végétaux dont la sève devient toxique pour le translocation interne.
- **l'effet obtenu** : on parle d'insecticides ou de fongicides polyvalents, herbicides totaux, produits sélectifs ou spécifiques.
- **l'utilisation** : les pesticides peuvent être utilisés soit en traitement préventif (prophylactiques) soit en traitement curatif (thérapeutiques) dont l'effet peut être local (topique) ou général (systématique) [9].

**Tableau I-1:** Répartition des pesticides selon les organismes nuisibles cibles [10].

TYPE DE PESTICIDE	CIBLE
Insecticide	Insectes
Herbicide	Mauvaises herbes
Fongicide	Maladies fongiques
Acaricide	Acariens
Algicide	Algues
Avicide	Oiseaux
Bactéricides	Bactéries
Piscicides	Poissons
Molluscicides	Escargots, limaces
Rodenticides	Rats, Souris
Miticides	Mites

**Tableau I-2:** La répartition des pesticides selon leurs natures chimiques [11].

Insecticides	Herbicides	Fongicides
<p><b>Minéraux</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Composés arsenicaux, silice, quartz, magnésium, Soufre</li> <li>- Composés fluorés</li> <li>-Dérivés de mercure, de sélénium</li> <li>- Huile de pétrole</li> </ul> <p><b>Organiques de synthèse</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Organochlorés Organophosphorés</li> <li>- Carbamates</li> </ul> <p><b>Organiques végétaux</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nicotine, Pyrène, Roténone</li> <li>- Véraptrine</li> </ul> <p><b>Fumigants</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bromure de méthyle</li> <li>- Acide cyanhydrique</li> <li>- Sulfure de carbone</li> </ul>	<p><b>Minéraux</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sels de NH<sub>4</sub>, Ca, Cu, Fe, Mg, K, Na, .... etc.</li> <li>- Sous forme de sulfate, nitrate, chlorures, chlorates</li> </ul> <p><b>Organiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Phytohormone</li> <li>- Carbamate</li> <li>- Dérivés de l'urée, des pyrimidines, de l'oxyquinoleine, des thiadiazines et thiazoles.</li> <li>- Triazine et diazine</li> </ul> <p><b>Divers</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dicamba Pichlorame</li> <li>- Paraquat</li> </ul>	<p><b>Minéraux</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sel de Cu</li> <li>- A base de soufre</li> <li>- Composés arsenicaux</li> <li>- Huiles minérales</li> </ul> <p><b>Organométalliques</b></p> <p><i>Organiques naturels ou de synthèse</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Carbamate et dithiocarbamate</li> <li>- Dérivés du benzène, des quinones</li> <li>- Amide, Benzonitriles, Toluidine</li> <li>- Organophosphorés</li> </ul> <p><i>Organiques divers</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Carboxine ;Chloropicrine;</li> <li>Doguanide ;Formol</li> </ul>

**Tableau I-3 :** Description des principaux groupes chimiques de pesticides [12]. []

Nature	Exemples	Types	Effets
<b>Organochlorés</b> (utilisé depuis 1942)	aldrine; chlordane; dicamba; dieldrine; endrine; heptachlore; lindane; méthoxychlore; toxaphène; hexachloro-benzène (HCB); pentachloro-phénole (PCP); DDT	Insecticides; acaricides; HCB et PCP sont des fongicides	Persistants; bioaccumulables; entravent la capacité de reproduction, le développement et la résistance aux agressions environnementales; déprimeurs des systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire.
<b>Organophosphorés</b> (1940)	schradan; parathion; malathion	Insecticides; acaricides	Non persistants, inhibent la cholinestérase, pas très sélectifs, toxiques pour l'homme.
<b>Carbamates</b> (1930) (Utilisé depuis 1955)	carbaryl; methomyl; propoxur; aldicarbe	Fongicides; insecticides; acaricides	Non persistants, inhibiteurs de la cholinestérase, pas très sélectifs, toxiques pour les oiseaux et les poissons.
<b>Phénoxy</b> (Distribution à grande échelle depuis 1946)	2,4-D 2,4,5-T	herbicides	2,4 D : potentiel à causer le cancer chez les animaux de laboratoire, 2,4,5-T : se trouve à la source d'un contaminant toxique, la Dioxine
<b>Pyréthroïdes</b> (Apparus en 1980)	Fenpropanthrine; deltaméthrine; cyperméthrine; Bifenthrine.	insecticides	Spécifiques de la cible, généralement sans toxicité aiguë pour les oiseaux ou les mammifères mais particulièrement toxiques pour les espèces aquatiques.

### ***I-3-Consommation***

Les tonnages ont régulièrement augmenté depuis 60 ans. Ils semblent diminuer dans certains pays en Europe, mais il faut aussi tenir compte du fait qu'à dose ou poids égal, les matières actives d'aujourd'hui, sont beaucoup plus efficaces que celles des décennies précédentes. La France est le 3ème consommateur mondial et le premier européen de pesticides devant l'Allemagne (plus de 120 000 tonnes utilisées en 1999 selon UIPP, rapport 2000) [13].

Les molécules commercialisées évoluent, soit par nécessité de s'adapter aux résistances des insectes, champignons ou végétaux, soit pour remplacer des produits interdits en raison de leur toxicité, soit parce que des molécules jugées plus intéressantes viennent en remplacer d'autres. Les pesticides les plus utilisés (en terme de quantité) sont les désherbants. Le plus vendu et utilisé dans le monde est le glyphosate [14].

### ***I-4-Pathologie et toxicologie***

#### **I-4-1-Effets et nuisances**

L'effet de chaque pesticide est spécifique et il est impossible de détailler les conséquences d'une intoxication par l'un ou l'autre d'entre eux. En outre, si les études épidémiologiques menées ont mis à jour des effets induits par l'ingestion de fortes doses, il est nettement plus délicat de tirer des conclusions quant à l'absorption de faibles quantités. Sur les bases de ces résultats, les normes concernant les concentrations maximales en pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine ont été établies en appliquant le principe de précaution.

On peut cependant établir une liste non exhaustive des effets que l'on peut attribuer aux pesticides : effets tératogènes, mutagènes, cancérigènes (estomac, foie, reins, prostate, thyroïde), atteintes du système nerveux central, troubles de la fertilité,..... [15].

#### **I-4-2-Les outils de toxicité**

Pour en mesurer les effets, des paramètres normalisés d'évaluation de l'impact ont été établis :

- **DJA (*Dose Journalière Acceptable*)** : quantité de produit pouvant être quotidiennement absorbée au cours d'une vie d'homme sans manifestation d'effets secondaires.

- **DL<sub>50</sub> (Dose Létale 50)** : c'est la dose d'une substance provoquant la mort de 50 % d'un lot d'animaux d'expérience. Elle s'exprime en milligramme par kilogramme (mg/kg) de poids vif. Plus une DL<sub>50</sub> est faible plus le produit est toxique (tableau I-4).

- **DES (Dose sans effet)** : c'est la dose la plus élevée d'un produit qui ne provoque aucun effet décelable chez des animaux soumis à expérimentation.

- **LMR (limite maximale de résidus)** : concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées restent commercialisables. Elle s'exprime en mg/kg (ou en ppm). Il existe pour chaque produit des LMR nationales et des LMR internationales qui sont utilisées lors des échanges internationaux [16].

**Tableau I-4 : Le danger des pesticides pour la santé [17,18].**

<i>Classes</i>	<i>DL<sub>50</sub> pour rat (mg/kg)</i>			
	<i>Voie orale</i>		<i>Voie cutanée</i>	
	<i>solides</i>	<i>liquides</i>	<i>solides</i>	<i>liquides</i>
I-a/ Extrêmement dangereux	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
I-b/ Très dangereux	5-50	20-200	10-100	40-400
II / Modérément dangereux	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III / Peu dangereux	>500	>2000	>1000	>4000

#### **I-4-3-Effets sur la santé humaine**

Sur homme, ils sont liés à des intoxications accidentelles aiguës ou chroniques dues à l'inhalation ou au contact cutané de ces substances.

Par ailleurs, l'incorporation des produits phytosanitaires dans la chaîne alimentaire peut conduire au phénomène de bioamplification [19].

- **Toxicité aiguë**

Elle est définie comme étant la cause qui provoque la mort ou de graves troubles physiologiques après un court délai, suite à l'absorption d'une dose assez importante d'un composé nocif, par voie transtégumentaire, pulmonaire ou buccale [12].

- **Toxicité subaiguë**

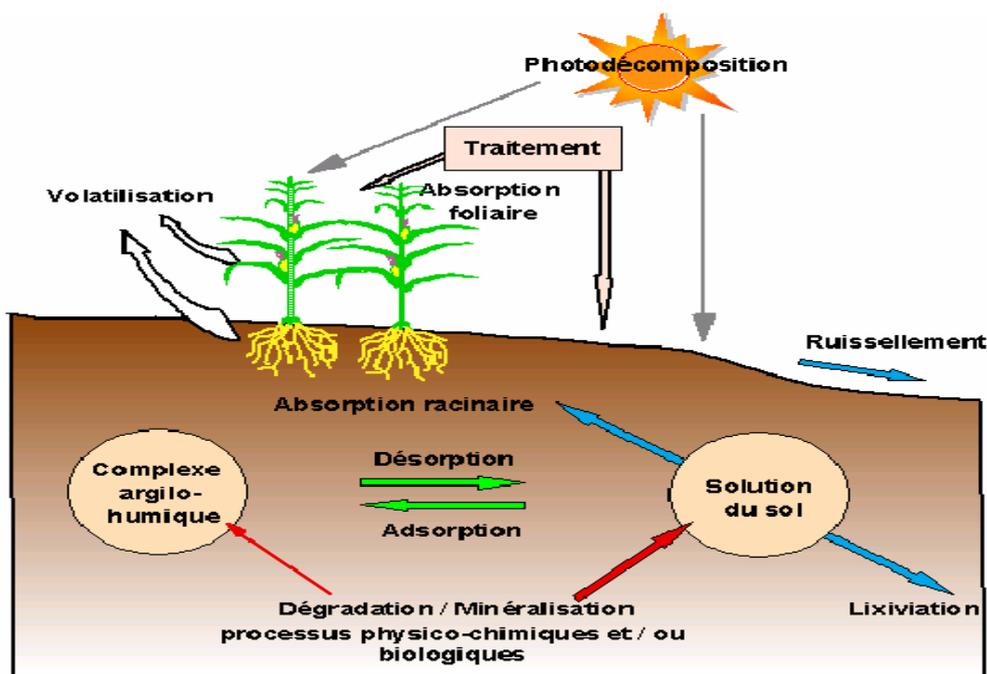
Elle diffère de la précédente par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication.

- **Toxicité à long terme**

Elle concerne les effets toxiques dus à l'exposition à de très faibles concentrations parfois même à des doses infinies, dont la répétition finit par produire des troubles plus insidieux [20].

### **I-5- Devenir et persistance**

Les pesticides se dispersent dans l'air, l'eau et le sol où ils persistent plus ou moins longtemps selon la nature du produit et les conditions du milieu.



**Figure I-1** : Schéma conceptuel des voies d'évolution des pesticides [21].

Les différents processus en jeu dans le devenir des pesticides sont donc (figure I-1) :

- dans le sol, les pesticides sont soumis à des processus de dégradation (voie physico-chimique) et de métabolisation (voie biologique). La persistance dépend aussi des conditions environnementales (température, humidité, pH du milieu, concentration, activité microbienne) [8,21].
- dans l'atmosphère, elle correspond, à la volatilisation. Elle se produit principalement pendant l'application, les quantités de produits qui restent en suspension dépendent de la pression de vapeur des molécules, des coefficients de partage (air / eau, air / phase solide) et

de la température. Une partie de produit se dégrade sous l'action de l'énergie lumineuse par photodécomposition.

- dans l'eau, la contamination des eaux superficielles et des nappes phréatiques. Elle s'opère soit latéralement par ruissellement, soit verticalement par lixiviation. Le transfert de la molécule dans les sols est lié à de nombreux facteurs comme la pente, les caractéristiques de précipitations ou d'irrigation, la stabilité structurale du sol, les pratiques agricoles ou la couverture végétale [21].

Le tableau I-5 présente la persistance de quelques pesticides.

**Tableau I-5 :** La persistance de quelques pesticides dans le sol [20].

<b>pesticide</b>	<b>Persistance (exprimée en temps nécessaire à une disparition de 70-95%)</b>
DDT	4-30 ans
Lindane	3-10 ans
Endosulfane	2 mois-2ans (50%)
Carbofurane	6 mois
Parathione	3-6 mois
2, 4,5 - T (herbicide)	3-5 mois
2,4 - D (herbicide)	4-6 mois

### ***I-6 -Réglementation***

Des normes fixées par les spécialistes de la santé publique suivant un principe de précaution limitent le risque potentiel de l'adsorption d'une substance sur la durée de toute une vie. Les normes les plus utilisées au plan international sont les valeurs guides de l'OMS codifiées par la directive européenne 98/83/CE, du 3 novembre 1998, fixant à 0,10 µg /l la limite de qualité pour chaque pesticide, avec une limite de 0,50 µg/l pour la concentration totale en pesticides [15,22].

### ***I-7-Techniques d'élimination des pesticides***

Trois procédés prévalent dans le traitement des eaux contenant des pesticides

**I-7-1-Les procédés chimiques :** Les POA (Procédés avancés d'oxydation, à l'ozone, au peroxyde d'oxygène)

**I-7-1-1- L'oxydation à l'ozone  $O_3$ :**(un procédé coûteux qui génère des sous produits nocifs).

L'ozone est un oxydant très puissant qui dégrade les molécules avec cependant plus ou moins d'efficacité, cette dernière est variable suivant la famille de pesticides considérée.

En effet, un des facteurs qui influence l'efficacité des réactions d'oxydation est la présence de matière organique qui consomme de l'ozone et des radicaux libres.

La présence de carbonates et de bicarbonates limite l'oxydation des pesticides [15,23].

**I-7-1-2- La photolyse**

Elle est basée sur l'élimination des molécules organiques par une radiation lumineuse qui peut être d'un rayonnement solaire et/ou ultraviolet (UV), à la fin de la filière de traitement. Pour les polluants organiques, la destruction reste fonction de la molécule, de la radiation et de la durée d'exposition [4].

**I-7-2- Les procédés physiques :**

**I-7-2-1- L'adsorption**

L'adsorption est un procédé de rétention et d'affinage. Il permet d'éliminer un grand nombre de pesticides, le Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB), et les mauvais goûts et odeurs [3].

Il existe deux procédés distincts d'adsorption par le charbon actif : l'un utilise le charbon actif en poudre (CAP), l'autre le charbon actif en grains (CAG). Tous les deux reposent sur l'accumulation, à la surface et à l'intérieur du charbon, des matières organiques contenues dans l'eau, par interactions chimiques et physiques.

**a / Charbon actif en poudre (CAP)**

Le charbon actif en poudre est mis en oeuvre par injection de barbotine (mélange eau-charbon en suspension). Cette injection s'effectue en amont dans la filière de traitement afin d'obtenir le temps de contact le plus long possible. Il permet notamment de traiter des pollutions accidentelles [15,24].

### ***b / Charbon actif en grain (CAG)***

Le charbon actif en grains sous forme de granulé ou de bâtonnets, est utilisé dans le cas de pollutions chroniques, mais pour des taux relativement faibles. Afin de ne pas arriver trop rapidement à une saturation du filtre, les concentrations moyennes en pesticides doivent être inférieures à 0,3 µg/l [25].

Comme pour le CAP, il faut éviter que le CAG ne soit complètement saturé, ce qui nécessite une surveillance permanente de la concentration des pesticides en sortie du traitement. En général, on le remplace dès que cette concentration dépasse 0,1 µg/l.

### ***I-7-2-2- La rétention membranaire***

#### ***a / L'ultrafiltration***

L'ultrafiltration permet d'éliminer toutes les particules en suspension, les bactéries et les virus, ainsi que les plus grosses molécules organique. Mais certains pesticides et certaines molécules de plus faible encombrement, ne sont pas retenus. Pour cette raison, du charbon actif en poudre est mélangé à l'eau à traiter. Ces substances s'adsorbent sur les grains de charbon lesquels, trop gros pour passer à travers les pores, sont retenus par les membranes (exploité industriellement en France depuis 1997) [26].

#### ***b / La nanofiltration***

C'est une technique de filtration membranaire, qui se situe entre l'ultrafiltration (membranes de clarification) et l'osmose inverse (membranes de dessalement) [27]. L'efficacité de la nanofiltration dépend non seulement de la structure des membranes, mais aussi de la matrice de l'eau : en effet, la matière organique que celle-ci contient (notamment les composés humiques) permet de former des complexes avec les pesticides à éliminer ; ces macro molécules sont alors plus facilement retenues par les membranes.

Son seul inconvénient technique est que l'eau produite est tellement pure qu'il est nécessaire de la minéraliser, cette technique est utilisée en France depuis 1999.

Son principe est très semblable à celui de l'ultrafiltration, la différence essentielle étant que la membrane de nanofiltration offre une porosité dix fois plus faible, de l'ordre de 0.001 micromètres, constituée de trois couches de matériaux différents [28,29].

### I-7-3-Biodégradation

Le terme biodégradation correspond à la destruction d'une substance organique en produits minéraux simples tels que  $H_2O$ ,  $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO_3^-$ , ou en composés organiques simples tels que  $CH_4$ ,  $CH_3COO^-$  et d'autres produits de fermentation.

#### *a /-Les paramètres de la biodégradation*

La charge polluante biodégradable est quantifiée par différents paramètres :

- **Demande Biologique en Oxygène :DBO<sub>5</sub>**: elle représente la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes pour oxyder la matière organique biodégradable pendant 5 jours.
- **Demande Chimique en Oxygène :DCO** : elle représente la consommation d'oxygène nécessaire à l'oxydation non biologique de l'ensemble des matières organiques [30].

#### *b /-Evaluation de la biodégradation*

Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> donne une première estimation de la biodégradabilité de la matière organique ; on convient généralement des limites suivantes:

- \*  $DCO/DBO_5 < 2$  : l'effluent est facilement biodégradable.
- \*  $2 < DCO/DBO_5 < 3$  : l'effluent est biodégradable avec des souches sélectionnées.
- \*  $DCO/DBO_5 > 3$  : l'effluent n'est pas biodégradable [31].

#### *c /-Biodégradation des pesticides*

Le devenir du pesticide dans l'environnement est affecté par l'activité microbienne. Quelques pesticides sont facilement biodégradables, d'autres ne le sont pas. Un groupe de diverses bactéries appartenant aux genres *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* et *Rhodococcus*, dégradent généralement les pesticides de manière partielle [32,33]. Quelques exemples sont cités dans le tableau I-6

**Tableau I-6 :** Biodégradation des quelques pesticides.

le pesticide	Les bactéries dégradantes	références
bifenthrine	Stenotrophomonas	[34]
permethrine	Aeromonas Erwinia, et Yersinia	[34]
malathion	Cottontail	[35]
carbofuran	Pseudomonas sp, Geotricum candidum	[36]

*Chapitre : III*  
*La Bifenthrine*

## Chapitre : II

# La Bifenthrine

### II-1-Définition

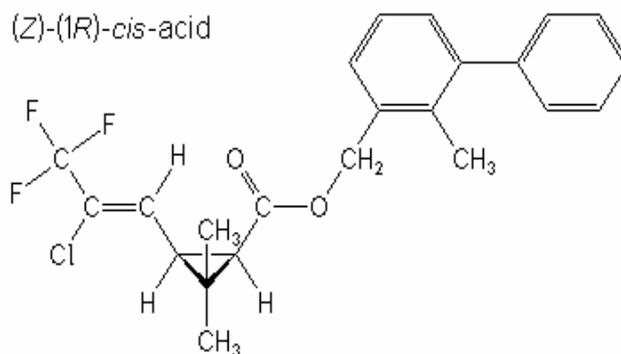
La **bifenthrine** est une substance active de produit phytosanitaire (ou produit phytopharmaceutique, ou pesticide), qui présente un effet insecticide et acaricide, et qui appartient à la famille chimique des pyréthrinoïdes de synthèse [37,38].

Fabriquée aux Etats-Unis, la bifenthrine est sous le nom commercial : TALSTAR [39].

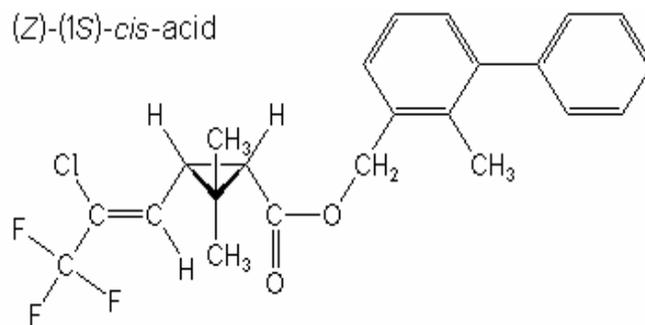
### II-2-Propriétés physiques et chimiques

Bifenthrine de formule générale  $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$ , est une substance brune légère avec une odeur aromatique, soluble dans le chlorure du méthyle, le chloroforme, l'acétone, l'éther et le toluène, et légèrement soluble dans l'heptane, le méthanol et l'éthanol.

La bifenthrine a deux isomères :



2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (1R, 3R)-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate.



2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (1*RS*)-*cis*-3-[(*Z*)-2-chloro-3, 3,3-trifluoroprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate.

**FigureII-1 :** Formules développées de bifenthrine[40].

Les caractéristiques physico-chimiques dont l'ordre de grandeur sont indiqués ci-après, influencent les risques de transfert de cette substance active vers les eaux, et le risque de pollution des eaux :

- **Hydrolyse à pH 7 :** très stable [38].
- **Solubilité :** 0,0001 mg/l [38].
- **Facteur de convention (dans l'air à 25°C) :**  $1 \text{ mg/m}^3 = 0.058 \text{ ppm}$  [41].
- **Masse moléculaire:** 422, 9 g /mol [38,42].
- **Coefficient de partage carbone organique eau :**  $50\ 000 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

Ce paramètre, noté Koc, représente le potentiel de rétention de cette substance active sur la matière organique du sol. La mobilité de la matière active est réduite par son absorption sur les particules du sol.

- **Durée de demi-vie :** 26 jours.

Ce paramètre, noté DT50, représente le potentiel de dégradation de cette substance active, et sa vitesse de dégradation dans le sol.

- **Coefficient de partage octanol-eau :**  $> 6$ .

Ce paramètre, noté log Kow ou log P, mesure l'hydrophile (valeurs faibles) ou la lipophile (valeurs fortes) de la substance active [38,43].

- **Pression de vapeur à 25 °C (mmHg) :**  $1.81 \times 10^{-7}$ [32,43,44].

### ***II-3-La toxicité***

Bifenthrine est modérément toxique pour les mammifères lors de l'ingestion. A grande dose, elle peut causer : incoordination, tremblement, salivation, vomissement, diarrhée, et irritabilité du toucher et de l'odorat.

**Tableau-II-1** : La toxicité de la bifenthrine [38,42].

<b>mammifères</b>	<b>LD<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
rates	54
rats	70
lapins	2
Colvert	2,15
<b>Organismes Aquatiques</b>	<b>LC50 (mg/l)</b>
Daphnie	0,0016
truite 'arc-en- ciel'	0,00015

-Toxicité pour l'homme

Sur le plan de la toxicité pour l'Homme, la dose journalière acceptable (**DJA**) est de l'ordre de : 0,02 mg/kg/j [38].

### ***II-4-Le comportement de la bifenthrine dans l'environnement***

#### **II-4-1-Air**

La bifenthrine se volatilise difficilement lorsqu'elle est appliquée au sol sec, et quelque peu plus haut pour le sol mouillé. Elle peut être trouvée dans l'air attaché aux particules de sol ou comme mouvement de l'aérosol.

#### **II-4-2-Eau:**

La bifenthrine est une molécule non polaire ce qui explique sa faible solubilité dans l'eau.

Elle peut créer une réactivité vers des photolyses aqueuses dont la demi-vie du photolytique varie de 5 jours à 600 jours. La volatilisation dans les eaux de surface est faible.

Bifenthrine peut persister dans l'eau, sol et la matière organique trouvée dans l'eau [43,45].

### **II-4-3-Sol**

La bifenthrine est généralement active dans le sol. Une petite quantité de bifenthrine est absorbée dans le sol par les plantes.

Bifenthrine est immobile dans le sol qui contient des grandes quantités de la matière organique, argile et limon. Sa mobilité est faible dans des sols sablonneux qui ne contiennent pas beaucoup de matière organique.

La demi-vie de bifenthrine peut varier de 7 jours à 8 mois.

La dégradation est dépendante de l'activité microbienne dans le sol.

La cassure principale en bas produits de bifenthrine dans le sol sont : l'alcool 3-phényl-2-méthyle, acide-3-phenylbenzoic-2-méthyles-3-phenylbenzaldehy-2-méthyles-4-hydroxyde de bifenthrine, et acide cis, trans-4-(2-chloro-3, 3,3-trifluoro-1-propenyl)-3,3-dimethylcyclopropanecarboxylic [40].

# Chapitre III

## Activité bactérienne de dégradation des pesticides

## *Chapitre III*

# *Activité bactérienne de dégradation des pesticides*

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires, caractérisés par une structure cellulaire particulière, la structure procaryote, qui est caractérisée par une absence de noyau et d'organites. Ils ne comportent qu'un chromosome.

### *III-1-Les besoins de croissance*

#### **III-1-1-besoins élémentaires**

Les bactéries se multiplient à partir des nutriments présents dans les milieux de cultures. Elles ont toutes un certain nombre de besoins communs, les besoins de base sont appelés besoins élémentaires qui présentent [46, 47,48]:

#### **❖ Source d'énergie :**

Selon le type d'énergie on distingue :

- ✓ Source d'énergie lumineuse : bactéries phototrophes utilisent l'énergie pour la photosynthèse (synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique).

Elle peut faire appel à :

- substrat énergétique minéral : bactéries **photolithotrophes**.
- substrat énergétique organique: bactéries **photoorganotrophes**.

- ✓ Source d'énergie réaction chimique (oxydoréduction): bactéries

**Chimiotrophes.** ; Puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Elles utilisent des donneurs et des accepteurs d'électrons

- substrat énergétique minéral: bactéries **chimiolithotrophes**.
- substrat énergétique organique: bactéries **chimioorganotrophes**.

### ❖ **Source de carbone**

Les exigences nutritionnelles aboutissent à deux grandes catégories. Les uns, capable de se développer en milieu inorganique contenant  $\text{CO}_2$  comme seule source de carbone et les autres des composés organiques pour se reproduire :

- $\text{CO}_2$ : bactéries **autotrophes**.
- Composés organiques: bactéries **hétérotrophes**.

### ❖ **Sources d'azote et besoins en soufre**

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. Quelques bactéries capable de fixer l'azote sous forme de : – N atmosphérique ; et d'autres l'utilisent : – N minéral ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_3$ ) ; – N organique ( $\text{R-NH}_2$ )

Le soufre est incorporé par les bactéries sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques : S minéral ( $\text{SO}_4$ ); S organique (thiol).

➤ D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium, chlore) et dans les réactions enzymatiques (calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines).

## **III-1-2- Croissance: facteurs physico-chimiques [46,47]**

### ✓ **Température**

Selon la température optimale de développement on distingue 3 catégories de bactéries :

- Bactéries **thermophiles**:  $45^\circ\text{C}$ - $65^\circ\text{C}$ .
- Bactéries **mésophiles**:  $30^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ .
- Bactéries **psychrophiles**:  $5^\circ\text{C}$ - $10^\circ\text{C}$ .

### ✓ **pH**

Les bactéries peuvent être classées selon le pH de l'environnement :

- pH 7-7,7 : **neutrophile**.
- pH 6: bactéries : **acidophiles**.
- pH 9: bactéries : **basophiles**.

✓ **Oxygène**

Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

- **Aérobic strict** (ne se développent qu'en présence d'air).
- **Microaérophile** (développent mieux lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air).
- **Aérobic anaérobic facultatif** (se développent avec ou sans air).
- **Anaérobic strict** (absence totale ou presque d'oxygène est le plus souvent toxique).

✓ **Pression osmotique, humidité relative.**

### **III-2-La croissance microbienne**

La croissance bactérienne peut être considérée comme un ensemble de réactions chimiques en chaîne, conduisant à la synthèse de la biomasse microbienne obtenue à la fin de l'opération.

#### **III-2-1-Les réactions de métabolisme**

La métabolisation de la matière organique dans un procédé biologique peut s'écrire par l'équation suivante [49] :

- Matière organique + N + P  $\longrightarrow$  Micro-organismes + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + résidu soluble non dégradable.
- Matière organique + O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + N + P + résidu cellulaire non dégradable.

#### **III-2-2-Croissance des bactéries**

La croissance en milieu liquide peut définir à l'aide des paramètres suivants :

- le temps de génération : G (h)

C'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives :

$$G = \frac{t}{n} \quad (\text{III-1})$$

t : temps.

n : nombre de division.

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

C'est le nombre de division par unité de temps :

$$\mu = \frac{n}{t} \quad (\text{III-2})$$

### III-2-2-1-Expression mathématique de la croissance [46,47] :

C'est le nombre N de bactéries en fonction du n nombre de divisions

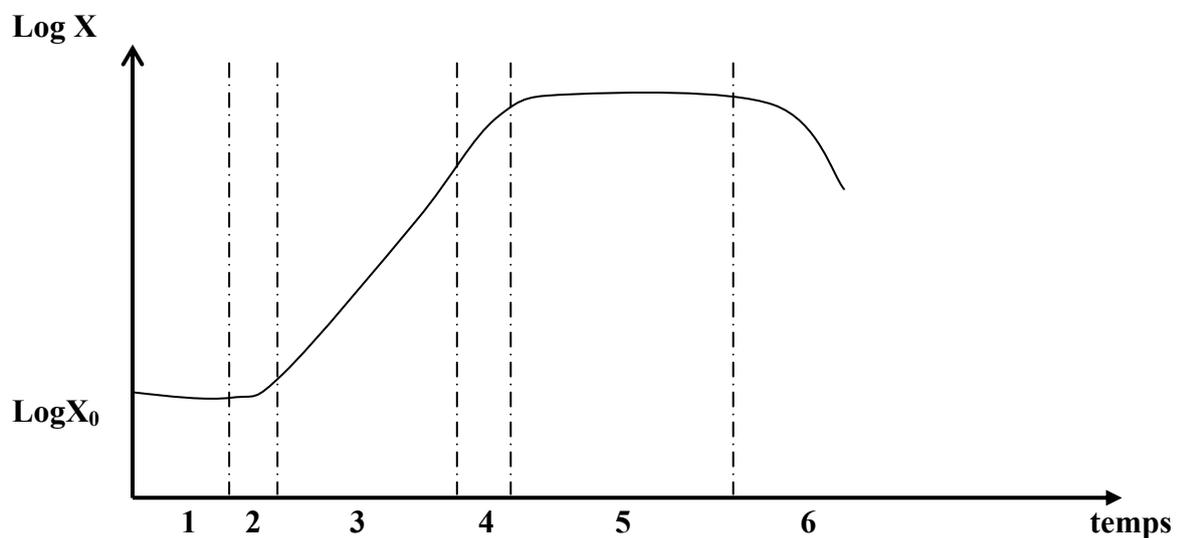
$$N_n = 2 \cdot \mu \cdot t \cdot N_0 \quad (\text{III-3})$$

$N_n$  : nombre de bactéries à temps t.

$N_0$  : nombre de bactéries à temps  $t=0$ .

### III-2-2-2-Courbe de croissance

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide. Il existe 5 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance qui sont :



**Figure III-1** : La courbe de croissance d'une bactérie en milieu liquide [50].

X : concentration cellulaire au temps t.

$X_0$  : concentration cellulaire au temps  $t=0$ .

#### 1 / -La phase de latence

Elle suit immédiatement l'ensemencement d'une petite quantité de culture bactérienne dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle les bactéries synthétisent.

Les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent, Il n'y a pas de division cellulaire:  $N=N_0$  et ( $\mu=0$ ) [47,48].

La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

## **2 / -La phase de départ**

Lorsque la phase d'adaptation précédente est terminée la reproduction cellulaire commence.

La concentration cellulaire augmente, lentement tout d'abord puis plus vite. La vitesse de reproduction augmente, ainsi que la vitesse spécifique de croissance [50].

## **3 / -La phase exponentielle de la croissance**

Lors de cette phase les bactéries se multiplient sans entrave, le taux de croissance est maximal et constant, Elle peut être évaluée simplement par le temps de génération des microorganismes qui prend de la valeur minimale le long de cette phase, cette valeur varie d'un organisme à un autre en fonction des conditions (milieu de culture, température, oxygène, ..... ) [46,47].

## **4 / -Phase de ralentissement**

Dans cette phase la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture de fait de la disparition de un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et accumulation de produits inhibiteurs résultant du métabolisme microbien [50].

## **5 / -Phase stationnaire**

Pendant cette phase le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Le nombre de bactérie viable reste constant, se qui traduit la persistance des bactéries vivantes en absence de tout développement.

(Le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent) [46, 47,50].

## **6 / -Phase de déclin**

Au cours de cette dernière phase, les bactéries ne se divisent plus, Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique) [46, 47,50].

### **III-3-Le phénomène de résistance bactérienne**

Pour qu'un antimicrobien soit actif sur une bactérie, un certain nombre de conditions doivent être remplies : il doit, en premier lieu, pénétrer dans la cellule ; il doit ensuite rencontrer le récepteur ou la cible moléculaire de son action à modifier ou à perturber; enfin, au cours de son contact avec la cellule, il ne doit subir aucune transformation susceptible de l'inactiver [47].

#### ***a- Définition de la résistance bactérienne***

Une bactérie est dite résistance lorsqu'elle est capable de se développer en présence d'un taux antibactérien significativement plus élevé que le taux habituel [46,47].

#### ***b-La résistance des bactéries aux pesticides :***

La résistance aux pesticides est généralement étudiée par la détermination des deux paramètres suivants :

-Concentration minimale inhibitrice (**CMI**) : la plus petite concentration de pesticide qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18-24 heures de culture à 37°C.

-Concentration minimale bactéricide (**CMB**): la plus petite concentration de pesticide laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C.

Ces deux paramètres sont déterminés habituellement pour les antibiotiques [51,52].

#### ***c- Techniques classiques de la détermination de CMI et CMB***

##### **-Techniques de détermination de la CMI**

Différentes techniques dérivent de ces deux mesures; le laboratoire de bactériologie effectuera ces techniques en fonction des différentes étapes de l'analyse bactériologique

## 1/-Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien au contact de concentrations croissantes de l'antibiotique.

-En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antibiotique.

-En milieu solide l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum des souches à étudier [51,52].

## 2/ -Méthodes de diffusion

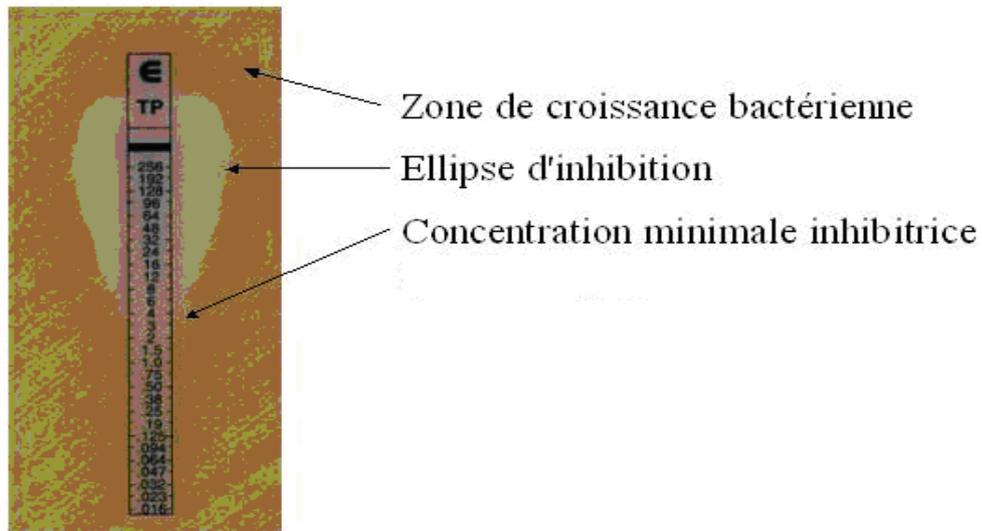
Les méthodes de diffusion sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier [53].



**Figure II-2** : Représente le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance [54].

## 3/-Méthode du E-test.

Une bandelette (5x50 mm) imprégnée d'un gradient d'antibiotique est déposée à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture de la souche à étudier. Après incubation, cette bandelette s'entoure d'une zone d'inhibition ellipsoïdale (d'où le nom E-test). La zone de contact entre la pousse bactérienne et la bandelette indique la CMI [54].

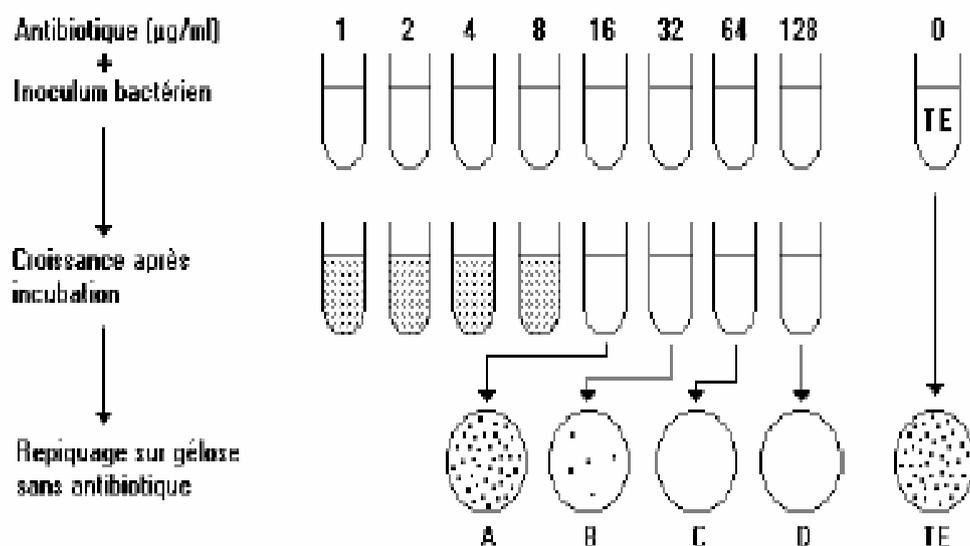


**Figure II-3** : Une bandelette (5x50 mm) imprégnée d'un gradient d'antibiotique [53].

### -La technique de détermination de la CMB

La technique basée sur des numérations bactériennes qui comparent le nombre de bactéries entre l'inoculum de départ et après l'action des antibiotiques. Ces techniques sont le plus souvent réalisées en milieu liquide [52].

La détermination de CMI et CMB seront étudiés en détail dans un chapitre à part.



TE : le témoin.

**Figure III-4:** Détermination de CMI et CMB [55].

*Chapitre IV*  
*Chapitre IV*

*Matériel et Méthodes*

## Chapitre IV

# Matériel et Méthodes

### IV-1-Matériel

#### IV-1-1-Matériel biologique

Sept souches (SE6 SE7 SE8 SB5 SB6 SD7 SC7) provenant de l'eau de Oued El Harrach ont fait l'objet de notre étude. Ces dernières ont été isolées et identifiées au niveau du Laboratoire des Sciences et Techniques Environnementales (LSTE) du département du Génie de l'Environnement (thèse de magister en cours de réalisation).

#### IV-1-2-Milieus de culture

Les milieux de culture contiennent les substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes. Lors de nos manipulations, nous avons utilisé trois milieux [47] :

- **PCA (*Plate Count Agar*) pour un litre d'eau distillée [56]**

- Peptone de caséine :	5g.
- Extrait de levure :	2,5g.
- Glucose:	1g.
- Agar-agar:	15g.

On ajuste le pH du milieu à 7.

- **Bouillon nutritif pour un litre d'eau distillée**

- Peptone de caséine :	10g.
- Extrait de viande :	5g.
- Na cl :	5g.

- **Milieu minéral pour un litre d'eau distillée**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :	1,5g.
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ :	0,5g.
- Na cl :	0,5g.
- $\text{Mg SO}_4$ :	0,5g.
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :	3g.
- Agar-agar:	15g.

On ajuste le pH à 7. Après stérilisation, on ajoute 0,02g de FeSO<sub>4</sub> et 0,02g de CaCl<sub>2</sub> séparément par filtration stérilisante.

**- Stérilisation :**

Les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage à une température de 120°C pendant 20 mn.

**IV-1-3-Appareils utilisés**

Les différents appareils utilisés pour cette étude sont représentés dans le tableau suivant

**Tableau IV-1 : Le matériel utilisé**

<b>Matériel</b>	<b>Type</b>
Agitateur	FISHER BRAND 10511
PH mètre	HANNE INSTRUMENT 211
Spectrophotomètre UV -Visible	SHIMADZU UV MINI-1240
Autoclave	WEBECO-GMPH BAD SCHWARTAU
Filtre stérilisant (0.2µm)	NALGENE
Etuve	MEMMERT UE-400

***IV-2-Méthodes :***

**IV.2-1-Préparation de la préculture**

La préculture est préparée par ensemencement de tubes de bouillon nutritif de 10 ml à partir des souches pures conservées sur gélose inclinée. L'incubation est de 24h à 48h à 37°C.

**IV-2-2-Etude de la croissance bactérienne**

Initialement pour pouvoir déterminer les deux caractéristiques (CMI, CMB), nous avons fait croître différentes souches bactériennes, pour cela le protocole opératoire suivi est :

- ✓ Préparer la préculture 24h avant chaque expérience.
- ✓ Préparer des flacons contenant 100ml de bouillon nutritif et les stériliser à l'autoclave.
- ✓ Mettre dans un bécher 0,2ml de la solution mère de pesticide de concentration 100g/l dans 2ml d'éthanol à l'aide d'une pipette stérile.

- ✓ Prélever à partir de la solution obtenue 0,05; 0,1; 0,2 ml puis les mettre dans les flacons de 100ml de bouillon nutritif respectivement.
- ✓ Déterminer à l'aide d'un spectrophotomètre l'absorbance de chaque flacon à la longueur d'onde 600nm ainsi que l'absorbance de la préculture préparée.
- ✓ Ensemencer le milieu de culture par 2ml de la préculture (ensemencement à 2%).
- ✓ Lire la Densité Optique de chaque flacon.
- ✓ Incuber les flacons à 37°C.
- ✓ Lire la DO des prélèvements effectués à différents intervalles de temps.

#### **IV-2-3-Détermination de la CMI**

On utilise la technique de la *méthode des puits* qui consiste à:

- ✓ Couler stérilement le milieu de culture minéral (maintenu à 45°C) en boîtes de pétri.
- ✓ Après refroidissement, déposer 2 gouttes de préculture.
- ✓ Etaler uniformément la préculture sur la surface de milieu à l'aide d'une pipette râteau.
- ✓ Faire un puits de 6 mm au centre de la boîte de pétri
- ✓ Préparer des dilutions à partir de la solution mère d'une concentration de 100g/l (1ml de pesticide dans 10ml d'alcool).
- ✓ Remplir les puits par 2 gouttes de différentes dilutions.
- ✓ Incuber les boîtes de pétri dans l'étuve à 37°C.
- ✓ Calculer le diamètre de la zone inhibitrice (diamètre d'une zone circulaire stérile ou le pesticide inhibe le développement des bactéries).

#### **IV-2-4-Détermination de la CMB**

La détermination de CMB a été effectuée selon la technique suivante :

- ✓ Préparer des flacons contenant 100ml de bouillon nutritif.
- ✓ Ensemencer le milieu de culture par 2ml de préculture.
- ✓ Ajouter aux flacons les concentrations croissantes (0,2 ; 0,3 ; 0,5; 0,7 ; 0,9 ; 1; 1,5; 1,7; 1,9; 2 ;..) mg/ml à partir de la concentration de pesticide 1ml /10 ml d'éthanol.
- ✓ Incuber les flacons à 37°C pendant 24h.
- ✓ Incorporer stérilement 1 ml de solution de chaque flacon dans une boîte de pétri vide et couler la gélose PCA liquéfiée et maintenue à 45 °C, chaque test est réalisé en double
- ✓ Dénombrer le nombre de colonies apparues après incubation des boîtes de pétri à 37°C.

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) d'une souche bactérienne représente la plus faible concentration de pesticide qui tue 99,99 % de nombre de germes par rapport à un témoin.

# Chapitre V

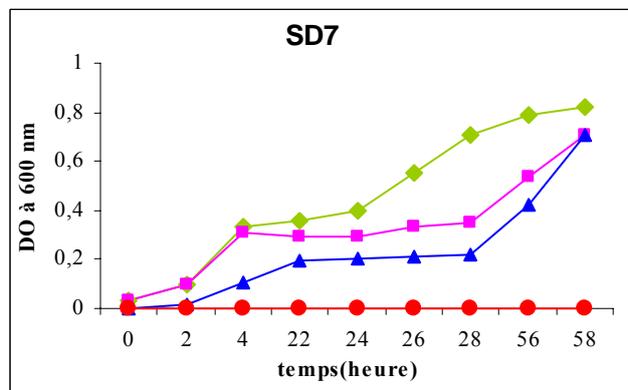
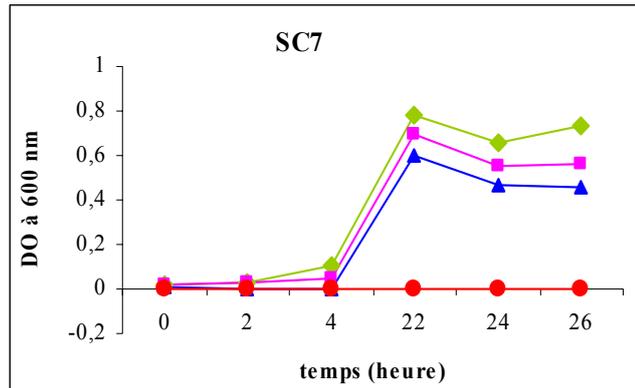
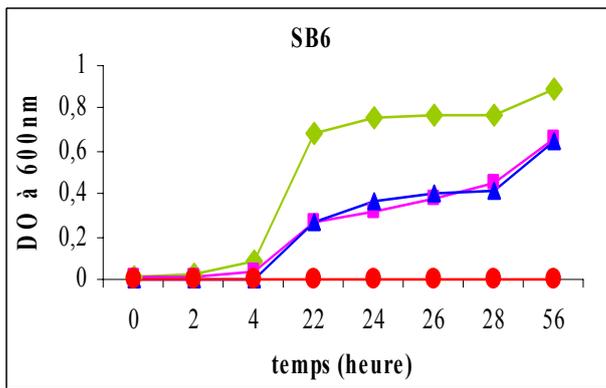
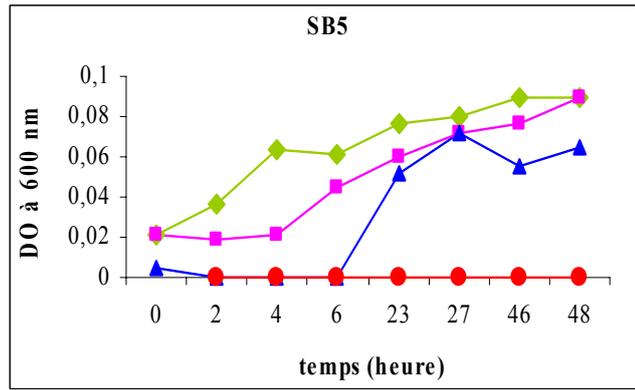
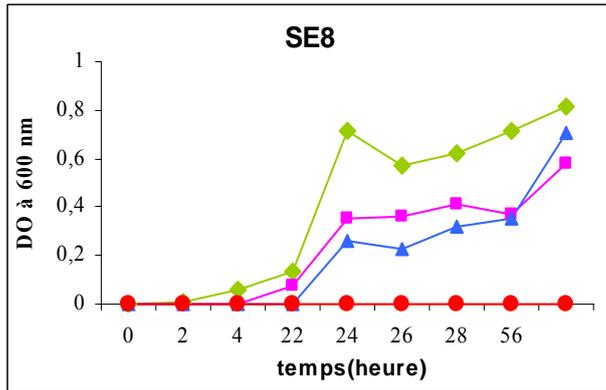
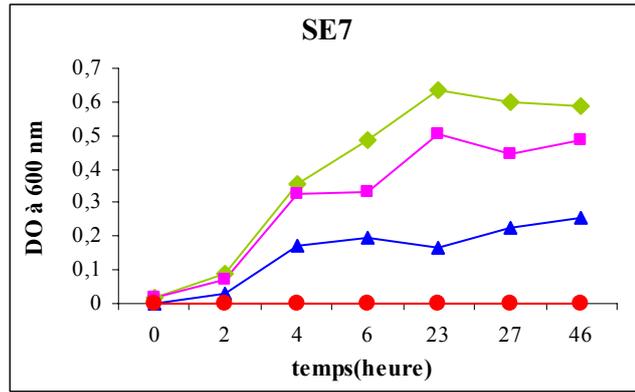
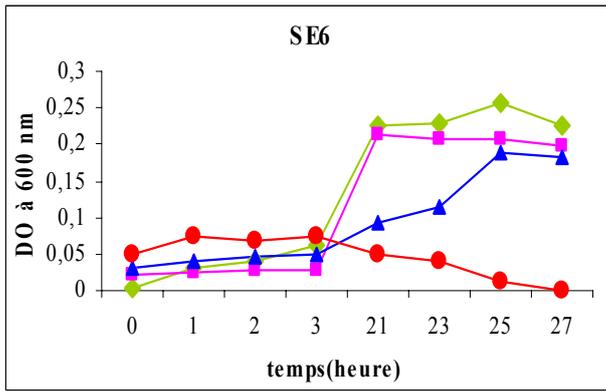
## Résultats et discussion

## *Chapitre V*

# *Résultats et discussion*

### *V-1-Cinétique de croissance*

Dans une série de flacons contenant le milieu de culture liquide, nous inoculons la même quantité des divers microorganismes et nous suivons l'évolution de la biomasse par spectrophotométrie à 600 nm. Pour les différentes souches sélectionnées, nous représentons la croissance bactérienne en fonction du temps pour différentes quantités de pesticides (figureV-1). Les volumes de pesticide ajoutées au milieu de culture (100ml) ont été prélevés à partir d'une solution de pesticide préparée à 10 mg/ml dans l'éthanol.



◆ Témoin ; ■ 0,05mg/ml ; ▲ 0,1mg/ml ; ● 0,2mg/ml

**Figures V-1:** Les courbes de croissances pour les différentes souches en présence du bifenthrine

Pour le témoin : on constate que les souches sont très bien adaptées au milieu de culture dont la phase de latence est faible de 0 à 4h à nulle pour les deux souches SB5 et SD7. La phase exponentielle faisant suite à la phase de latence, est courte donc croissance rapide jusqu'à 22-24h pour SE8, SB6, SC7 et moins pour le reste de souches. Elle se termine par une phase stationnaire maximale

Pour les faibles concentrations de pesticide, elles sont sub-inhibitrices. Au delà de 0,1mg/ml, l'inhibition devient plus accentuée, elle est totale à 0,2mg/ml pour l'ensemble des souches.

Afin de comparer l'effet de la concentration du pesticide sur la vitesse de ralentissement de la croissance des souches, nous déterminons le taux de croissance maximal de chaque souche. Pour cela on utilise l'équation suivante :

$$\mu_{\max} = \frac{\text{Log} [N] - \text{Log} [N_0]}{(t - t_0)\text{Log} 2} \quad (\text{V-1})$$

$N$  : Nombre de germes (*nombre de bactéries*) par ml à temps  $t$ .

$N_0$  : Nombre de germes par ml à temps  $t=0$ .

Selon la loi de **Beer Lambert**, les nombres de germes peuvent être assimilés aux DO, ce qui nous donne :

$$\mu_{\max} = \frac{\text{Log} DO - \text{Log} DO_0}{(t - t_0)\text{Log} 2} \quad (\text{V-2})$$

D'après les courbes croissances on peut déterminer les valeurs de  $\mu_{\max}$  (exprimés par la pente de la phase exponentielle) qui sont données dans le tableau suivant :

**Tableau V-1** : les valeurs de  $\mu_{\max}$  des souches bactériennes.

	<i>SE6</i>	<i>SE7</i>	<i>SE8</i>	<i>SB5</i>	<i>SB6</i>	<i>SC7</i>	<i>SD7</i>
<i>Témoin</i>	0,1027	0,5688	0,1562	0,0456	0,1637	0,1424	0,8648
<i>0,05mg/ml</i>	0,1598	0,2022	0,0282	0,0452	0,1537	0,1882	0,7808
<i>0,1mg/ml</i>	0,0488	0,6787	0,0983	0,0439	0,2397	0,382	0,0662
<i>0,2mg/ml</i>	0	0	0	0	0	0	0

Globalement, nous remarquons que le taux de croissance de la souche SD7 est le meilleur, le plus faible est celui des souches SB5 et SE6.

Ces premières remarques nous laissent supposer que, à priori la souche SD7 présente la meilleure résistance au pesticide et qu'à l'inverse la souche SB5 serait la plus sensible. Mais ces observations ne pourront être vérifiées que par la détermination des CMI et CMB.

### ***V-2-Détermination de CMI*** (la concentration minimale inhibitrice)

Les sept souches bactériennes ont été testées pour la résistance au bifenthrine par la méthode des puits en milieu gélosé.

Dès l'application dans le puits, la bifenthrine diffuse de manière uniforme.

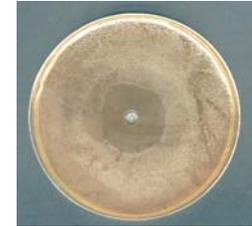
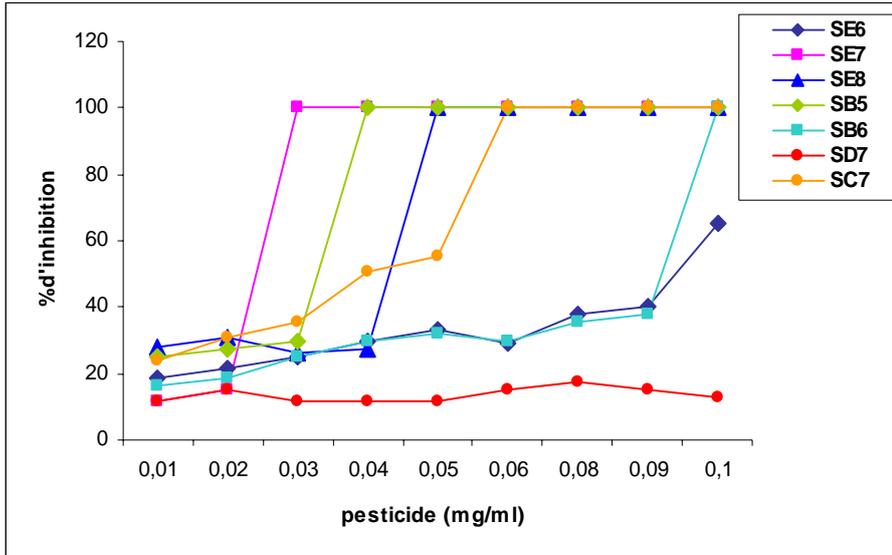
Après incubation, les puits s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (développement bactérien) (photo A). Plus la zone d'inhibition est grande, plus la sensibilité de la souche bactérienne testée est grande vis-à-vis du pesticide.

La CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration de pesticide.

Les mesures des diamètres de la zone d'inhibition pour chaque concentration de pesticide sont présentées dans l'annexe n°1.

Le pourcentage d'inhibition déterminée par la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Diamètre de la zone d'inhibition}}{\text{Diamètre de la boîte de Pétri}} \cdot 100$$



**Photo A** : zone d'inhibition.

**FigureV-2** : Etude de la sensibilité des souches au bifenthrine en fonction de la concentration.

L'action du pesticide peut être interprétée par les courbes de la figureV-2 que l'on les appelle sigmoïdes d'inhibition. Elle permet de définir deux points :

La concentration minimale inhibitrice ou CMI et la concentration inhibitrice 50% ou CI50. En pratique, la CMI est la concentration qui correspond au premier flacon de la série dans lequel aucun trouble n'apparaît.

La CI50 quant à elle, détermine une inhibition de la croissance microbienne de 50%.

Le tableau représente les résultats des tests de détermination de la CMI obtenues à partir de la figureV-2

**TableauV-2** : les valeurs de CMI des souches bactériennes.

Les souches bactériennes	SB5	SB6	SE6	SE7	SE8	SC7	SD7
<b>CMI (mg/ml)</b>	0,04	0,1	>0,1	0,03	0,05	0,06	>0,1

Comme nous pouvons le constater sur la figure V-2 les résultats indiqués dans le tableauV-2, presque toutes les souches sont sensibles au pesticide avec une CMI inférieure à 0,1g/ml : la plus sensible est la souche « SE7 : 0,03g/ml », par contre la souche « SD7 » est

particulièrement résistante. Nous remarquons pour la souche SD7 que la concentration de bifenthrine n'a aucun effet sur la croissance avec un pourcentage d'inhibition négligeable. Par contre pour la souche SE6 nous observons une augmentation légère du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration jusqu'à 66% à 0,1 g/ml.

Des résultats indiqués de la CMI, nous pouvons déduire les valeurs de CI50%.

**Tableau V-3** : Détermination de CI50% de différentes souches.

<b>Souches Bactériennes</b>	<b>SB5</b>	<b>SB6</b>	<b>SE6</b>	<b>SE7</b>	<b>SE8</b>	<b>SC7</b>	<b>SD7</b>
<b>CI50% (mg/ml)</b>	0,033	0,093	0,095	0,024	0,043	0,043	>0,1

Ces résultats nous permettent de confirmer que la souche la plus résistante au pesticide est bien la SD7 car nous remarquons que pour la souche SE6 l'inhibition de 50% de la population microbienne est observée à 0,095 mg/ml.

### ***V-3-Détermination de la CMB***

La détermination de la CMB, peut se mesurer à temps fixe, généralement au bout de 18-24 heures de contact entre la bactérie et le pesticide. Il suffit de repiquer sur milieu solide tous les flacons incubés puis de dénombrer les survivants. Dans la zone bactéricide, le nombre de survivants diminue plus ou moins fortement.

Les résultats obtenus dans l'évaluation de la croissance bactérienne nous ont conduit à considérer pour la détermination de CMB des concentrations en bifenthrine supérieures à 0,2 mg/ml car c'est à cette concentration que nous avons noté une inhibition totale des sept souches. La question est de savoir si la concentration minimale bactéricide est égale ou supérieure à celle qui inhibe les bactéries.

Le tableau suivant représente le nombre de survivants en fonction de la quantité de bifenthrine.

Les valeurs de **CMB** représentent la concentration minimale qui tue 99,99 % d'une population bactérienne en 18-24 heures.

**Tableau V-4** : Nombre de survivants après traitement par différentes concentrations en bifenthrine (mg/ml de éthanol)

souches	T	0,5	0,7	0,9	1,5	1,7	1,9	2	2,2	2,4	3
SC7	300	100	50	30	17	0					
SB6	ind	300	100	4	0						
SE6	ind	ind	ind	ind	100	100	50	30	16	0	
SE7	ind	ind	Ind	ind	ind	200	100	0			
SB5	ind	ind	Ind	ind	ind	ind	300	200	150	100	0
SE8	ind	ind	Ind	31	20	8	8	6	0		
SD7	ind	ind	ind	ind	ind	100	50	0			

A partir du tableau nous déduisons les valeurs de CMB pour l'ensemble des souches (tableau V-5)

**Tableau V-5** : Les CMB des souches bactériennes.

Les souches bactériennes	SB5	SB6	SE6	SE7	SE8	SC7	SD7
CMB (mg/ml)	3	1,5	2,4	2	2,2	1,7	2

D'après ces résultats nous constatons que presque toutes les souches sont résistantes, Particulièrement, SB5 est la plus résistante « CMB=3mg/ml » par contre SB6 la plus sensible « CMB=1,5mg/ml ».

Apparemment les valeurs de CMI et de CMB ne semblent pas montrer une corrélation

Ces deux paramètres auraient un rapport direct avec la structure cellulaire et la physiologie des bactéries (le mécanisme de résistance est différent).

Pour qu'un pesticide soit actif sur une bactérie, un certain nombre de conditions sont à considérer : il doit, en premier lieu, pénétrer dans la cellule ; il doit ensuite rencontrer le récepteur ou la cible moléculaire de son action à modifier ou à perturber.

*Conclusion*

# Conclusion

La présence des pesticides dans les sols et les eaux est devenue un problème de santé publique qui mérite une attention très particulière des producteurs, utilisateurs et ce compte tenu des dangers potentiels qu'ils présentent.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent la sensibilité microbienne des souches bactériennes isolées localement au bifenthrine par la mesure de deux paramètres : concentration minimale inhibitrice CMI, et bactéricide CMB. Les résultats sont présentés en classant la souche bactérienne comme sensible ou résistante. Cette sensibilité au pesticide est liée à la toxicité du pesticide sur les cellules bactériennes qui diffère selon la structure cellulaire et l'état physiologique des bactéries.

En perspective de ce travail, pour une meilleure caractéristique de la résistance des souches aux pesticides, il serait important de :

- Etudier le mécanisme d'action du pesticide.
- Etudier les caractérisations biochimiques et génétiques des souches en vue d'identifier les gènes impliqués dans la résistance aux pesticides.

# Références Bibliographiques

# Références bibliographiques

[1] Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement.

<http://www.inra.fr/dpenv/sommrc31.htm>

[2] **R. Boussahel; Le problème des pesticides dans les eaux potables** : origine, impact, et gestion. Proceeding des journées Techniques sur les Eaux du sud; El-Oued; (2003).

[3] **M. O. S. A. Ould Kankou; Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie**; Etude en laboratoire du comportement de deux pesticides; Thèse de doctorat; (2004).

[4] **F. Marliere; Mesure des pesticides dans l'atmosphère**; Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air; *Direction des Risques Chroniques* Loi sur l'Air; Paris; (2000).

[5] Pesticides, Introduction, Chapitre1

<http://www.fao.org/docrep/W1604F/w1604f03.htm>

[6] **Les pesticides, Réglementation et l'effets sur la santé et l'environnement**; Maison de consommation et l'environnement; (2003).

[7] **I. Even, J.L. Berta, J.L. Volatier; Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles**; (2002).

[8] **N. Domange ; Etude des transferts de produits phytosanitaires à l'échelle de la parcelle et du bassin versant viticole Strasbourg**; Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur; Paris; (2005).

**[9] Les pesticides en milieu atmosphérique : Étude en région Centre** : Etude en Région Centre; Lig'Air– Réseau de surveillance de la qualité de l'Air en région Centre; Automne 2001.

<http://www.ligair.fr/documentation/etudes/pesticidesAutomne2001.pdf>

**[10] C.Bliefert, R.Perraud ; Chimie de l'environnement**, (air, eau, sols, déchets), De Boek; 1<sup>ier</sup> édition ; 3<sup>ème</sup> tirage; Paris; 2004.

**[11] pesticides**

<http://www.iav.ac.ma/veto/hidaoa/bouchriti/pollution/chimique/pesticides.htm>

**[12] Historique de l'utilisation des pesticides.**

<http://www.parl.gc.ca/InfocomDoc/36/2/ENVI/Studies/Reports/envi01/10-ch3-f.html>

**[13] Alimentation et santé - les pesticides - notre- planète.**

[http://www.notre-planete.info/ecologie/alimentation/pesticides\\_0.php.htm](http://www.notre-planete.info/ecologie/alimentation/pesticides_0.php.htm)

**[14] Pesticides**

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Pesticide.htm>

**[15] L'élimination des pesticides pour la production d'eau potable.**

<http://www.gls.Fr/memotec8.htm>

**[16] Les résidus de pesticides**, édition N°9, Paris, Janvier- 2001.

**[17] Pesticides.**

<Http://www.lomag-man.org/produitsphytosanitaires.htm>

**[18] K. Squibb; Pesticides Program in Toxicology NURS 678-Applied Toxicology;** (2002).

<http://aquaticpath.umd.edu/toxnurse/>

[19] C.Margoum; **Contribution a l'étude du devenir des produits phytosanitaires lors d'écoulement dans les fossés**: Caractérisation physico-chimique et hydrodynamiques; Thèse de Doctorat de l'université Joseph Fourier-Grenoble I; France; (2003).

[20] F. Ramade; Ecotoxicologie; 2ème édition ; Paris ; (1979).

[21] A. Kersanté ; **Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la Dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré**; Thèse de doctorat de l'université de Rennes I; U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement; Paris ; (2003).

[22]G. Alloy, S.Herault, R. Israel, A.Robin, C.Aout ,R Tracol; Les pesticides dans l'eau potable; guide technique; 2001-2003.

[23] S. Detoc; Pesticides dans les eaux: Les difficultés pour la production d'eau destinée à la consommation humaine; Agence de l'eau Loire-Bretagne.

<http://assoc.orange.fr/erb/colqP3.htm>

[24] Intégration des membranes dans la production d'eau potable.

<http://www.u-picardie.fr/beauchamp/duce/decaux/decaux.htm>

[25] Les procédés d'élimination des pesticides

[www.fao.org/docrep/W1604F/w1604f06.htm](http://www.fao.org/docrep/W1604F/w1604f06.htm) ( chapitre 4)

[26] Eau Potable La filtration sur membranes, un procédé d'avenir.

<http://www.cnrs.fr/cv/dossier/doseau/decouv/potable/filtrationsur membrane.htm>

[27] Ultrafiltration à Vigneaux sur seine.

<http://www.brollagency.com/Fr/dpv/Vigneaux.htm>

[28] La nanofiltration, une technologie adaptée aux eaux difficiles.

<http://www.gls.fr/pdf/Memotec1-nanofiltration.pdf>

[29] La Nanofiltration

<http://www.lenntech.com/fran%E7ais/nanofiltration-fr.htm>

[30] La biodégradabilité des effluents urbains

<http://www.gls.fr/memotec19.htm>

[31] Dégrémont. Mémento technique de l'eau ; Huitième édition 1978; France; 97-106, 646-647.

[32] J Aislabie, G Lloyd-Jones; **A review of bacterial-degradation of pesticides;**

Australian Journal of Soil Research 33(6) 925 – 942; (2006).

<http://www.publish.csiro.au/paper/SR9950925.htm>

[33] Biodégradation des pyréthroides

<http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2002/document/?ID=20000>

[34] Lee, Sangjin, Gan, Jianying, Kim, Jong-Sik, Kabashima, John N, Crowley, David E; **Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases;** Society of Environmental Toxicology and Chemistry; V-23; Page 1-6; (2005).

[35] **B-les antiparasitaires concernés par l'étude expérimentale**

[http://www.bibli.vet-nantes.fr/theses/2003/larhantec03\\_47/part1b.pdf](http://www.bibli.vet-nantes.fr/theses/2003/larhantec03_47/part1b.pdf)

[36] M. Slaoui, M.Ouhssine, M.El M'rabet, M.Massoui, M.El Yachioui; Dégradation du carbofuran par une bactérie du genre Pseudomonas.sp isolée à partir du sol; Science letters; Vol 3; N°3; (2001).

[37] S Taylor, P Di Marco; **Health-Based Investigation Level for Bifenthrin in Soil,** Department of Health, Australia, (2003).

[www.fluoridealert.org/pesticides/bifenthrin.soil.report.2003.pdf](http://www.fluoridealert.org/pesticides/bifenthrin.soil.report.2003.pdf)

[38].Bifenthrine

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Bifenthrine>

[39] E X T O X N E T Extension Toxicology Network, Bifenthrin  
<http://extoxnet.orst.edu/pips/bifenthr.htm>

[40] Bifenthrin data sheet  
<http://www.alanwood.net/pesticides/bifenthrin.html>

[41] Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids.  
<http://www.homestead.com/ipmofalaska/files/pyrethrins.html>

[42] **A Fecko; Environmental fate of bifenthrin;** Environmental Monitoring and Pest Management Branch; Department of Pesticide Regulation; Sacramento; (1999).

[43] **A.M. Boyd ,B. Noller ,P. White,D. Gilbert ,Smith ,D., Mortimer, M, Langford, P, Martinkovic, J.,Sadler, R., Hodge, M., Moore, M; Murray, J., Cristaldi, C., Zalucki, M.P, Francis, I., Brown, M., Cruice, R., Connell, D.****Enviromental effects of currently used termiticides under australianconditions,** National Research Centre for Environmental Toxicology (2002).

[44] **R.S Harris;** The fate of bifenthrin and fipronil in pine bark nursery media; Louisiana State University; **These de magister de Sciences dans le Department de l'Agriculture; Aout-2004.**

[45] **A.Langley, M.Gilbey, B.Kennedy;** Health-Based Investigation Level for Bifenthrin in Soil; Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination; (2003).

[46] **H.Leclerc, D Ohusson, P Wattre, E Jakubczak;** **Microbiologie générale;** Doin Editeur; 2<sup>e</sup> édition- 2<sup>e</sup> tirage; Paris ;(1983).

[47] **A.Meyer, J.Deiana, H.Leclect;** **Cours de microbiologie Générale;** Doin Editeur; Paris; (1984).

[48]**P.Berche, S.Kayal, C.Poyart, X.Nassif;** **Bactériologie générale;** Faculté de Médecine Necker- Enfants malades; 2002-2003.

[49] W. W. Eckenfelder. **Gestion des eaux usées urbaines et industrielles**. Lavoisier 1982, Paris; 193-202.

[50] R. Scriban; **Biotechnologie**; Tec & Doc 1999, France; 193-228.

[51] Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques

[http://www.medbc.com/meditline/review/brulures/vol\\_1/num\\_3/text/vol1n3p141.asp](http://www.medbc.com/meditline/review/brulures/vol_1/num_3/text/vol1n3p141.asp)

[52] L'évaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/atbq/sensibilite.html>

[53] Les antibiotiques

<http://www.biologie.univ-mrs.fr/upload/p62/TD2.pdf>

[54] Antibiogramme

[http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio\\_web/TD\\_DCEM1/Antibiogramme.htm](http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio_web/TD_DCEM1/Antibiogramme.htm)

[56] PCA

[http://fr.wikipedia.org/wiki/PCA\\_standard\\_ou\\_g%C3%A9lose\\_pour\\_d%C3%A9nombrement](http://fr.wikipedia.org/wiki/PCA_standard_ou_g%C3%A9lose_pour_d%C3%A9nombrement)

annee

**Annexe1 : Les valeurs du diamètre de la zone d'inhibition en cm**

<b>Concentration de pesticide (mg/ml)</b>	<b>SE8</b>	<b>SE7</b>	<b>SE6</b>	<b>SB6</b>	<b>SB5</b>	<b>SC7</b>	<b>SD7</b>
<b>0,01</b>	2,4	0,8_1,4	1,6_1,6	3	2,2_2	2_2,2	1,4_0,9
<b>0,02</b>	2,6	1,2_1,4	2_1,8	1,6_2,2	2,4_2,4	2,8_2,6	1,2_1,4
<b>0,03</b>	3,4	IT	2,2	2,6_2,6	2,6_2,6	3_3,2	1_1
<b>0,04</b>	3,4_3	IT	2,6_2,6	3,2_3	IT	4,4	1_1,1
<b>0,05</b>	IT	IT	2,8_3	3_3	IT	4,8	0,8_1,2
<b>0,06</b>	IT	IT	1,8_2,2	2,6_2,8	IT	IT	1,6_1,2
<b>0,08</b>	IT	IT	3,2_3,4	2,8_2,8	IT	IT	1,6_1,4
<b>0,09</b>	IT	IT	3,4_3,6	3	IT	IT	1,4_1,1
<b>0,1</b>	IT	IT	5,6_5,8	IT	IT	IT	1_1,1

**IT** : Inhibition totale sur toute la boîte de pétri.