
Comptage et expression des résultats

La détermination de la charge microbienne est faite par comptage des colonies et les résultats sont exprimés en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies) / ml d'eau selon la formule mathématique ci-dessous. Seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies au niveau de deux dilutions successives sont retenues pour le dénombrement (Dutruc-Rosset, 2003).

$$N = \sum \text{colonies} / V_{\text{ml}} \times (n_1 \times 0,1n_2) \times d_1$$

Où : N: Nombre d'UFC par volume d'eau; \sum colonies: somme des colonies des boîtes interprétables; V: Volume de solution déposée (1ml); n_1 : Nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue; n_2 : Nombre de boîtes considéré à la seconde dilution retenue; d_1 :Facteur de la première dilution retenue.

Identification de la microflore fongique isolée des eaux agricoles superficielles

après une série de repiquages successifs jusqu'à purification du champignon, La caractérisation et l'identification des espèces fongiques est basée sur l'observation macrosopiques et microscopiques des caractères morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

5.2.1. Identification macroscopique

L'identification morphologique repose sur des caractères macroscopiques sur les différents milieux de culture (dimension, couleur, texture, pigmentation du milieu, et croissance, aspect des colonies, de leur revers).

5.2.2. Identification microscopique

Les caractères microscopiques tels que l'aspect du mycélium, des spores, conidies, des phialides, des conidiophores, structures de résistances et éventuellement la forme sexuée ou asexuée constituent les bases de critères principaux de l'identification des champignons (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

À partir des caractéristiques macroscopiques et microscopiques, l'identification est effectuée en se référant à différentes clés de détermination : (Barnett, 1960 ; Ellis, 1971 ; Ellis, 1976 ; Domsch et *al.*, 1980 ; Wang et Zabel, 1992).

5.3. Identification de la microflore bactérienne

5.3.1. Identification macroscopique

Pour chaque colonie isolée et purifiée, les caractéristiques macroscopiques de la colonie sont vérifiées en se basant sur :

- la taille ou le diamètre de la colonie : Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies.
- la forme : l'allure des contours lisses, dentelés, déchiquetés, réguliers, irréguliers.
- relief : surface bombée, demi-bombée, plate centre parfois surélevé, parfois ombiliqué (en creux).
- L'aspect de la surface, Il peut être lisse ou rugueux.
- L'opacité : colonies opaques, translucides, transparentes.
- La consistance : au moment du prélèvement, il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).
- La couleur (pigmentation) : Les colonies habituelles sont crèmes. Une couleur différente est due à des pigments : jaune, rouge, orange, violette ...

5.3.2. Détermination des principaux types de bactéries

En rassemblant les critères précédemment décrits, trois sortes de colonies peuvent être distinguées :

- colonies S ou Smooth : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes.
- colonies R ou Rugueuses : colonies à surface rugueuse et bords dentelés, plates, de consistances sèches et donnant des suspensions hétérogènes.
- colonies M ou muqueuse : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, filantes sous l'anse, et donnant des suspensions hétérogènes.

5.3.3. Observation microscopique

L'observation microscopique permet de faire les observations suivantes :

- **la forme des cellules** : Ce caractère est très important en bactériologie, il peut à lui seul conduire à la détermination de genre mais on doit l'utiliser avec une extrême prudence. C'est ainsi qu'on différencie des germes ayant :
 - une forme sphérique : les cocci (ordres de Micrococcales)
 - une forme allongée en bâtonnet : les bacilles (ordre des Bacterales)
 - une forme intermédiaire : les cocobacilles
 - une forme incurvée en virgule (vibrio) ou en ondulation (ordre des Spirillales)
 - une forme spiralée (ordre des Spirochaetales)
 - une forme ramifiée (ordre des Actinobactériales).
- **Mode de groupements** : dans les cultures, les modes de regroupement sont liés au mode de division des germes et viennent compléter les données morphologiques et fournir de précieuses informations pour l'identification . Ainsi par exemple, dans l'ordre des Micrococcales, les différents groupements observés sont caractéristiques d'un genre donné:
 - groupement par deux en diplocoques : genre *Pneumococcus* pour les cocci Gram +genre *Neisseria* pour les cocci Gram-
 - groupement en chainettes : genres *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*
 - groupement en tétrades : genre *Gaffkya*
 - groupement en amas plans (grappe de raisin): genre *Staphylococcus*
 - groupement en amas non plans : amas cubiques : genre *Sarcina*, amas irréguliers : genre *Micrococcus*
 - groupements en palissades ou genres *Corynebacterium* et *Cellulomonas*
- **Mobilité** : la mobilité est le caractère le plus important mis en évidence à l'état frais. On doit observer :

La présence ou l'absence de mobilité,- les caractères de cette mobilité : frémissement des bactéries à ciliature polaire ou tournoiement des bactéries péritriches.

Remarque: Une bactérie mobile doit se déplacer dans le champ microscopique avec un mouvement qui lui est propre, les autres bactéries restant immobiles ou se déplaçant dans d'autres directions. Attention cette mobilité ne doit pas être confondue avec les mouvements browniens qui sont des mouvements désordonnés de particules (sans déplacement véritable) dus à l'agitation thermique des molécules de liquide ni avec les

mouvements transmis par les courants (toutes les bactéries sont entraînées dans la même sens).

- **Éléments particuliers de la bactérie :** la présence d'une capsule est révélée à l'état frais de la souche cultivée sur milieu enrichi, par la coloration négative à l'encre de Chine. Sa mise en évidence est un indice important.

Ex : des diplocoques Gram+ entourés d'une capsule importante évoquent *Streptococcus pneumoniae*.

- **Les spores,** Leur présence permet à elle seule de ranger les bactéries aérobies dans la famille des Bacillaceae. De plus la spore et sa position permettent la classification des bactéries en groupes à l'intérieur d'une famille.

La coloration de Gram

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux à ensemercer etc. La coloration de Gram est une coloration qui teste l'alcool - résistance d'une souche bactérienne. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi.

Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine que celles à Gram positives. De plus, cette paroi est très riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans laquelle l'éthanol est fortement soluble.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatives » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positives » sont colorés en bleu foncé/violet (rem : certaines bactéries telles que les *Bacillus*, apparaissent parfois roses et violettes sur le même frottis, on les dit « Gram labiles » et les différences de coloration sont dues à des différences d'âge des bactéries).

5.3.5. Test oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries. Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène -diamine- oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène -diamine.

Il s'agit d'écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie du germe à étudier sur le disque de papier pré-imprégné par le réactif. Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le

germe possède une oxydase : le test est positif, si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

5.3.6. Test catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction : $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (Marchal et *al.*, 1991).

Caractérisation à l'aide de galeries API 20E

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif (dont les Vibrionaceae), comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, et permet aussi la réalisation de tests en anaérobiose (ajout de paraffine). La suspension bactérienne, inoculée dans 5 ml d'eau physiologique stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, est préparée à partir d'une colonie isolée suite à plusieurs repiquages successifs. L'ajout de réactifs s'avère nécessaire pour certains tests. L'incubation se fait à 36°C ± 2°C pendant 18 à 24 heures.

Le 21^{ème} test (oxydase) est réalisé en parallèle grâce à un disque oxydase, sur lequel quelques gouttes de suspension bactérienne sont versées.

Puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

La lecture des réactions se fait d'après le tableau de lecture fournit dans le kit et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (base de données Api Web), après y avoir inscrit le profil numérique à 7 chiffres.

Tableau 7. Tableau de lecture des tests du système API 20 E

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitropheline-BD-Galactopyranoside	0.223	B-galactosidase (Ortho Nitro Phenyl-BD Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DèCarboxylase	Jaune	Rouge / orange (2)
<u>CIT</u>	Trisodimucitrane	0.756	Utilisation du CITrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert /bleu (3)
<u>H2S</u>	Sodiome thiosulfate	0.075	Production d'H2S	Incolore / grisatre	Dépôt noir/fin liserè
<u>URE</u>	Uree	0.76	UREase	Jaune	<u>Rouge / orange (2)</u>
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DèAminase	<u>TDA / immédiat</u>	
IND	L-tryptophane	0.19	Production d'INDole	Jaune rougeatre	morron-
				<u>JAMES / immédiat</u>	
				incolore vert pale /jaune	rose
<u>VP</u>	Sodium pyruvate	1.9	Production d'acétoine (VogesProskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 mln</u>	
<u>GEL</u>	Gelatine (origine bovine)	0.6	Gèlatinasa (GELatine)	Incolore/rose pale	rose /rouge(5)
GLU	D-glucose	1.9	Fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	1.9	Fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbiol	1.9	Fermentation / oxydation (SORbito) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	Fermentation / oxydation (RHAMnose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	1.9	Fermentation / oxydation (SACcharose)(4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	1.9	Fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	0.57	Fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	1.9	Fermentation / oxydation (ARAbiose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		Cytochrome-Oxydase	(voir notice du test oxydase)	

3.8. Caractérisation à l'aide de galeries API 20 NE

C'est une série de test qui permet d'identifier les non- Enterobacteriaceae et/ou bacilles à Gram négatif oxydase positif. La galerie API 20 NE comporte 20 microcupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se développent

seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification par un logiciel d'identification.

5.3.8.1. Test NO₃

La révélation des deux tests NO₃ et TRP est faite en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air. Une goutte de chaque réactif (NIT 1 et NIT 2) est ajoutée dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche des résultats. Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles). Pour cela, 2-3 mg de réactif de Zn sont ajoutés dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.

5.3.8.2. Test TRP

Une goutte de réactif JAMES est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

5.3.8.3. Test d'assimilation

La pousse bactérienne est observée, une cupule trouble indique une réaction positive.

5.3.8.4. Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Tableau 08. Tableau de lecture des tests du système API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO3	potassium nitrate	0.136	Reduction des Nitrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
			Reduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
				<u>Zn / 5 min</u>	
				rose	incolore
TRP	l-tryptophane	0.2	Formation d'indole (tryptophane)	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incolore	
				vert pâle/jaune	rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1.92	Fermentation (GLUcose)	Bleu à vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1.92	Arginine DHydrolase	jaune	orange/rose/rouge
<u>URE</u>	Urée	0.76	UREase	jaune	orange/rose/rouge
ESC	Esculine	0.56	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris/marron/noir
	citrate de fer	0.072	(ESCuline)		
GEL	gélatine (origine bovine)	0.6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion de pigment	diffusion de pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
<u>GLU</u>	D-glucose	1.56	Assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
<u>ARA</u>	L-arabinose	1.4	Assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
<u>MNE</u>	O-mannose	1.4	Assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1.36	Assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl-glucosamine	1.28	Assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1.4	Assimilation (MALtose)	transparence	trouble
<u>GNT</u>	potassium gluconate	1.84	Assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
<u>CAP</u>	acide caprique	0.78	Assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1.12	Assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1.12	Assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
<u>MLT</u>	acide malique	1.56	Assimilation (trisodiumCITrate)	transparence	trouble
<u>CIT</u>	trisodium citrate	2.28	Assimilation (PhénylACétique)	transparence	trouble
<u>PAC</u>	acide phénylacétique	0.8		transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

6. Etude de la biodégradation de deux pesticides (mancozèbe et méthomyl) par les souches microbiennes isolées

- **Objectif de l'étude:** il s'agit de déterminer les capacités cataboliques et de rechercher parmi les souches microbiennes isolées acclimatées et non acclimatées à la pollution par les pesticides, des souches capables de dégrader efficacement les substances actives du mancozèbe et du méthomyl. Afin de déterminer les capacités métaboliques des souches sélectionnées, deux objectifs ont été formulés.

1. Vérifier la tolérance des souches microbiennes à travers leur croissance en mode batch (culture discontinu)
2. Déterminer ensuite les taux de biodégradation des deux pesticides après 5 jours à partir des cultures batch.

6.1. Les souches microbiennes

Dix souches bactériennes et dix souches fongiques ont été testées séparément. Un consortium d'une population mixte constituée par l'ensemble des souches bactériennes et un consortium d'une population composée de l'ensemble des souches fongiques ont été également étudiés.

6.2. Les milieux de culture

Les milieux nutritifs utilisés pour la culture des souches fongiques sélectionnées pour le processus métaboliques : tolérance et biodégradation sont : MEA, PDA, CZAPEK, Milieu liquide de GALZY et Slonimski. La composition des milieux de cultures est présentée dans l'annexe n°2.

6.3. Les produits chimiques ou pesticides

Les pesticides utilisés, nous ont été fournis par Bayer. Ce sont des composés utilisés à grande échelle pour les cultures maraîchère et céréalières au niveau des régions du Nord-est algérien. Il s'agit d'un fongicide et d'un insecticide commercialisés en Algérie respectivement sous les noms de mancozèbe et méthomyl.

6.3.1. Le mancozèbe

Le mancozèbe est un est un fongicide particulièrement approprié pour lutter contre les champignons de moisissure, etc. Appartenant à la famille des carbamates et, plus précisément, un dithiocarbamate, non inhibiteur des cholinestérases².

Il s'agit de la combinaison de 2 autres dithiocarbamates : l'éthylène-bis-dithiocarbamate de manganèse et de zinc ou manèbe et l'éthylène-bis-dithiocarbamate de zinc ou zinèbe³.

Le mancozèbe est un fongicide de contact à action préventive, dont le mode d'action multisite correspond au groupe de gestion de la résistance. Il est utilisé pour lutter contre un large éventail de maladies des plantes sur une grande variété de cultures. Le mancozèbe appartient au groupe des fongicides communément appelés les éthylènebis(dithiocarbamates) (EBDC), au même titre que les matières actives manèbe, métirame et nabame.

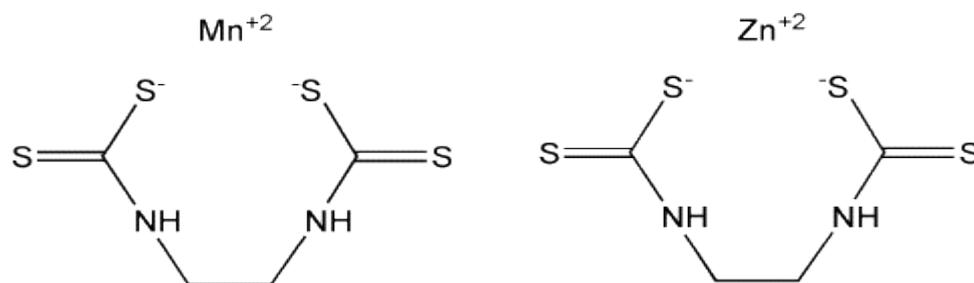


Figure 6. Structure chimique du mancozèbe

Formule brute : (C₄ H₆ Mn N₂ S₄)_x (Zn)_y

IUPAC: manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt

CA:[1,2-ethanediybis[carbamo(dithio)ato](2-)]manganese mixture with [1,2-ethanediybis[carbamo(dithio)ato] (2-)]zinc 9Cl)[ethylenebis(dithiocarbamate)]manganese mixture with [ethylenebis(dithiocarbamate)]zinc (8Cl).

6.3.2. Le méthomyl

Le méthomyl est un insecticide systémique à action rapide faisant parti du groupe des carbamate. La matière active méthomyl agit par contact et ingestion et inhibe la formation de cholinérase. Il est soluble dans l'eau, solide cristallin, qui dégage une odeur de soufre-like. Il est très toxique, il est classé comme un insecticide carbamate qui est désigné comme une utilisation limitée de pesticides par l'Agence américaine de protection de l'environnement. Depuis la fin des années 1960, la substance est utilisée comme pesticide dans les fruits et légumes commerciale ainsi que des produits stockés. L'utilisation comme insecticide est très efficace contre une large gamme de parasites, en particulier ceux qui sont résistants aux organophosphorés.

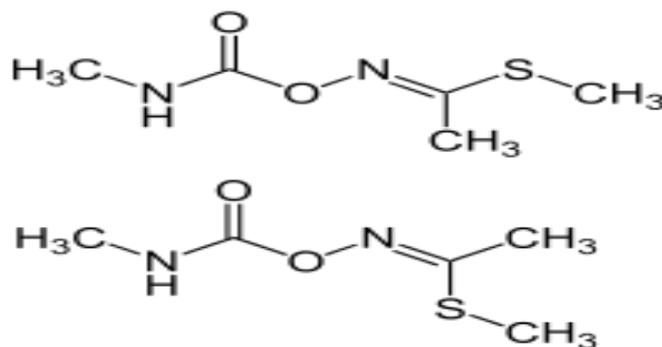


Figure 7. Structure chimique du méthomyl

Formule brute : C₅ H₁₀ N₂ O₂ S

IUPAC : N-[(methylcarbamoyl)oxy]ethanethioimidate de S-méthyle

CA : methyl N-[[[(methylamino)carbonyl]oxy]ethanimidothioate.

Les principales caractéristiques physico-chimiques sont données dans les tableaux.

6.4. Les précultures et les cultures

Les précultures et cultures sont conduites en mode batch sur milieu synthétique Galzy et Solninski (GS), additionné de glucose (5g/l) à pH 4,5, le milieu est réparti dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml par fiole, l'ensemble est alors stérilisé sous pression vapeur saturante (20 mn à 120°C). L'inoculum (mycélium plus spores ou colonies de bactéries ou de champignons) est prélevé des boîtes de Pétri et introduit de manière aseptique dans les fioles. Chaque essai est réalisé en triplicata (trois répétitions pour chaque souche et trois répétitions pour le consortium bactérien constitué par la population mixte). L'incubation se fait à une température 27°C sous éclairage de 1200Lux (12H/24H) et en condition agitée (sur plaque orbitale à une vitesse de rotation de 180 tr/mn) pendant deux jours.

Les molécules de fongicide et d'insecticide sont préparées dans un mélange DMSO/éthanol (50/50, V/V) et stérilisées par filtration à travers une membrane de 0,22 µm Millipore (Bedford, MA), puis ajoutées dans les cultures d'une façon aseptique à la concentration finale de 100 mg/l.

Des témoins de dégradation abiotique (milieu + pesticide sans inoculum) sont inclus dans les essais.

Les différentes phases de la méthodologie utilisée sont schématisées dans la figure suivante :

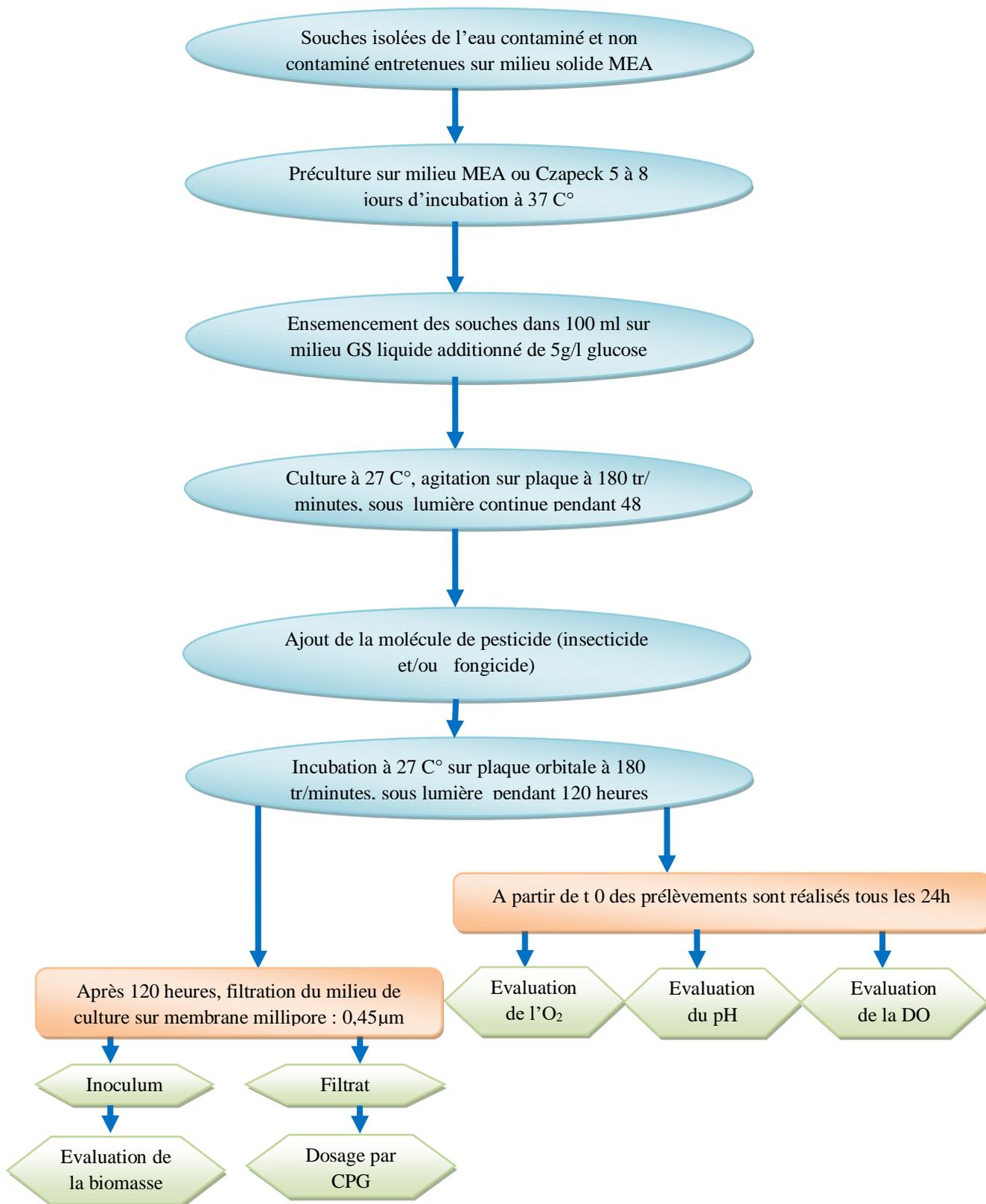


Figure 8. Phases de la méthodologie utilisée pour l'évaluation de la biodégradabilité des molécules de pesticides

6.5. Détermination de la tolérance des souches microbiennes vis-à-vis du pesticide à travers leur croissance en mode batch (culture discontinu)

Les paramètres étudiés sont le pH, la Densité optique ou turbidité, le taux d'oxygène (DCO) et le poids sec de l'inoculum. Les mesures sont prises à partir des prélèvements sur milieu à partir du temps t_0 puis à tous les 24 heures. Les valeurs calculées ont permis ensuite de tracer les cinétiques de croissance.

6.5.1. Mesure du pH

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Et par voie de conséquence, il peut affecter le processus de biodégradation. Pour maintenir la survie de la bactérie dans le milieu, il est nécessaire que le pH soit proche de la neutralité ou légèrement basique, ceci favorise évidemment la rupture des liaisons ester par hydrolyse. Le pH est déterminé à l'aide d'un pH mètre de type Wagtech 525043.

6.5.2. Détermination de la densité optique

La turbidimétrie est utilisée pour déterminer la croissance bactérienne en présence de pesticides utilisé comme source de carbone à température ambiante pendant 5 jours. La densité optique est déterminée pendant la période d'incubation à des intervalles de temps de 24 h. Elle est mesurée à une longueur d'onde de 660 nm pour les bactéries et 630nm pour les champignons sur un spectrophotomètre (Jenway-6300). La courbe d'étalonnage réalisée séparément permet de relier la densité optique obtenue au nombre réel de bactéries ou de champignons.

6.5.3. Détermination du taux d'oxygène nécessaire à la dégradation des composés organiques du milieu (DCO)

Ce test est particulièrement utile pour la caractérisation d'un milieu traité par voie biologique ou physico-chimique. Il détermine la quantité de l'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique (biodégradable ou non) du milieu à l'aide d'un oxydant puissant.

L'oxydabilité est utilisée dans le cas de faible concentration en matières organiques (<40 mg/l). La technique utilisée est celle de Rodier (2005) qui utilise à froid le permanganate de potassium comme oxydant. Elle consiste à introduire dans un erlenmeyer 50 ml d'échantillon, 5 ml de solution d'acide sulfurique ($\frac{1}{2}$), et 50 ml de solution de permanganate de potassium (N / 80). Ce mélange est laissé pendant quatre heures à la température ambiante du laboratoire. Puis décoloré par 10 ml de solution de sulfate de fer et

d'ammonium. L'excès de sulfate de fer est titré par la solution de permanganate (N / 80) jusqu'à apparition de la coloration rose. L'oxydabilité est déterminée par mesure de l'oxygène nécessaire à l'oxydation du carbone organique en molécule de CO₂ dans l'échantillon). Cette mesure a l'avantage de fournir rapidement un résultat, et d'être facilement reproductible, mais ne renseigne pas directement sur la nature ou la quantité des composés du milieu.

6.5.4. Calcul du poids sec de l'inoculum

Après 120 heures, le contenu des fioles erlen-Meyer est récupéré, filtré à travers une membrane de 0,45 µm Millipore. Le filtrat est récupéré dans un tube en vue des dosages chromatographiques pour la détermination du pourcentage de biodégradation du pesticide. Le contenu de la membrane est mis à sécher à une température de 105 °C pendant 24 heures puis pesé afin de déterminer son poids en mg/ml.

Le poids sec est calculé selon l'équation suivante :

$$Ps = (M - M0)$$

M : poids de la membrane après séchage

M0 : poids de la membrane vide

7. Evaluation des taux de biodégradation des deux pesticides après 5 jours à partir des cultures batch en mode discontinu.

L'évaluation de la disparition du produit (pesticide) se fait par dosage en chromatographie en phase gazeuse (CPG) de sa quantité résiduelle, quantité qui, par la suite, permet de déterminer le pourcentage de disparition. Des prélèvements (1ml) sont effectués à un temps (t₀), c.à.d. au moment de l'ajout du pesticide, et après 120h. Les fractions prélevées sont filtrées sur membrane millipore (0,45µm), extraites à l'hexane puis injectées. Trois injections sont réalisées pour chaque échantillon.

7.1. Conditions chromatographiques

Colonne OV-1701, L = 30 m, D = 0,32 mm, Ep = 0,25 µm, N₂ = 2 ml/min- Détecteur Abs à 300 °C, débit N₂, 30 ml/min – Injecteur SPI 50°C (30 sec) à 300°C, volume Injectable 1µl – Four 50°C à 280°C, avec un pas de température de 10°C/min.

7.2. Le dosage

Pour déterminer les concentrations résiduelles des différentes molécules testées, nous utilisons pour chaque produit, un échantillon étalon de concentration connue dans le méthanol correspondant à une concentration finale de 100 mg/l dans le milieu de culture. Le programme de l'intégrateur, sur la base du temps de rétention, de la surface du pic donnée par l'étalon et de la surface du pic donnée par l'échantillon, calcule la concentration restante du substrat étudiée pour chaque échantillon.