

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Ecologie microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Influence des pesticides sur la croissance des
Rizobium

Présenté par :

RAMDANI Tinhinane et HADROUG Hayat

Soutenu le : **20/06/2017**

Devant le jury composé de :

M^r : ADJEBLI A

MCA

Président

M^r : BELHADI D

MCB

Encadreur

M^{me} : SSAIDANI K.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à : notre promoteur Mr BELHADI Djellali, qui nous a permis de bénéficier de la qualité de son encadrement, les conseils qu'il nous a prodigué, la patience, la confiance qu'il nous a témoigné.

Nous tenons à remercier les membres de l'équipe de recherche du « Laboratoire d'Ecologie Microbienne » de nous avoir accueillies au sein du laboratoire.

On remercie vivement, Mr A. ADJEBLI et M^{me} K.SAIDANI qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant toutes nos années d'études.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin de quelque façons que ce soit, à la concrétisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A` mes très chères parents en témoignage de l'amour, du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leur porte et ma reconnaissance pour leur soutien et leur encouragement qu'ils m'ont prodigué tout au long de ma vie .

A` l'âme de mon grand père et ma grande mère .

A` mes chers frères, sœurs et belle sœur pour leurs sacrifices et leurs aides illimitées tout au long de mes études. Que Dieu vous préserve longue vie et prospérité .

*A` ma belle famille surtout mon très cher époux **FAHIM** qui ma donné l'aide et le courage à surmonter des situations pénibles.*

A` tous mes amis pour nos souvenirs inoubliables. Que notre amitié dure à jamais.

Hayat

Dédicaces

Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys.

Nous prions dieu que cette soutenance

Fera signe de persévérance

Et que nous serions enchantées

Par notre travail honoré

Je dédie ce modeste travail qui à :

Mes très chers parents,

*Aucune dédicace ne peut exprimer mon respect, ma considération et
l'amour éternel pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon
instruction et mon bien être.*

*Trouve en ce travail le fruit de votre dévouement, de votre patience et
l'expression de ma gratitude et mon profond amour.*

Mes chères sœurs et frère,

Vous m'avez toujours soutenu durant toutes mes études

Mes professeurs,

Mes chères amis "

Tous ce que j'aime,

À tous ceux qui m'ont aidé de près « Touhami » ou de loin.

JJNHNANE

Sommaire

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I- Historique 4

II- Classification chimique des pesticides 4

II-1-Pesticides organiques 4

II-2-Pesticides organométalliques 4

II-3-Pesticides inorganiques 5

III- Classification biologique et mode d'action 5

III-1-Herbicides 5

III-2-Fongicides 5

III-3-Insecticides 6

IV- Effet des pesticides sur l'activité microbiologique 8

V- Toxicités des pesticides 9

VI- Dégradation des pesticides 9

VII- Biodégradation des pesticides 10

VIII- Persistance des pesticides 10

Matériel et Méthodes

I- Choix des souches bactériennes 12

I-1-Revivification des souches 12

I-2-Préparation et standardisation de l'inoculum.....	12
I- Etude de l'effet des pesticides sur la croissance des souches de <i>rhizobium</i>.....	12
II- Evaluation de la toxicité de pesticides vis-à-vis les <i>rhizobiums</i>	13
III- Etude de la biodégradabilité des pesticides.....	13

Résultats et discussions

I- Etude de l'effet des pesticides sur la croissance des souches de <i>rhizobium</i>.....	15
II- Détermination de la concentration minimale inhibitrice	17
III- Evaluation de la toxicité de pesticides vis-à-vis des <i>rhizobiums</i>	21
IV- Etude de la biodégradabilité des pesticides.....	25
IV.1. Evolution de la croissance en présence des pesticides	25
IV.2. Effet du traitement sur les souches.....	28
V. Conclusion	31
VI- Perspective	
VII- Références bibliographique	
VIII- Annexe	
XI- Résumé	

Liste des tableaux

Tableau I : Exemples de la diversité chimique et fonctionnelle des pesticides 07

Tableau II : Effet des pesticides sur le rhizobium..... 08

Tableau III : Croissance des souches de *Rhizobium* en présence de différentes concentrations en pesticides..... 16

Tableau IV : Concentrations minimales inhibitrices des souches des *Rhizobiums vis-à-vis* les pesticides 17

Tableau V : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches *rhizobium*..... 21

Liste des figures

Figure 01 : Taux de tolérance des souches de <i>Rhizobium</i> au fongicide ARDAVO	18
Figure 02 : Taux de tolérance des souches de <i>rhizobium</i> à l'acaricide RIVAFOL	19
Figure 03 : Taux de tolérance des souches de <i>rhizobium</i> à l'insecticide DURSBAN.....	20
Figure 04 : Taux de tolérance des souches de <i>rhizobium</i> à l'insecticide BYE BYE	21
Figure 05 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches <i>vis-à-vis</i> d'insecticide DURSBAN	22
Figure06 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches <i>vis-à-vis</i> de l'acaricide RIVAFOL	23
Figure07 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches <i>vis-à-vis</i> du fongicide ARDAVO	24
Figure08 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches <i>vis-à-vis</i> d'insecticide-acaricide BYE BYE	25
Figure09 : Evolution de la croissance en présence de DURSBAN.....	26
Figure 10 : Evolution de la croissance en présence d'ARDAVO	27
Figure11 : Evolution de la croissance en présence de RIVAFOL.....	28
Figure 12 : Variation de la croissance de RLV, MEK6 et ES8 selon les traitements	29
Figure 12 : Variation de la croissance de EB1, UM2, AM11FR et AKE1 selon les traitements	30

Abréviations

AR : ARDAVO.

BB : BYE BYE.

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

DDT : Dicholodiphényltrichloroéthane.

DL50 : Dose Létale 50%.

DU : DURSBAN.

F : Fongicide.

FAO : Food Agriculture Organisation.

H : Herbicide.

I : Insecticide.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

RI : RIVAFOL.

UFC : Unité Formant Cellule.

YMA : Yeast-Mannitol-agar.

YMB : Yeast-Mannitol-broth.

Introduction

Introduction

Pendant que la population mondiale a été multipliée par 2,4 entre 1950 et 2000, la production agricole a été multipliée par 2,6 dépassants de peu l'évolution démographique (Mazoyer, 2004).

L'amélioration de la production agricole est due à 77% à la généralisation des éléments qui ont contribué à la révolution agricole contemporaine dans les pays développés et aux apports de la révolution verte dans quelques pays en voie de développement. (Baudouin, 2013).

La population mondiale en constante augmentation force les agriculteurs à rendre leurs terres de plus en plus productives. A l'heure actuelle, la productivité élevée de l'agriculture intensive est grandement dépendante des intrants chimiques en particulier les engrais et les pesticides (Tanguay, 2014).

La contamination des sols agricoles à diverses origines mais, elle reste généralement liée aux activités humaines avec l'utilisation des engrais chimique (Soussou, 2013)

Les légumineuses ont une forte présence dans les écosystèmes naturel, quels que soit le climat et le sol. Elles occupent depuis très longtemps une place importante dans les systèmes agricoles (Anne, 2015).

En Algérie, la culture des légumineuses alimentaires a un intérêt important vu leur apport nutritionnel et économique (Boudjenouia *et al.*, 2003).

Les pesticides sont utilisés pour lutter contre les ravageurs des plantes, ce qui fait que beaucoup de ces produits chimiques atteignent le sol où ils persistent pendant de longues périodes provoquant la nuisance des microorganismes et diminuent la croissance des plantes. Les pesticides organiques appliqués au sol peuvent être utilisés comme substrats par des microorganismes et subissent une dégradation, ce qui provoque la formation de nouveaux composés qui peuvent se révéler beaucoup plus délétères pour les plantes que la molécule d'origine (Subba, 1995).

L'utilisation des pesticides par l'agriculture présente deux aspects aux conséquences totalement opposées. Le premier concerne la nécessaire réduction des dégâts causés aux cultures par des organismes phytopathogènes pour maintenir la productivité alors que, le deuxième tient à la nature même des pesticides qui en fait, dans certaines conditions, de possibles polluants de l'air, des eaux, des aliments et des sols (Calvet *et al.*, 2005).

Les pesticides utilisés en agriculture ont des compositions et des structures très variées, leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques le sont aussi ce qui explique les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols. Une fois que la molécule a pénétré dans le sol, elle est soumise à des phénomènes de rétention, d'adsorption, d'infiltration et de diffusion qui sont contrôlés par les propriétés du pesticide et du milieu. Elle peut également être transportée par la solution du sol et être entraînée dans les eaux souterraines par des processus d'infiltration et de percolation (Yaron *et al.*, 1996 ; Mirsal, 2004). Lorsqu'il se trouve dans le sol, le pesticide peut être dégradé par des processus abiotiques (photodécomposition, réactions d'oxydo-réduction, d'hydrolyse...) ou biotiques réalisés par les microorganismes du sol, limitant ainsi les contaminations (Kersante, 2003).

Les microorganismes du sol qui provoquent la dégradation de la cellulose, la nitrification, le renouvellement de la matière organique et d'autres matières biologiques peuvent également être affectés négativement par les pesticides. Ces derniers affectent aussi les enzymes d'oxydo-réduction, la virulence des bactéries et l'activité fixatrice de l'azote chez *rhizobium* (Shahin *et al.*, 2003).

Le sol contient de nombreux types de microorganismes tels que les bactéries, champignons et algues, qui sont importants parce qu'ils affectent les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Parmi les bactéries du sol, les Rhizobiums ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes. Ils peuvent vivre soit dans le sol, soit dans les nodules racinaires de l'hôte (Légumineuses). En plus de la fixation biologique de l'azote, ces bactéries peuvent également stimuler la croissance des plantes ou réduire les dommages causés par les agents pathogènes des plantes. Les *rhizobium* peuvent être utilisés comme engrais azotés potentiels pour augmenter le rendement des cultures (Pranita *et al.*, 2015).

Les légumineuses forment des nodules racinaires dans lesquels les *Rhizobia* fixent l'azote atmosphérique. Le processus de nodulation dans la symbiose légumineuse-*rhizobium* est constitué d'une série d'événements initiés par un échange de composés de signalisation spécifiques entre les deux partenaires. Les racines de plantes légumineuses sécrètent des flavonoïdes, qui déclenchent la synthèse de molécules de signalisation comme les lipochito-oligosaccharides qui sont des facteurs de nodulation, par *Rhizobium* (Maki, 2014).

Les *rhizobiums* sont essentiels au cycle de l'azote terrestre et à la fixation biologique de l'azote dans légumineuses, jouant un rôle très important comme des biofertilisant qui, lorsqu'ils sont appliqués à la semence, la racine ou le sol, colonisent la rhizosphère, ou l'intérieur de la plante, et favorisent la croissance en augmentant l'apport en azote à la plante hôte et renforcent la fertilité des sols. Les *rhizobiums* représentent une ressource économique, durable et écologique pour garantir l'exigence d'azote dans l'agroécosystème (Nagata, 2014).

Pour cette raison et compte tenu de l'importance des légumineuses dans l'alimentation ainsi que les rhizobiums qui leur sont associées, nous nous sommes intéressés dans cette présente étude aux effets que les pesticides exercent sur les souches de *Rhizobium*. Afin de développer ces aspects, nous avons opté pour la méthodologie suivante :

- Etude de l'effet des pesticides sur la croissance des souches de *Rhizobium*, et détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu solide.
- Evaluation de la toxicité des pesticides *vis-à-vis* des souches de *rhizobium*.
- Etude de la dégradation des pesticides par les souches de *rhizobium*.

Synthèse bibliographique

I. Historique

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture remonte au début de l'agriculture elle-même et elle est devenue plus prononcée avec le temps en raison de l'augmentation de la population d'organismes nuisibles parallèlement à la diminution de la fertilité des sols. Cependant, l'utilisation des pesticides dans l'agriculture remontent au 19^{ème} siècle. La première production de pesticides implique l'utilisation de composés hautement toxiques tels que l'arsenic (calciumarséniate et arséniate de plomb) et le cyanure d'hydrogène en 1860 pour le contrôle des parasites comme les champignons, les insectes et les bactéries. La deuxième génération impliquait l'utilisation de produits organiques synthétiques composés (Zacharia et *al.*, 2011).

Le premier pesticide organique synthétique important était le DDT, synthétisé en 1873 mais, dont l'effet insecticide fut découvert en 1939 (Calvet et *al.*, 2005).

L'utilisation intensive de pesticides dans l'agriculture est également bien connue pour être associée à "la Révolution verte". La révolution verte était un mouvement agricole mondial qui a commencé au Mexique en 1944, dans le but principal de stimuler les rendements de céréales dans le monde. La révolution verte comportait trois aspects majeurs des pratiques agricoles, parmi lesquels l'utilisation de pesticides faisait partie intégrante. Suite à son succès au Mexique, la révolution verte s'est répandue dans le monde entier (Zacharia et *al.*, 2011).

Il existe une grande diversité de pesticides qui diffèrent par leur structure chimique, leur fonction et leur mode d'action. Leur classification peut ainsi s'effectuer selon leurs caractéristiques chimiques, la nature de l'organisme nuisible sur lequel ils doivent agir, ou leurs modes et période d'action (Anne-Antonella, 2015).

II. Classification chimique des pesticides

II.1. Pesticides organiques

Ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques selon les atomes constituant la structure de base de la molécule et les fonctions chimiques associées (Calvet et *al.*, 2005). Parmi ces multiples familles, on distingue les organochlorés comme l'aldrine, le DDT, ou le lindane, les organophosphorés comme le malathion ou le glyphosate, les carbamates comme l'aldicarbe, les pyréthrinoïdes, dont la structure

générale est similaire aux pyréthrine comme la cyperméthrine, les triazines comme l'atrazine et les urées substituées comme le diuron ou le linuron (Tableau 1) (Anne-Antonella, 2015).

II.2. Pesticides organométalliques

Ce sont principalement des fongicides dont la molécule est constituée d'un complexe entre un métal, tel que le zinc ou le manganèse, et un composé carboné. Le mancozeb (comprenant du zinc) et le manèbe (comprenant du manganèse) sont des exemples de ce type de molécule (Calvet et *al.*, 2005).

II.3. Pesticides inorganiques

Peu nombreux, n'ont pas de carbone dans leur structure et dérivent de composés minéraux stables dans le milieu naturel tels que le soufre et le cuivre. Le cuivre est appliqué de manière importante en tant que fongicide, sous forme de sulfate de cuivre (bouillie bordelaise) (Komárek et *al.*, 2010).

III. Classification biologique et mode d'action

Elle repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles d'activités :

III.1. Herbicides

Les herbicides sont appelés parfois désherbants, notamment en horticulture. Ce sont des matières actives ou des produits formulés ayant la propriété de tuer les végétaux. Comme tous les autres pesticides, un produit herbicide se compose de deux types de constituants : les matières actives qui lui confèrent son activité herbicide et les formulant qui complètent la formulation. Ces derniers sont soit des charges ou des solvants qui n'ont qu'un rôle de dilution des matières actives, soit des produits qui améliorent la préparation :

- Pour sa qualité, la stabilité (émulsifiant, dispersif, etc.), la présentation (colorant, parfum, répulsif, etc.) et la facilité d'emploi (vomitif, etc.),
- Pour son comportement physique lors de la pulvérisation ; mouillant, adhésif ou même pour son activité biochimique (surfactant, phytoprotecteur) (El habib, 2013).

III.2. Fongicides

Ils permettent de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries. Ils peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides. Ils peuvent agir chez les champignons selon différents modes d'action, tels que l'inhibition de la synthèse des lipides (cas du boscalide) ou des stérols (cas du tébuconazole), ainsi que la germination des spores (cas de la bouillie bordelaise). Certains fongicides perturbent aussi les processus respiratoires (cas du chlorothalonil), ou inhibent la synthèse des microtubules (cas du propamocarbe) (Calvet *et al.*, 2005).

II.3. Insecticides

Ils sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire.

Les insecticides peuvent agir sur le système nerveux (exemple de la cyperméthrine), sur la respiration (exemple de l'hydraméthylnon) ou sur la synthèse de composés cuticulaires (exemple du triazoxide). Le tableau I donne une vue d'ensemble de la diversité des pesticides.

Outre, ces trois grandes familles mentionnées ci-dessus, d'autres peuvent être citées en exemple : les acaricides, contre les acariens ; les nématicides, contre les vers du groupe des nématodes ; les rodenticides, contre les rongeurs ; les taupicides, contre les taupes ; les molluscicides, contre les limaces et escargots ou encore les corvicides et corvifuges, respectivement contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture (El Habib, 2013).

Tableau I : Exemples de la diversité chimique et fonctionnelle des pesticides (Calvet *et al.*, 2005)

Pesticides	Organismes cibles	Exemples de familles chimiques	Exemples de molécules	Modes d'action
Herbicide	Plantes concurrençant les cultures "mauvaises herbes "	Acides chlorophénoxy-alcanoïques	2,4D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique)	Perturbation de la régulation de l'auxine
		Acides benzoïques	Dicamba	
		Carbamates	Carbétamide	Blocage des centres organisateurs des microtubules et désorganisation du fuseau
		Organophosphorés	Glyphosate	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés aromatiques
		Sulfonylurées	Metsulfuron-méthyle	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés ramifiés
		Triazines	Atrazine	Inhibition de la photosynthèse
		Urées substituées	Isoproturon, linuron	
Fongicide	Champignons parasites des cultures "maladies "	Carbamates	Propamocarbe	Inhibition de la formation des microtubules
		Triazoles	Tébuconazole	Inhibition de la biosynthèse des stérols
		Organophosphorés	Fosétyl-Al	Inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne
		Dérivés soufrés, sulfate de cuivre	Bouillie bordelaise	Inhibition de la germination des spores
Insecticide	Insectes ravageurs "ravageurs "	Triazines	Triazoxide	Perturbation de la biosynthèse des mélanines
		Carbamates	Aldicarbe	Perturbation du système nerveux
		Pyréthriinoïdes	Cyperméthrine	
		Organophosphorés	Malathion	
		Organochlorés	Aldrine	
		Néonicotinoïdes	Thiaméthoxame	Perturbation du système respiration
Amidinohydrazones	Hydraméthylnon			

IV. Effet des pesticides sur l'activité microbiologique

Les pesticides affectant les organismes par leurs entrée dans le sol, qui peut se faire à travers des programmes de lutte contre les ravageurs du sol, des dérives de pulvérisation des plantes, des résidus de parties de plantes, etc. (tableau II).

En raison des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol, les pesticide dans le sol subissent des changements de transformation et se dégradent, mais certains produits de transformation sont hautement toxiques pour l'habitat et les organismes du sol (Stanley et al. 2015).

Tableau II : Effet des pesticides sur le rhizobium (Ahmed et al. 2013).

Pesticides	Effets
2,4-D(H), round up(H), atrazine (H)	Diminution du nombre de nodules et de leur poids sec dans les racines de niébé sans développement de nodule sur le système racinaire latéral.
Thiram(F)	Une augmentation graduelle de la dose du thirame a montré un effet négatif très important sur <i>Rhizobium meliloti</i> .
Captan(F), mancozeb (F), carbaryl(I)	Inhibe le nombre et la croissance des souches de <i>Rhizobium</i> , Mesorhizobium, Sinorhizobium et Bradyrhizobium.
Agroxone(H), atranex 50SC(H), 2,4 damine(H)	Diminution du pourcentage de survie de <i>Rhizobium phaseoli</i> avec l'augmentation de la concentration d'herbicides.
Hexaconazole (F)	Inhibition du système de déshydrogénase chez <i>rhizobium</i> .
Omethoate (I)	Montre une toxicité pour les souches de <i>Rhizobium</i> en contact direct en diminuant leur nombre.
Brassical(F), thiram(F), orthocide75(F), vitavax 75(F), agrosan(f)	Réduit le nombre de rhizobia à zéro dans les 10 jours dans les graines inoculées.
Lindana(I), chlorpyrifos(I), thiram(F)	Entrave de manière significative la croissance de <i>Rhizobium japonicum</i>
Pivot 100SL(H)	Réduction de l'activité de la nitrogénase de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv, trifolii KGL, <i>Siorhizobiuni meliloti</i> Bp et <i>Badyrhizobium</i> sp.

V. Toxicité des Pesticides

Les pesticides présentent des risques et des dangers pour la santé humaine et l'environnement car ils provoquent la plupart des effets nocifs. La contamination de l'homme par les pesticides peut se faire par différentes voies ; il peut les absorber via les aliments, l'eau, par contact avec la peau ou encore par inhalation.

En 1975, l'OMS a établi une classification des pesticides en fonction de leur toxicité avec comme critère la dose létale 50 (DL50). Le degré de toxicité des pesticides est étudié sur des rats et animaux de laboratoire au moyen de la DL 50. La DL 50 est une caractéristique de la toxicité aiguë ; c'est la quantité de pesticide ingérée nécessaire pour provoquer la mort de 50% des rats participant à une expérience en laboratoire. Cette dose létale 50 est exprimée en ppm (OMS, 1975).

Suite aux nombreuses constatations sur le terrain, après épandages insouciantes de pesticides toxiques effectués ces 20 dernières années, les scientifiques ont mis en évidence trois types d'effets sur la faune et l'homme :

- Des effets cancérogènes: provoquant des tumeurs.
- Des effets mutagènes: entraînant des modifications du matériel génétique de la cellule.
- Des effets tératogènes: entraînant des malformations de l'embryon.

VII. Biodégradation des pesticides

La biodégradation est la panne ou la transformation des pesticides par des agents microbiens qui se produit normalement dans l'eau et le sol. Le taux de dégradation microbienne dépend fortement de la quantité et nature des pesticides présents dans le sol, des populations microbiennes dans le sol et les conditions du sol qui favorisent les activités microbiennes, telles que la température élevée, le pH favorable, une humidité suffisante du sol, une aération et une teneur élevée en matière organique. Les microorganismes participent à la biodégradation comprennent les champignons, les bactéries et autres microorganismes qui utilisent les pesticides comme substrat. Les pyréthroïdes, les organophosphates et certains carbamates ont été jugés plus susceptibles de subir une biodégradation. Cependant, la plupart des organochlorés ont été propres à la biodégradation en raison de la force de la liaison C-Cl (Zacharia, 2010).

La dégradation microbienne des composés chimiques dans l'environnement constitue une voie d'élimination de ces composés. La biodégradation des pesticides est souvent complexe et implique une série de réactions biochimiques. Bien que de nombreuses enzymes catalysent efficacement la biodégradation des pesticides, il y a peu d'études qui ont évoqué les nouveaux produits biotransformés et leur destinée dans l'environnement (Adriana *et al.*, 2012).

Cette dégradation a pour origine l'activité des microorganismes, le pesticide étant utilisé comme substrat nutritif et dégradé grâce à des enzymes. Généralement, la biodégradation est plus importante que la dégradation abiotique, exception faite des pesticides récalcitrants. Il est important à ce stade de souligner que l'activité des microorganismes est importante notamment dans les premiers centimètres du sol (Calvet et Charnay, 2002). Les deux voies principales sont (Ecrin, 2002) :

- **le métabolisme** : le pesticide est utilisé comme source d'énergie unique ou partielle ;
- **le co-métabolisme** : le pesticide ne peut être utilisé directement comme source de carbone ; ce mécanisme nécessite l'association de plusieurs souches complémentaires (et la présence d'un co-substrat) ; ce phénomène est lent et peut être inachevé.

L'importance relative des phénomènes est déterminée par des facteurs édaphiques tels la température, le pH, l'humidité, l'aération et la fertilité. Toutefois, un mécanisme peut être privilégié ou voir sa cinétique augmenter par l'utilisation répétée d'un pesticide sur un même sol : on parle alors d'adaptation de la population microbienne (qui peut conduire à la sélection d'une souche privilégiée) (Ecrin, 2002).

VIII. Persistance des pesticides

Elle reflète la capacité de la substance à ne pas être altérée par des processus physiques, chimiques et biologiques. Elle correspond donc à la stabilité des composés dans l'environnement, à leur résistance à une décomposition ou à une transformation dans la nature. Il est important de souligner que les composés issus de la dégradation d'une substance initiale et ne pouvant être détruits dans la nature sont aussi considérés comme persistants mais persistants secondaires voire tertiaires. Par ailleurs, il y a une différence

entre la persistance voulue et non désirée, dans le sens où la persistance non désirée induit un effet au-delà du temps prévu initialement (typiques des composés organiques chlorés comme le DDT) (Bliefert et Perraud, 2001).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I- Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude proviennent de la collection de *Rhizobium sp.* du Laboratoire d'Ecologie Microbienne. Elles ont été isolées à partir des nodules de *Vicia faba L.* cultivée sur des sols provenant de différentes régions de la Wilaya de Bejaia. Il s'agit de : UM2, UE28, AKE1, EB1, AM11R, MEK6, RLV et ES8.

I-1-Revivification des souches

Avant leur utilisation, les différentes souches ont été repiquées sur la gélose YMA (Annexe I) inclinée puis incubées à 28°C/48h en vue de leur revivification.

I-2-Préparation et standardisation de l'inoculum

Les souches bactériennes à tester sont ensemencées dans des tubes à essai 9ml de milieu YMA liquide et incubées à 28°C. Après 48h d'incubation, les cultures sont ajustées à une unité de DO_{600 nm} allant de 0.08 à 0.1, correspondant à 10⁸ UFC/ml.

II- Etude de l'effet des pesticides sur la croissance des souches de rhizobium

L'étude de l'effet des pesticides sur la croissance des rhizobiums a été réalisée sur milieu YMA additionné de différents pesticides et les concentrations utilisées pour la préparation des différentes solutions varient de 100µg/ml jusqu'à 1000µg/ml.

- Insecticide : DURSBAN (chlopyrifos-ethyl).
- Fongicide : ARDAVO (720 SC chlorotolonil).
- Acaricide : RIVAFOL (dicofol).
- Insecticide-acaricide : BYE BEY (200 amitraze).

Les concentrations des pesticides utilisés sont choisies selon des études faites par (Sabeen et *al.*, 2013).

A partir des solutions mères de pesticides, des volumes bien définis sont prélevés et ajoutées à un volume de la gélose YMA en surfusion dans des tubes à raison de 20 ml.

Les inocula préparés précédemment sont utilisés pour ensemencer en spot et raison de 10µl les différents milieux. Un témoin ne contenant que de la gélose YMA est ensemencé avec les mêmes suspensions bactériennes.

Après incubation à 28°C/48h, la présence ou l'absence de croissance est notée pour chaque souche et chaque concentration en pesticide. Ainsi, les concentrations minimales inhibitrices qui correspondent aux plus faibles concentrations inhibant toute croissance sont déterminées pour chaque pesticide.

III- Evaluation de la toxicité de pesticides *vis-à-vis* les rhizobiums

La sensibilité des souches de rhizobiums aux pesticides est évaluée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose YMA selon la méthode décrite par Sabeen et al. (2013).

A partir des solutions mère des différents pesticides, une série de 5 dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) est préparée pour chaque pesticide.

Après avoir coulé la gélose et après solidification, les boîtes sontensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions bactériennes des précultures standardisées ($DO_{600}=0.1$). Les boîtes ainsiensemencées sont séchées pendant 3 à 5 minutes. Après séchage, des disques en papiers filtres stérile sont déposés à la surface de la gélose. 10µl de chacune des concentrations préparées sont déposées sur chaque disque. Un disque en papier filtre stérile contenant de l'eau distillée stérile est utilisé comme témoin négatif.

Après incubation à 28°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés. La sensibilité aux différents pesticides testés est déterminée.

IV- Etude de la biodégradabilité des pesticides

La capacité des différentes souches de *Rhizobium* à dégrader les pesticides est réalisée sur le milieu YMB (Annexe I) modifié en remplaçant le mannitol par le pesticide à tester et l'extrait de levure par du chlorure d'ammonium. Un insecticide (DURSBAN), un fongicide (ARDAVO) et un acaricide (RIVAFOL) sont retenus pour ce test.

A partir des solutions initiales de pesticides, des volumes bien définis sont prélevés et ajoutés à un volume de milieu YMB modifié, reparti dans des flacons à raison de 100ml. Quatre traitements sont ainsi réalisés :

- Traitement 1 : YMB (témoin)
- Traitement 2 : YMB modifié+ DURSBAN
- Traitement 3 : YMB modifié + ARDAVO
- Traitement 4 : YMB modifié + RIVAFOL.

Les différents milieux ainsi préparées sontensemencés avec 1 ml d'une préculture standardisée en ajustant sa densité optique à 0.1. Pour évaluer la croissance des différentes souches en présences de ces pesticides, des prélèvements et des mesures de densité optique sont effectués après incubation à 28°C pendant 24h, 96h, 148h et 172h.

Résultats et discussions

I. Etude de l'effet des pesticides sur la croissance des souches de *Rhizobium*

L'étude de la croissance des souches des *Rhizobiums* en présence des différentes pesticides montre que la plus part des souches se développent en présence de faibles concentrations (tableau III). Toutefois leur croissance diffère en fonction de la souche, du pesticide et de la concentration considérée.

Dans le cas d'ARDAVO, on remarque que la majorité des souches poussent à des concentrations de l'ordre de 700µg/ml. Les souches EB₁ et UM₂ apparaissent plus sensibles puisqu'elles se développent à une concentration faible à savoir 100 µg/ml.

En ce qui concerne l'acaricide RIVAFOL, toutes les souches présentent une tolérance à 200µg/ml. Toutefois, seules les souches AKE₁ et MEK₆ poussent à 600 µg/ml.

A l'exception des souches RLV, EB₁ et AM₁₁R qui tolèrent des concentrations allant jusqu'à 900 µg/ml, toutes les autres souches tolèrent des concentrations de l'ordre de 1000 µg/ml d'insecticide DURSBAN.

Parmi les 08 souches testées *vis-à-vis* d'insecticide-acaricide BYE BYE, 02 d'entre elles EA₂ et UM₂ persistent à des concentrations de 1000 µg/ml tandis que, la souche ES₈ montre une sensibilité à la concentration la plus faible à savoir 100µg/ml.

Tableau III : Croissance des souches de *Rhizobium* en présence de différentes concentrations en pesticides

souches pesticides		EA2	RLV	EB1	UM2	ES8	AM11R	AKE1	MEK6
		ARDAVO		0	+	+	+	+	+
		100	+	+	-	-	+	+	+
		200	+	+	-	-	+	+	+
		300	+	+	-	-	+	+	+
		400	+	+	-	-	+	+	+
		500	+	+	-	-	+	+	+
		600	+	+	-	-	+	+	+
		700	+	+	-	-	+	+	+
		800	+	-	-	-	+	+	+
		900	+	-	-	-	+	+	-
		1000	+	-	-	-	+	+	-
RIVAFOL		0	+	+	+	+	+	+	+
		100	+	+	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+	+	+
		300	-	-	-	-	+	+	+
		400	-	-	-	-	+	+	+
		500	-	-	-	-	+	+	+
		600	-	-	-	-	-	+	+
		700	-	-	-	-	-	-	-
		800	-	-	-	-	-	-	-
		900	-	-	-	-	-	-	-
		1000	-	-	-	-	-	-	-
DURSBAN		0	+	+	+	+	+	+	+
		100	+	+	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+	+	+
		300	+	+	+	+	+	+	+
		400	+	+	+	+	+	+	+
		500	+	+	+	+	+	+	+
		600	+	+	+	+	+	+	+
		700	+	+	+	+	+	+	+
		800	+	+	+	+	+	+	+
		900	+	+	+	+	+	+	+
		1000	+	-	-	+	+	+	+
Bye Bye		0	+	+	+	+	+	+	+
		100	+	+	+	+	-	+	+
		200	+	+	+	+	-	+	+
		300	+	+	+	+	-	+	-
		400	+	+	+	+	-	+	-
		500	+	+	-	+	-	+	-
		600	+	+	-	+	-	+	-
		700	+	-	-	+	-	+	-
		800	+	-	-	+	-	+	-
		900	+	-	-	+	-	-	-
		1000	+	-	-	+	-	-	-

II. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats de la recherche des concentrations minimales inhibitrices montrent une variabilité entre les souches et entre leurs réponses aux différentes concentrations de pesticides (Tableau IV). Le maximum de résistance est observé dans le cas d'insecticide DURSBAN où la majorité des souches se sont développées en présence de différentes concentrations testées. A l'exception de RLV, EB1 et AM11R qui ont une CMI de 1000µg/ml, toutes les autres souches possèdent une CMI supérieure à 1000 µg/ml.

Une forte tolérance a été enregistrée pour l'acaricide RIVAFOL avec un CMI qui varie de 300 à 600 µg/ml. Les résultats obtenus montrent également que ces souches présentent des CMI allant de 100 à 1000 µg/ml pour le fongicide ARDAVO et l'insecticide-acaricide BYE BYE.

Tableau IV : Concentrations minimales inhibitrices des souches des *Rhizobiums vis-à-vis* les pesticides.

Pesticides souches	DURSBAN	ARDAVO	RIVAFOL	BYE BYE
	EA2	>1000	>1000	300
RLV	1000	800	300	700
EB1	1000	<100	300	500
UM2	>1000	<100	300	>1000
ES8	1000	>1000	300	<100
AM11R	>1000	900	600	800
AKE1	>1000	>1000	700	900

Les concentrations minimales inhibitrices de fongicide ARDAVO *vis-à-vis* des souches de *rhizobium* testées sont comprises entre 100 et 1000 μ g/ml, toutes les souches poussent en absence de pesticide ARDAVO (témoin) et trois tiers (75%) des souches tolèrent la concentration de 100 à 700 μ g/ml. Plus que la moities (62%) des souches tolèrent la concentration de 800 μ g/ml et la moitié (50%) de ces souches poussent à des concentrations de 900 μ g/ml. Seules les souches EA2, ES8 et AKE1 présentent une CMI supérieure à 1000 μ g/ml (Figure 01).

Le taux de tolérance de nos souches est beaucoup plus élevé comparé à celui observé par MOHAMED AHMED *et al.*, (2007) (>0.5 μ g/ml) en testant l'action d'un fongicide (captan) avec des souches de *rhizobium*.

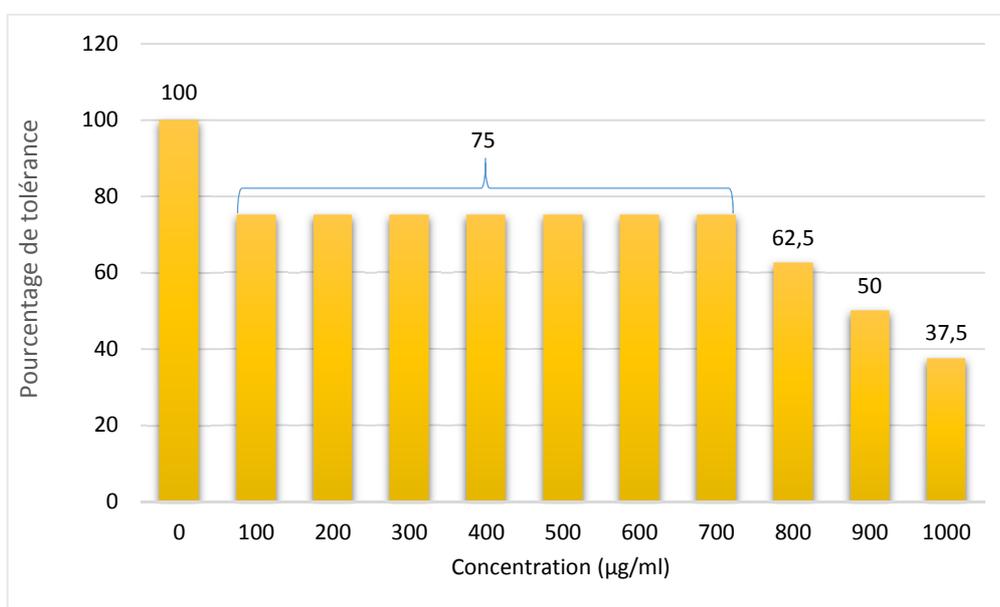


Figure 01 : Taux de tolérance des souches de *Rhizobium* au fongicide ARDAVO.

La tolérance des souches de *Rhizobium* vis-à-vis d'acaricide RIVAFOL est faible par rapport au fongicide ARDAVO. Les CMI obtenues sont comprises entre 300 et 700µg/ml. Toutes les souches présentent une tolérance à 200µg/ml, tandis que, seules 37.5% des souches tolèrent les concentrations allant de 300 à 600µg/ml et un quart de ces souches 25% tolèrent la concentration de 600µg/ml (Figure 02). Ces souches présentent une CMI supérieures à celles obtenues par Kalam et al. (2001), avec les pesticides (hexaconazol, carbofuran et l'ethion) qui sont >200µg/ml avec quelques bactéries du sol.

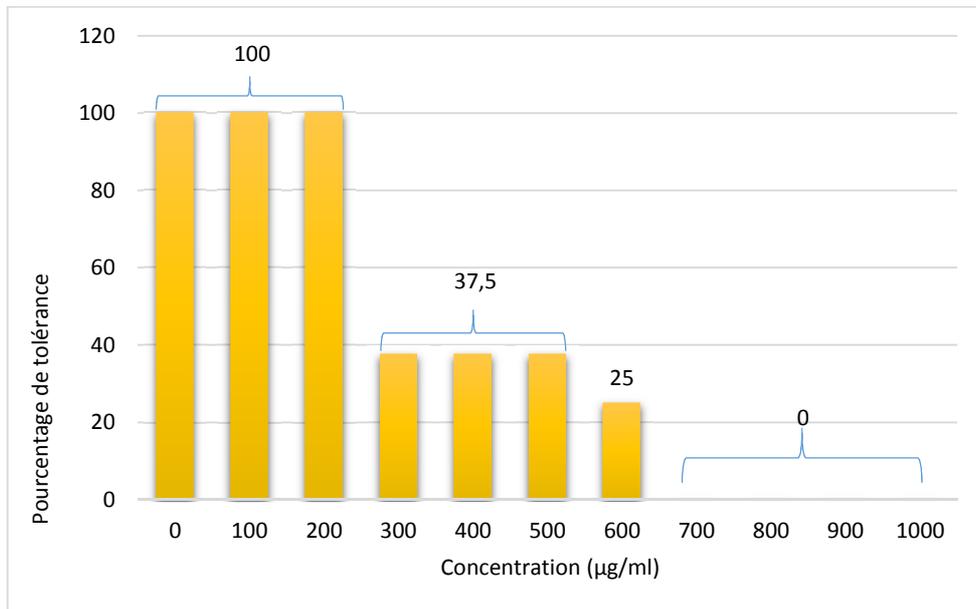


Figure 02 : Taux de tolérance des souches de *rhizobium* à l'acaricide RIVAFOL.

Dans le cas d'insecticide DURSBAN presque toutes les souches de *Rhizobium* étudiées présentent une croissance élevée et on a observé que toutes les souches 100% poussent à une concentration de 900µg/ml. Seules 62.5% des souches poussent à 1000µg/ml, leur CMI est donc supérieure à 1000µg/ml (Figure 03). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par SHIN-CHSIANG LIN et al., (1972), qui ont montré que l'insecticide n'a aucun effet sur les quatre espèces de *rhizobium* (*R. leguminosarium*, *R. trifolli*, *R. japonicum* et *R. meliloti*) à des concentrations allant jusqu'à 500 ppm.

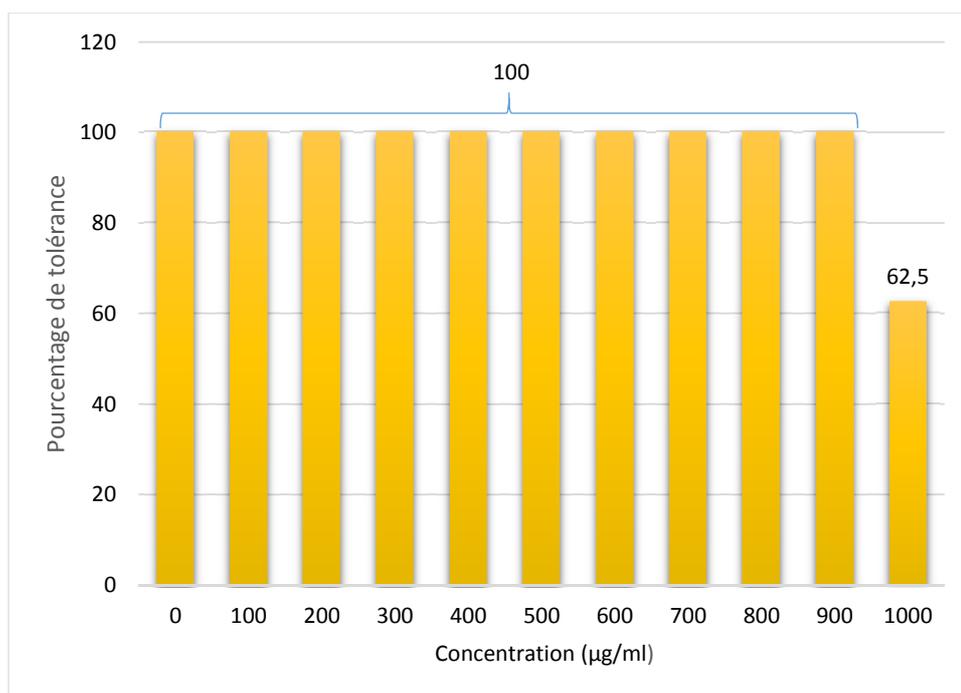


Figure 03 : Taux de tolérance des souches de *rhizobium* à l'insecticide DURSABAN.

Une forte tolérance est observée dans le cas d'insecticide-acaricide BYE BYE où la majorité des souches présente une CMI de 600µg/ml. La moitié 50% des souches présente une CMI de 700µg/ml et plus d'un tiers 37.5% présente une CMI de 800µg/ml. Nous remarquons que deux souches EA2 et UM2 présentent une CMI supérieur à 1000µg/ml (Figure 04).

Le test de tolérance réalisé avec le pesticide BYE BYE montre que la majorité des souches de *rhizobium* présente une forte tolérance pour toutes les concentrations testées. A 400 µg/ml, 75% des souches ont poussé tandis qu'à 200 µg/ml, 87.5% des souches sont avérées tolérantes à ce pesticide. Le taux de ces souches est beaucoup plus élevé comparé à celui trouvé par Sabeen and Tarranum (2013) en effet, ces auteurs ont rapporté que la tolérance des souches de *rhizobium* atteint 700µg/ml *vis-à-vis* du Monocrotophos.

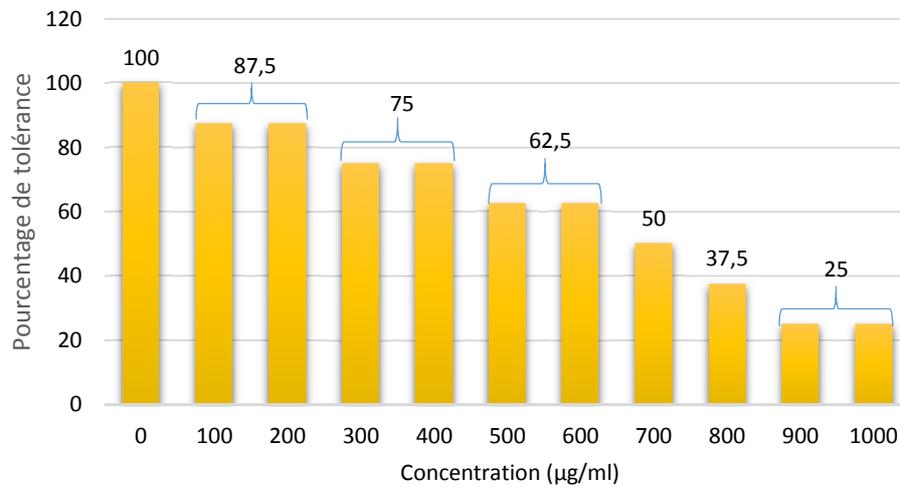


Figure 04 : Taux de tolérance des souches de *rhizobium* à l'acaricide-insecticide Bye Bye

III- Evaluation de la toxicité de pesticides *vis-à-vis* des *rhizobiums*

L'étude de l'effet des différents pesticides sur le développement des souches de rhizobiums permet d'évaluer leur toxicité (tableau V).

Tableau V : Les diamètres des zones d'inhibition en (mm) des différentes souches *rhizobium*.

Souches \ Pesticides	AM11R	MEK6	UE28	EB1	RLV	ES8	UM2	AKE1	EA2
0	6	6	6	6	6	6	6	6	6
DURSBAN	10	10	10	10	10	6	8	11	14
RIVAFOL	15	10	10	12	10	14	9	10	6
ARDAVO	24	15	25	18	14	6	13	24	6
BYE BYE	6	9	10	15	9	6	11	12	12

Toutes les souches présentent une faible tolérance à la concentration de 100µg/ml d'insecticide-acaricide DURSBAN et présentent des zones d'inhibition avec des diamètres entre 10 et 14mm (Figure 05). Seule la souche ES8 tolère la présence de ce pesticide puisqu'elle présente une croissance de contact. Cette tolérance est comparable à celle rapporté par MOHAMED AHMED *et al.* (2007) qui est de 4,5 mm à 100µg/ml.

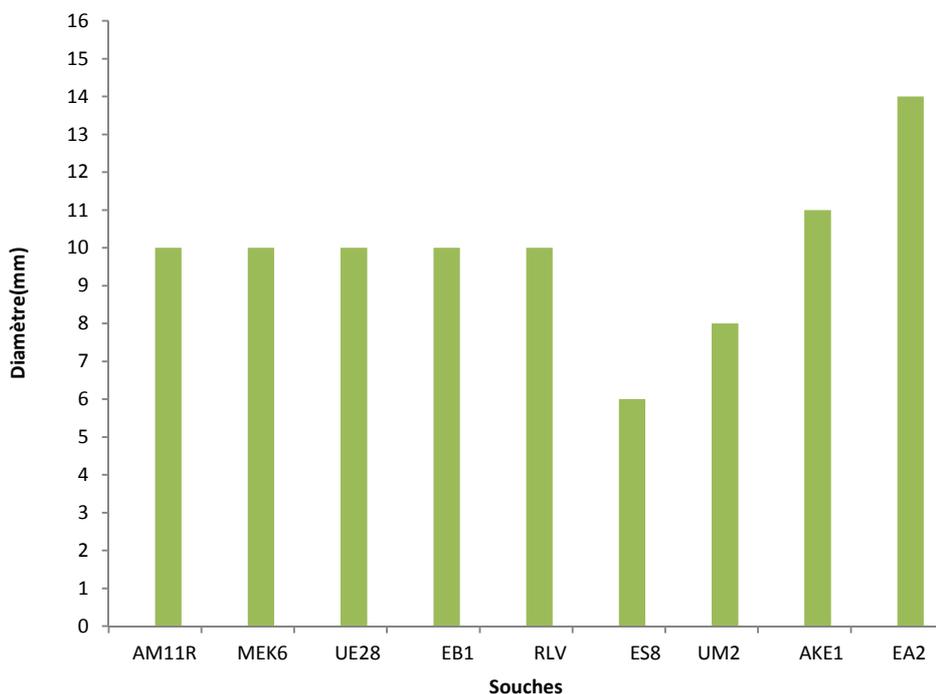


Figure 05 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches *vis-à-vis* d'insecticide DURSBAN.

L'acaricide RIVAFOL (100µg/ml) présente une inhibition plus ou moins variable avec des diamètres allant de 9 à 15 mm La souche EA2 semble être plus tolérante puisqu'elle présente une croissance de contact avec le disque (Figure 06).

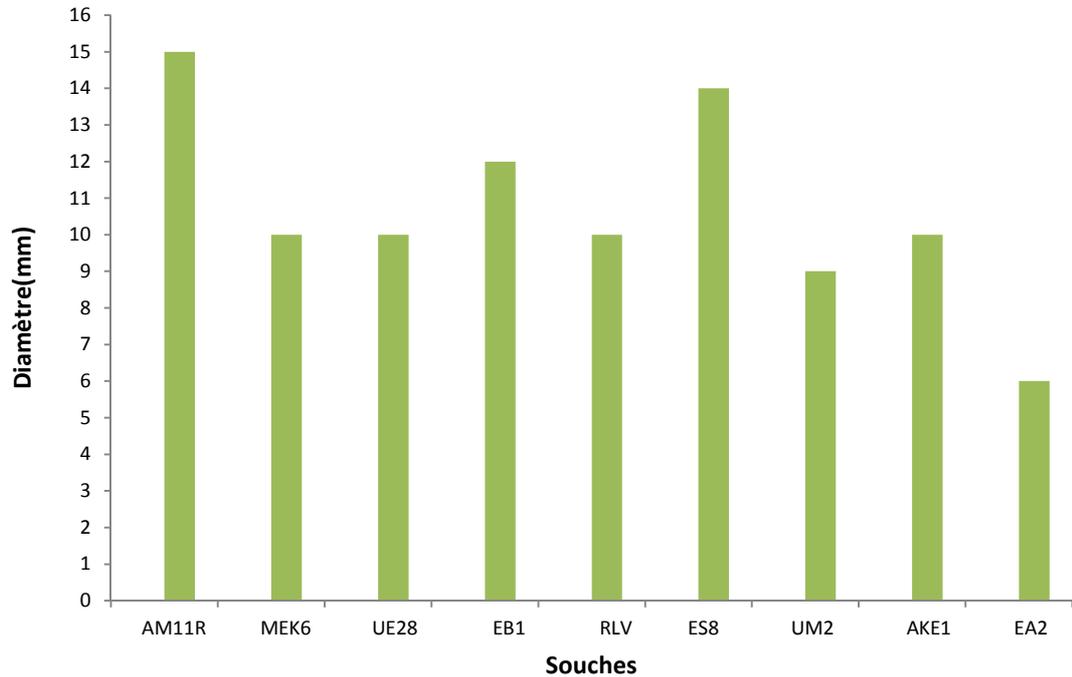


Figure06 : Diamètres des zones d’inhibition des différentes souches *vis-à-vis* de l’acaricide RIVAFOL.

Le fongicide ARDAVO apparaît plus puissant et présente une action plus nuisible sur les souches testées. En effet, les diamètres des zones d’inhibition observés avec les souches (AM11R, MEK6, UE28, EB1, RLV, UM2 et AKE1) varient entre 13 et 25mm. Les souches ES8 et EA2 sont les plus tolérante *vis-à-vis* de ce fongicide, aucune inhibition n’est observée (Figure 07). Ces résultats sont comparable avec les résultats obtenu par DROUIN et al. (2010) en effet ils ont appliqué des concentrations des pesticides 45µg par disque et le résultat présent que seules deux fongicides captan et mancozeb inhibition de la croissance d’un grand nombre des souches parmi les 122 souches testées.

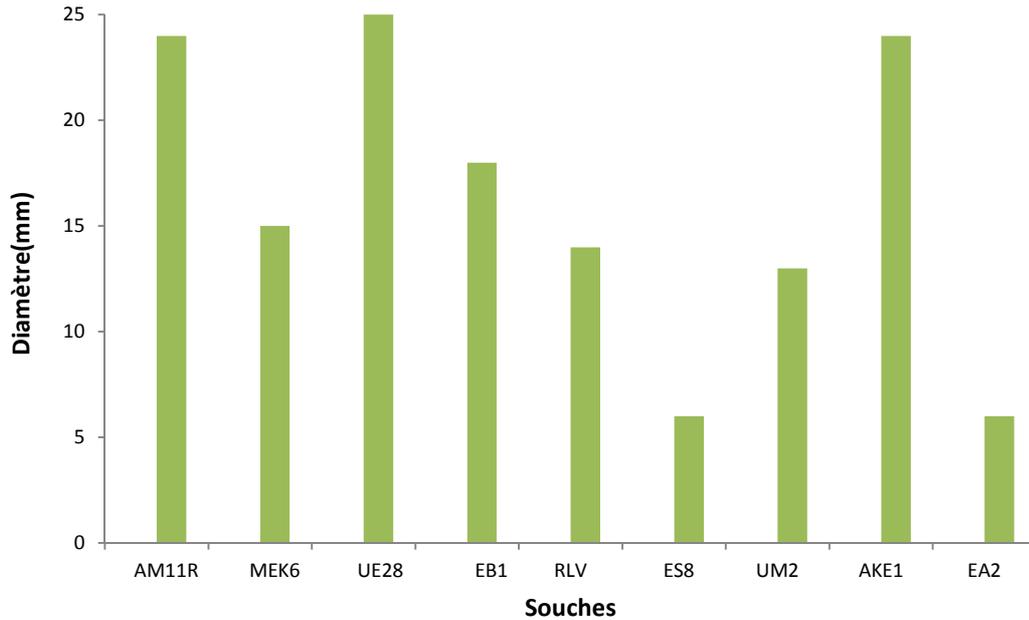


Figure07 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches *vis-à-vis* du fongicide ARDAVO.

Les souches MEK6, UE28, EB1, RLV, UM₂, AKE1 et EA₂ présentent une sensibilité à la concentration de 100 µg/ml d'insecticide-acaricide BYE BYE et présentent des zones d'inhibition avec des diamètres entre 9 et 15mm (Figure 08). Les souches AM11R et ES8 ne sont inhibées par cette concentration. C'est résultats sont comparable à celle obtenue par GAHRAWAL et al., (2015) qui ont rapporté que les trois pesticides testés (2,4-D, dimethoate et Carbendazim) donnent des zones d'inhibition à 100% de leur concentration contre *Aztobacter*, *Azospirillum* et *rhizobium* et que le 2,4D donne le plus grand diamètre contre les *rhizobium* (8,3mm).

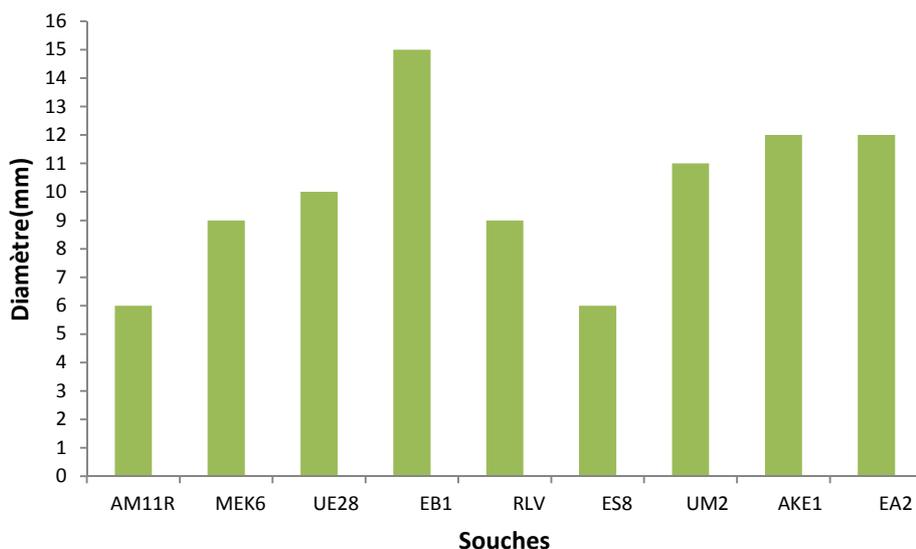


Figure08 : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches *vis-à-vis* d'insecticide-acaricide BYE BYE.

IV. Etude de la biodégradabilité des pesticides

IV.1. Evolution de la croissance en présence des pesticides

L'étude de la biodégradabilité des pesticides par les souches de *rhizobium* permet de déterminer la capacité des différentes souches à les utiliser comme substrat carboné pour leur croissance.

Le test d'utilisation du l'insecticide DURSBAN montre que les souches AM11R, MEK6 et ES8 présentent une allure de croissance comparable, leur croissance augmente proportionnellement avec le temps (figure 09). Ces résultats sont comparables avec les résultats obtenus par Sepperumal et *al.* (2013) qui ont constaté que certaines bactéries du sol comme *Bacillus ciradans* et les espèces appartenant à *Acinetobacter* pourraient dégrader le pesticide Endosulfan.

La souche UM2 présente une croissance très importante, ce qui serait dû à sa forte capacité d'assimilation de ce fongicide. La croissance des souches AKE1 et RLV diminue

au début de la croissance pour atteindre un minimum après 96H puis reprennent leur croissance. Ceci serait dû à l'induction des enzymes nécessaires à la dégradation de ce pesticide.

La souche EB1 présente une croissance importante au début de l'incubation, elle a atteint son optimum après 96h d'incubation au-delà desquelles, sa croissance a diminuée. Cette diminution serait due à la libération d'un dérivé toxique.

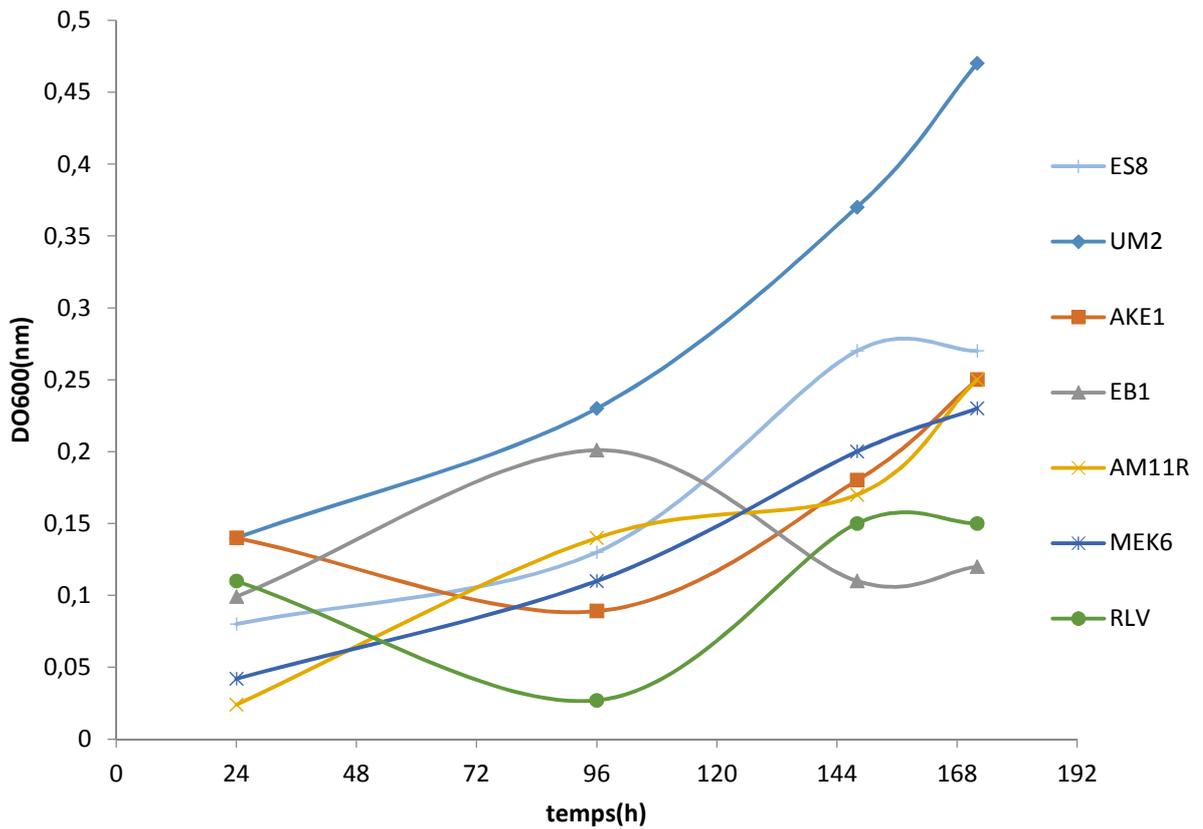


Figure09 : Evolution de la croissance en présence de DURSABAN

Le test d'utilisation du fongicide ARDAVON montre que les souches AM11R, AKE1, MEK6, ES8 et RLV présentent une allure de croissance comparable (Figure 10).

La souche AM11R présente une croissance très importante, ce qui serait dû à sa forte capacité d'assimilation de ce fongicide. Tandis que, la souche UM2 présente une faible croissance.

La souche EB1 présente un optimum de croissance à 96H puis, sa croissance diminue progressivement. Ceci pourrait être dû à la libération de dérivés toxiques. Ces résultats sont comparables aux résultats de Bhattacharyya et *al.* (2012) qui ont constaté que les pesticides incorporés fournissent une faible concentration de nutriments et pourraient

être utilisés comme substrat secondaire par les souches PGPR, ce qui implique que les pesticides testées sont probablement dégradés par co-métabolisme.

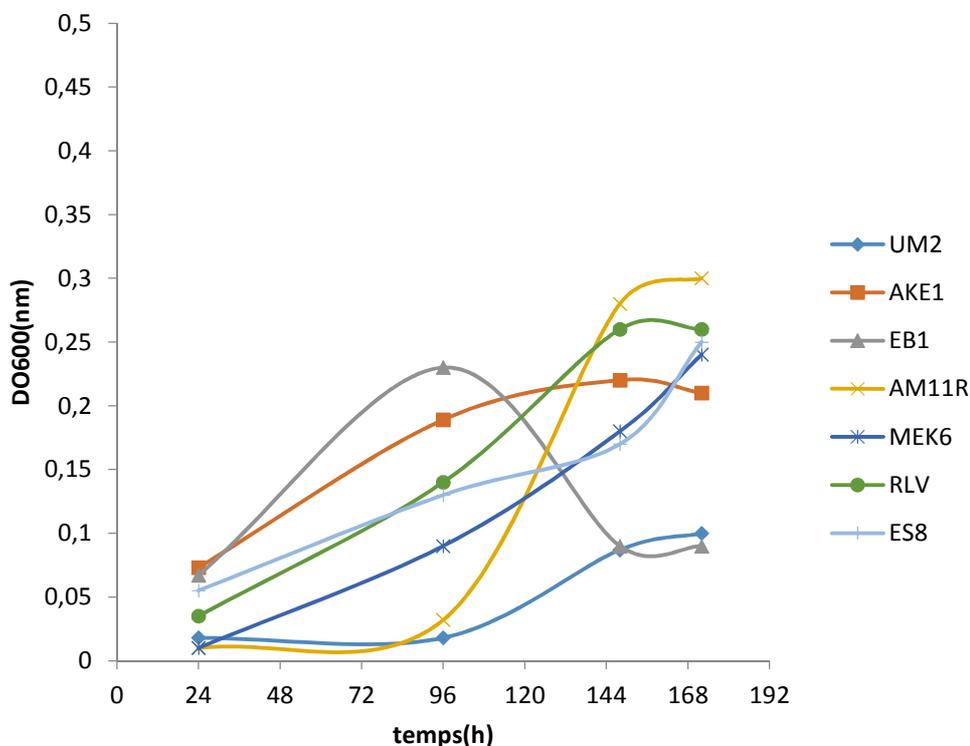


Figure 10 : Evolution de la croissance en présence d'ARDAVO

L'utilisation de l'acaricide RIVAFOL montre que les souches AM11R, RLV, AKE1, MEK6 et ES8 présentent une croissance comparable. La diminution de la croissance des souches RLV, AKE1, UM2 et EB1 pendant les premiers 96H pourrait s'expliquer par le temps à l'adaptation à la présence de l'acaricide puis au-delà de cette période d'incubation, une reprise de croissance a été observée (figure 11). Il y a lieu de signaler que les souches AMM11R, MEK6 et ES8 présentent une bonne croissance, proportionnelle au temps d'incubation, ce qui serait lié à la dégradation de ce pesticide par ces souches. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Gunjan et *al.* (2009) qui ont signalé l'isolement de souches de *Pseudomonas sp.* capables de dégrader environ 70% du thiaméthoxame après 14 jours d'incubation.

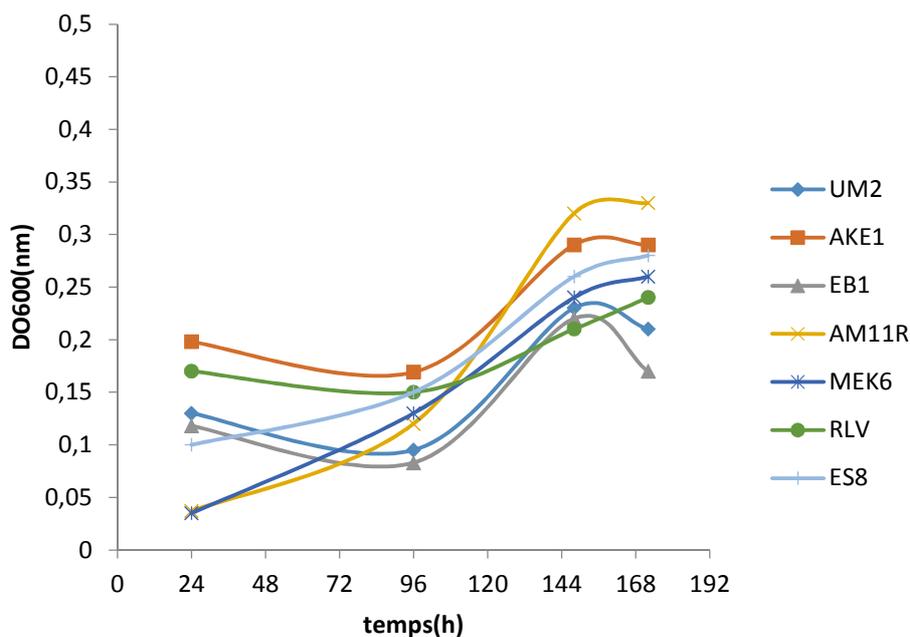


Figure11 : Evolution de la croissance en présence de RIVAFOL

IV.2. Effet du traitement sur les souches

La comparaison de l'effet des différents pesticides sur la croissance des différentes souches de *rhizobium* montre qu'il y a une variabilité dans leur réponse. En effet, on constate que la souche AKE1 présente une meilleure croissance en présence du traitement 4 (RIVAFOL) tandis que, sa croissance est comparable dans le cas des traitements avec traitement 2 (DURSBAN) et traitement 3 (ARDAVO) respectivement.

Les souches RLV et AM11R présentent une même allure de croissance. Leur croissance est plus importante dans le cas des traitements 3 (ARDAVO) et traitement 4 (RIVAFOL).

Les souches MEK6 et ES8 présentent une croissance comparable en présence des trois traitements. Toutefois, elles se développent mieux en présence des traitements 4 (RIVAFOL) et traitement 2 (DURSBAN) respectivement. La souche UM2 présente une croissance beaucoup plus importante que toutes les autres souches en présence du traitement 2 (DURSBAN) mais sa croissance reste similaire à celle des autres souches en présence du traitement 4 (RIVAFOL).

La croissance de la souche EB1 semble être affectée par le traitement 4 (RIVAFOL). En effet, sa croissance diminue pendant les 96H puis reprend, pour atteindre son optimum après 148H. Dans le cas des traitements 2 (DURSBAN) et 3 (ARDAVO), la

croissance de cette souche augmente considérablement pour atteindre son optimum après 96H puis diminue.

A la lumière de l'ensemble des résultats obtenus avec les différentes souches, il ressort que le traitement 4 (RIVAFOL) est celui qui permet l'obtention d'une meilleure croissance chez la plupart des souches. Par conséquent, ce pesticide apparaît plus assimilable par la plupart de ces souches.

L'augmentation de la croissance des différentes souches en présence des différents traitements serait due à la dégradation suivie de l'utilisation de ces pesticides comme source de nutriments. En effet, Kanade *et al.* (2010) ont rapporté que la dégradation du Malathion augmente avec la durée d'incubation et que la dégradation permet de libérer du carbone, de l'azote et du phosphore qui utilisés par la bactérie pour sa croissance.

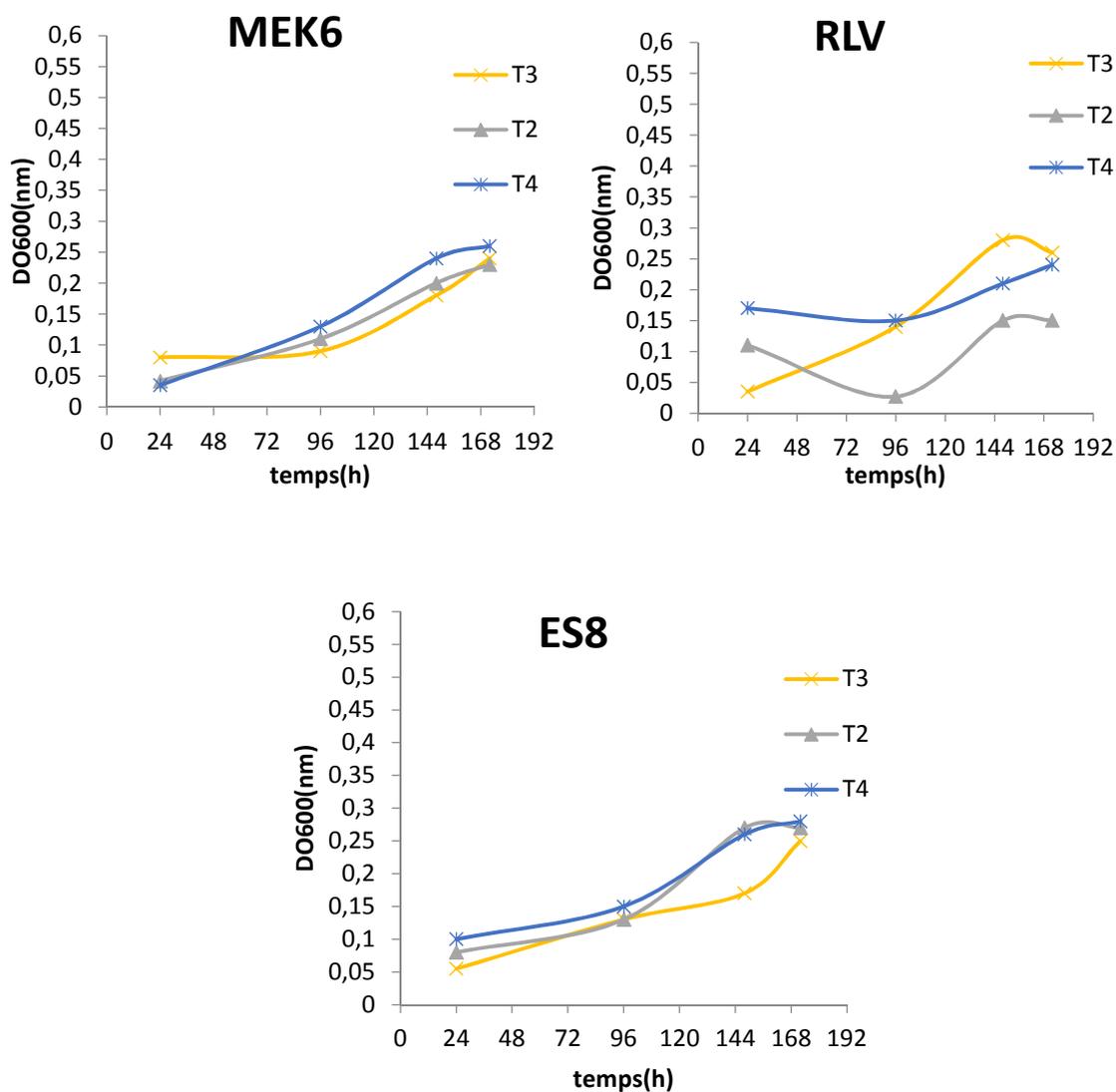


Figure 12 : Variation de la croissance de RLV, MEK6 et ES8 selon les traitements.

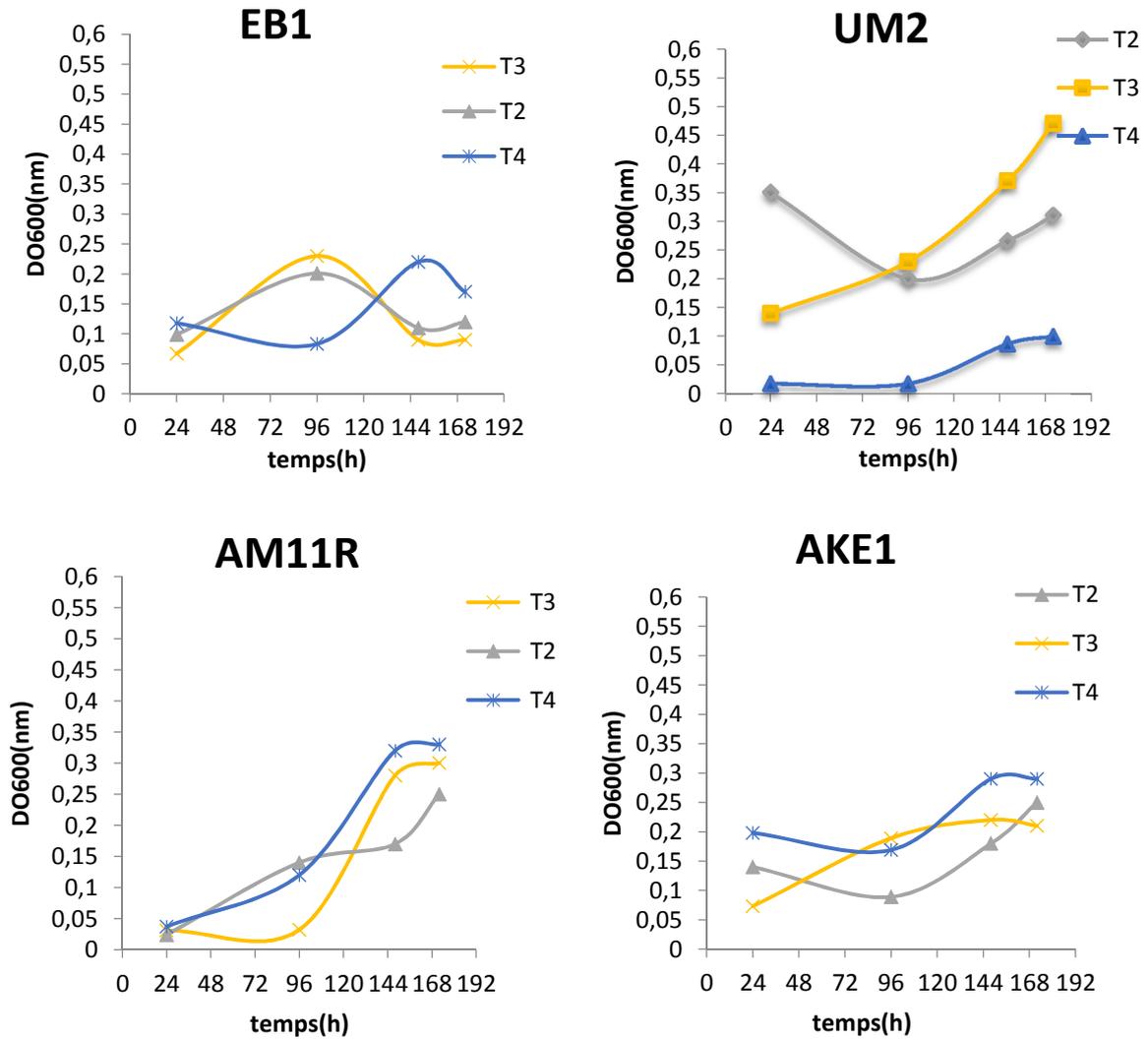


Figure 12 : Variation de la croissance de EB1, UM2, AM11FR et AKE1 selon les traitements

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué l'influence des pesticides sur la croissance de 08 souches de rhizobium.

L'évaluation de la croissance en présence de différentes concentrations de pesticides montre différents niveaux de tolérance chez les souches de *Rhizobiums* étudiés *vis-à-vis* du DURSBAN, ARDAVO, RIVAFOL et du BYE BYE avec des CMI respectives de > 1000 µg/ml, 1000 µg/ml, 700 µg/ml et 1000 µg/ml.

L'ensemble des souches présente un taux de résistance faible *vis-à-vis* des concentrations élevées d'acaricide RIVAFOL (37.5%), et présente une résistance notable *vis-à-vis* du fongicide ARDAVO (75%) et l'insecticide-acaricide BYE BYE (62.5%). Toutes les souches ont montré une résistance totale aux concentrations allant jusqu'à 900 µg/ml en DURSBAN par contre seul 62.5% se développent à 1000.

Concernant la toxicité des pesticides testés, les souches étudiées montrent une certaine tolérance des différents pesticides. Les souches ES8 et UM2 présentent une tolérance élevée à l'insecticide DURSBAN. Dans le cas de RIVAFOL on distingue une tolérance plus élevée chez les souches EA2 et AM11R, tandis que, dans le cas de Bye BYE se sont les souches AM11R et ES8 qui sont les plus tolérantes. Les souches ES8 (14 mm), EA2 (14 mm) et EB1 (15 mm) présentent une faible tolérance *vis-à-vis* de DURSBAN, RIVAFOL et BYE BYE respectivement. Une très faible tolérance est marquée pour les souches AM11R (24 mm), UE28 (25 mm) et AKE1 (24 mm) *vis-à-vis* d'ARDAVO alors que les souches EA2 et ES8 montrent une très forte résistance à ce pesticide (6 mm).

A propos de la biodégradabilité des pesticides testés, toutes les souches dégradent les différents pesticides mais à des durées variables selon la souche et le pesticide. Toutes les souches montrent une meilleure croissance dans le traitement 1 (YMB) à l'exception d'UM2 traitement 2 (DURSBAN). Les souches AKE1, ES8, MEK6 et AM11R donnent une bonne croissance dans le traitement 4 (RIVAFOL) après le traitement 1 (YMB) comparant aux autres traitements 2 (DURSBAN) et traitement 3 (ARDAVO) alors que les souches EB1 et RLV, la bonne croissance est remarquée dans le traitement 3 (ARDAVO).

Cette étude montre qu'il y a des souches de *Rhizobium* présentent une résistance aux différents pesticides donc il y a possibilité de les introduire dans des sites qui sont traitées par des pesticide.

D'autre souche sont sensible .donc nous pouvons suggérer que les concentrations élevés de pesticides pourraient avoir un impact important au niveau de la croissance des souches et des plantes en bloquant la communication biochimique entre les légumineuses et les Rhizobiums, en outre, l'application des recommandations pour l'utilisation optimal des pesticides est nécessaire pour minimiser les dommages aux produits agricoles.

En perspectives, il serait très intéressant de :

- ❖ Réaliser une étude de la croissance ou sera pris en compte une gamme élargie de pesticides.
- ❖ Faire une étude sur la relation entre les *Rhizobiums* et légumineuse en présence de ces pesticides afin d'évaluer leur niveau de résistance et leur impact sur la symbiose.
- ❖ Faire une étude sur les mécanismes de résistance des souches de *Rhizobiums* aux pesticides.

Références Bibliographiques

A

AHEMAD M, SAGHIR KHAN M. Pesticides as Antagonists of Rhizobia and the Legume-Rhizobium Symbiosis: a Paradigmatic and Mechanistic Outlook. *Biochemistry & Molecular Biology* (2013). Vol. 1(4), p.63-75

ANNE-ANTONELLA S. (2015). Réponses écophysiological et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité : implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées. Thèse de doctorat de Préparation à l'unité de recherche UMR CNRS 6553 ECOBIO. UNIVERSITÉ DE RENNES 1, France, 302p.

ANNE S, CHRITIAN H. (2015). Les légumineuses pour le système agricoles et alimentaire durable. Ed, Quae RD 10, Versailles Cedex, 515p.

B

BAUDOIN K. (2013). Le rôle des Industrie Agroalimentaires dans la croissance agricole : Cas de la cote d'Ivoire. Thèse doctorat en Sciences Economiques. Université IBN ZOHR Faculté des Sciences Juridiques Economiques et Sociales-Agadir UFR : Economie et Gestion de l'Espace, 288p.

BOUDJENOUIA A, FLEURY A, TACHERIFTE A. Les légumineuses alimentaires dans les zones périurbaines de Sétif (Algérie) : analyse d'une marginalisation. *New Medit N*(2003), p.23-27.

C

CALVET R, BARRIUSO E, BEDOS C, BENOIT P, CHARNAY MP, COQUET Y. (2005). Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. Ed : France Agricole, pp.49-50-637.

CALVET R, CHARNAY M-P. (2002). Le devenir dans le sol des substances phytopharmaceutiques. *In* : Pesticide et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement. Paris : ACTA, pp. 805-833.

CHAHAL, V.P.S. & CHAHAL, P.P.K. (1994). Effect of pesticides on soil microorganisms. In Management of agricultural pollution in India. (eds) Dhaliwal, G.S. & Kansal, B.D., Commonwealth Publishers, New Delhi. ISBN 81-7169-285-0.

CHARALAMPOS K. Biodegradation of soil-applied pesticides by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on bacterial growth. *Biodegradation* (2012), vol. 23, pp297–310. p. 297–310.

D

DAROUIN P, SELLAMI M, PREVOST D, FORTIN J, Antoun H. Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health, Part B :Pesticides, Food Contaminants, and AgriculturalWastes* *Journal of Environmental Science and Health Part B.*(2010), vol. 45,p.780-788..

E

EI HABIB EL. (2013). Processus Physico-chimiques d'Élimination des pesticides dans l'environnement : Cas de l'Imazéthapyr. Thèse doctorat de Chimie Physique. Université Mohammed V – Agdal, Faculté Des Sciences, Rabat, 108p.

F

FÖLDÉNYI R, CZINKOTA I and TOLNER L (2011). Pesticide-Soil Interaction, *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*, Ed, Octobre, 2011, pp439-462.

G

GAHERWAL S., PRAKASH M.M., KHASDEO K. and SHARMA Anirudh. Impact of Selected Chemical and Herbal Pesticide on Beneficial Soil Microorganism. (2015), vol. 3, p.236-239.

GUNJAN P. Biotransformation of the Neonicotinoid Insecticides Imidacloprid and Thiamethoxam by *Pseudomonas sp.* 1G. *Jornal Biochemical annd Biophysical Research Cominications*(2009), vol. 3, p380-384.

K

KALAM A et MUKHERJEE A K. Influence of hexaconazol, carbofuran and ethion on soil microflora and dehydrogenase activities in soil and intact cell. *Indien Journal of Experimental Biology* (2001), vol. 39 p.90-94.

KANADE S.N., SHAIKH S.M., A.B.A and KHILARE V.C. Degradation Of Malathion Rhizobium Isolated From Fenugereek(*Trigonella Foenum Graecum*).*Journal of Biotechnologie and Bioinformatics* (2010). Vol. 4, n° 1, p. 29-38.

KERSANTE, A., 2003 - Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré, Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, France, p101.

KOMAREK M, ČADKOVA E, CHRASTNÝ V, BORDAS F, BOLLINGER JC. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides : A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, vol. 36, 138-151.

M

MARIA A. MOREL, BRAÑA V et CASTRO-SOWINSKI S. (2012). Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production. Ed par Aakash Goyal, ISBN 978-953-51-0527-5, 220p.

MAZOYER M. (2004). Le point de vue de l'agronome : nourrir les pays du Sud aujourd'hui et pour longtemps. *In* : Actes du séminaire national-Les sciences de la vie et de la terre au XXIème siècle, p.4-5.

MOHAMED AHMED T. H., ELSHEIKH E. A.E. & MAHDI A.A. The in vitro Compatibility of some Rhizobium and Bradyrhizobium Strains with Fungicides. African Crop Science Conference Proceedings (2007), Vol. 8. pp. 1171-1178.

N

NAGATA M and AKIHIRO S, (2014). Effects of phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation in Leguminous Plants, *In :Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, pp.128.

P

PAROMENSKAYA, L.N. (1979). The symbiotic relations of Rhizobium and leguminous plants exposed to herbicides. Byulleten-Vsesoyuznogo-Nauchno-Issledovatelskogo-Institutu-Selskokhozyaistvennoi-Microbiologii 32, 11–13.

PIERZYNSKI, G. M. SIMS, J. T. & VANCE, G. F. (1994). Soils and Environmental Quality, Lewis Publishers, ISBN 0-87371-680-9, Boca Raton, USA. pp. 187-190

PRANITA A. GULHANE, ASHOK V. GOMASHE and KAJAL M. Influence Of Pesticides On Nitrogen Fixing Bacteria. International Journal of Research and Applications (2015), vol. 3, pp. 157-160.

S

SABEEN H and TARRANUM S. Resistance of rhizobia against different pesticides and detection of nitrogen fixing protien sequences. Annals of Biological ResearchE. (2013). Vol. 4, n°1, p.29-38.

SEPPERUMAL U, PALANIMANICKAM and SIVALINGAM G. Plasmid mediated endosulfan degradation by Bacillus ciradans and Acinetobacter species. (2013), Microbiol. Biotech. Res. vol. 6, p.15-20.

SHAFIANI S and MALIK A. Tolerance of Pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater-irrigated soil. *Journal of microbiology and biotechnology*(2003). Vol. 19,p.897_901.

SHIN-CHSIANG LIN, B. R. FUNKE and J. T. SCHULZ. Effects of some organophosphate and carbamate insecticides on Nitrification and legume growth. *Jornal Plante and Soil* (1972), vol. 37. P.489-496.

SINGH G. and WRIGHT D *In vitro* studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. *Lettrs in Appelied Microbiology, Journal letters in Applied Microbiology*(2002),35,pp.12-16.

SOUSOU S. (2013). Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sitea miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse de doctorat en Microbiologie, Parasitologie /Agriculture Durable. Institut Supérieur Agronomique De Chott Meriam Université De Sousse ,219p.

STANLEY J, GNANADHAS P. (2015). Exposure,Toxicity and Risk Assessment Methodologies.In:Pesticide Toxicology to Non-target Organisms. Tamil Nadu, India, 499pp.

SUBBA RAO, N.S. (1995). In *Soil Microorganisms and Plant Growth*. ed Oxford and IBH Publishing. New Hampshire, USA ,335pp.

T

TANGUAY L. J. (2014). Les inoculant Mycorhziens pour une agriculture Québécoise Plus Productive Moins Déponente Au Engrais Minéraux Phosphate. Grade de Maitre en Envirenment. Université de Sherbrooke, 87p.

Y

YARON, B., R. CALVET and R. PROST. (1996). Soil pollution, Processes and dynamics, ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany. p.23-31.

Z

ZACHARIA, TANO J. (2011). Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides. In : Ecological Effects of Pesticides. edited by Margarita Stoytcheva, ISBN 978-953-307-437-5, Agricultural and Biological Sciences, Tanzania, pp. 01-18.

Annexes

Annexe 01:

Composition du milieu de culture (Vincent ,1970).

–

Yeast Extract Mannitol Agar (YMA).

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,8 g
Agar	15 g
NaCl	0,1g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g

Le pH est ajusté à 7 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.

Yeast Extract Mannitol Broth (YMB).

Mannitol	10 g
Extrait de levure	0,8 g
NaCl	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g

Le pH est ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.

Annexe 2 :**Tableau I : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches vis-à-vis du fongicide ARDAVO.**

Souche	AM ₁₁ R	MEK ₆	UE ₂₈	EB ₁	RLV	ES ₈	UM ₂	AKE ₁	EA ₂
Concentration µg/ml									
0	6	6	6	6	6	6	6	6	6
100	10	10	10	10	10	6	8	11	14

Tableau II : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches vis-à-vis de l'acaricide RIVAFOL.

Souche	AM ₁₁ R	MEK ₆	UE ₂₈	EB ₁	RLV	ES ₈	UM ₂	AKE ₁	EA ₂
Concentration µg/ml									
0	6	6	6	6	6	6	6	6	6
100	24	15	25	18	14	6	13	24	6

Tableau III : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches vis-à-vis l'insecticide DURSBAN.

Souche	AM ₁₁ R	MEK ₆	UE ₂₈	EB ₁	RLV	ES ₈	UM ₂	AKE ₁	EA ₂
Concentration µg/ml									
0	6	6	6	6	6	6	6	6	6
100	15	10	10	12	10	14	9	10	6

Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibition des différentes souches *vis-à-vis* l'insecticide - acaricide BYE BYE.

Souche	AM ₁₁ R	MEK ₆	UE ₂₈	EB ₁	RLV	ES ₈	UM ₂	AKE ₁	EA ₂
Concentration µg/ml									
0	6	6	6	6	6	6	6	6	6
100	6	9	10	15	9	6	11	12	12

Tableau V : Les DO des différentes souches *vis-à-vis* du DURSBAN.

Souche	UM ₂	AKE ₁	EB ₁	AM ₁₁ R	MEK ₆	RLV	ES ₈
Temps(h)							
24	0,14	0,14	0,099	0,024	0,042	0,11	0,08
96	0,23	0,089	0,201	0,14	0,11	0,027	0,13
148	0,37	0,18	0,11	0,17	0,2	0,15	0,27
172	0,47	0,25	0,12	0,25	0,23	0,15	0,27

Tableau VI : Les DO des différentes souches *vis-à-vis* d'ARDAVO.

Souche	UM ₂	AKE ₁	EB ₁	AM ₁₁ R	MEK ₆	RLV	ES ₈
Temps(h)							
24	0,018	0,073	0,067	0,01	0,01	0,035	0,055
96	0,018	0,189	0,23	0,032	0,09	0,14	0,13
148	0,087	0,22	0,09	0,28	0,18	0,26	0,17
172	0,1	0,21	0,09	0,3	0,24	0,26	0,25

Tableau VII : Les DO des différentes souches *vis-à-vis* de RIVAFOL.

Souche	UM ₂	AKE ₁	EB ₁	AM ₁₁ R	MEK ₆	RLV	ES ₈
Temps(h)							
24	0,13	0,198	0,118	0,037	0,035	0,17	0,1
96	0,095	0,169	0,083	0,12	0,13	0,15	0,15
148	0,23	0,29	0,22	0,32	0,24	0,21	0,26
172	0,21	0,29	0,17	0,33	0,26	0,24	0,28

Tableau VIII : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* d' AKE1.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps (h)				
24	0,24	0,14	0,073	0,198
96	0,26	0,089	0,189	0,169
148	0,35	0,18	0,22	0,29
172	0,36	0,25	0,21	0,29

Tableau IX : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* de la souche RLV.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps(h)				
24	0,29	0,11	0,035	0,17
96	0,33	0,027	0,14	0,15
148	0,39	0,15	0,28	0,21
172	0,36	0,15	0,26	0,24

Tableau X : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* de la souche EB1.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps(h)				
24	0,38	0,099	0,067	0,118
96	0,06	0,201	0,23	0,083
148	0,13	0,11	0,09	0,22
172	0,2	0,12	0,09	0,17

Tableau XI : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* de la souche AM11R.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps(h)				
24	0,036	0,024	0,031	0,037
96	0,2	0,14	0,032	0,12
148	0,33	0,17	0,28	0,32
172	0,56	0,25	0,3	0,33

Tableau XII : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* de la souche UM2.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps(h)				
24	0,35	0,14	0,018	0,13
96	0,2	0,23	0,018	0,11
148	0,266	0,37	0,087	0,21
172	0,31	0,47	0,1	0,21

Tableau XIII : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* de la souche ES8.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps(h)				
24	0,056	0,08	0,055	0,1
96	0,13	0,13	0,13	0,15
148	0,28	0,27	0,17	0,26
172	0,29	0,27	0,25	0,28

Tableau XVI : Les DO de différents traitements *vis-à-vis* de la souche MEK6.

Traitement	T1	T2	T3	T4
Temps(h)				
24	0,09	0,042	0,08	0,035
96	0,1	0,11	0,09	0,13
148	0,28	0,2	0,18	0,24
172	0,31	0,23	0,24	0,26

Résumé

Ce travail a eu pour objectif d'étudier l'effet des pesticides sur la croissance des souches de *Rhizobium* et d'estimer la capacité de ces *Rhizobium* à les dégrader. La plupart des souches de *Rhizobium* se développent en présence de faibles concentrations en pesticides. Le maximum de tolérance est observé dans le cas d'insecticide DURSBAN où la plus part des souches présentent une CMI supérieure à 1000µl/ml. La CMI obtenue avec l'acaricide RIVAFOL varie de 300 à 600µg/ml tandis que, dans le cas du fongicide ARDAVO et de l'insecticide-acaricide BYE BYE, la tolérance des différentes souches est très variable avec des CMI allant de 100 à 1000 µg/ml.

Le test de biodégradation des pesticides montre que la plupart des souches utilise les différents pesticides comme substrat carboné. Toutefois, le fongicide ARDAVO est le plus dégradé. Les souches AM11R et UM2 présentent une meilleure croissance et par conséquent une meilleure biodégradation des différents pesticides utilisés.

Mots clés : *Rhizobium*, pesticides, biodégradation, tolérance.

Abstract

The aim of this work was to study the effect of pesticides on the growth of *Rhizobium* strains and to estimate the ability of *Rhizobium* to degrade them. Most strains of *Rhizobium* develop in the presence of low concentrations of pesticides. The maximum tolerance is observed in the case of DURSBAN insecticide where most strains have a MIC greater than 1000 µl / ml. The MIC shown by RIVAFOL acaricide ranges from 300 to 600 µg / ml while in the case of ARDAVO fungicide and BYE BYE insecticide-miticide, the tolerance of different strains varies widely with MIC ranging from 100 to 1000 µg /ml.

The biodegradation test pesticides shows that most strains used the various pesticides as a carbonaceous substrate. However, ARDAVO Fungicide is the most degraded. Strains AM11R and UM2 show a better growth and therefore better biodegradation of the various pesticides used.

Key words: *Rhizobium*, pesticides, biodegradation, tolerance.

Sommaire

Introduction

Annexes