

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

1. Présentation de la zone d'étude

Les eaux superficielles agricoles étudiées ont été prélevées à partir des régions de Ben M'Hidi-Echatt. Plusieurs sites ont été choisis au niveau de ces deux régions (5 sites). C'est une zone à vocation agricole et qui constitue la zone polluée par les pesticides. La zone témoin choisie est une zone forestière; il s'agit de El-Aioun, située à la frontière Algéro-Tunisienne) loin de toute contamination par les différents polluants y compris les pesticides.

1.1. Situation géographique

La daïra de Ben M'hidi est située au Nord-Est algérien, elle est limitée au Nord par la mer méditerranée, à l'Est par Berrihane et Boutheldja. Au Sud par les massifs gréseux qui surplombent les localités de Besbes et Zerizer et à l'Ouest par la wilaya d'Annaba. Elle appartient à la wilaya d'El Tarf qui est située à l'extrême Nord-Est du pays et couvre une superficie de 2892km². Sa surface agricole est de 71000 ha dont 13500 sont irrigués.

La plaine Ouest d'El Taref s'inscrit dans un quadrilatéral délimité approximativement par les méridiens 7°45' et 8°00' Est et par les parallèles 36°41' et 36°50' Nord. Elle est comprise dans la zone littorale de la région d'Annaba et d'El Taref entre le cordon dunaire au Nord et les monts de Chefia au Sud.



Figure 2. Carte de localisation géographique des sites étudiés (google earth).

1.2. Hydrographie

La plaine est traversée par deux principaux oueds, oued Seybouse à l'Ouest et oued Bounamoussa à l'Est. Entre ces deux principaux cours d'eau, plusieurs prennent naissance tels que oueds Khalid de Boukhamira, et oued Bou Hallal.

1.3. Les caractéristiques climatiques

La région d'étude est soumise à un climat méditerranéen. Les températures hivernales varient entre 6,9 à 7,8 en moyenne, elles atteignent 30°C aux mois de juin et juillet.

La région compte parmi les régions les plus arrosées d'Algérie, ainsi les précipitations enregistrées est de 2,8mm au mois d'Août et atteint 95.5 mm au mois de décembre. L'humidité de l'air est de 64.6% (moyenne annuelle) et une élévation du degré hygrométrique en période hivernale. D'autres données climatiques sont présentées dans l'annexe n°1

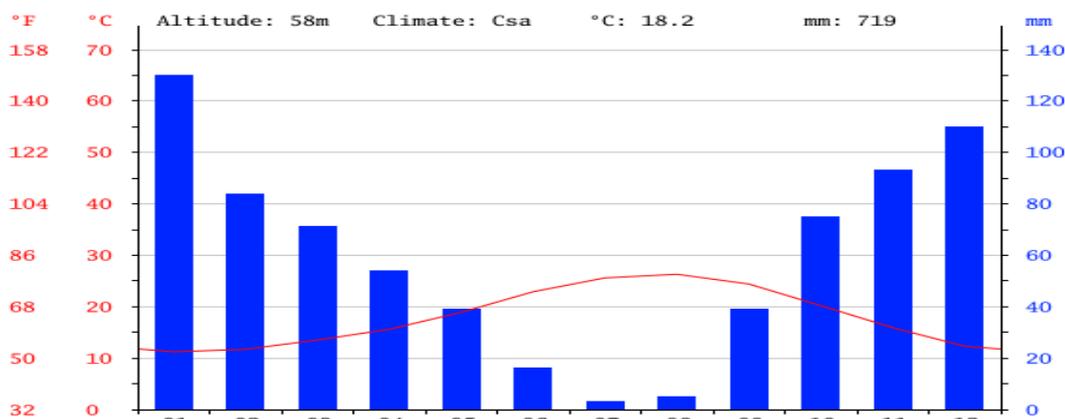


Figure 3. Diagramme climatique de la région d'El Taref (année 2009).

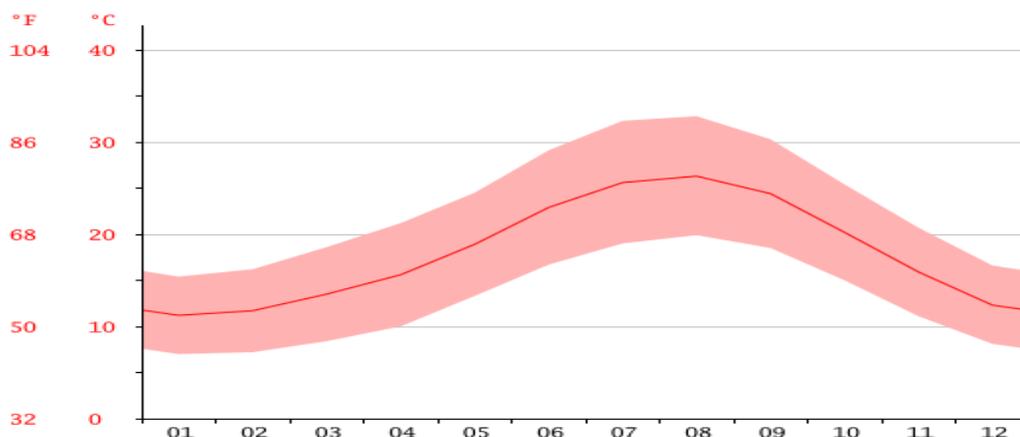


Figure 4. Courbe de température de la région d'El Taref (année 2009).

1.4. Prélèvements des échantillons d'eau

Dans le cadre de notre étude, nous avons effectué des prélèvements à différents endroits de la zone d'étude pour qualifier et quantifier leur pollution en pesticides. Les échantillons d'eau sont collectés à partir des eaux stagnées au niveau des champs, mis dans des bouteilles de verre ambré bien propres et rincées avec cette même eau (Rodier, 1996). Une feuille d'aluminium est placée sur le goulot afin d'empêcher tout contact entre l'échantillon et le bouchon de plastique. Les différents échantillons ont été conservés dans des glacières à des températures inférieures à 4 degrés jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils sont rapidement analysés. La localisation des points de prélèvement sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau6. Les différents sites de prélèvement

N° Sites	Localisation des sites
1	Parcelle de blé située au niveau d'Echatt
2	Parcelle de Tomate, située au niveau de l'Institut national de la protection des végétaux (INPV)
3	Parcelle de Pomme de terre, située à 0.5 km de l'INPV
4	Parcelle de concombre, située à 1km à gauche de l'INPV
5	Puits situé à 2 km de l'INPV
6	Site témoin : zone forestière située au niveau de l'El-Aioun

2. Analyse physico chimique des eaux superficielles agricoles

2.1. La température

Elle a été mesurée à l'aide d'un thermomètre au 1/100 de degré, trempé dans l'échantillon pendant cinq (5) minutes. Nous avons mesuré la température au lieu de prélèvement (in situ). On lit directement la température exprimée en degré Celsius (°C).

2.2. Le pH

C'est un paramètre chimique caractérisant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Il résulte de la composition ionique de l'eau, (Aminot et Kérrouel, 2004). En théorie, le pH est défini comme le cologarithme décimal de l'activité de l'ion H⁺. Le pH dépend de la teneur en dioxyde de carbone ; c'est à dire une modification de CO₂ (Respiration, photosynthèse, échange air- eau) entraînera donc une modification du pH (Ramade, 2000).

Le calcul du pH des échantillons d'eau a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre de type Wagtech 525043. La méthode a consisté à plonger l'électrode dans l'échantillon contenu dans un bêcher dans lequel le barreau d'un agitateur magnétique homogénéise l'échantillon. Après stabilisation de l'affichage sur le cadran du pH mètre, nous avons noté le pH.

2.3. La Conductivité (CE)

La détermination de la conductivité se fait par la mesure de la résistance. Un voltage est appliqué entre deux électrodes plongées dans l'échantillon et la chute du voltage due à la résistance de la solution est utilisée pour calculer la conductivité par centimètre.

La conductivité de l'eau est une mesure de sa capacité à conduire le courant électrique. Elle permet d'apprécier rapidement mais très approximativement la minéralisation de l'eau et de suivre son évolution. La conductivité électrique des échantillons d'eau a été mesurée à l'aide d'une sonde multi paramètres de type WTW 197i. Celui-ci mesure le passage de l'électricité entre deux électrodes plongées dans l'eau. La mesure peut s'effectuer à 20° C avec un conductimètre avec compensateur automatique de température. La mesure de la conductivité est un moyen assez simple de détection d'une anomalie indiquant la présence probable d'une pollution, par comparaison de la valeur norme admissible. Les charges importantes de pollution organique augmentent la conductivité.

2.4. L'oxygène dissous

L'oxygène dissous dans les eaux de surface provient essentiellement de l'atmosphère et de l'activité photosynthétique des algues et des plantes aquatiques. La concentration en oxygène dissous varie de manière journalière et saisonnière car elle dépend de nombreux facteurs tels que la pression partielle oxygène de l'atmosphère, la température de l'eau, la salinité....

La teneur en oxygène dissous a été mesurée *in situ* à l'aide de l'oxymètre de type 340i Multi / SET.

2.5. La demande biologique en oxygène (DBO5)

La DBO5 exprime la consommation naturelle d'oxygène en gramme/litre des composés organiques dans l'eau, dégradée par les bactéries du milieu par une oxydation. L'oxydation des composés organiques biodégradables par les microorganismes entraîne une consommation de dioxygène (O₂). La mesure de cette demande en oxygène permet d'évaluer le contenu d'une eau en matières organiques biodégradables, donc son degré de pollution ou sa qualité. Cette technique permet de mesurer au laboratoire sur 5 jours (à 20° C dans l'obscurité), la

quantité d'oxygène consommée par le processus naturel de décomposition de la matière organique décomposable présente dans un litre d'eau.

Pour mesurer la DBO₅, on réalise une première mesure de la concentration en dioxygène dans l'échantillon d'eau. On répète cette mesure 5 jours plus tard. La DBO₅ représente la différence entre les deux concentrations mesurées.

2.6. La demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation par voie chimique, effectuée à l'aide d'un oxydant puissant, des composés organiques présents dans l'eau. Elle permet de mesurer la teneur en matières organiques totales, y compris celles qui ne sont pas dégradables par les bactéries. Il s'agit donc d'un paramètre important permettant de caractériser la pollution globale d'une eau par des composés organiques.

Cette technique a été réalisée par oxydation chimique à chaud des matières organiques ou minérales présentes dans l'eau à l'aide d'un oxydant puissant, le permanganate de potassium (KMnO₄) pendant 2 heures.

2.7. Le rapport DCO / DBO₅

Le rapport DCO/DBO₅ donne une première estimation de la biodégradabilité d'un échantillon donné (Rodier, 2005). Le rapport DCO / DBO₅ donne une indication sur l'origine de la pollution organique. Plus il se rapproche de 1, plus le rapport DCO / DBO₅, indique la biodégradabilité d'un milieu. Lorsque le rapport est supérieur à 2, ceci indique que l'échantillon analysé est difficilement biodégradable ; Lorsque le rapport est < à 2 : l'échantillon analysé est facilement biodégradable ; lorsqu'il est > à 3 : l'échantillon n'est pas biodégradable.

2.8. Les ions ammonium NH₄⁺

Les concentrations d'ammonium sont mesurées par une méthode de normalisation internationale (ISO 715/1-1998). Les ions NH₄⁺ ont été dosés par colorimétrie suite à une catalyse en milieu alcalin par une solution de nitroprussiate de sodium.

2.9. Les chlorures

Les ions chlorures sont dosés par la méthode volumétrique, dans un milieu neutre (pH=6,7 ou 7) par une solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent. (Rodier, 1996).

2.10. Les orthophosphates

Les concentrations des ortho phosphates ont été déterminées par spectrophotométrie à absorption moléculaire en utilisant une longueur d'onde $\lambda=700$ nm selon la méthode de normalisation internationale (ISO 6878/1-1998).

2.11. Les phénols

Détermination photométrique des phénols et d'autres composés de manière oxydative par formation de colorantes antipyrine sa l'aide du 4-aminoantipyrine. Réaction chimique conforme aux méthodes normées DIN 38409-H 16-3. La longueur d'onde utilisée est égale à 520nm. La méthode détaillée est présentée en annexe.

2.12. Les Nitrites

Nous avons utilisé la méthode au Réactif de Zambelli pour le dosage des nitrites (NO_2^-) (Rodier, 1987), l'acide sulfanilique en milieu chlorhydrique et en présence d'ions ammonium et de phénol, forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré en jaune dont la densité est proportionnelle à la concentration en nitrites. Les lectures sont effectuées au spectrophotomètre à la longueur d'onde 435nm.

2.13. Les Nitrates

Les nitrates (NO_3^-) ont pour principale origine le lessivage des terres agricoles et la dégradation de la matière organique. Les variations saisonnières des teneurs en nitrates sont importantes et liées au développement du phytoplancton et au débit des cours d'eau.

Pour le dosage des nitrates, nous avons utilisé la méthode au Salicylate de sodium indiquée par Rodier (1987). En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent le paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique.

3. Analyses des paramètres physico-chimiques des pesticides

Il y a une relation étroite entre les caractéristiques physico-chimiques des pesticides, celles de la matrice (eau, sol, air) et les facteurs climatiques. Cette relation influe d'une manière

importante sur la contamination des milieux et la biodégradabilité du polluant ou pesticide (Bordjiba, 2003).

3.1. La solubilité (S)

Les substances ayant une solubilité élevée sont rapidement distribuées par le cycle de l'eau, ces substances sont peu absorbées sur les particules solides et tendent à être plus facilement dégradées à la fois par les phénomènes biotiques. Aucune substance n'est complètement insoluble dans l'eau.

3.2. La pression de vapeur (P)

La pression de vapeur permet d'évaluer le taux d'évaporation d'une substance. Il est nécessaire d'ajuster la pression de vapeur d'une substance à une température donnée différente de la température normale.

3.3. La constante de Henry (H)

Elle représente le coefficient de partage à l'équilibre d'une substance entre l'air et l'eau. Plus la valeur est forte, plus la substance aura tendance à passer dans l'air sous forme gazeuse au lieu de rester dissoute dans l'eau.

3.4. Les coefficients de rétention : Koc et Kd

La rétention des pesticides par les sols est classiquement caractérisée à l'aide du coefficient de partage Kd ou de distribution du pesticide entre les phases liquide et solide.

Ce coefficient déterminé à l'équilibre traduit l'affinité du sol pour le pesticide. Comme la matière organique est considérée comme le constituant du sol majoritairement responsable de l'adsorption des pesticides. Le coefficient Kd est fréquemment normalisé par rapport à la teneur en carbone organique du sol, pour donner ainsi le coefficient Koc.

3.5. Mobilité

La mobilité d'une substance est évaluée par sa constante de sorption. Elle évalue les risques de contamination des eaux souterraines par des tests sur colonne.

3.6. Persistance en plein champ

La persistance d'une substance active est l'évaluation du risque d'accumulation dans les sols et de dispersion dans l'environnement dans les conditions réelles.

3.7. Coefficients de partage octanol-eau : K_{ow}

Le K_{ow} ou le coefficient de partage octanol-eau. C'est une grandeur sans dimension, définie à une température et à un pH donné. Il est souvent exprimé en logarithme décimal : \log de P. \log P est un indicateur de liposolubilité d'une substance. Si \log P est supérieur ou égal à 3, la substance est susceptible de bioaccumulation.

3.8. Stabilité dans l'eau

Elle est évaluée par le temps de dégradation de 50 % de la substance active (DT 50) dans l'eau et exprimée en jours ou en heures à un pH donné.

4. Méthodes d'analyse statistique

Toute étude statistique peut être décomposée en deux phases au moins : le rassemblement ou la collecte des données, d'une part, et leur analyse ou leur interprétation, d'autre part.

Les données collectées sont des caractéristiques physicochimiques mesurées dans chaque échantillon d'eau superficielle agricole prélevée par site.

La statistique descriptive a pour but de mesurer et de présenter les données observées d'une manière telle qu'on puisse en prendre connaissance aisément, par exemple sous la forme de tableaux ou de graphiques.

L'inférence statistique permet d'étudier ou de généraliser dans certaines conditions les conclusions ainsi obtenues à l'aide de tests statistiques en prenant certains risques d'erreur qui sont mesurés en utilisant la théorie des probabilités.

Concernant notre travail, tous les calculs ont été réalisés pour chaque variable et pour chacun des 6 sites, à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données minitab version 14.1(X, 2003).

4.1. Description des données

Pour mieux décrire les différentes caractéristiques obtenues par site, nous avons calculés certains paramètres statistiques de base tels que la moyenne arithmétique (\bar{x}) qui est un paramètre de position et de tendance centrale, l'écart type (s) qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne, les valeurs minimales (x_{min}) et maximales (x_{max}) qui donnent toutes les deux une idée sur l'étendue des données, et enfin l'effectif (n) qui nous renseigne sur l'importance des données traitées.

4.2. Comparaison entre les sites : Analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA)

Pour comparer, entre les 6 sites, nous avons utilisé le test d'analyse de la variance à un critère ou à un facteur de classification modèle fixe.

L'analyse de la variance (ANOVA) du modèle linéaire général (GLM) du logiciel Minitab d'analyse statistique des données (MinitabInc, 2014) est utilisée pour comparer les moyennes, entre elles, des 6 sites et ceci pour chaque caractéristique étudiée (Dagnelie, 2009). On considère qu'il existe des différences significatives entre les moyennes des quatre doses quand la valeur de la probabilité (p) est inférieure ou égale au risque $\alpha = 0,05$ ($p \leq \alpha = 0,05$) ; des différences hautement significatives quand $p \leq \alpha = 0,01$ et des différences très hautement significatives quand $p \leq \alpha = 0,001$ (Dagnelie, 2009).

4.3. Test de TUCKEY

Le test de TUKEY (Dagnelie, 2009) a permis de déterminer les groupes de sites homogènes par caractéristique physicochimique (MinitabInc, 2014).

5. Etude de la microflore microbienne totale des eaux superficielles agricoles

5.1 Dénombrement de la microflore microbienne

5.1.1. Isolement, purification et conservation des souches

L'analyse de la microflore a été conduite selon la technique des suspensions – dilutions telle qu'elle est décrite par (Rapilly, 1968) sur différents milieux de culture selon la méthode suivante(Figure : 05).

Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Pour permettre le développement des microorganismes, le milieu doit contenir tous les aliments nécessaires en quantité suffisante et en proportion relativement convenable.

Les milieux de culture choisie pour l'isolement sont purement synthétiques et favorables au développement des microorganismes. C'est un choix déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore Il s'agit des milieux PDA (milieu à base de Pomme de terre, Dextrose et Agar), MEA (milieu à base d'extrait de Malt et d'Agar, Czapeck (milieu à base d'élément minéraux et Agar), Sabouraud (a base de glucose et Agar) et milieu de Galzy et Slonimski (a base des sels minéraux et vitamines) . La composition chimique et le pH des milieux sont présentés dans l'annexe n°2.

10 ml de la solution mère de chaque prélèvement sont mélangés et agitées pendant quelques minutes dans un tampon phosphate PBS (Phosphate - Buffered Saline) Plusieurs dilutions au dixième sont préparées à partir du tube contenant la suspension mère.

Il est possible de dénombrer globalement les populations microbiennes d'une eau en comptant les colonies qui se développent sur milieu gélosé ensemencé par une dilution de l'échantillon (1 microorganisme =1 colonie).

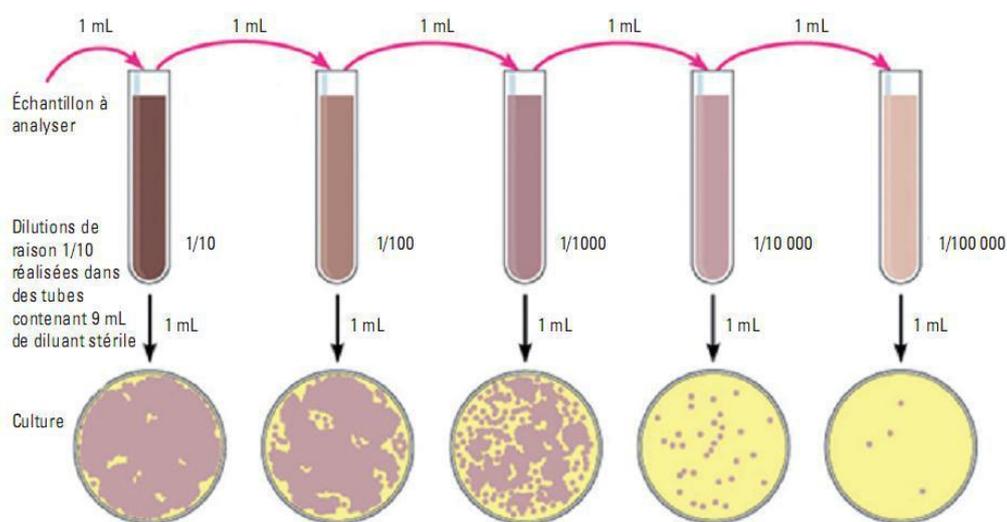


Figure 05. Méthode d'isolement de la microflore totale microbienne.

Après agitation, les différentes dilutions préparées sont utilisées pour réaliser des étalements sur différents milieux de culture. Un ml de chaque suspension-dilution est déposé dans une boîte des boîtes de pétri contenant le milieu de culture stérile, trois répétitions sont réalisées pour chaque dilution. Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours.

Les microorganismes isolés sont d'abord purifiés par plusieurs repiquages successifs monospore ou mono-colonie sur des milieux de culture spécifiques. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code. La conservation des microorganismes ainsi désignés se fait soit à une température de 4°C soit au congélateur à une température de -18°C. Dans les deux cas, aussi bien pour les bactéries que pour les champignons, des disques de gélose