

**UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES**



**Mémoire de Fin d'Etudes**  
**En vue de l'obtention d'un**  
**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine** : Sciences Biologiques  
**Filière** : Ecologie et Environnement  
**Spécialité** : Ecologie Végétale et Environnement

Présenté par :  
**SEBIHI Anfel**  
**MERABTI Djemaa**

*Thème*

**Etude de la biodégradation du glyphosate par des  
bactéries isolées des eaux de Sebket Sefioune –Ouargla  
(Sud-Est de l'Algérie)**

Soutenu publiquement le :  
**07/07/2019**

Devant le jury :

Mme YOUCEF. F	<b>MCB</b>	<b>Présidente</b>	<b>U.K.M.Ouargla</b>
M KARABI. M	<b>MCB</b>	<b>Examineur</b>	<b>U.K.M.Ouargla</b>
Mme KHALLEF. S	<b>MCB</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>U.K.M.Ouargla</b>
Mme OULED-HADDAR. H	<b>Prof</b>	<b>Encadreur</b>	<b>U.M.S.B.Jijel</b>
Mme ALOUI. N	<b>Doctorante</b>	<b>Co-encadreur</b>	<b>U.K.M.Ouargla</b>
Mme AMAOUCH. A	<b>Docteur</b>	<b>Invitée</b>	

**Année universitaire : 2018/2019**



## *Remerciements*

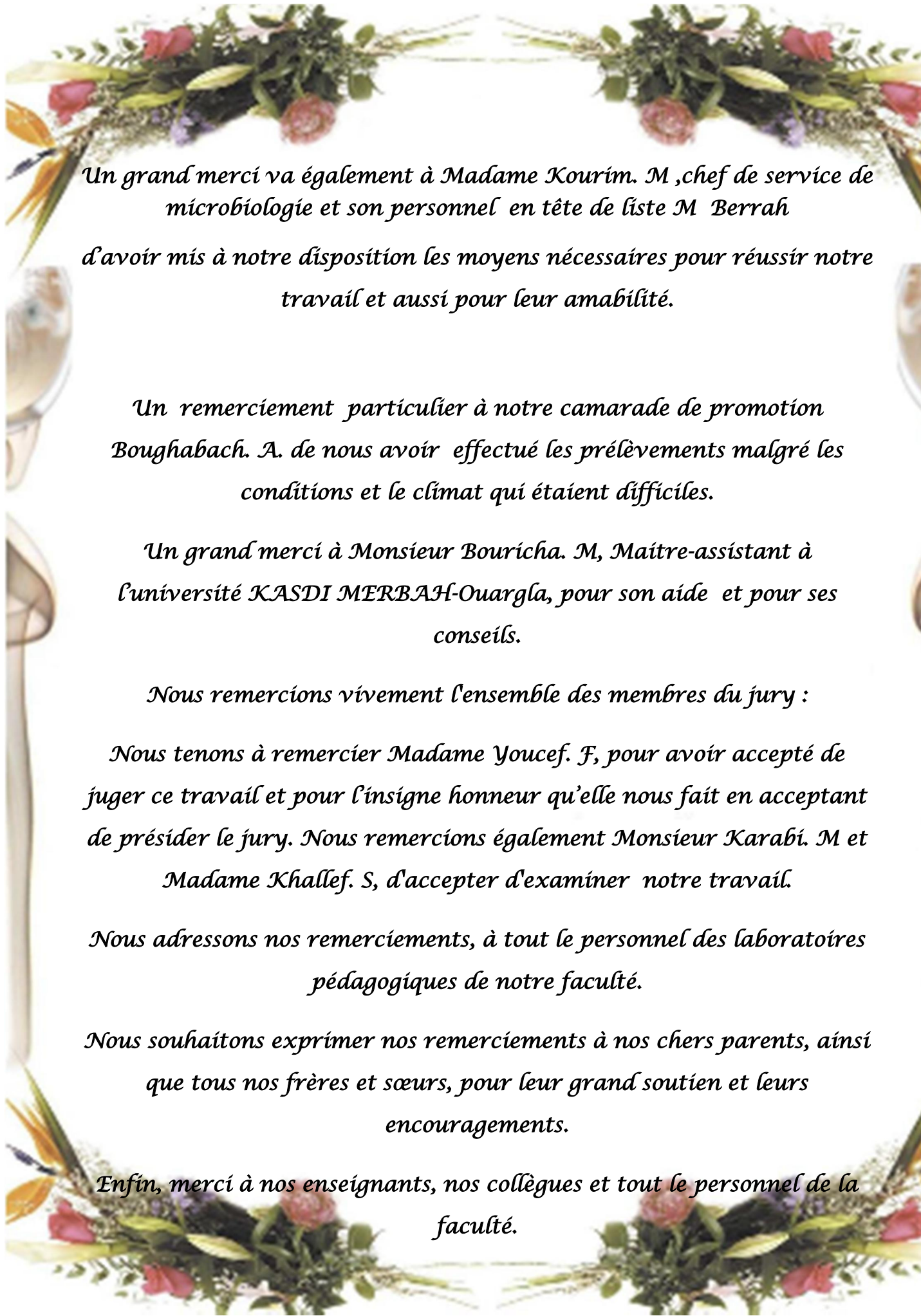
*LOUANGE à ALLAH, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a inspiré et comblé de bienfaits, on lui rend grâce.*

*Au terme de ce travail, qu'il nous soit permis d'exprimer nos plus vifs remerciements à :*

*Avant tout, nous tenons tout particulièrement à témoigner notre profonde gratitude à notre promotrice Madame Alouï.N, enseignante à l'université KASDI MERBAH- Ouargla, pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous proposant ce thème et en assurant son encadrement. Votre souci majeur a été l'aboutissement de ce travail. Grâce à vous, nous avons appris la rigueur scientifique et l'amour du travail.*

*Ça ne sera pas suffisant pour vous exprimer toute notre grande reconnaissance pour la confiance, le grand soutien et la disponibilité que vous nous avez accordés pour faire avancer ce travail. Ainsi que votre optimisme, votre compréhension, vos qualités humaines et surtout l'estime que vous avez toujours manifestée à notre égard nous ont profondément touchés et donnés de l'assurance. Vous avez fait preuve à la fois d'une grande patience, gentillesse, et d'un esprit responsable. Nous vous serons éternellement reconnaissantes.*

*On voudrait adresser nos remerciements chaleureux à Madame Amaouch.A, médecin microbiologiste à l'hôpital Mohamed Boudiaf, d'avoir accepté de nous Co-encadrer tout au long de notre partie expérimentale, pour ses précieux conseils, son profond humanisme et sa bonne orientation.*



*Un grand merci va également à Madame Kourim. M, chef de service de microbiologie et son personnel en tête de liste M Berrah d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour réussir notre travail et aussi pour leur amabilité.*

*Un remerciement particulier à notre camarade de promotion Boughabach. A. de nous avoir effectué les prélèvements malgré les conditions et le climat qui étaient difficiles.*

*Un grand merci à Monsieur Bouricha. M, Maître-assistant à l'université KASDI MERBAH-Ouargla, pour son aide et pour ses conseils.*

*Nous remercions vivement l'ensemble des membres du jury :*

*Nous tenons à remercier Madame Youcef. F, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury. Nous remercions également Monsieur Karabi. M et Madame Khallef. S, d'accepter d'examiner notre travail.*

*Nous adressons nos remerciements, à tout le personnel des laboratoires pédagogiques de notre faculté.*

*Nous souhaitons exprimer nos remerciements à nos chers parents, ainsi que tous nos frères et sœurs, pour leur grand soutien et leurs encouragements.*

*Enfin, merci à nos enseignants, nos collègues et tout le personnel de la faculté.*

## Liste des abréviations

<b>DO</b>	Densité optique
<b>GN</b>	Gélose Nutritive
<b>S</b>	Souche
<b>BN</b>	Bouillon nutritive
<b>MMS</b>	Milieu de sels minéraux solide
<b>MM</b>	Milieu de sels minéraux
<b>t/min</b>	Tour/minute
<b>UICP</b>	l'union internationale de chimie pure et appliquée
<b>CE</b>	Conductivité électrique
<b>dS/m</b>	Dicisiemens par mètre
<b>EPSPS</b>	5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase
<b>AMPA</b>	l'acide aminométhylphosphonique
<b>API</b>	analytical profile index
<b>SF</b>	Souche Sefiouné

## Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques physico-chimiques du glyphosate .....	10
Tableau 02: Caractéristiques morphologiques des souches bactériennes isolées .....	25
Tableau 03: Résultats de l'identification des souches par l'API 20 E.....	28

## Liste des figures

Figure 01: Processus montrant le devenir des pesticides dans l'environnement .....	8
Figure 02: Structure chimique du glyphosate.....	8
Figure 03: Localisation du site d'étude (google earth, 2019).....	13
Figure 04 : pH de l'eau du site de Sebkhet Sefioune.....	22
Figure 05 : La conductivité électrique de l'eau de Sebkhet Sefioune .....	22
Figure 06: Résultats des différentes colonies des bactéries obtenues avant la sélection.....	23
Figure 07: Aspect macroscopique des bactéries.....	24
Figure 08: Résultats de la coloration de Gram des souches isolées (( Gx100).....	26
Figure 09: Résultats de la mesure de la densité optique (DO). .....	32

## Liste des photos

Photo 01: L'herbicide glyphosate.....	9
Photo 02: Site d'échantillonnage.....	13
Photo 03: Ensemencement sur milieu de gélose nutritive.....	14
Photo 04: Identification des souches bactériennes par API 20E .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Photo 05: Agitateur incubateur.....	20
Photo 06 : Mesure de la densité optique par spectrophotométrie.....	20
Photo 07: La différence entre la catalase positive et la catalase négative .....	27
Photo 08: La différence entre oxydase positive et oxydase négative .....	27
Photo 09: Résultats de la galerie API 20 E inoculée avec la SF1( <i>Serratia ficaria</i> ) .....	29

## Table des matières

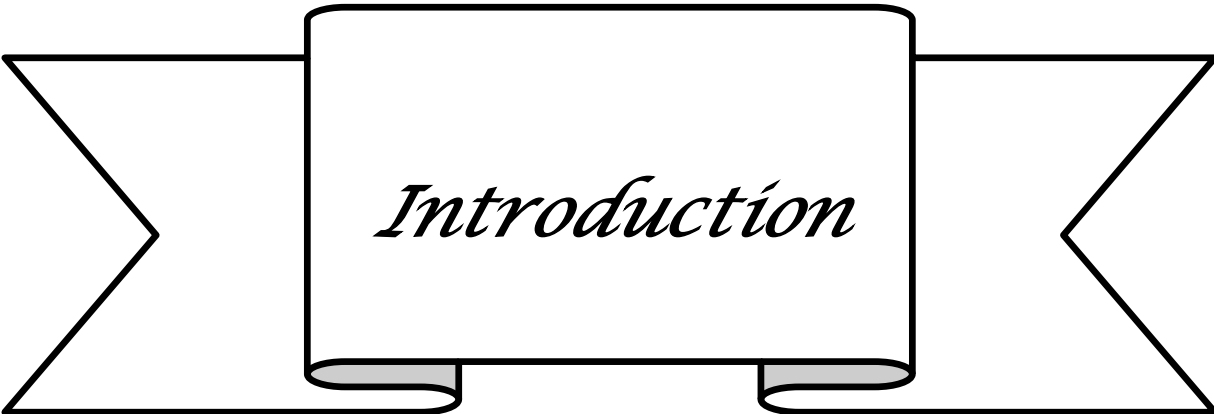
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Table des matières	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I: Pollution des eaux par les pesticides</b>	
I. Pollution des eaux par les pesticides.....	3
I.1. Définition des pesticides .....	3
I.2. Classification des pesticides.....	3
I.2.1. Classification des pesticides selon leur mode d'action .....	3
I.3. Utilisation des pesticides.....	4
I.3.1. En Algérie .....	5
I.3.2. L'agriculture dans la région d'Ouargla .....	5
I.4. Effet des pesticides.....	6
I.5. Dégradation des pesticides.....	6
I.5.1. Dégradation abiotique .....	6
I.5.2. Dégradation biotique.....	7
I.6. Présence et devenir des pesticides dans l'environnement.....	7
I.6.1. Dégradation.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.6.2. Adsorption par les plantes.....	7
I.6.3. Drainage dans le profond ou sur la surface du sol .....	7
II. Pesticide d'étude : glyphosate .....	8
II.1. Présentation.....	8
II.2. Propriétés physico-chimique du glyphosate .....	9
II.3. Mode d'action.....	10
II.4. Dégradation du glyphosate .....	11
II.4.1. Dégradation chimique.....	11
II.4.2. Photodégradation .....	11
II.4.3. Dégradation biologique.....	11

## Chapitre II. Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	13
II. Caractéristiques de l'eau.....	14
II.1. Potentiel hydrogène (pH).....	14
II.2. Conductivité électrique (CE).....	14
III. Analyses microbiologiques.....	14
III.1. Ensemencement.....	14
III.2. Purification des colonies bactériennes.....	14
III.3. Isolement des bactéries dégradant le glyphosate.....	15
III.4. Conservation des souches purifiées.....	15
IV. Identification des souches.....	15
IV.1. Etude morphologique.....	15
IV.1.1. Aspect macroscopique.....	15
IV.1.2. Aspect microscopique.....	16
IV.2. Etude biochimique.....	16
IV.2.1. Etudes des enzymes respiratoires.....	16
IV.2.2. Système d'identification par des galeries API 20 E.....	17
IV.3. Etude de la biodégradation du glyphosate par les souches bactériennes.....	19

## Chapitre III. Résultats et discussion

I. Analyses physico chimiques de l'eau.....	22
I.1. pH.....	22
I.2. Conductivité électrique.....	22
II. Analyses microbiologiques.....	23
II.1. Observation de la croissance des bactéries.....	23
II. Isolement et identification des bactéries.....	24
II.1. Etude morphologique.....	24
III. Etude Biochimique.....	25
III.1. Coloration de Gram.....	25
III.2. Test catalase.....	27
III.3. Test de l'oxydase.....	27
III.4. Identification des souches par l'API20E.....	27
IV. Mesure de la densité optique en présence de glyphosate.....	31
Conclusion et perspectives.....	34
Références bibliographique.....	35
Annexes.....	42



*Introduction*



### **Introduction**

La protection de l'environnement et la problématique de la dépollution des eaux contaminées nécessitent une réaction rapide du monde entier. La pollution est bien souvent d'origine industrielle ou agricole, c'est-à-dire due au manque de précautions nécessaires pour éviter les fuites de déchets toxiques comme les engrais et les pesticides. Ces pesticides sont fréquemment utilisés dans le domaine agricole. Par conséquent, ils contribuent à la dégradation de la qualité des eaux de surface et des eaux souterraines par leurs effets secondaires nocifs et toxiques. Plusieurs études ont montré la présence de traces de pesticides dans les aliments (**NASREDDINE et PARENT, 2002. KAN et MEIJER, 2007**) ainsi que dans les eaux (**RITTER, 1990**). La toxicité de ces polluants organiques est liée à leur structure moléculaire qui est stable et résiste à la dégradation, ou qu'ils se dégradent en produits secondaires plus dangereux et cancérigènes (**FOGARTY et TUOVINEN, 1991. LAL et SAXENA, 1982**).

La consommation des pesticides est toujours en croissance. De 140 tonnes de pesticides en 1940, la consommation à l'échelle mondiale est passée en 1997 à 600 000 tonnes. Ainsi en 1991, environ 23 400 produits pesticides étaient enregistrés par l'Agence de Protection de l'Environnement aux Etats-Unis (**UIPP, 2007**).

Ce sont plus de 500 matières actives qui sont utilisées dans l'environnement et la consommation annuelle est estimée à environ 4 millions tonnes au niveau mondial. Seulement environ 1% de cette quantité arrive directement sur les parasites cible, tandis que près de 30 à 50% de la quantité peut être perdue dans l'air (**GAVRILESCU, 2005. GIL et SINFORT, 2005**).

L'utilisation des pesticides présente deux volets ayant des conséquences totalement opposées. En effet le pesticide tout en réduisant les dégâts causés aux cultures par les organismes nuisibles, il participe à la dégradation de la qualité des eaux de surface et souterraines, la contamination du sol et de l'atmosphère (**GDOURA, 2013**). De part leurs caractéristiques physico-chimiques, ces composés présentent des dangers, du fait de leur écotoxicité pour l'environnement et les organismes vivants. Ils entrent dans la chaîne alimentaire, et finissent, à termes, par menacer la santé humaine (**BENSLAMA, 2014**).

La capacité des bactéries hétérotrophes à dégrader une large variété de composés organiques est exploitée pour le traitement des sols pollués dans des stratégies de bioremédiation ou pour le traitement des eaux usées (**FURUKAWA, 2003**).

En Algérie, comme ailleurs, les agriculteurs utilisent abondamment les pesticides. En conséquence, le risque de pollution des ressources en eau par les résidus de produits phytosanitaires est susceptible d'être très élevé. Même si l'activité agricole s'efforce maintenant de présenter une image de qualité et de préservation du milieu environnemental (BENSLAMA, 2014).


Parmi les produits phytosanitaires disponibles sur le marché Algérien, le Roundup (glyphosate) est l'herbicide le plus utilisé à l'échelle mondiale (AMAND et JACOBSEN, 2001). Etant un herbicide facile d'emploi, efficace et de faible coût, il a été appliqué massivement, en résultant une contamination chronique des sols, des eaux souterraines et de surface.

Les recherches se sont orientées depuis plusieurs années vers les techniques de dépollution des sols et des eaux contaminés par ces produits phytosanitaires. Parmi elles il y a des techniques physico-chimiques qui sont très coûteuses et nécessitent des moyens généralement lourds. Ces dernières années ils assistent à l'émergence de techniques biologiques qui sont beaucoup moins onéreuses et très efficaces. Ces techniques font appel aux potentiels de biodégradation des microorganismes très variés.

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'identification de certaines souches bactériennes qui semblent avoir une capacité de dégrader le glyphosate (Roundup); c'est un herbicide de la famille des organophosphorés dans les eaux de la Sebket Sefioune - Ouargla, et d'utiliser comme une seule source de carbone et d'énergie, pour une éventuelle application en bio-remédiation.

Pour se faire, notre travail s'articule autour de trois parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique consacrée à la pollution des eaux par les pesticides.
- La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés.
- La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leur discussion, suivie par une conclusion.



*Chapitre I.  
Pollution des  
eaux par les  
pesticides*

## **Chapitre I: Pollution des eaux par les pesticides**

### **I. Pollution des eaux par les pesticides**

La pollution par les produits phytosanitaires est un problème de grande ampleur posé à l'interface de l'agriculture et de la ressource en eau, en particulier des eaux de surface. Des études (IFEN, 1998) ont montré des concentrations en produits phytosanitaires dans les eaux de surface et les eaux destinées à la consommation humaine supérieures aux normes en vigueur (FRANÇOIS, 2000).

Le devenir des pesticides concerne tout le milieu naturel dans son ensemble, sol, eau et air. L'usage de produits phytosanitaires est susceptible de contaminer tous les compartiments de l'environnement. La dégradation et la dispersion des pesticides sont des phénomènes compétitifs qui se déclenchent dès que les produits phytosanitaires sont épandus sur le sol. La volatilisation est le phénomène de dispersion dans l'air alors que le ruissellement et l'infiltration engendrent respectivement la pollution des eaux de surface et des eaux souterraines (MOHAMED , 2004).

#### **I.1.Définition des pesticides**

Le mot pesticide composé de deux parties : le suffixe « -cide » qui a pour origine le verbe latin «caeder» qui signifie « tuer ». On lui a adjoint la racine anglaise « Pest » qui signifie animal ou plantes nuisibles à la culture (COLIN, 2000).

Les pesticides sont des produits « phyto-pharmaceutiques », ou plus communément produits phytosanitaires, dont les propriétés physiques, chimiques, et biologiques permettent de détruire ou de limiter le développement et la croissance d'organismes vivants (CALVET *et al*, 2005. DEVILLERS *et al*, 2005).

#### **I.2.Classification des pesticides**

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités biologiques que leur classification est complexe. D'une manière générale les pesticides peuvent être classés selon deux façons: selon les organismes vivants visés et selon leurs caractéristiques chimiques (BENSLAMA, 2014).

##### **I.2.1.Classification des pesticides selon leur mode d'action (CALVET, 2005)**

\* Les herbicides : destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices. Peuvent être sélectifs ou totaux. Les familles de substances les plus importantes sont les acides

aminophosphoriques (glyphosate), les urées (diuron, isoproturon), les triazines (atrazine, simazine).

\* Les insecticides : destinés à tuer les insectes ou à empêcher le déroulement normal de leur cycle de vie. Les familles les plus rencontrées sont les organophosphorés (malathion), les carbamates insecticides (carbaxyl), les pyréthriinoïdes (deltaméthrine) et les organochlorés (endosulfan).

\* Les fongicides : destinés à éliminer les champignons. On distingue trois modes d'action différents. Les multisites qui s'attaquent aux spores des champignons. Ils sont donc préventifs. Les unisites qui perturbent la perméabilité membranaire des champignons. Les antimétabolites qui bloquent la division cellulaire.

Les principaux pesticides utilisés appartiennent à quelques grandes familles chimiques **(CHARBONNEAUX, 1993)**:

- Les organochlorés ;
- Les organophosphorés ;
- Les pyréthroïdes ;
- Les carbamates, très toxiques, sont utilisés comme insecticides et fongicide

Les phytosanitaires, qui regroupent un très grand nombre de produits de la famille des fongicides. Ces produits réagissant avec le sol lors de leur migration (piégeage, relargage, spéciation), l'évaluation de leur devenir et de leur impact se révèle difficile.

### **I.3.Utilisation des pesticides**

Pesticides, produits phytosanitaires, phytopharmaceutiques, agro-pharmaceutiques, produits contre les ennemis des cultures, de lutte antiparasitaire, pour la protection des plantes, tous ces termes désignent les composés épandus sur les cultures pour en assurer le bon développement. Utilisés depuis l'aube de l'agriculture, leur formulation et les quantités employées ont fortement évolué depuis les années 50.

Les produits phytosanitaires ont une fonction exogène à la croissance des plantes qui permet d'atteindre des rendements potentiels. Trois grandes classes de produits sont distinguées suivant les parasites ciblés : les herbicides, les insecticides, les fongicides contre les champignons, les bactéries, les virus. **(FRANÇOIS, 2000)**.

**I.3.1. En Algérie**

Environ 100 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie, dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs. L'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est le milieu agricole d'abord qui utilise des tonnes de pesticides, ces produits sont consacrés en majorité pour le traitement des cultures, la lutte contre les rongeurs et pour augmenter la production agricole (BOUZIANI, 2007).

L'Algérie est un grand consommateur de pesticides : 30 000 tonnes sont "épanchées" chaque année. "Les conséquences sanitaires de l'exposition à ces milliers de composants chimiques, par le biais de l'eau et de l'alimentation, sont massives et inquiétantes. Le risque est multiplié par quatre si le pesticide employé est périmé ou de mauvaise qualité (REGUIEG, 2013).

**I.3.2. L'agriculture dans la région d'Ouargla**

L'agriculture dans la région de Ouargla a connu depuis ces dernières décennies un développement très remarquable en termes de superficies agricoles, qui sont en cours d'extension par la mise en valeur de nouveaux périmètres et en termes de la diversité culturelle dans les systèmes de production végétale, qui tend de plus en plus vers l'agriculture intensive. Ceci fait appel à l'usage de nouvelles techniques afin d'assurer une bonne production de quantité et de qualité.

Et sous l'effet de ces mutations, les agriculteurs et notamment ceux qui pratiquent le maraîchage ont une tendance à utiliser des intrants agricoles, comme les fertilisants, les correcteurs de carence, les stimulateurs de croissance et les pesticides de toutes catégories (insecticides, acaricides, fongicides et herbicides) pour augmenter leurs productions (SLAMENE, 2015).

L'agriculture dans le sud de l'Algérie est dominée par la culture du palmier dattier dont la pratique remonte à des siècles. La phoeniciculture est souvent intercalée par d'autres types de cultures, grâce au microclimat qui favorise la coexistence de ce type de culture (BAOUIA, 1998).

**I.4. Effet des pesticides**

La toxicité d'un pesticide est son potentiel à produire des effets nocifs sur la santé, à court ou à long terme (ARIAS *et al*, 2008). L'évaluation des effets toxiques des pesticides est complexe car de nombreux paramètres sont à considérer : la nature du composé, ses propriétés

toxico- dynamiques, la durée d'exposition et ses variations, l'effet des mélanges, la nature libre ou liée des résidus, etc....(CAPKIN *et al*, 2005).

D'un point de vue écologique, l'impact des pesticides sur l'environnement varie en fonction d'un grand nombre de facteurs qui sont : la persistance du pesticide dans l'environnement (durée de demi-vie), le temps d'exposition, la dose et la toxicité, la sensibilité relative des organismes ou de l'écosystème exposés et l'âge de l'organisme exposé. Les pesticides peuvent donc être responsables de pollutions diffuses chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur épandage sur les surfaces agricoles mais également lors de leur fabrication, transport ou élimination (MARGNI *et al*, 2002).

### **I.5.Dégradation des pesticides**

La dégradation des pesticides est un processus qui dépend de plusieurs facteurs (pH du sol, microorganismes du sol) et constitue un processus qui définit la persistance du produit et sa durée d'action. Ces processus ont lieu dans l'eau, l'air, le sol et les sédiments même si le plus grand nombre d'étude concerne le compartiment sol (BELAMIE *et al*, 1997)

Ceci a des conséquences sur son efficacité biologique. On distingue une dégradation abiotique et une dégradation biotique :

#### **I.5.1. Dégradation abiotique**

Dans les zones où l'activité biologique est réduite, comme les horizons de sol profonds ou les eaux souterraines, ces processus peuvent alors être importants (AMALRIC *et al*, 2003).

Les transformations abiotiques sont dues à des réactions chimiques qui ne sont pas catalysées par des systèmes enzymatiques, elles comprennent des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de conjugaison et des photos réactions. Il est difficile de les distinguer des transformations biotiques (RAOUL *et al*, 2005).

#### **I.5.2. Dégradation biotique**

Cette dégradation est appelée aussi « biodégradation ». Elle consiste à décomposer un substrat organique comme, les hydrocarbures, les solvants, les composés organochlorés...etc., par l'action des microorganismes vivants (bactéries et champignons essentiellement). Elle a lieu dans les milieux naturels comme les sols, les sédiments et les eaux mais elle peut aussi se produire dans les organismes végétaux et animaux (CLAVET *et al*, 2005).

En présence d'oxygène, deux types de biodégradation de composés organiques peuvent avoir lieu : La minéralisation ou la biotransformation. La biotransformation est une biodégradation

incomplète qui peut transformer un composé en métabolites organiques stables. Ces derniers peuvent être inoffensifs ou parfois plus toxiques que le polluant initial (KAUFMANN, 2004). La minéralisation est une biodégradation oxydative complète de molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) (ALEXANDER, 1994).

La biodégradation est basée sur deux processus : la croissance et le co-métabolisme microbien. Dans le cas de croissance, les polluants organiques sont utilisés comme source de carbone et d'énergie. Le co-métabolisme est défini comme un métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance qui est utilisé comme source primaire de carbone et d'énergie (LAPERTO, 2006).

### **I.6. Présence et devenir des pesticides dans l'environnement**

Les pesticides ou les polluants organiques persistants (POPs) sont caractérisés par leurs propriétés physiques et chimiques stables et très persistantes dans l'environnement (KNEPPER et al, 1990), plusieurs travaux scientifiques ont confirmé la présence de polluants organiques dans l'environnement (GUNNINGHAM et SINCLAIR, 2005. MOUSSAVI et al, 2013), notamment dans l'environnement aquatique. En effet, les polluants organiques commencent à se propager selon les deux principales voies suivantes (HICHAM, 2015) :

#### **I.6.1. Adsorption par les plantes**

Les particules du sol peuvent jouer un rôle très important pour immobiliser les pesticides grâce à l'adsorption. Aussi, les plantes piègent ces pesticides et affaiblissent leur disponibilité, et par conséquent arrêtent sa migration dans l'environnement. L'adsorption fait référence à l'attachement du pesticide par les particules du sol (GONDAR et al, 2013).

#### **I.6.2. Drainage dans le profond ou sur la surface du sol**

Le déplacement des pesticides se fait soit par le transfert qui est provoqué principalement par la pluie (ruissellement, infiltration et transfert vers les nappes et les cours d'eau), ou soit par la volatilisation en étant emportés par les courants d'air. En effet, des gouttelettes d'une taille inférieure à 100µm sont susceptibles d'être transportées sur de très longues distances. Elles finissent par se déposer par voie sèche ou par lessivage de l'atmosphère par les pluies. La disponibilité et le transfert des pesticides vers les nappes souterraines constituent des problèmes sérieux et redoutables, (figure 01) (SCHIAVON et al, 1995).



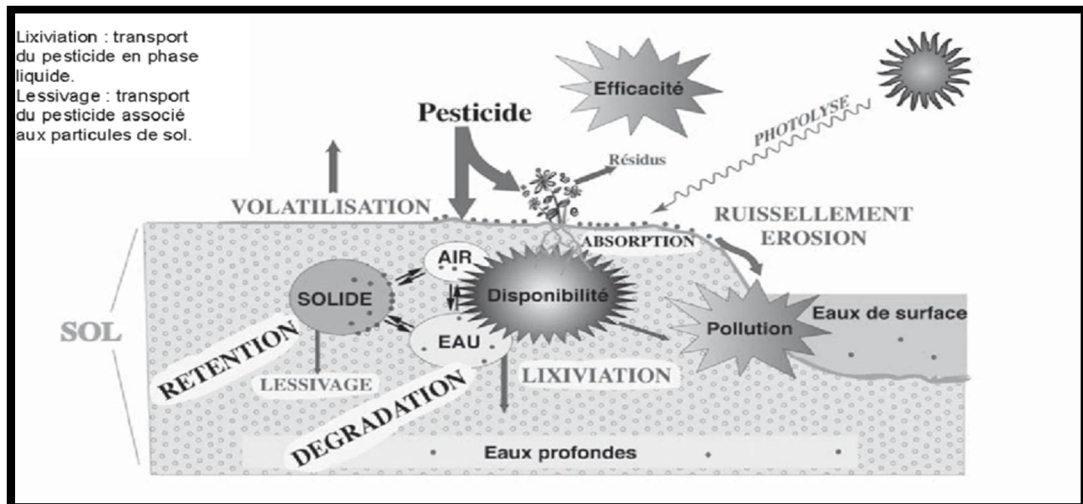


Figure 01: Processus montrant le devenir des pesticides dans l'environnement (SCHIAVON *et al*, 1995).

## II. Pesticide d'étude : glyphosate

### II.1. Présentation

Le glyphosate est un herbicide organophosphoré (TSUIOSHI *et al*, 2009), de formule moléculaire ( $C_3H_8NO_5P$ ), Selon la nomenclature de l'union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA) il est enregistré sous le numéro CAS, 107-83-6, et sa formule chimique est  $C_3H_8NO_5P$  (figure 02), (BENSLAMA ,2014).

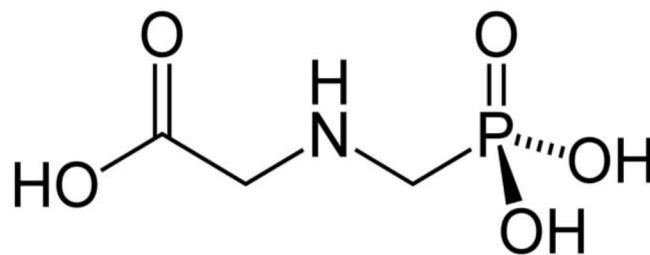


Figure 02: structure chimique du glyphosate

C'est l'herbicide le plus vendu dans le monde depuis son arrivée sur le marché en 1974 sous la formulation commerciale « Roundup » (Monsanto, États-Unis). (MAZZELLA *et al*, 2009).

Le glyphosate est disponible dans le commerce sous différentes formulations, liquide (photo 01), sous forme de sel d'isopropylamine en solution aqueuse. Parfois, des granulés solubles sont proposés (sous forme de sel d'ammonium) (PIERRE-LOUIS, 2013).

Pour les professionnels, la gamme Roundup propose des produits sous formes liquides avec des concentrés solubles pouvant atteindre 450 grammes par litre de matière active (Roundup Flash, Roundup Max, Roundup TDI) (PIERRE-LOUIS, 2013).

Les formes solides sont plus rares, elles contiennent jusqu'à 680 grammes de glyphosate par kilo, et se présentent généralement sous forme de granulés solubles dans l'eau (Roundup Energy, Roundup 680) (PIERRE-LOUIS, 2013).



Photo 01 : L'herbicide glyphosate

## II.2. Propriétés physico-chimique du glyphosate

Le glyphosate est très polaire, il est très soluble dans l'eau mais insoluble dans la plupart des solvants organiques. (IBANEZ *et al*, 2005), (tableau 01).

**Tableau 01 : Caractéristiques physico-chimiques du glyphosate (WORTHING et HANCE, 2000)**

Caractéristiques	Identification/valeurs
Non chimique	N-(phosphonométhyl) glycine
Forme	Cristal
Couleur	Blanc
Odeur	Inodore
Formule chimique	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P
Masse moléculaire (g/mole)	169.1
Densité (g/mole)	1.74
Point de fusion (°C)	200
Point d'éclair (°C)	>93 (vision)
Pression de vapeur (mm Hg à 25 °C)	<7.5×10 <sup>-8</sup>
Solubilité dans l'eau mg/l à 25 °C	12000
Solubilité dans les solvants organiques	Insoluble dans la plupart des solvants Organiques
Coefficient d'adsorption (K)	16.5
Constante de dissociation (pka)	< 2 ; 2,6 ; 5,6 et 10,6

### II.3. Mode d'action

Le glyphosate utilisé en post-émergence, pulvérisé et absorbé par les feuilles. Il se déplace alors rapidement dans les tissus de la plante jusqu'aux racines, sans affecter les tissus s'il est appliqué selon les concentrations recommandées.

Le glyphosate bloque la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Plus précisément, il inhibe un des enzymes impliqués dans la biosynthèse de ces acides il s'agit de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS), une enzyme située majoritairement dans les chloroplastes et essentielle à la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane). Cette voie métabolique n'existe pas chez les insectes, les poissons, les oiseaux et les mammifères y compris l'homme. Le mode d'action du glyphosate n'est donc pas applicable à ces espèces (**PIERRE-LOUIS, 2013**).

En bloquant cette étape de la voie métabolique, l'herbicide induit une accumulation d'acide shikimique. Il en résulte, une diminution du taux de synthèse protéique et de la formation de certains composés phénoliques. La cessation de la croissance qui en découle est alors suivie

de la nécrose des tissus qui aboutit à la mort de la plante (**KOUASSI BROU et al, 2012. PIERRE-LOUIS, 2013**).

#### **II.4. Dégradation du glyphosate**

La dégradation d'un pesticide correspond à sa dissipation par transformation de la molécule mère. Lors du traitement phytosanitaire une partie du produit entre en contact avec la surface des constituants du sol, tandis qu'une autre partie peut rester dans la solution du sol.

En fonction de cette répartition, de la nature des surfaces mises en jeu, de l'activité biologique et des propriétés physico-chimiques, diverses réactions chimiques et/ou biochimiques peuvent intervenir et conduire à la transformation, voire à la minéralisation du pesticide (**GREBIL et al, 2001**).

##### **II.4.1. Dégradation chimique**

Les résultats trouvés dans la littérature montrent que le glyphosate est faiblement dégradé par voie chimique. **RUEPPEL et al en 1977** ont examiné le potentiel de dégradation chimique du glyphosate dans le sol et l'eau. Leurs résultats montrent l'absence de dégradation significative. Dans une étude de **DOLINER en 1991** sur des eaux stérilisées et contaminées par le glyphosate, a montré que la concentration de la molécule reste stable après 32 jours d'incubation des eaux dans l'obscurité.

##### **II.4.2. Photodégradation**

Aucun résultat dans la littérature n'a signalé la photodégradation du glyphosate lorsqu'il est appliqué au sol. De même, **TROTTER et al en 1990** estime que la photolyse joue un rôle mineur dans la dégradation du glyphosate dans l'environnement. Selon une étude menée par **Rueppel et al en 1977**, le glyphosate peut résister à une exposition à la lumière naturelle de 8 heures pendant 16 jours, le même résultat est trouvé par **WORTHING et HANCE (2000)**.

##### **II.4.3. Dégradation biologique**

Le glyphosate peut être biodégradé par des bactéries ou par des champignons, le glyphosate étant ou non utilisé comme source de phosphore ou éventuellement d'azote. Aucune publication ne rapporte son utilisation en tant que source de carbone. Deux voies métaboliques ont été décrites conduisant à la formation intermédiaire de la glycine ou de l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) (**SINGH et WALKER, 2006**).



*Chapitre II.  
Matériel et  
méthodes*

Chapitre II. Matériel et méthodes

I. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué le 31/01/2019 au niveau de Sebkheth Sefioune (exutoire des eaux usées traitées et de drainage, sa superficie est en progression elle est estimée à 4000 ha) à Ouargla (commune de N'goussa) (**figure 03**), on a prélevé 04 échantillons d'eau de différents points afin d'avoir la diversité des échantillons (**photo 02**), la profondeur est entre 0.5m- 1m et la température était entre 10°C et 5°C respectivement. Les échantillons sont par la suite transférés immédiatement au laboratoire et conservés au réfrigérateur en attendant les analyses.



Figure 03: Localisation du site d'étude (google earth, 2019).



Photos 01: Site d'échantillonnage.

## **II. Caractéristiques de l'eau**

### **II.1. Potentiel hydrogène (pH)**

Le pH est le logarithme négatif de la concentration d'ion  $H^+$  libre d'une solution. Il se mesure par l'appareil pH-mètre. Il permet de déterminer l'acidité et la basicité de l'eau (SOLTNER, 1989).

### **II.2. Conductivité électrique (CE)**

Pour chaque échantillon d'eau, nous avons mesuré la CE, à l'aide de conductimètre en plaçant son électrode dans les bouteilles réservées à cet effet. Qu'elle estime la quantité des sels dissous dans l'eau (FRANK J et KEMMER N, 1992).

## **III. Analyses microbiologiques**

### **III.1. Ensemencement**

L'ensemencement est effectué en surface sur un milieu de gélose nutritive dans des boîtes de pétri avec un volume d'eau de 0,1ml prélevée par les quatre échantillons (**photo 03**). Les boîtes sont par la suite incubées à 30°C, après 24h à 48h d'incubation, les colonies développées sont isolées et repiquées l'opération est répétée trois fois de suite dans le même milieu afin de sélectionner des bactéries possédant un aspect identique.



**Photo 02: Ensemencement sur milieu de gélose nutritive**

### **III.2. Purification des colonies bactériennes**

Dans cette étape, nous avons effectué la purification des souches qui se sont développées sur milieu de gélose nutritive. La sélection des colonies est basée sur leur aspect macroscopique, à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs par la méthode de quadrant sur milieu (GN), (**voir annexe 03**).

### **III.3. Isolement des bactéries dégradant le glyphosate**

Cette phase nous permet de déterminer les bactéries qui sont capables de dégrader le glyphosate à partir des échantillons prélevés.

On a ensemencé les souches pures dans des boîtes de pétri coulées avec le milieu minimum solide (MMS), (voir annexe 02), contenant 35ml/l de glyphosate. L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24h à 48h.

### **III.4. Conservation des souches purifiées**

Les souches isolées sont conservées dans le glycérol additionné au BN (voir annexe 03) avec un pourcentage 30% et 70% respectivement dans les tubes Eppendorf. Ces tubes seront conservés à une température de 4°C pour une longue durée.

## **IV. Identification des souches**

L'identification implique une série d'étapes liées les unes aux autres, les espèces requises sont identifiées à travers des analyses différentes tel que les analyses morphologiques et les tests biochimiques (coloration de Gram, catalase et oxydase). Et enfin par l'utilisation d'un système d'identification API 20 E.

### **IV.1. Etude morphologique**

L'étude morphologique a été réalisée pour les souches pures afin de les classer, elle est subdivisée en deux parties : macroscopique et microscopique.

#### **IV.1.1. Aspect macroscopique**

L'observation et la description de l'aspect macroscopique des colonies isolées, permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après SINGLETON(1999), les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières, ...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La Chromogénèse: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée, ...etc.



### IV.1.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique consiste en une observation des cellules bactériennes à la coloration de Gram.

#### ✚ Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

Cette coloration (**voir annexe 04**) permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le violet de gentiane. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (**Gram-**), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (**Gram+**). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives (**MARCHAL et BOURDON, 1982**).

### IV.2. Etude biochimique

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les microorganismes étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes. Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (**TORTORA et al, 2003**).

#### IV.2.1. Etudes des enzymes respiratoires

##### ✚ Recherche de la catalase

La catalase (Ferro porphyrine, de poids moléculaire élevé) a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

On prend une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) et on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24h. Le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase (**GARNIER et DENIS, 2007**).



##### ✚ Recherche de l'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore,

cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

A l'aide d'une pince, placé un disque d'oxydase sur une lame porte objet. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Prélever la colonie choisie (à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée). Frotter la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes indique que le test est positif (MACFADDIN, 2011).

#### **IV.2.2. Système d'identification par des galeries API 20E**

La galerie API 20E c'est une analyse de métabolisme d'une colonie bactérienne isolée sur boîte de pétri, se présentant sous la forme d'une galerie de petits tubes en plastique contenant chacun un milieu différent déshydraté. Après inoculation et incubation durant 24h, la coloration des milieux sera révélatrice d'une modification ou non d'un composé donné par l'organisme étudié. Les résultats obtenus sont ensuite reportés sur une fiche d'identification, permettant d'obtenir un code propre à la souche étudiée, et l'identification se fait par consultation du catalogue de références fourni par Biomérieux. La galerie API 20E (**photo 04**) est une galerie dédiée à l'identification des entérobactéries (MERLET, 2011), selon les tests suivants:



**Photo 04 : Identification des souches bactériennes par API 20E**

##### **IV.2.2.1. Les tests de métabolisme glucidique**

###### **✚ Voges Proskauer (VP):**

C'est un voie fermentative intermédiaire effectuée par la réaction de Voges Proskauer (VP) qui donne la couleur rouge (VP+) (SINGLETON, 1999).

**✚ ONPG  $\beta$ -galactosidase (OPNG)**

L'ONPG un composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose, l'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre (MARCHAL et BOURDON, 1982).

**✚ Citrate perméase (CIT)**

Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone par la libération des OH et alcalinisation, donc il y aura la couleur bleu (SINGLETON, 1999).

**✚ Mannitol mobilité (MAN)**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité, une coloration jaune indique la fermentation du mannitol (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

**✚ Gélatinase (GEL)**

La gélatinase est une protéase ; enzyme qui hydrolyse le collagène (gélatine) en acides aminés ou en peptides (JAQUES et ALAIN, 2005), par l'apparence d'une diffusion des pigments noirs.

**✚ Sulfure d'hydrogène production (H<sub>2</sub>S)**

Test de la production de gaz sulfure d'hydrogène. Le sulfure d'hydrogène est produit si le composé soufré est réduit par la souche bactérienne, détecté par un dépôt noir (TILLE et FORBES, 2014).

**✚ D-glucose (GLU), D-saccharose (SAC)**

La fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, et qui est attaqué par voie fermentative entraînant une acidification, seront alors oxydés et fermentés (MARCHAL et BOURDON, 1982) traduit par la couleur jaune, la réaction se manifeste de la même manière avec les autres glucides; Inositol (INO), D-sorbitol (SOR), L-rhamnose (RHA), D-melibiose (MEL), Amygdaline (AMY), L-arabinose (ARA).

**IV.2.2.1. Les tests de métabolisme protéique****✚ Décarboxylases (ODC, LDC, ADH)**

Les décarboxylases ; la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine

correspondant avec la libération de CO<sub>2</sub> avec une coloration rouge (**MARCHAL et BOURDON, 1982**).

#### **Uréase (URE)**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone, et donne la coloration rouge (**JOFFIN et LEYRAL, 2006**).

#### **Production d'indole (IND)**

La production d'indole est mise en évidence par utilisation de tryptophane exempt d'indole, la couleur qui apparaît est le rose (**JOFFIN et LEYRAL, 2006**).

#### **Tryptophane-désaminase (TDA)**

La désaminase agit sur le L- tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (**SINGLETON, 1999**).

### **IV.3. Etude de la biodégradation du glyphosate par les souches bactériennes**

- Préparation de l'inoculum pour les études de biodégradation

Les souches ont été pré-cultivées pendant 18h dans un milieu BN dont la composition est donnée en (**annexe 03**), puis recueillies par centrifugation à 4000t/10mn à 4°C. Les inoculums cellulaires ont été lavés deux fois avec l'eau distillée stérile.

L'étude de la biodégradation a été effectuée dans des Erlenmeyers de 50 ml, contenant 2ml de suspension bactérienne et 18 ml de milieu minimum de sels minéraux MM stérile. Chaque souche possède trois Erlenmeyers, le premier et ledeuxième contiennent 2ml de glyphosate à 35ml/l (le deuxième c'est une répétition), la troisième contient 2 ml de glucose à 1g/l (témoin).

Tous les échantillons ont été mis en incubation sur un agitateur rotatif 120t/mn à 30°C (**photo 06**). Les échantillons de MM ont été périodiquement prélevés de manière aseptique pour déterminer le taux de croissance bactérienne.

La croissance des souches a été enregistrée par spectrophotométrie, en mesurant la densité optique (DO) à 660 nm durant 5 jours, en utilisant un spectrophotomètre ultraviolet-visible (**photo 07**).



**Photo 06: Agitateur incubateur**



**Photo 07 : Mesure de la densité optique par spectrophotométrie**

A decorative banner with a central rectangular box containing text. The banner has a ribbon-like shape with pointed ends and a central rectangular section. The text is centered within the rectangle.

*Chapitre III.  
Résultats et  
discussion*

## Chapitre III. Résultats et discussion

### I. Analyses physico chimiques de l'eau

#### I.1. pH

L'échantillon de l'eau prélevé présente un pH varié entre 7.32 à 7.46 (**figure 04**), (**voir annexe 02**) ; nous concluons que l'eau de Sebket Sefioune est caractérisée par un pH de neutralité approchée ( $7,3 < \text{pH} < 8$ ), (**RODIER, 1996**).

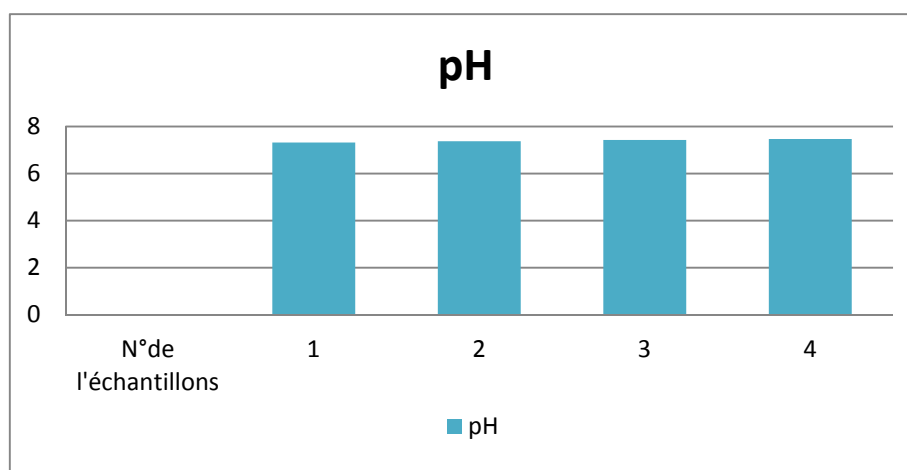


Figure 04 : pH de l'eau du site de Sebket Sefioune

#### I.2. Conductivité électrique

Les valeurs de la conductivité électrique (CE) de l'échantillon d'eau est supérieure à 6 dS/m ( $7,44 \text{ dS/m} < \text{CE} < 10,04 \text{ dS/m}$ ), (**figure 05**), ce qui lui confère la classe de l'eau saline; car c'est une eau de sebkha et exutoire des eaux de drainage, (**voir annexe 02**), (**RODIER, 1996**).

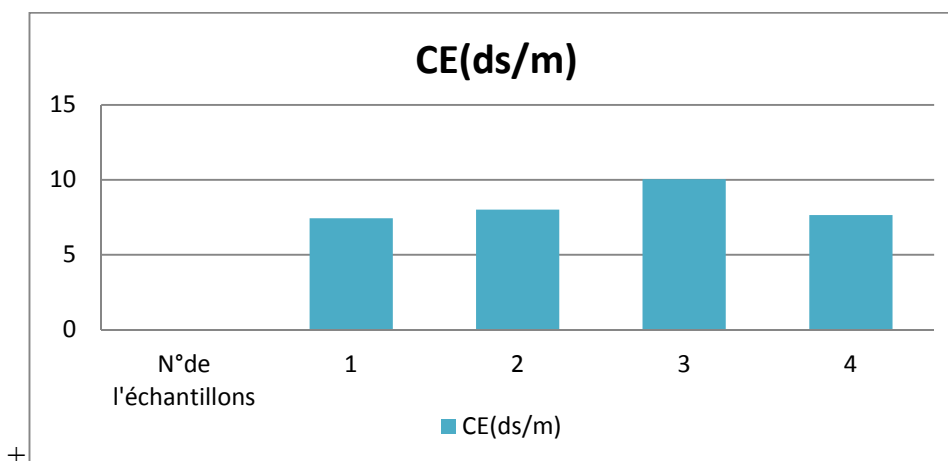
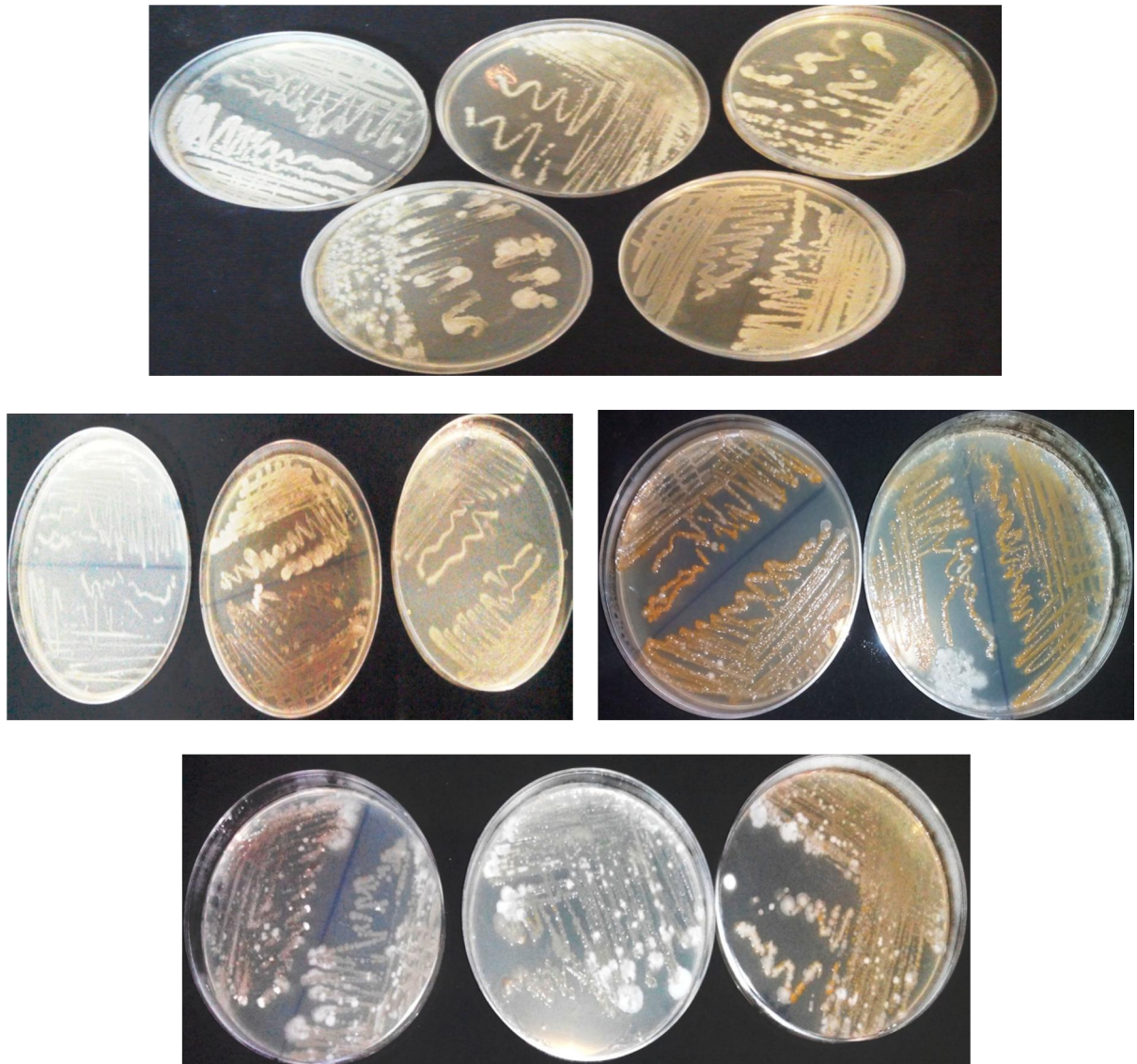


Figure 05 : la conductivité électrique de l'eau de Sebket Sefioune

## II. Analyses microbiologiques

### II.1. Observation de la croissance des bactéries

L'observation de la croissance des bactéries a été effectuée après 24h à 48 h de l'ensemencement sur le milieu GN, dans laquelle plusieurs colonies bactériennes sont apparues qui possèdent des aspects différents, a partir des quatre échantillons prélevés (**figure 06**).



**Figure 06 : Résultats des différentes colonies des bactéries obtenues avant la sélection**



## II. Isolement et identification des bactéries

### II.1. Etude morphologique

Au cours de cette partie du travail, nous avons traité les souches issues de l'ensemencement en présence de l'herbicide (le glyphosate). L'observation macroscopique des bactéries a été effectuée après 24h à 48h d'incubation à 30 °C. Nous avons isolé et identifié après la purification sept souches présentant des aspects différents (**figure 07**).

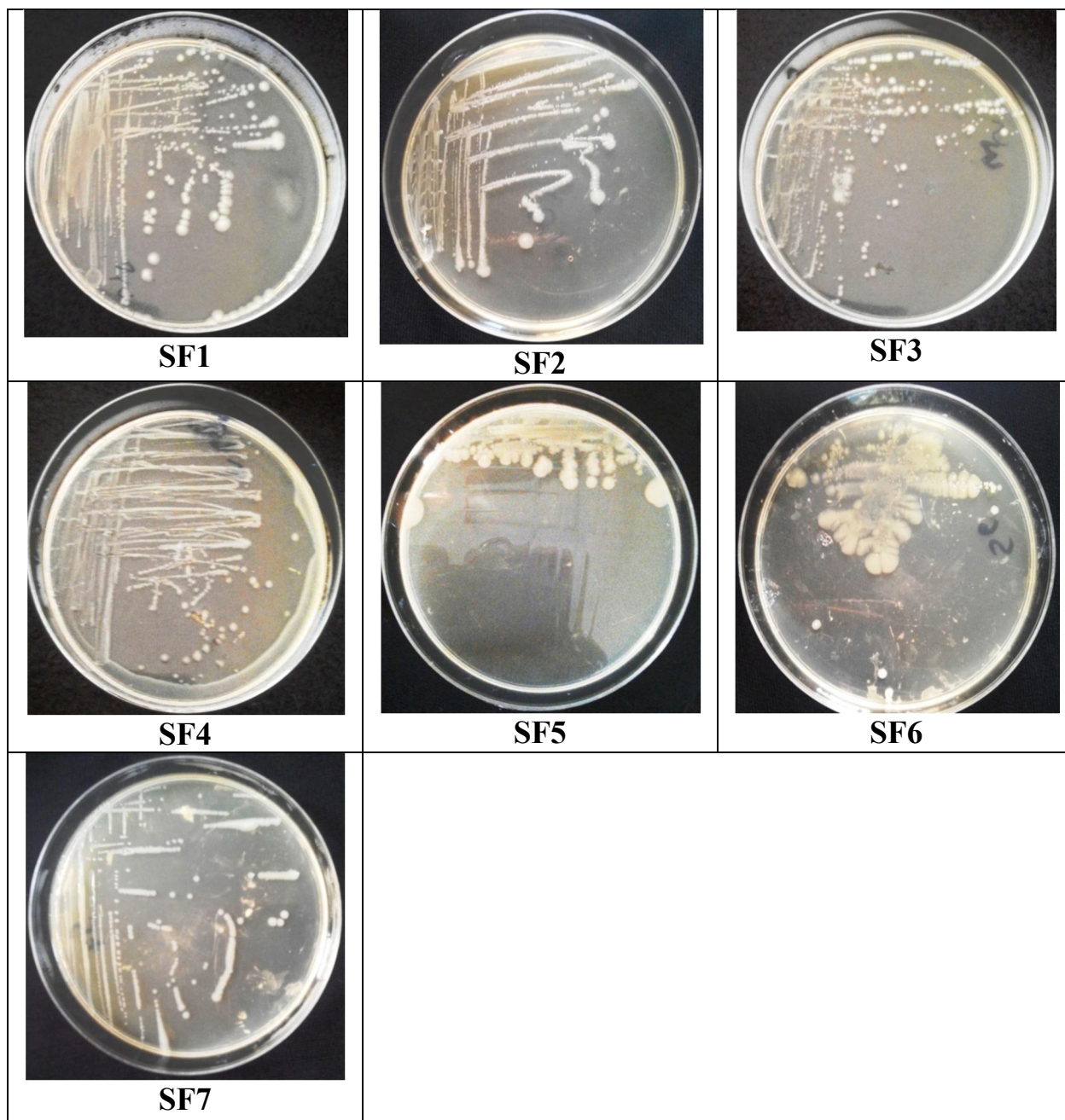


Figure 07 : Aspect macroscopique des bactéries purifiées

La caractérisation morphologique de ces souches est présentée dans le tableau 02.

**Tableau 02: Caractéristiques morphologiques des souches bactériennes isolées**

Critère souche	Taille	Couleur	forme	élévation	contour	opacité	surface	Consistance
SF1	Petite	Blanche	Ronde	plate	régulier	opaque	Lisse	Crémeuse
SF2	petite	Blanche	Ronde	Convexe (bombée)	régulier	Transparente	Lisse	Crémeuse
SF3	Petite	Beige	Ronde	plate	régulier	Transparente	Lisse	Crémeuse
SF4	Moyenne	Beige	Ronde	plate	régulier	Transparente	Lisse	Crémeuse
SF5	Moyenne	Blanche	Ronde	plate	régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
SF6	Moyenne	Beige	Ronde	plate	régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
SF7	Moyenne	Beige	Ronde	Convexe (bombée)	régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse

### III. Etude Biochimique

#### III.1. Coloration de Gram

L'observation microscopique après coloration de Gram a révélé que six souches apparaissent sous forme de bacilles colorés en rose, ce sont des bactéries à Gram négatif à paroi perméable à l'alcool, qui ont été décolorées puis recolorées par la fuchsine.

Et une souche possède une forme cocci colorée en violet, c'est une bactérie à Gram positif à paroi imperméable à l'alcool qui capable de fixer le violet de gentiane, (**figure 08**).

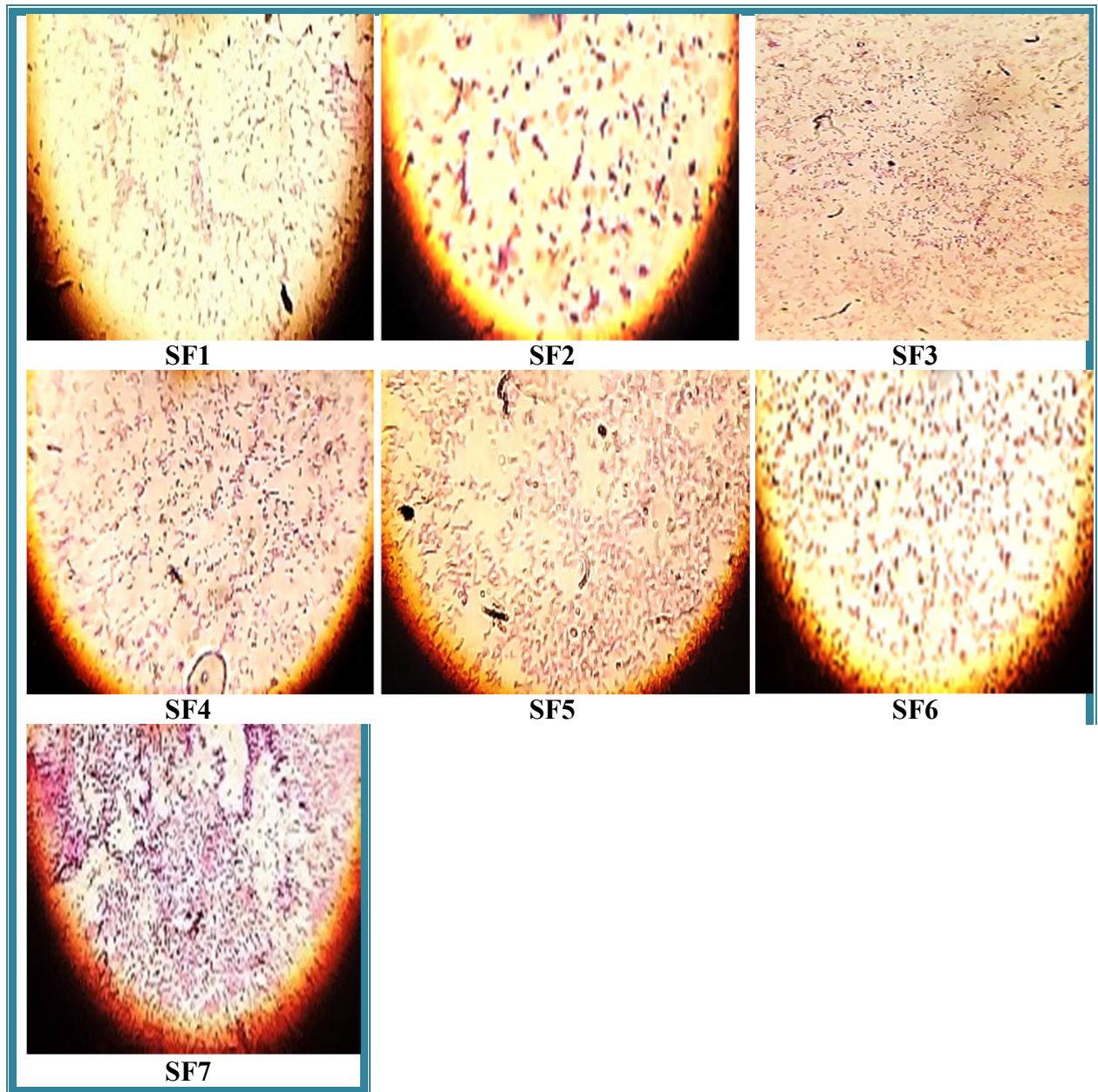


Figure 08 : Résultats de la coloration de Gram des souches isolées (G x 100)

### III.2. Test catalase

Les résultats du test catalase (**photo 08**) montrent qu'il y a parmi les sept souches isolées des bactéries, six à catalase positive et une à catalase négative.

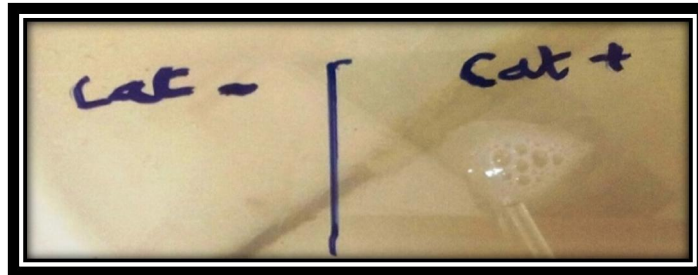


Photo 08 : La différence entre la catalase positive et la catalase négative

### III.3. Test de l'oxydase

Les résultats du test oxydase (**photo 09**) montrent l'existence parmi les sept souches isolées, deux souches à oxydase positive et cinq souches à oxydase négative.

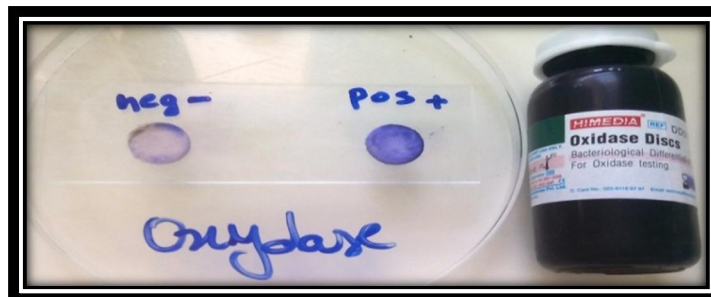


Photo 09 : La différence entre oxydase positive et oxydase négative

III.4. Identification des souches par l'API20E

Les résultats de l'identification des souches par l'API 20 E sont présentés dans le tableau 03.

Tableau 03: Résultats de l'identification des souches par l'API 20 E

Tests biochimiques	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7
Gram	Bacille Gram -	Bacille Gram -	cocci Gram +	Bacille Gram -	Bacille Gram -	Bacille Gram -	Bacille Gram -
Catalase	-	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	+	+
ONPG	+	+	-	+	-	-	/
ADH	-	-	-	-	-	-	/
LDC	+	-	-	-	-	-	/
ODC	-	-	-	-	-	-	/
Citrate	+	-	-	-	-	-	/
H2S	-	-	-	-	-	-	/
Uréase	-	-	-	-	-	-	/
TDA	+	-	+	-	-	+	/
Indole	+	-	-	-	+	+	/
VP	-	-	-	-	-	-	/
Gélatine	-	-	-	-	+	+	/
Glucose	+	+	-	+	-	+	/
Mannitol	+	+	-	+	+	+	/
Inositol	+	-	-	-	-	-	/
Sorbitol	+	+	-	+	+	+	/
Rhamnose	+	+	-	-	-	-	/
Saccharose	+	-	-	+	+	+	/
Melibiose	+	+	-	-	-	-	/
Amygdaline	+	-	-	+	+	+	/
Arabinose	+	+	-	-	-	-	/

L'identification des espèces a été réalisée en se basant sur les tests biochimiques d'API 20E (voir annexe 05), dont le principe repose sur les caractères physiologiques et biochimiques des souches (coloration de Gram, catalase et oxydase), (tableau 03), Sept isolats bactériens identifiées.

Pour la souche SF1, c'est une souche à Gram-, le test catalase et le test d'oxydase a montré qu'elle possède une catalase et oxydase négative.

Pour l'étude des caractères biochimiques, une galerie API 20E est inoculée avec une suspension bactérienne de la souche SF1.

#### ✚ Caractères biochimiques de la souche bactérienne (SF1)

Le test d'ONPG montre que la souche (SF1) possède de la B- galactosidase (enzyme de métabolisme du lactose), une réponse positive est obtenue pour la lysine décarboxylase (LDC), le citrate et le tryptophane désaminase (TDA), une réponse négative pour l'uréase, l'arginine dihydrolase (ADH), d'ornithine décarboxylase (ODC), la gélatine et la réaction de Voges Proskauer (VP). Elle produit l'indole, fermente le glucose, le saccharose et assimile le mannitol et les autres glucides.

En comparant les résultats de l'API 20E (**photo 10**) avec les genres bactériens publiés dans la 8<sup>ème</sup> édition du <<Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, on assimile la souche SF1 au genre *Serratia*, précisément l'espèce *Serratia ficaria* (**BIZIO, 1923**).

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec de précédents travaux qui indiquaient, la présence d'une souche capable de dégrader le glyphosate appartenant au genre *Serratia* (**BENSLAMA, 2014**).



**Photo 10: Résultats de la galerie API 20E inoculée avec la SF1 (*Serratia ficaria*)**

#### ✚ Caractères biochimiques des souches bactériennes SF2, SF4 et SF5

Pour les souches SF2, SF4 et SF5, se sont des souches à Gram- possédant un test catalase positif et un test oxydase qui est négatif. Pour connaître les caractères biochimiques des trois souches citées, une galerie API 20E est inoculée avec une suspension bactérienne pour chacune des trois souches (SF2, SF4 et SF5).

La souche (SF2) possède de la B- galactosidase, la souche (SF5) produit l'indole et il y a une fermentation de quelques glucides présentés (**tableau 03**), tel que le glucose pour la souche (SF2), le mannitol et le sorbitol pour les trois souches.

Après la comparaison des résultats des galeries API 20E (**tableau 03**) avec les genres bactériens publiés dans la 8<sup>ème</sup> édition du <<Bergey's Manual of Determinative Bacteriology>> on démontre que la souche SF2 et SF4 appartiennent au genre *Klebsiella* précisément l'espèce *Klebsiella pneumoniae ozaenae* (SF2) (**ABEL, 1893**) et *Klebsiella*

*pneumonia erhinoscleromatus* (SF4) (TREVISAN, 1887), et la souche SF5 appartient au genre *Erwinia* spécifiquement *Erwinia* sp (WINSLOW, 1917).

Les microorganismes capables d'utiliser l'herbicide bromoxynil (3, 5-dibromo-4-hydroxybenzonnitrile), et métabolisent rapidement ce composé, un isolat identifié comme *Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae* (MCBRIDE et STALKER en 1986).

Dans une expérimentation, il a été montré la capacité d'une communauté bactérienne; *Burkholderia* sp., *Erwinia* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp, a récupérée 10% d'un milieu contaminé par le glyphosate (JULIA et al,2005).

#### ✚ Caractères biochimiques des souches bactériennes SF3, SF6 et SF7

Pour la souche SF3 l'une seule souche qui on a trouvé à Gram +, le test catalase et l'oxydase a montré que cette souche à catalase positive et oxydase négative. Et les souche SF6 et SF7 sont des bactéries à Gram - et ont une catalase positive et oxydase positive.

A partir des résultats de l'API 20E (tableau 03) ; une réponse positive du tryptophane désaminase (TDA) pour les souches SF3 et SF6, et aussi de l'indole, Gélatine et la fermentation / oxydation des glucides comme le glucose, le Saccharose et l'amygdaline pour la souche SF6.

En comparant les résultats de l'API 20E (tableau 03) avec les genres bactériens publiés dans la 8<sup>ème</sup> édition du <<Bergey's Manual of Determinative Bacteriology>>, on assimile la souche SF3 au genre *Staphylococcus* précisément l'espèce *Staphylococcus aureus* (ROSENBAACH, 1884), et la souche SF6 au genre *Pseudomonas* spécifiquement l'espèce *Pseudomonas* sp (MIGULA, 1894).

Dans une étude, il a été conclu que les isolats bactériens comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* ont la capacité d'utiliser les pesticides et bien pousser dans le milieu complété avec des pesticides comme source de carbone (TAMILSELVAN et al, 2014).

Dans les études précédentes, ont été trouvées que quatre espèces de *Pseudomonas* isolées qui poussaient uniquement sur glyphosate ont été identifiés (*P. maltophilia*, *P. putida*, *P.aeruginosa* et *Pseudomonas* sp), dont la croissance n'ont pas été inhibés en raison d'une résistante au glyphosate (SCHULZ et al, 1985).

Dans une autre étude, a montré que parmi sept espèces bactériennes identifiées, deux (*Acetobacter* sp et *Pseudomonas fluorescens*) ont été sélectionnés pour l'étude de biodégradation basées sur leur court délai phase et utilisation rapide du glyphosate. Beaucoup espèces de *Pseudomonas* ont été largement utilisées dans la dégradation et / ou métabolisme du glyphosate (JACOB et al, 1988).

L'application de glyphosate entraîne la diminution substantielle de l'abondance des microorganismes a été indiqué par (WEAVER et al, 2007; SANTOS et al, 2004; JAKELAITIS et al, 2006).

En général, les herbicides agissent indirectement sur les microbes, entraînant des modifications physiologiques, une augmentation de la production enzymatique, ou lorsqu'ils sont appliqués à fortes doses, la mort de groupes de micro-organismes sensibles (CERVELLI et al, 1978).

La capacité des bactéries à dégrader facilement des pesticides organophosphorés qu'elles utilisent comme seule source de carbone et d'énergie (WALKER, 1978).

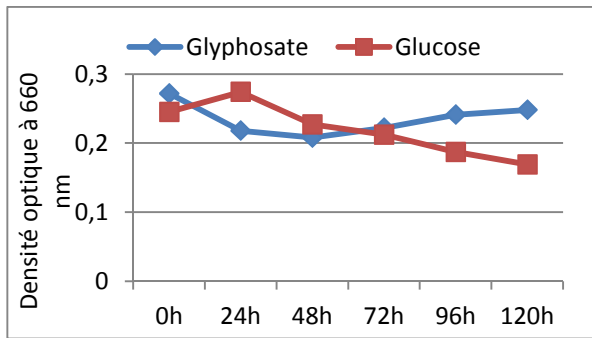
Les résultats obtenus sont en accord avec des précédents travaux qui indiquaient l'implication des différentes espèces des *Enterobacteriaceae*, mis à part la souche7 (SF7) qui reste inconnue.

#### **IV. Mesure de la densité optique en présence de glyphosate**

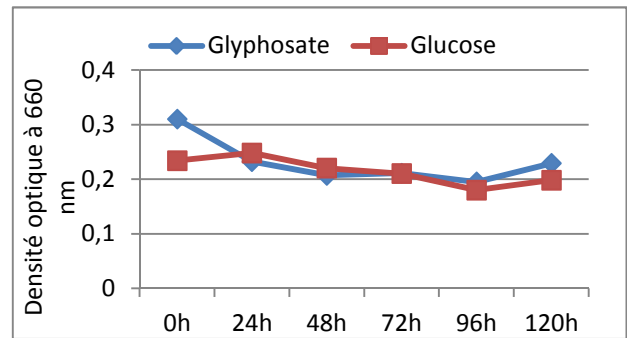
Après l'isolement des sept souches, qui avaient la capacité de dégrader le glyphosate au milieu ne contenant que des sels minéraux (MM) et aussi contient ce produit avec une concentration 35ml/l qui a été utilisé comme source unique de carbone et d'énergie.

Le résultat de la croissance des bactéries en présence de glyphosate a montré que la totalité des sept souches sont capables de croître, en comparant cette croissance avec le témoin qui contient le glucose 1g/l (**figure 9**).

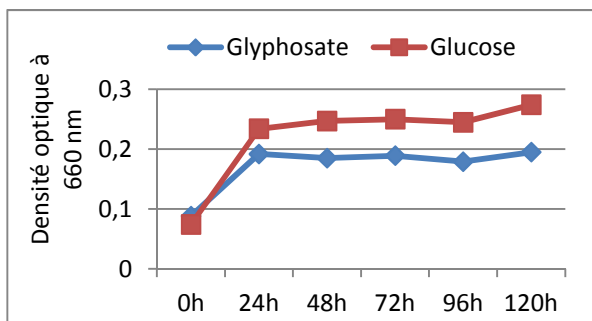




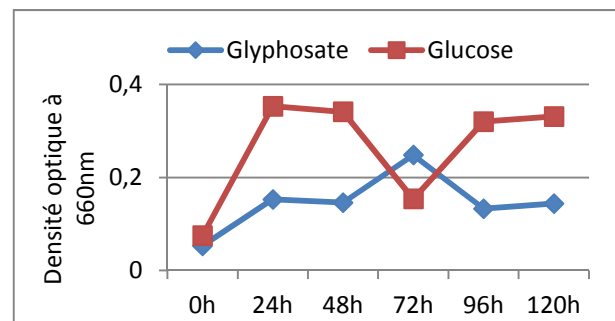
Souche 1



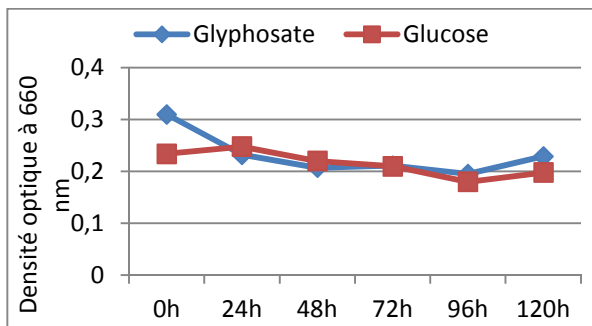
Souche 2



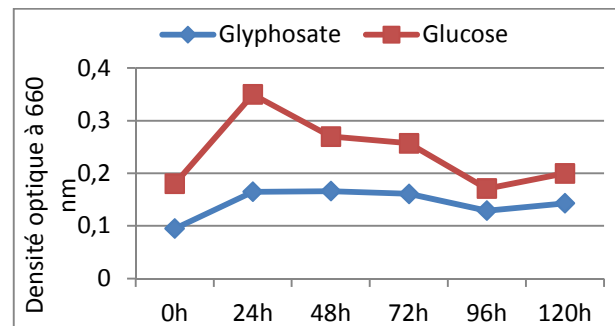
Souche 3



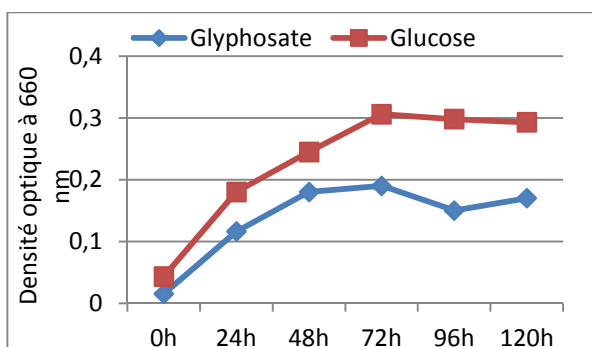
Souche 4



Souche 5



Souche 6



Souche 7

Figure 09: Résultats de la mesure de la densité optique (DO).

La figure 09 représente la mesure de la densité optique des sept souches qui sont capables de dégrader le glyphosate et leur croissance pendant 05 jours.

La densité optique des sept souches au temps 0h est variable, comprise entre 0.01 et 0.3. Dès les 1<sup>ère</sup>s heures d'incubation, une croissance significative est observée pour les souches SF3, SF6 et SF7 après deux jours d'incubation. Au cours des prochaines heures, nous avons noté une diminution du taux de croissance pour les souches SF3, SF4, SF6 et SF7 par contre une augmentation de taux de croissance est remarquable pour les souches SF1, SF2, et SF5 qui a augmenté pendant ces heures. Cette dégradation est immédiate indiquant qu'il n'y a pas de phase de latence et que la grande partie de la population microbienne est capable de dégrader le glyphosate par co-métabolisme (**WIREN-LEHR et al, 1997; FORLANI et al, 1999 ; CHEAH et al, 1998 ; STENROD et al, 2003**).

Pendant les premières heures d'incubation (la phase de latence), la majorité des souches se sont multipliées. Ce doublement peut s'expliquer par une acclimatation rapide des bactéries en présence de glyphosate.

Au cours de la phase exponentielle, une multiplication croissante est observée pour les souches SF3, SF6 et SF7 montre que les bactéries utilisent le glyphosate comme seule source de carbone et d'énergie.

La dégradation biotique est due à des enzymes intracellulaires qui font intervenir un facteur supplémentaire qui est la croissance microbienne (**CALVET et al, 2005**).



*Conclusion et  
perspectives*

### Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail visait à établir une relation entre la qualité de l'eau (contaminée par le glyphosate), et les bactéries isolées, identifiées et leur capacité à tolérer cet herbicide.

Dans ce contexte et à partir des analyses physico-chimiques (pH et CE) nous avons constaté que l'échantillon de l'eau caractérisé par un pH de neutralité approchée et une conductivité électrique de la classe saline. Sept souches bactériennes ont été isolées puis identifiées à partir des échantillons étudiés, en utilisant des milieux minimum enrichis par l'herbicide (glyphosate) qui est fourni comme seule source de carbone et d'énergie. Les souches apparaissent sous forme de bacilles à Gram négatif et cocci à Gram positive appartenant aux genres et espèces suivants : *Serratia ficaria*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Erwinia* sp, *Pseudomonas* sp et le septième n'a donné aucun résultat par l'API 20E.

La mesure de la densité optique montre une cinétique de croissance variable entre les sept souches isolées, mais la totalité des souches sont capables de croître en présence de glyphosate, en comparant avec le témoin, cette croissance indique le développement important des souches testées, traduisant une bonne tolérance et transformation du pesticide comme source de carbone et d'énergie dans le milieu.

Ces résultats montrent que ces souches peuvent être utilisées dans la bioremédiation de l'environnement contaminé par le glyphosate, la bioremédiation est un moyen pas cher et écologique pour éliminer les composés phytosanitaires de l'environnement.

Il est donc souhaitable de compléter cette étude par des études plus approfondies, à savoir :

- ✚ Compléter l'identification de la souche sept par d'autres méthodes.
- ✚ Déterminer le taux de la biodégradation du glyphosate à des concentrations différentes par les bactéries isolées.
- ✚ Réaliser une identification à base moléculaire des souches isolées et détecter les gènes responsables de la biodégradation du glyphosate.



*Références  
bibliographiques*

**Références bibliographique**

**ABEL., 1893.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>ème</sup> édition, USA. p 345.

**ALEXANDER M., 1999.** Biodégradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).

**AMALRIC L ; BARAN N ; JEANNOT R ; MARTIN J.C ; MOUVET C., 2003.** Les mécanismes de transfert des produits phytosanitaires du sol vers les nappes et les méthodes d'analyse des produits phytosanitaires dans les eaux. BRGM/RP-51590-FR, 116 p., 31 fig., 18 tabl.

**AMAND, J et JACOBSEN, O.S., 2001.** Sorption and degradation of glyphosate and dichlobenil in fractured clay. BCPC Symposium Proceedings n° 78: Pesticide Behaviour in Soil and Water. 55: 205-210.

**ARIAS E. M; LOPEZ P. E; MARTINEZ C. E; SIMAL G. J., MERUT J. C., GARCIA R. L., 2008.** The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, ecosystems and environment vol 123: 247-260.

**BAOUIA A., 1998.** La nouvelle exploitation agricole oasienne face aux changements de l'environnement économique. Mémoire INFSAS. Ouargla, 59 p.

**BELAMIE R ; R. CALVET and P. CHASSIN., 1997.** Les transferts sol-eau des produits phytosanitaires. L'eau dans l'espace rural, production végétale et quantité de l'eau, INRA Edition, p 231-248.

**BENSLAMA O., 2014.** Isolement et caractérisation des bactéries capables de dégrader l'herbicide glyphosate et optimisation des conditions de culture pour une dégradation plus efficace. En Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement. Cas de Biskra et Constantine. Thèse de Doctorat. Université de Constantine 1, p120.

**BIZIO., 1923.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>ème</sup> édition, USA. p 359,360.

**BOUZIANI M., 2007.** L'usage immodéré des pesticides. de graves conséquences sanitaires. Le guide de médecin et de la santé. Santé Maghreb. (Consulte, 11/12/2011).

**CALVET R; E. BARRIUSO; C. BEDOS; P. BENOIT; M.-P CHARNAY; Y. COQUET., 2005.** Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales, Edition France AGRICOLE. 637 p.

- CALVET R., 2005.** Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole Editions.p. 637.
- CAPKIN E; ALTINOK I et KARAHAN S., 2006.**Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere* 64:1793–1800.
- CERVELLI S; NANNIPIERI P et SEQUI P., 1978.** Interactions between agrochemicals and soil enzymes. *Soil enzymes*. 251-293.
- CHARBONNEAUX A., 1993.** Synthèse bibliographique des principales familles de pesticides. p 88.
- DEVILLER J; FARRET R; GIRARDIN P; RIVIERE J.-L; SOULAS G., 2005.** Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides. Edition Tech & Doc, Londres, Paris, New York.p 11.
- FOGARTY A et TUOVINEN O., 1991.** « Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. », *Microbiol. Rev.*, vol. 55, no 2, p. 225–233.
- FOURNIER J.C., 1996.** Microbial aspects of soil pesticide degradation in surface soil, In *Pesticides, Soil microbiology and soil quality*. pp. 78- 87.
- FRANÇOIS C., 2000.** Approche spatiale de la pollution des eaux de surface par les produits phytosanitaires cas de l'atrazine dans le bassin versant du sousson (GERS, France).
- FRANK J et KEMMER N., 1992.** Manuel de l'eau .Edition : Lavoisier .P 3.102.105.
- FURUKAWA K., 2003.** 'Super bugs' for bioremediation.*Trends Biotechnology*. 21: 187-190.
- GARNIER F ; DENIS F., 2007.** Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254.
- GAVRILESCU M., 2005.** Fate of pesticides in the environment and its bioremediation.*Engineering in Life Sciences*. 5: 497-526.
- GDOURA M., 2013.** Amélioration de la capacité de biodégradation de deux pesticides (methylparathion, méthomyl) par des bactéries irradiées. en vue de l'obtention du Diplôme National d'Ingénieur en Sciences Appliquées et en Technologie. Université de Carthage. 70p.
- GUNNINGHAM N et SINCLAIR D., 2005.**« Policy instrument choice and diffuse source pollution », *J. Environ. Law*, vol. 17, no 1, p. 51–81.

**HICHAM Z., 2015.** Dégradation de pesticides dans l'eau par les procédés d'oxydation avancée (POA). Matériaux. En Science et Techniques de l'Environnement. Thèse de Doctorat. Université Paris-Est, Français et l'Université Ibn Zohr Faculté des Sciences d'Agadir, p175.

**IFEN (Institut Français de l'Environnement), 1998** — Les pesticides dans les eaux. Collecte et traitement des données. Etude et Travaux n°19, Paris, 188pp.

**JACOB G.S; GABROW J.R; HALLAS L.E; KIMACK N.M; KISHORE G.M.; SCHAEFER J .,1988.** Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2953-2958.

**JAKELAITIS A; SANTOS J.B; SILV A.A; COSTA M.D; MANABE A, SILVA M.C.S., 2006.** Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) in conventional-till and no-till systems. Weed Res. 46(4):284-289.

**JAQUES B, ALAIN A-COSTESECC et CHRISTIAN de DUVE., 2005.** Dictionnaire de Biologie, 1<sup>re</sup> édition, novembre, p1018.

**JOFFIN J. N et LEYRAL G., 2006-** Microbiologie technique, Tomel : Dictionnaire des techniques, 4<sup>eme</sup> édition. Edition CRDP d'équitaire, p368.

**JU'LIA KUKLINSKY- S., WELINGTON LUIZ A., RODRIGO MENDES., ALINE APARECIDA P -KLEINER & JOA'Õ LU' CIO A., 2005.** Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. Plant and Soil 273: p91–99.

**KAN C et MEIJER G., 2007.** « The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed », Anim. Feed Sci. Technol., vol. 133, no 1–2, p. 84–108.

**KAUFMANN K., 2004.** Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).

**KNEPPER T ; SACHER F ; LANGE F ; BRAUCH H ; KARRENBROCK F ; ROERDEN O ; LAL R et SAXENAD., 1982.** « Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. », Microbiol. Rev., vol. 46, no 1, p. 95–127.

**KRZYSKO-LUPICKA T et ORLIK A., 1997.** The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. Chemosphere. 34: 2601–2605.



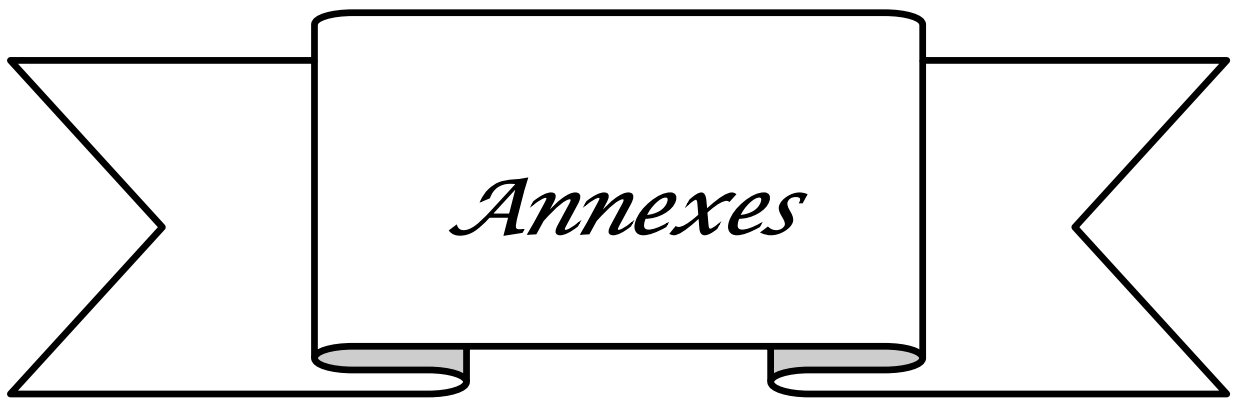
- LAPERTO M., 2006.** A strategy for xenobiotic removal using Photocatalytic treatment, microbial degradation or integrated photocatalytic-biological process. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France). Le guide de médecin et de la santé. Santé Maghreb. (Consulter, 11/12/2011).
- LINDNER K., 1999.** «Detection of polar organic substances relevant for drinking water », Waste Manag., vol. 19, no 2, p. 77-99.
- MACFADDIN J. F., 2011.** Oxidase test, Biochemical test for Identification of Medical Bacteria, 154-162.
- MARCHAL N et BOURDON J. L., 1982.** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.
- MARGNI M ; ROSSIER D ; CRETZAZ Pet JOLLIET O., 2002.** Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 93 (1-3): 379- 392.
- MCBRIDE, K.E; KENNY J.W; and STALKER D.M., 1986.** Metabolism of the herbicide bromoxynil by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 325.
- MERLET-B M ; PALAGI A ; STREK L ., 2011-2012.** Travaux pratique de microbiologie, université nice Sophia Antipolis. p7. microbiology (Thirteenth edition.). St. Louis, Missouri: Elsevier. Microbiology. 57: 1799-1800.
- MIGULA., 1894-** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ème édition, USA. p89.
- MOHAMED OULD SID'AHMED OULD KANKOU., 2004.** Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie-Etude en laboratoire du comportement de deux pesticides, Limoges.
- MOUSSAVI G ; HOSSEINI H ; ALAHABADI A., 2013.** « The investigation of diazinon pesticide removal from contaminated water by adsorption onto NH<sub>4</sub>Cl-induced activated carbon », Chem. Eng. J., vol. 214, p. 172-179.
- NASREDDINE L et PARENT D -MASSIN., 2002.** « Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? », Toxicol. Lett., vol. 127, no 1-3, p. 29-41. phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. Chemosphere. 34: 2601-2605.

- RITTER W., 1990.**« Pesticide contamination of ground water in the United States - A review », J. Environ. Sci. Health Part B, vol. 25, no 1, p. 1-29.
- RODIER J., 1996.** L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, Eaux résiduaires, Eau de mer. 6<sup>ème</sup> édition: Dunod, Paris.
- ROSENBACH., 1884.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>ème</sup> édition, USA. p 464, 465.
- SANTOS J.B ; JACQUES R.J.S ; PROCOPIO SO ; KASUYA M.C.M ; SILVA A.A et SANTOS E.A., 2004.** Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de Bradyrhizobium Effects of different glyphosate commercial formulations on Bradyrhizobium strains. Planta Daninha. 22(2):293-299.
- SCHIAVON M ; PERRIN C-GANIER et PORTAL J., 1995.** « La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : état et origine », Agronomie, vol. 15, no 3-4, p. 157-170.
- SCHULZ A; KRÜPER A; AMRHEIN N., 1985.** Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate.FEMS Microbiol. Lett. 28:297-301. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La SB, Fournier PE, Rolain
- SINGLETON P., 1999-** Bactériologie, Edition Duonod 4<sup>ème</sup> édition Paris. P.415.
- SLAMEN N., 2015.** Place des produits phytosanitaires inféodés aux ravageurs dans la regionde Ouargla.Thèse.Mastre.Univ.Ouargla. 58p.
- SOES., 2014 .** Observatoire et statistiques.
- TAMILSELVAN C; JOHN JOSEPH S; MUGUNTHAN G; SATHISH KUMAR A; SYED MUSTHAQ AHAMED S., 2014 .**Biological Degradation of Metribuzin and Profenofos by some Efficient Bacterial IsolatesInternational Letters of Natural Sciences .ISSN: 2300-9675, Vol. 14, pp 26-39.
- TILLE P. Met FORBES B. A., 2014.** Bailey &Scott's diagnostic
- TORTORA G. J ; FUNKE B.R et CASE C. L., 2003.** Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc.* pp : 157- 355.
- TREVISAN., 1887.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>ème</sup> édition, USA. p346.
- UIPP** « Union des Industrie de la Protection des Plantes ». **2007.**  
<http://www.uipp.org/repere/chiffre.php>

**WALKER., 1978** . Insecticide persistence in natural seawater as affected by salinity, temperature, and sterility. Environmental research laboratory office of research and development U.S environmental protection agency gulf breeze Florida 32561 .pp 14, 15.

**WEAVER M.A; KRUTZ L.J; ZABLOTOWICZ R.M; REDDY K.N 5., 2007.** Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. Pest Manag Sci. 63(4):388-393.

**WINSLOW., 1917.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ème édition, USA. p 349, 350.



*Annexes*

Annexe 01 : Figure des différentes étapes expérimentales



Photo 01: Sebkhet Sefioune

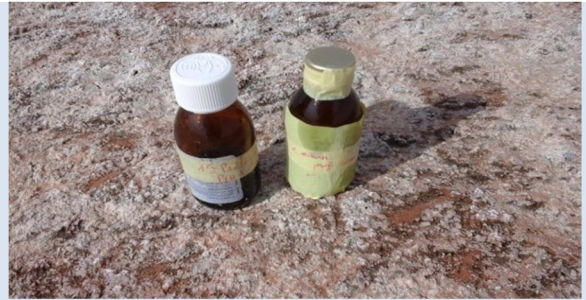


Photo 02: Les échantillons



Photo 03: Observation des colonies bactérienne



Photo 04: Observation des colonies bactérienne



Photo 05: Ensemencement des bactéries dans le milieu gélosé nutritif



Photo 06: l'échantillonnage

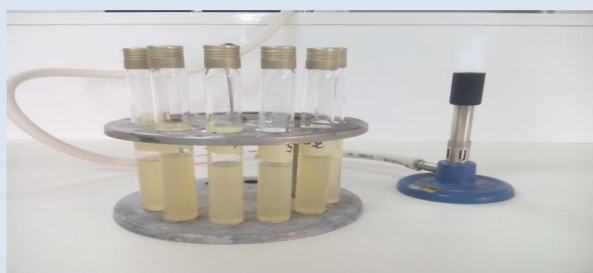


Photo 07: La pré-cultivation des souches dans le BN



Photo 08: La 1<sup>ère</sup> étape de coloration de Gram



Photo 09: Identification des souches

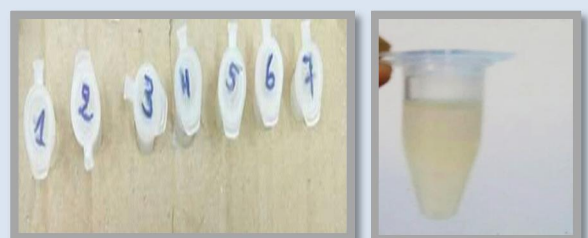


Photo 10: La conservation des souches

**Annexe 02 : Echelle d'interprétation des analyses physicochimiques de l'eau (RODIER, 1996)**

**Tableau 01 : Echelle de pH de l'eau**

pH	Eau
pH < 5	acidité forte
pH = 7	neutralité (eau pure)
7 < pH < 8	neutralité rapprochée (eau de surface)
5,5 < pH < 8	majorité des eaux souterraines
pH > 8	alcalinité, évaporation intense.

**Tableau 02 : Echelle de salinité de l'eau en fonction de la conductivité électrique**

CE (Us/cm) à 25 °C	Degré de salinité
CE = 0,05	eau déminéralisée
10 < CE < 80	eau de pluie
80 < CE < 100	eau peu minéralisée
300 < CE < 500	eau moyennement minéralisée
1000 < CE < 3000	eau saline
CE ≥ 3000	eau de mer.

**Annexe 03 : Composition chimique des milieux de culture et solutions utilisés**

**1. Gélose nutritive**

Ingredients	Quantité
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000ml
pH=7.4	

**2. L'eau physiologique**

Ingredients	Quantité
Chlorure de sodium	9 g
Eau distillée	1000ml

### 3. Milieu minimum

Ingrédient	Quantité
FeSO <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O	0,013 g/l
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,013 g/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5 g/l
Extrait de levure	0,6 g/l
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH = 7	

### 4. Bouillon nutritif

Ingredients	Quantité
Tryptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000ml
pH=7.2	

### Réactifs et solutions :

- Eau physiologique stérile
- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool 90°C
- Fushine basique
- Eau distillée
- l'eau oxygénée
- HCl et NaOH
- Huile de paraffine
- Disques d'oxydases
- glyphosate
- Réactifs de Kovacs
- Réactif de TDA
- Réactif VP 1 et VP 2
- Acide acétique

## Annexe 04: Le principe de technique coloration de Gram

### Coloration de Gram

D'après SINGLETON (1999), la coloration de Gram s'effectue selon les étapes suivantes :

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 minute. Eliminer l'excès par l'eau courante.
- Ajouter du Lugol : deux bains de 45 secondes, jeter l'excès par l'eau courante.
- Traiter a l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau.
- Recolorer à la Fushine pendant 1à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage.
- L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion ; les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

### Annexe 05: Résultats des galeries API20E



Figure 01: Résultats de l'API 20E pour la souche (S2)



Figure 02: Résultats de l'API 20E pour la souche (S3)



Figure 03: Résultats de l'API 20E pour la souche (S4)



Figure 04: Résultats de l'API 20E pour la souche (S5)





Figure 05: Résultats de l'API 20E pour la souche (S6)

### Annexe 06 : Etude de la cinétique de croissance des 7 souches pures isolées dans le glyphosate par rapport au glucose

Jours	Glyphosate	Glucose
0 h	0,272	0,245
24 h	0,218	0,274
48 h	0,208	0,227
72 h	0,222	0,212
96 h	0,241	0,187
120 h	0,248	0,169
<b>Souche 1</b>		

Jours	Glyphosate	Glucose
0 h	0,310	0,234
24 h	0,232	0,248
48 h	0,207	0,220
72 h	0,211	0,210
96 h	0,195	0,180
120 h	0,229	0,198
<b>Souche 2</b>		

Jours	Glyphosate	Glucose
0 h	0,088	0,074
24 h	0,192	0,234
48 h	0,185	0,247
72 h	0,189	0,250
96 h	0,179	0,245
120 h	0,195	0,274
<b>Souche 3</b>		

Jours	Glyphosate	Glucose
0h	0,053	0,075
24h	0,153	0,353
48h	0,146	0,341
72h	0,248	0,154
96h	0,133	0,320
120h	0,144	0,331
<b>Souche 4</b>		

Jours	Glyphosate	Glucose
0h	0,088	0,130
24h	0,173	0,399
48h	0,169	0,338
72h	0,175	0,295
96h	0,156	0,276
120h	0,178	0,215
<b>Souche 5</b>		

Jours	Glyphosate	Glucose
0h	0,095	0,180
24h	0,165	0,350
48h	0,166	0,270
72h	0,161	0,257
96h	0,129	0,171
120h	0,143	0,200
<b>Souche 6</b>		

Jours	Glyphosate	Glucose
0 h	0,015	0,043
24 h	0,116	0,180
48 h	0,180	0,245
72 h	0,190	0,306
96 h	0,150	0,298
120 h	0,170	0,293
<b>Souche 7</b>		

## Etude de la biodégradation du glyphosate par des bactéries isolées à Sebkhet Sefioune –Ouargla (Sud-Est de l'Algérie)

### Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'identification de certaines souches bactériennes qui semblent avoir une capacité de dégrader le glyphosate (Roundup); c'est un herbicide de la famille des organophosphorés, dans les eaux de Sebkhet Sefioune de la wilaya de Ouargla commune de Ngoussa .

Les échantillons des eaux usées traitées, présentent un pH entre 7.32 et 7,46 c'est une eau neutre, et une conductivité électrique entre 7.44 à 10.04 ds/m traduisant une eau salée. Ces caractéristiques ont certainement favorisé un développement d'une microflore bactériennespécifique. L'analyse microbienne de ces échantillons a révélé la présence de sept souches isolées et identifiées, affiliées aux genres *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* et *Erwinia*. Ces genres bactériens présentent une variabilité dans leur cinétique de croissance indiquant un développement important en présence du glyphosate. Dans ce contexte les bactéries peuvent utiliser le pesticide testé comme seule source de carbone et d'énergie, et donc contribuent pour une éventuelle application en dépollution et en bioremédiation.

**Mots clés :** Biodégradation, glyphosate, bactéries, eaux, Sebkhet Sefioune, ouargla.

## Study of the biodegradation of glyphosate by bacteria isolated at Sebkhet Sefioune–Ouargla (South East Algeria)

### Abstract

The objective of this work is the isolation and identification of certain bacterial strains that appear to have the ability to degrade glyphosate (Roundup); it is a herbicide of the organophosphorus family, in the waters of Sebkhet Sefioune of the wilaya of Ouargla commune of Ngoussa.

The treated waste water samples have a pH between 7.32 and 7.46 it's neutral water, and an electrical conductivity of 7.44 to 10.04 ds / m, indicating salty water. These characteristics certainly favored a development of the bacterial microflora specific. Microbial analysis of these samples revealed the presence of seven isolated and identified strains affiliated with the genera *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* and *Erwinia*. These bacterial genera exhibit variability in their growth kinetics indicating significant development in the presence of glyphosate. In this context, these bacteria can use the tested pesticide as a single source of carbon and energy, and therefore contribute to a possible application in dépollution and bioremediation.

**Key words:** Biodegradation, glyphosate, bacteria, water, Sebkhet Sefioune. Ouargla.

دراسة التحلل الحيوي للغليفوزات بواسطة البكتيريا المعزولة على مستوى سبخة سفيون بولاية ورقلة (جنوب شرق الجزائر)

### الملخص

تمحورت دراستنا حول عزل وتحديد لبعض الأنواع البكتيرية التي لها القدرة على تفكيك المبيد العشبي المسمى بالغليفوزات في مياه سبخة سفيون ببلدية انقوسة التابعة لولاية ورقلة

تتميز عينات المياه المستعملة المعالجة بكمون هيدروجيني يتراوح بين 7.32 و7.46 تعرف كونها مياه متعادلة وتتميز أيضا بملوحة مرتفعة تتراوح من 7.44 الى 10.04 دس/م ، هذه الخصائص تعزز بالتأكيد تطور البكتيريا الدقيقة الخاصة.

كشفت التحليل الميكروبي لهذه العينات وجود سبع سلالات معزولة والتي تم تحديدها والمرتبطة بالأجناس *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Erwinia*. تظهر هذه الأجناس البكتيرية تبايناً في حركيات نموها مما يشير إلى حدوث تطور كبير في وجود الغليفوزات ، في هذا السياق، يمكن استخدام الغليفوزات من طرف هذه البكتيريا كمصدر وحيد للكربون والطاقة مما يساهم في المعالجة الحيوية و التقليل من التلوث.

**الكلمات المفتاحية:** تحلل الحيوي ، غليفوزات، بكتيريا ، مياه ، سبخة سفيون، ورقلة.