

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI
CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre :10/D3c/2018

N° de série :01/MB/2018

Thèse

Présentée pour l'obtention

Du Diplôme de Doctorat de 3^{ème} cycle

En Biotechnologies Microbiennes, Génomes et Environnement

Par

HOCINAT Amira

Thème :

Biodégradation de quelques composés organiques volatils et certains pesticides par des actinomycètes provenant d'un sol agricole et de boues activées

Soutenue le : 22/02/2018

Membres de jury :

Président	Mr. Hamidechi M ^{ed} Abdelhafid	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse	Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Co-encadreur	Mr. ALI-KHODJA Hocine	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur	Mr. KITOUNI Mahmoud	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur	Mr. GRAMA Borhane Samir	Maitre de conférences	U. Larbi Ben M'hidi-OEB.

Année universitaire : 2017-2018

Dédicaces

A la mémoire de ma mère, symbole de sagesse et de piété. Que son âme repose en paix.

A la mémoire de mon grand-père Mohand Oulhadj, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, à Tata symbole de fidélité, de patience et de bonté, en faible témoignage de mon incommensurable reconnaissance pour tous ses sacrifices. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père, à qui je dois tout en gage de ma profonde affection. Puisse ce témoignage de reconnaissance et de foi lui prouver mon familial attachement. Rien au monde ne vaut ton dévouement et tes efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A Mohand mon mari, en sus des remerciements que je te formule, daigne accepter que je te dédicace ce travail pour tout ce que cela représente pour toi et pour moi. Une fois de plus, j'aimerais vous demander de trouver dans ce travail, l'expression de mon effort pour arriver à vous donner un bon exemple de réussite intellectuelle. Bon vent et longue vie à toi Asma ma sœur et Amar son mari, Hocine et Lahcene mes frères, Nadji et Karim mes beaux-frères.

A ma grand-mère Nouara et mon oncle Abd El Kader. Je vous dis merci pour votre soutien et daignez accepter que je vous dédicace ce mémoire.

A mes beaux-parents Abdennour et Saliha, Faible gage de ma profonde considération et de mon attachement, je leurs dédie cet ouvrage en reconnaissance de leur aide et des conseils si précieux qu'ils n'ont cessé de me prodiguer et que je ne saurais jamais suffisamment remercier.

Je dédie à Mr Abdessalem BOUCHOUAREB cette thèse pour laquelle je demande à être honorée en recevant cet humble ouvrage.

A toute ma famille et mes amis.

Remerciements

*Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le **Pr. BOUDEMAGH Allaoueddine** de l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de diriger ce travail, pour m'avoir soutenu et supporté ces quelques années ainsi que pour tous ses précieux conseils, et ses encouragements, pour ses qualités humaines si précieuses, sa dévotion, et sa grande générosité, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je tiens à témoigner ma sincère gratitude à mon Co-encadrant, le **Pr. ALI-KHODJA Hocine**, pour sa disponibilité et ses encouragements. Qu'il trouve ici ma reconnaissance la plus profonde et le témoignage de mon plus profond respect.*

*Mes sincères remerciements sont adressés au **Pr. HAMIDECHI M^{ed} Abdelhafid** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Je tiens également à remercier Le **Pr. KITOUNI Mahmoud** et le **Dr. GRAMA Borhane Samir** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Un grand merci au **Pr. Boulahrouf Abderrahmane** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.*

*J'adresse aussi mes vifs remerciements à Monsieur **Pierre PEYRET**, Professeur et Directeur de recherche à EA 4678 CIDAM à l'université d'Auvergne, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire et de son équipe. Ce séjour à Clermont-Ferrand a été pour moi l'occasion de découvrir un autre laboratoire, d'acquérir de nouvelles techniques, de croiser et discuter avec beaucoup de personnes.*

*Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire EA 4678 CIDAM, particulièrement **Auriane BERNARD**, **Eric PEYRETAILLADE** maître de conférences.*

*Mes remerciements les plus profonds et sincères s'adressent à **Mr. Sylvain DENIS** ingénieur de recherche à EA CIDAM-EA 4678 pour sa patience, son soutien et son aide précieuse.*

Par crainte d'oublier de nommer certaines personnes, j'adresse mes remerciements à celles et ceux qui m'ont accompagné de près ou de loin jusqu'à aujourd'hui. J'ai une pensée pour celles et ceux qui m'ont donné le goût de la Biologie et surtout pour les personnes qui m'ont accompagné durant toutes ces années de thèse et qui m'ont permis de mener à bien ce travail en me faisant vivre des moments inoubliables.

Je pense bien sûr à mes collègues et amis(es) du Laboratoire pour les bons moments passés ensemble mais aussi à mes amis (es) de parcours.

Je terminerai en adressant un très grand merci à ma famille pour son soutien sans faille et de tous les instants.

Résumé

Abstract

الملخص

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Composés organiques Volatils.....	5
I.1. Définition.....	5
I.2. Sources.....	5
I.3. Réduction des émissions.....	6
I.3.1. Législation algérienne.....	6
I.3.2. Législation française	6
I.3.3. Législation internationale.....	7
I.4. Impacts des COV.....	7
I.4.1. Les effets sur l'environnement.....	7
I.4.2. Les effets sur la santé.....	8
I.5. Procédés de traitement des COV.....	8
I.5.1. Procédés biologiques.....	8
I.5.2. Biofiltres.....	9
I.5.3. Filtres percolateurs.....	10
I.5.4. Biolaveurs.....	11
II. Les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes).....	12
II.1. Caractéristiques physico-chimiques des BTEX.....	12
II.2. Sources et utilisation des BTEX.....	14
II.3. Pollution.....	14
II.4. Toxicité et écotoxicité.....	15
II.5. Techniques de dépollution biologiques des BTEX.....	16
II.5.1. Atténuation naturelle.....	16
II.5.2. Bioaugmentation et biostimulation.....	17
II.6. Voies de dégradation aérobies des BTEX.....	19
II.6.1. Benzène.....	20

II.6.2. Toluène.....	23
II.6.3. Ethylbenzène.....	27
II.6.4. Xylène.....	28
II.7. Voies de dégradation anaérobies des BTEX.....	30
II.7.1. Benzène.....	30
II.7.2. Toluène.....	31
II.7.3. Ethylbenzène.....	31
II.7.4. Xylène.....	31
II.8. Rôle des microorganismes dans la biodégradation des BTEX.....	31
II.9. Biodégradation des BTEX par les microorganismes autres que les actinomycètes....	32
II.10. Biodégradation des BTEX par les actinomycètes.....	34
III. Généralités sur les pesticides.....	35
III.1. Définition.....	35
III.2. Classification.....	35
III.2.1. Les insecticides.....	35
III.2.2. Les fongicides.....	35
III.2.3. Les herbicides.....	36
III.2.4. Les acaricides.....	36
III.2.5. Les nématocides.....	36
III.2.6. Les rodenticides.....	36
III.2.7. Les taupicides.....	36
III.2.8. Les molluscicides.....	36
III.2.9. Les corvicides et les corvifuges.....	36
III.3. Modes d'application des pesticides et dispersion dans l'environnement.....	36
III.4. Impact de l'utilisation des pesticides.....	37
III.4.1. Impact sur l'environnement.....	38
III.4.1.1. Contamination de l'air par les pesticides : la volatilisation et la dérive.....	38
III.4.1.2. Contamination de l'eau : lessivage et ruissèlement.....	39
III.4.1.3. Impact des pesticides sur le sol : la rétention.....	39
III.4.2. Impact des pesticides sur la faune sauvage.....	40
III.4.3. Impact sur la santé humaine.....	40
III.4.3.1. Toxicité aiguë.....	40
III.4.3.2. Toxicité chronique.....	41

III.5. La lutte contre les pesticides.....	41
III.5.1. La dégradation.....	41
III.5.1.1. La dégradation abiotique.....	42
III.5.2.2. La dégradation biologique (la biodégradation).....	42
III.6. Biodégradation des pesticides par les microorganismes autres que les actinomycètes.....	42
III.7. Biodégradation des pesticides par les actinomycètes.....	43
V.1. Généralités et caractéristiques des actinomycètes.....	45
V.2. Les actinomycètes en tant qu'agents de biodégradation.....	54
 MATERIEL & METHODES	
I. Isolement des actinomycètes.....	56
I.1. Echantillonnage.....	56
I.1.1. Sol.....	56
I.1.2. Eau.....	56
I.2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons.....	56
I.3. Isolement, purification et conservation des actinomycètes.....	59
II. Mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolés à dégrader certains les BTEX.....	61
II.1. Criblage des actinomycètes dégradant les BTEX.....	61
II.2. Biodégradation des BTEX.....	62
III. Mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolés à dégrader certains pesticides.....	67
III.1. Tests de biodégradation des herbicides : Roundup, Mamba, Axial, Zoom, Glyphosate et l'Herbasate.....	67
III.2. Tests de biodégradation des fongicides : Ortiva et Rodazime.....	67
III.3. Tests de biodégradation des insecticides : Karaté, Dursban, Traxos, Cypemethrine et Phoenix.....	67
III.4. Essai de Biostimulation.....	69
IV.1. Identification morphologique, physiologique et moléculaire des actinomycètes actifs.....	70
IV.1.1. Etudes de quelques caractères phénotypiques.....	70
IV.2.2. Détermination de quelques caractères physiologiques.....	70
IV.2. Identification moléculaire des actinomycètes actifs.....	74
IV.2.1. Extraction d'ADN à partir des actinomycètes.....	74

IV.2.2. Réaction de polymérisation en chaine.....	74
IV.2.3. Migration électrophorétique.....	75
IV.2.4. Purification des produits PCR.....	75
IV.2.5. Séquençage.....	76
IV.2.6. Analyse des séquences d'ADNr 16S.....	76
IV.2.7. Comparaison des séquences avec la banque informatique.....	76
IV.2.8. Arbre phylogénétique.....	76
 RESULTATS & DISCUSSION	
I. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol et des boues activées	77
II. Isolement et purification des actinomycètes.....	81
III. Résultats de la capacité des actinomycètes isolés à dégrader les BTEX.....	86
III.1. Croissance des isolats sur les BTEX.....	86
III.2. Tolérance de différentes concentrations de BTEX par les actinomycètes actifs.....	89
III.3. Etude de la biodégradation des BTEX par des cultures individuelles et mixtes des actinomycètes.....	90
IV. Résultats des tests de la biodégradation des pesticides.....	106
IV.1. Résultats de test de la biodégradation des herbicides.....	106
IV.2. Résultats de test de la biodégradation des fongicides.....	108
IV.3. Résultats de test de la biodégradation des insecticides.....	110
IV. 4. Essai de Biostimulation.....	112
V. Identification morphologique, physiologique et moléculaire des actinomycètes actifs...	123
V.1. Etudes de quelques caractères phénotypiques.....	124
V.2. Etudes de quelques caractères physiologiques et biochimiques.....	131
V.3. Sensibilité aux antibiotiques des souches actinomycètes identifiées.....	138
V.4. Identification moléculaire des actinomycètes actifs.....	140
 CONCLUSION et PERSPECTIVES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	148
 ANNEXES	
 ARTICLE	

Résumé

À partir d'un échantillon de sol agricole de la région de Ain M'Lila et un échantillon de boues activées de la station d'épuration des eaux usées Ibn Ziad-Constantine, nous avons isolé respectivement 80 et 18 actinobactéries phénotypiquement différentes. Les échantillons en question ont fait l'objet d'une analyse physico-chimique. Premièrement, nous avons mené une étude fonctionnelle en testant ces isolats sur un milieu minimum solide additionné de 500 mg/L de différents pesticides les plus utilisés en Algérie à savoir les fongicides Ortiva et Rodazime. Des insecticides comme Karaté, Phoenix, Dursban et Cyperméthrine. Des herbicides sous plusieurs formes commerciales comme Mamba, Zoom, Glyphosate, Herbasate, Roundup, Traxos et Axial pour caractériser leurs aptitudes d'utiliser ces pesticides comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats ont montré que la majorité des isolats avaient la capacité de dégrader ces composés de synthèse. Ainsi, dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à tester la capacité de ces isolats à dégrader les BTEX qui constituent une famille importante de composés organiques volatils. Les BTEX sont des polluants majeurs de l'environnement, grâce à leur grande volatilité et solubilité. Ces composés toxiques sont dépollués au moyen de méthodes physico-chimiques mais la remédiation biologique apparaît comme étant la moins invasive et la moins coûteuse. La bioremédiation microbienne se base sur l'exploitation des capacités métaboliques des communautés microbiennes assurant la dégradation des polluants. Plusieurs micro-organismes ont été testés pour leur capacité à dégrader les BTEX. D'autres ont malheureusement été négligés malgré leurs intéressantes aptitudes métaboliques et physiologiques. Dans la présente étude, nous avons testé la dégradation de ces composés par les actinomycètes isolés pris individuellement ou en 2 consortia. Les résultats des cinétiques de croissance et de dégradation ont montré que 20 actinobactéries et 2 consortiums reconstitués étaient capables d'utiliser au moins un composé de BTEX comme unique source de carbone et d'énergie. Parmi eux, quatre provenant de boues activées et un provenant de sols agricoles dégradaient *in vitro* en conditions aérobies tous ces composés organiques volatils à des concentrations allant de 1400 à 1500 mg/L en 72 à 96 h d'incubation. Le second volet de ce travail a visé à identifier les isolats actifs. L'étude physiologique nous a renseignés sur la diversité métabolique remarquable des isolats testés. Par ailleurs, une étude taxonomique a été menée par séquençage de l'ARNr 16S des 25 souches. Cette identification a montré que 21 de ces isolats appartenaient au genre *Streptomyces* et trois au genre *Nocardia*. Ces résultats sont très prometteurs et montrent que les actinomycètes des boues activées et du sol agricole peuvent être d'excellents candidats pour la bioremédiation des écosystèmes terrestres et aquatiques pollués par les BTEX et les pesticides.

Mots clés : Actinobactéries, Biodégradation, BTEX, Pesticides, boues activées, sol agricole.

Abstract

From an agricultural soil sample from the region of Ain M'Lila and a sample of activated sludge from the Ibn Ziad-Constantine wastewater treatment plant, we isolated respectively 80 and 18 phenotypically different actinobacteria. The samples in question were the subject of a physico-chemical analysis. Firstly, we conducted a functional study by testing these isolates on a minimum solid medium supplemented with 500 mg/L of different pesticides most commonly used in Algeria, namely the Ortiva and Rodazime fungicides. Insecticides like Karate, Phoenix, Dursban and Cypermethrin. Herbicides in several commercial forms such as Mamba, Zoom, Glyphosate, Herbasate, Roundup, Traxos and Axial to characterize their abilities to use these pesticides as the sole source of carbon and energy. The results showed that the majority of isolates had the ability to degrade these synthetic compounds. Thus, in this thesis work, we have been interested in testing the ability of these isolates to degrade BTEX, which is an important family of volatile organic compounds. They contaminate various ecosystems such as air, surface water, groundwater and soil. These compounds have very toxic effects on humans and animals. Several microorganisms have been tested for their ability to degrade BTEX. Others have unfortunately been neglected despite their interesting metabolic and physiological aptitudes. In the present study, we tested the degradation of these compounds by isolated actinomycetes taken individually or in consortia. The results of growth and degradation kinetics showed that 20 actinobacteria and 2 reconstituted consortia were able to use at least one BTEX compound as the sole source of carbon and energy. Of these, four from activated sludge and one from agricultural soils degraded all these volatile organic compounds *in vitro* under aerobic conditions at concentrations ranging from 1400 to 1500 mg/L in 72 to 96 h of incubation. The second part of this work aimed to identify active isolates. The physiological study informed us about the remarkable metabolic diversity of the isolates tested. In addition, a taxonomic study was conducted by sequencing 16S rRNA of 25 strains. This identification showed that twenty-one of these isolates belonged to the genus *Streptomyces* and three to the genus *Nocardia*. This result is very encouraging and shows that actinomycetes that come from sewage treatment plants and agricultural soils have the ability to biodegrade these organic volatile compounds and pesticides. The isolated strains are excellent candidates for bioremediation of terrestrial and aquatic sites polluted by these xenobiotics.

Key words: Actinobacteria, Biodegradation, BTEX, Pesticides, activated sludge, agricultural soil.

ملخص

من عينة تربة زراعية من منطقة عين مليلة وعينة من الحمأة المنشطة من محطة ابن زياد-قسنطينة لمعالجة مياه الصرف الصحي، عزلنا على التوالي 80 و18 بكتريا أكتينوميستات ظاهريا مختلفة. وكانت العينات المعنية موضوع تحاليل فيزيائية وكيميائية. أولا، أجرينا دراسة وظيفية عن طريق اختبار هذه العزلات على وسط صلب خالي من الكربون يستكمل مع 500 مغ/ لتر من المبيدات المختلفة الأكثر استخداما في الجزائر، وهي مبيدات الفطريات أورتيفا ورودازيم. مبيدات الحشرات مثل الكاراتيه، فينيكس، دورسبان وسيبرمثرين. مبيدات الأعشاب في عدة أشكال تجارية مثل مامبا، زوم، غليفوسات، هيرباسيت، رونوب، تراكسوس وأكسيال لتحديد قدراتهم على استخدام هذه المبيدات كمصدر وحيد للكربون والطاقة. وأظهرت النتائج أن غالبية العزلات لديها القدرة على النمو على الأوساط المحتوية على هذه المركبات الاصطناعية. وهكذا، في هذه الأطروحة، كنا مهتمين باختبار قدرة هذه العزلات على تهديم وتحليل بتيكس، وهي عائلة هامة من المركبات العضوية المتطايرة. فهي تلوث النظم الإيكولوجية المختلفة مثل الهواء والمياه السطحية والمياه الجوفية والتربة. هذه المركبات لها آثار سامة جدا على البشر والحيوانات. وقد تم اختبار العديد من الكائنات الحية الدقيقة لقدرتها على تحليل بتيكس. ولسوء الحظ تم تجاهل الآخرين على الرغم من مهاراتهم الأيضية والفسيلوجية المثيرة للاهتمام. في هذه الدراسة، اخترنا تهديم هذه المركبات عن طريق أكتينوميستس معزولة تؤخذ بشكل فردي أو في اتحادات. وأظهرت نتائج النمو ومنحنى التحلل أن 20 أكتينوبكتيريا و2 من الكونسورتيومات المشكلة استطاعوا استخدام مركب بتيكس واحد على الأقل كمصدر وحيد للكربون والطاقة. من هذه البكتيريا، أربعة من الحمأة المنشطة وواحدة من التربة الزراعية حللت جميع هذه المركبات العضوية المتطايرة في المختبر تحت الظروف الهوائية في تراكيزات تتراوح بين 1400 إلى 1500 مغ/لتر في 72 حتى 96 ساعة من الحضانة. ويهدف الجزء الثاني من هذا العمل إلى تصنيف العزلات النشطة. الدراسة الفسيلوجية أبلغتنا عن التنوع الأيضي الملحوظ عند العزلات التي تم اختبارها. بالإضافة إلى ذلك، أجريت دراسة تصنيفية من خلال تسلسل الحمض النووي الريبسي S16 ل 25 سلالة وأظهر هذا التحديد أن 21 من هذه العزلات تنتمي إلى جنس ستريبتوميسز وثلاثة إلى جنس نوكارديا. وهذه النتائج واعدة جدا وتبين أن الأكتينوميستات من الحمأة المنشطة والتربة الزراعية يمكن أن يكونوا مرشحين ممتازين من أجل المعالجة البيولوجية للنظم الإيكولوجية الأرضية والمائية الملوثة بواسطة بتيكس ومبيدات الآفات.

الكلمات المفتاحية: أكتينوبكتيريا، التحلل البيولوجي، بتكس، المبيدات، الحمأة المنشطة، التربة الزراعية.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
µL	Microlitre
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
BTEX	Benzène Toluène Ethylbenzène Xylène
CO ₂	Dioxyde de Carbone
COVs	Composés Organiques Volatils
dNTPs	Désoxyribo Nucléotides Tri Phosphates
DO	Densité optique
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
g	Gramme
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionization Detector
h	Heure
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HPLC	High-performance liquid chromatography
L	Litre
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NaOH	Hydroxyde de Sodium
ng	Nanogramme
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel Hydrogène
ppm	Partie par million
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Rotation par minute
U	Unité
V	Volt

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Sources d'émissions de COV (Liu and Liptak, 1995).....	6
Figure 2.	Les systèmes d'épuration des COV contenus dans les effluents gazeux.....	8
Figure 3 (a, b et c).	Les systèmes de traitement biologiques des effluents gazeux rencontrés dans l'industrie : a) biofiltre, b) filtre percolateur, c) biolaveur (Pré et al., 2004).....	11
Figure 4.	Devenir des BTEX après relargage dans l'environnement.....	15
Figure 5.	Représentation schématique d'une (A) toluène-monooxygénase et d'une (B) benzène-dioxygénase. (Ferraro et al., 2005).....	20
Figure 6.	Schéma général de la dégradation aérobie des hydrocarbures monoaromatiques. (Das et Chandran, 2010).....	20
Figure 7.	Métabolisme du benzène. (INRS, 2007a).....	21
Figure 8.	Voies de dégradation aérobie du benzène. (INRS, 2007a).....	22
Figure 9.	Métabolisme du toluène. (INRS, 2008).....	25
Figure 10.	Voies de dégradation aérobie du toluène. (INRS, 2008).....	26
Figure 11.	Métabolisme de l'éthylbenzène. (INRS, 2007b).....	27
Figure 12.	Voies de dégradation aérobie de l'éthylbenzène. (INRS, 2007b).....	28
Figure 13.	Voies de dégradation aérobie des différents isomères du xylène.....	29
Figure 14.	Schéma général des voies de dégradation aérobie des différents BTEX.....	30

Figure 15. Schéma du devenir des pesticides dans l'environnement (Wyoming Department of Agriculture).....	37
Figure 16. Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Prescott et al., 2003).....	46
Figure 17. Les morphologies rencontrées de <i>Streptomyces olindensis</i> cultivé en milieu liquide (Pamboukian et al., 2002).....	46
Figure 18. Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (Breton et al., 1989).....	47
Figure 19. Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre <i>Streptomyces</i> (Lyons et Pridham, 1971).....	48
Figure 20. Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes.....	49
Figure 21. Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi et al., 2009).....	52
Figure 22. Chromatographe (Agilent technologies INV 1998/00005 avec une colonne capillaire DB-5 (30m x ID de 0,25 mm x 1 µm) et le détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un système échantillonneur de purge et piégeage automatique).....	64
Figure 23. Photographie représentant les différents aspects de colonies actinomycétales purifiées sur milieu YMEA.....	81
Figure 24. Cinétiques de croissance des vingt isolats sélectionnés capable de se développer sur les composés BTEX pris comme seule source de carbone et d'énergie.....	89
Figure 25. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) du Benzène (a), Toluène (b), Ethyle benzène (c), O-Xylène (d) et P-M-Xylène (e) en fonction du temps (h) pour les 20 monocultures.....	97
Figure 26. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) des BTEX en fonction tu temps (h) des 2 consortiums reconstitués.....	98
Figure 27. Contrôle abiotique de dégradation des BTEX.....	98

Figure 28.	Dégradation d'un hydrocarbure en milieu aérobie.....	100
Figure 29.	Nombre des isolats d'actinomycètes provenant du sol agricole ayant dégradé les herbicides testés.....	107
Figure 30.	Nombre des isolats d'actinomycètes provenant des boues activées ayant dégradés les herbicides testés.....	107
Figure 31.	Photographies représentant la croissance des actinomycètes isolés sur le milieu minimum additionné des différents insecticides.....	108
Figure 32.	Nombre des actinomycètes isolés du sol agricole ayant dégradés les fongicides testés.....	109
Figure 33.	Taux des actinomycètes des boues activées ayant dégradés les fongicides testés.....	109
Figure 34.	Photographies représentant la croissance des actinomycètes isolés sur milieu minimum additionné de l'ortiva et Rodazime comme seule source de carbone par rapport au témoin.....	110
Figure 35.	Nombre des actinomycètes isolés du sol agricole ayant dégradé les insecticides testés.....	111
Figure 36.	Nombre des actinomycètes provenant des boues activées capable d'utiliser les insecticides testés.....	111
Figure 37.	Photographie représentant la croissance des actinomycètes sur milieu minimum additionné des insecticides testés.....	112
Figure 38.	Photographies représentant la croissance des isolats sur milieu minimum additionné du Glyphosate et d'Ortiva après une biostimulation du pH et température.....	115
Figure 39.	Photographie montrant les différents aspects microscopiques des souches actinomycétales.....	126
Figure 40.	Photographie montrant la croissance des actinomycètes sur les différentes concentrations de NaCl étudiées.....	132
Figure 41.	Photographie montrant l'activité hydrolytique de la cellulase, la lipase, la gélatinase, la chitinase, l'amylase et la pectinase produites par les actinomycètes.....	137
Figure 42.	Photographies montrant la sensibilité des souches aux antibiotiques testés.....	139

Figure 43. Amplification du gène 16S rDNA à partir des échantillons d'ADN extraits des isolats sélectionnés.....140

Figure 44. Vérification de la purification des produits PCR.....140

Figure 45. Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega version 6.0 montrant la position phylogénétique de 25 souches.....143

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Classification des procédés biologiques de traitement d'air.....	9
Table 2. Structure, principales caractéristiques physico-chimiques des BTEX.....	13
Table 3. Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (Goodfellow et Williams, 1983).....	51
Table 4. Paramètres physicochimiques de l'échantillon de sol agricole étudié.....	77
Table 5. Résultat de l'analyse granulométrique de l'échantillon de sol agricole.....	77
Table 6. Paramètres physicochimiques de l'échantillon des boues activées étudié.....	78
Table 7. Nombre d'actinomycètes isolés, à partir de différents milieux d'isolement.....	81
Table 8. Isolats provenant des boues activées capables de se développer sur au moins un des composés BTEX comme seule source de carbone et d'énergie.....	86
Table 9. Isolats provenant du sol agricole capables de se développer sur au moins un des composés BTEX comme seule source de carbone et d'énergie.....	86
Table 10. Croissance des actinomycètes actifs sur diverses concentrations de BTEX.....	90
Table 11. Exemples de microorganismes dégradant les BTEX.....	101
Table 12. Résultats de la biodégradation des herbicides par les isolats d'actinomycètes testés.....	Annexe
Table 13. Résultats de la biodégradation des fongicides par les isolats d'actinomycètes testés.....	Annexe
Table 14. Résultats de la biodégradation des insecticides par les isolats d'actinomycètes testés.....	Annexe

Table 15. Résultats de la biostimulation des isolats SA1, SA37 et A sur milieu contenant l'Ortiva et le Glyphosate.....131

Table 16. Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu ISP5 et à différentes concentrations de NaCl.....133

Table 17. Utilisation des différentes sources de carbone par les actinomycètes actifs.....134

Table 18. Utilisation des différentes sources d'azote par les actinomycètes actifs.....135

Table 19. Résultats de la dégradation de certains composés organiques naturels complexes.....138

Table 20. AntibioGramme de certaines souches d'actinomycètes.....141

Table 21. Identification moléculaire des actinomycètes isolés des boues actives.....141

Table 22. Identification moléculaire des actinomycètes provenant du sol agricole.....142

INTRODUCTION

La pollution est l'une des appréhensions majeures de l'homme moderne afin de protéger l'environnement. Les principales sources de la pollution planétaire sont la production et l'utilisation de diverses sources d'énergies, les activités industrielles et l'agriculture, surtout celle causée par les pesticides. Tous ces secteurs sont responsables de l'apparition de grandes concentrations de deux composés chimiques très toxiques pour l'environnement à savoir les composés organiques volatils et les pesticides.

Les composés organiques volatils aliphatiques et aromatiques sont des composants naturels largement retrouvés dans l'environnement. Ils sont formés naturellement au cours de processus géochimiques (**Jüttner et Henatsch, 1986**). Cependant, les activités anthropiques, avec notamment l'utilisation des produits pétroliers dans plusieurs secteurs, le développement de l'exploitation offshore, ainsi que l'implantation littorale des unités de raffinage (**Mesbaiah et Badis, 2013**) et le secteur industriel ont aggravé encore plus la pollution par ces composés en augmentant considérablement dans l'environnement, les quantités d'hydrocarbures tolérées par toutes les normes. Certains de ces hydrocarbures, comme les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes), sont connus par leurs toxicités illimitées. Ils sont à titre d'exemple pour l'homme, très mutagène et carcinogène. Ils sont classés par l'Agence de Protection Environnementale (EPA) comme polluants prioritaires. Ils ont la particularité d'être volatils et solubles dans l'eau, ce qui les rend particulièrement omniprésents et totalement mobiles dans l'environnement, notamment dans le sol et les écosystèmes aquatiques, comme les nappes phréatiques. La pollution par ces hydrocarbures en milieu marin et terrestre, qu'elle soit chronique ou accidentelle, pose d'importants problèmes de persistance. Malgré leur transformation au cours de l'accumulation, les hydrocarbures enfouis dans les sols et les nappes aquifères et phréatiques peuvent persister longtemps (**Perfumo et al., 2010**).

Quant à l'agriculture, Les anciennes méthodes de culture reposaient initialement sur l'utilisation d'une main d'œuvre intensive pour enlever les mauvaises herbes, sur l'emploi des semences résistantes et adaptés aux régions et sur l'intervention d'une mécanisation d'une manière progressive. Paradoxalement, le 20^{ème} siècle a vu naître une révolution dans les pratiques agricoles dont les techniques de protection phytosanitaires sont les plus touchés. Ces orientations nouvelles, ont laissé la place à une agriculture dominée par les pesticides (**Lalancette, 2012**). L'usage de ces molécules chimiques a permis d'améliorer les rendements et la diversité des cultures afin de satisfaire la demande nutritionnelle liée à l'accroissement de la population mondiale. Cependant, cette utilisation a également provoqué des effets indirects et néfastes sur l'environnement. Ainsi des études ont montré la présence de résidus de pesticides dans les eaux (**Masiá et al., 2013 ; Calvet et al., 2005**) et dans les sols (**Calvet**

et al., 2005), dans les multiples aliments (**Kesraoui-Abdessalem, 2008**). Les pesticides s'accumulent dans les tissus adipeux, le cerveau, le sang, le lait maternel, le foie, le placenta, le sperme et le sang du cordon ombilical (**Ntzani et al., 2013**).

La nécessité de mettre en place des techniques de remédiation des environnements pollués a été ressentie depuis déjà des années. Afin d'y endiguer, des moyens physiques, chimiques ou biologiques ont vu le jour. Les voies d'élimination chimiques et physiques ont cependant leurs limites du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement (**Ballerini et Vandescateele, 1999**). Néanmoins, les approches de remédiation biologiques également appelées bioremédiation semblent plus adaptées et plus prometteuses. Ce sont des techniques peu coûteuses, plus faciles à mettre en œuvre et moins invasives pour l'environnement.

Ces approches de bioremédiation se basent sur les capacités intrinsèques de certains micro-organismes à pouvoir utiliser les polluants comme source de carbone et ou d'azote. Différentes stratégies de dépollution sont envisagées : (i) l'atténuation naturelle où seule la capacité intrinsèque des micro-organismes à dégrader les polluants est engagée, (ii) la biostimulation, favorisant la croissance des populations microbiennes dégradant les polluants et (iii) la bioaugmentation grâce à l'apport de micro-organismes épurateurs directement sur le site contaminé. Toutefois, la mise en œuvre de stratégies de bioremédiation efficaces repose sur une bonne connaissance des communautés indigènes ainsi que de leurs capacités métaboliques. Dans ce cadre, les techniques de cultures basées sur l'isolement des microorganismes à pouvoir épurateur à partir des sites pollués ou non, permettent d'obtenir une meilleure compréhension de la structure et des fonctions des communautés microbiennes. Ainsi, dans de multiples travaux, plusieurs microorganismes ont été testés pour leurs capacités à dégrader les BTEX et plusieurs pesticides (**Emtiazi et al., 2005 ; Ghanavati et al., 2008**). Une grande variété de levures, de champignons et de bactéries sont capables d'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie des composés organiques volatils (**Manee et al., 1998**) et des pesticides (**Christian et al., 1996**).

Les actinomycètes sont connus par leurs capacités à dégrader par leurs riches systèmes enzymatiques, les substrats les plus complexes et les plus variés (**Prescott et al., 2010**). Ces bactéries sont ubiquistes et colonisent plusieurs sites écologiques (**Williams et al., 1984**). Elles peuvent par conséquent être des agents importants pour la biodégradation de diverses molécules polluantes de la nature. Ces bactéries possèdent également une caractéristique des plus importantes dans la dépollution biologique des sols. La majorité possède une structure mycélienne qui favorise leur dissémination dans les coins les plus éloignés de l'écosystème

tellurique. Contrairement aux bactéries non filamenteuses qui nécessitent un retournement constant des sols, l'emploi des actinobactéries nous évite cette contrainte technique très coûteuse. Ces bactéries sont également pour leur majorité, capable de donner des spores résistantes à la chaleur et à la dessiccation. Cet atout majeur permet la pérennité de ces microorganismes dans tous les écosystèmes. Les *Streptomyces* sont d'après nous, parmi les genres d'actinobactérie important qui peuvent répondre à notre problématique

Les stations d'épuration des eaux usées sont des endroits incontournables où les polluants les plus divers doivent être acheminés. Dans des études antérieures, il apparaît que les boues activées et les sols agricoles sont très pollués par les composés hydrocarbures et par les pesticides (Klöpffer, 1996, Harrad et al., 1994). Ils sont en outre très riches en matière organique et inorganique et peuvent par conséquent, offrir une biodiversité importante d'actinobactéries adaptées métaboliquement à nos différents polluants testés dans cette étude.

Selon la littérature, la biodégradation du mélange BTEX par les actinomycètes est moins rapportée à ce jour. Elle se limite à quelques genres comme *Rhodococcus* (Kim et al., 2002), et *Mycobacterium* (Zhang et al., 2013). En revanche, les actinomycètes ont été utilisés pour la biodégradation des pesticides avec les structures chimiques les plus variées, comme les composés organochlorés, les triazinones, les carbamates, les organophosphates, les organophosphonates, les acétanilides et les sulfonilurées (De Mot et al., 1999). Les travaux faisant appel aux actinomycètes dans ces biodégradations restent moins rapportés dans la littérature comparativement aux autres bactéries. La nécessité d'isoler des microorganismes indigènes performants est plus qu'importante, car aucune structure au monde ne pourra nous fournir des souches capables de s'adapter à nos différents écosystèmes. En outre, la spécificité des polluants de chaque pays est une raison supplémentaire pour rechercher des microorganismes plus concurrentiels et plus adaptés à ces xénobiotiques.

L'objectif de cette étude est d'isoler, de purifier, de caractériser et d'identifier des actinomycètes provenant de deux écosystèmes : les boues activées d'une station d'épuration des eaux usées et un sol agricole. Il est aussi question de mettre en évidence la capacité des souches isolées à biodégrader les BTEX et à utiliser certains pesticides pour leur croissance.

Cette étude est scindée en trois parties :

La première partie est consacrée à une revue bibliographique composée de quatre chapitres. Le premier chapitre décrit les composés organiques volatils et les moyens de dépollution adaptés à ces molécules. Le deuxième chapitre expose les principales données concernant l'origine des BTEX dans l'environnement et leurs voies biochimiques de

dégradation. Le troisième chapitre est consacré aux pesticides notamment les plus utilisés en Algérie. Enfin le quatrième chapitre relate succinctement les actinomycètes.

La deuxième partie de ce travail, est dédiée à la partie expérimentale, sur les techniques d'isolement et de sélection des actinomycètes capables de vivre en présence des BTEX et de quelques pesticides (l'Ortiva et le Rodazime, le Karaté, le Phoenix, le Dursban et la Cypermethrine et d'autres formes commerciales). Cette partie exprime les études cinétiques en réacteur batch de la croissance et de la dégradation ainsi que les méthodes analytiques. L'identification phénétique et moléculaire est également envisagée.

La troisième partie, est consacrée à une synthèse des principaux résultats obtenus, qui seront discutés, suivie par une conclusion générale et des perspectives pour ce travail de recherche.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les composés organiques volatils (COV)

1.1. Définition

La définition du terme COV diffère selon les pays et les réglementations.

La directive française **1999/13/CE, du 11 mars 1999**, définit un COV comme un composé organique ayant une pression de vapeur saturante de 10 Pa ou plus à une température de 20°C ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulière. La législation française exclut, par **l'arrêté du 29 mai 2000**, le méthane de cette définition. Les autres composés sont donc nommés COVNM (Composés Organiques Volatils Non Méthaniques).

Aux Etats-Unis les COV sont des composés organiques dont la pression de vapeur est au-dessus de 13.3 Pa à 25°C.

En Australie les COV sont définis comme des composés chimiques ayant une pression de vapeur supérieure de 0.27 kPa à 25 °C (**Dewulf et Langenhove, 2002**).

En Europe, la Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999, définit les COV comme des produits chimiques organiques dont la pression de vapeur est au-dessus de 10 Pa à 20°C.

1.2. Sources

Les émissions de COV ont deux origines :

- Naturelle (forêts, prairies),
- Anthropique.

A l'échelle planétaire, les émissions de COV dans le monde, sont estimées à environ un milliard de tonnes pour l'année 2000. Elles proviennent principalement, à hauteur de 90 % de sources naturelles (fermentation biologique, fuites de gaz naturel, éruptions volcaniques et la végétation), et à hauteur de seulement 10 % de sources anthropiques. Cependant dans les régions industrialisées, la prépondérance de sources naturelles diminue. Ainsi 550 000 kilos d'hydrocarbures se dispersent dans les airs et retombent dans l'océan avec la pluie. (ADEME)¹

La figure 1 présente un inventaire des principales sources de COV.

¹ ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie.

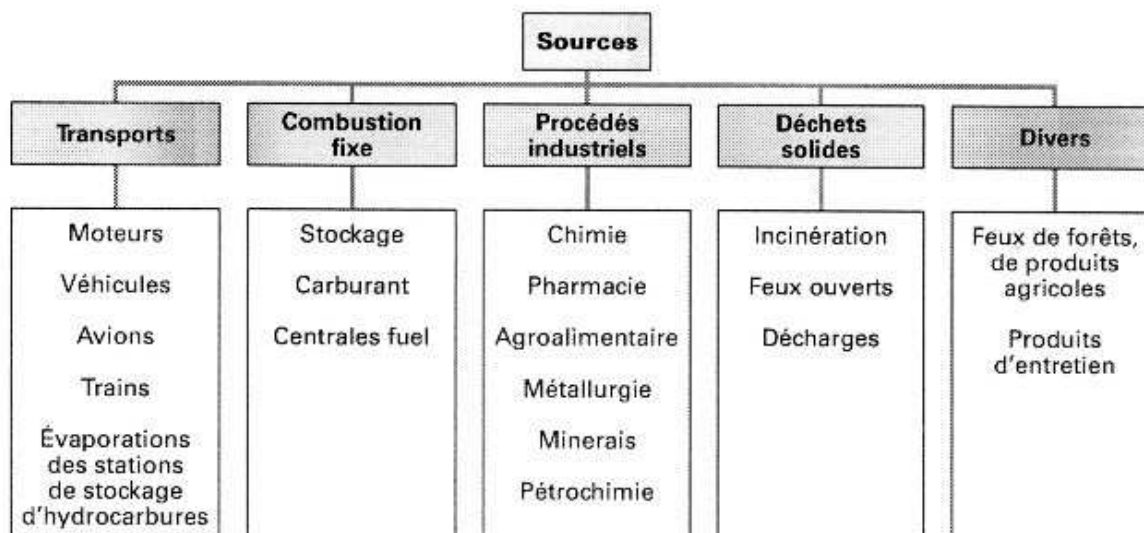


Figure 1. Sources d'émissions de COV (Liu and Liptak, 1995).

1.3. Réduction des émissions

1.3.1. Législation Algérienne

En Algérie, la législation porte sur les émissions anthropiques ponctuelles et diffuses. Elle fixe des valeurs seuils de rejets.

Les seuils d'émissions des installations classées pour la protection de l'environnement sont régis par le **décret exécutif n° 06-138 du 16 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 15 avril 2006** réglementant l'émission dans l'atmosphère de gaz, fumées, vapeurs, particules liquides ou solides, ainsi que les conditions dans lesquelles s'exerce leur contrôle. Pour les COV, la valeur limite d'émission, exprimée en carbone total, de la concentration de l'ensemble des composés à l'exclusion du méthane est de 150 mg.Nm^{-3} et de 200 mg.Nm^{-3} pour les anciennes installations.

1.3.2. Législation européenne

Les seuils d'émissions des installations classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE) sont régis par l'arrêté du 29 mai 2000 qui transpose en droit français **la directive européenne 1999/13/CE**. Pour les COV, la valeur limite d'émission, exprimée en carbone total, de la concentration de l'ensemble des composés est de 110 mg.Nm^{-3} , si le flux horaire total dépasse 2 kg.h^{-1} .

D'autre part, la directive européenne du 23 octobre 2001, **directive 2001/51/CE**, à l'échelle européenne, impose à tous les États membres des plafonds d'émission en composés organiques volatils non méthaniques (COVNM) à respecter égale à 1050 kT en 2010. Ces seuils sont dépassés par trois pays selon les estimations provisoires 2013 : l'Allemagne, le

Danemark et l'Irlande. En valeur absolue, l'Allemagne dépasse le plus son plafond d'émission avec 143 kilotonnes alors qu'en pourcentage ce sont l'Irlande et le Danemark avec respectivement 64 % et 35 % de dépassement.

De plus, la **Directive européenne 2001/81/CE** du 23 octobre 2001 relative aux plafonds d'émissions nationaux (NEC) demande que chaque État membre communique un inventaire des émissions de SO₂, NO_x, COVNM et NH₃ selon un format similaire à celui retenu par la convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière.

1.3.3. Législation internationale

En novembre 1991, un protocole sur « la limitation des émissions des COV et leurs flux transfrontières » fut signé à Genève par 21 états, contraignant les pays signataires à :

- Une réduction d'au moins 30 % des émissions de 1999 par rapport à l'année de référence 1988 ;
- Une stabilisation du niveau d'émission en 1999 par rapport au niveau de 1988 pour les pays dont les émissions sont inférieures à 500 kt pour l'année de référence, 20 kg/habitant et 5 t/km².

L'effet nocif induit par les émissions gazeuses chargées en COV, ainsi que la mise en place d'une réglementation de plus en plus sévère ont contraint les industriels à contrôler et réduire les émissions de COV avant leur rejet dans l'atmosphère. Si une limitation des rejets au niveau du procédé de fabrication ne peut être mise en place, il est alors nécessaire de mettre en œuvre des unités de traitement des effluents pollués générés.

1.4. Impacts des COV

La présence de COV dans l'atmosphère présente des risques directs et indirects pour la santé humaine et pour l'environnement.

1.4.1. Sur l'environnement

Dans l'atmosphère, les composés organiques volatils se dégradent et contribuent à perturber les équilibres chimiques avec, pour conséquence, la formation ou l'accumulation d'ozone. Les COV sont des polluants directs pour les hommes et les végétaux, et contribuent également à la pollution olfactive. Ils sont aussi des précurseurs de l'ozone dans l'air en provoquant de nombreuses réactions chimiques. Cette surproduction d'ozone a un effet néfaste sur la végétation, il entraîne une baisse de la production des plantes. (**Dusserre *et al.*, 1998**).

1.4.2 Sur la santé humaine

Les COV ont un double effet sur la santé :

Un effet indirect en agissant sur l'ozone, en tant que précurseurs de ce gaz dans l'air : les conséquences de cette surproduction d'ozone pour la santé varient selon le niveau d'exposition, le volume d'air inhalé et la durée de l'exposition. Plusieurs manifestations sont possibles : toux, inconfort thoracique, gêne douloureuse en cas d'inspiration profonde, mais aussi essoufflement, irritation nasale, oculaire et de la gorge. Ces effets diffèrent toutefois en fonction des individus et de l'état de santé ;

Un effet direct en tant que substance toxique, jusqu'à des niveaux de gravité extrêmes justifiant une classification rigoureuse. Les COV les plus nocifs, comme le benzène, sont classés CMR (cancérogène, mutagène et reprotoxique). Ils font l'objet d'une réglementation renforcée, notamment dans le code du travail, dont les dispositions imposent à l'employeur de le substituer, ce qui prévaut sur toutes les autres mesures de réduction du risque. (Dussere *et al.*, 1998).

1.5. Procédés de traitement des COV

Il existe différentes catégories de systèmes de dépollution des effluents gazeux chargés en COV. Elles sont classiquement réparties en deux groupes selon que les COV sont conservés ou détruits (Figure 2).

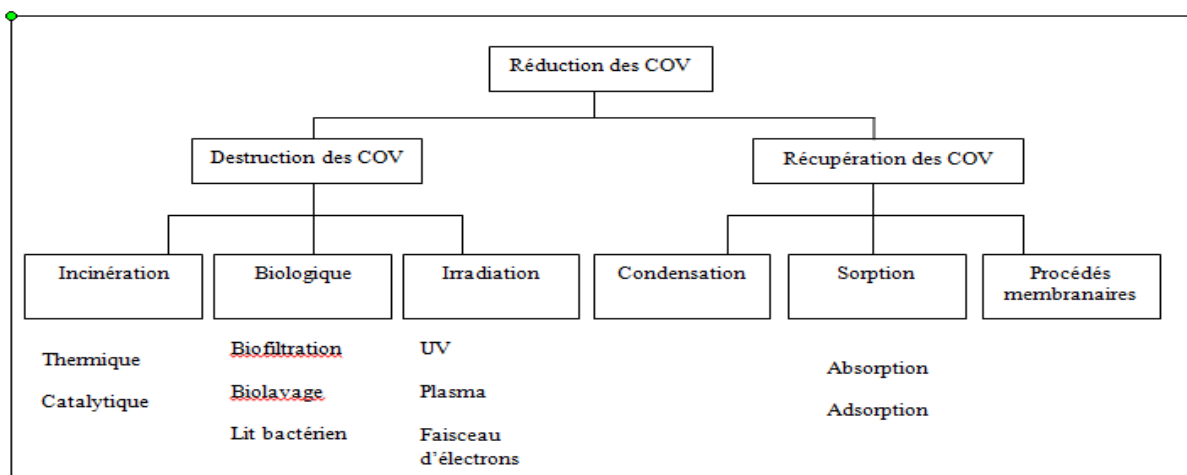


Figure 2 : Les systèmes d'épuration des COV contenus dans les effluents gazeux.

1.5.1. Procédés biologiques

Les procédés biologiques industriels ont été initialement mis en œuvre pour traiter des effluents malodorants. La première application industrielle du traitement d'émissions malodorantes a été réalisée en 1953 en Californie (Le Cloirec *et al.*, 1991) ; alors que la prise de conscience des effets nocifs des COV date des années 90 (Le Cloirec, 1998).

Aujourd'hui encore la majorité des procédés biologiques, et plus particulièrement les biofiltres, sont utilisés pour la désodorisation des gaz, mais la recherche vise à élargir leur champ d'application au traitement des COV (Zilli *et al.*, 2001).

Les avantages des bio-réacteurs sont les suivants :

Un coût de fonctionnement modéré, l'absence de nocivité des produits de dégradation (biomasse, eau et dioxyde de carbone), leur image positive auprès de l'opinion publique qui les perçoit comme des technologies respectueuses de l'environnement.

Le principe de fonctionnement de ces systèmes peut être résumé comme suit :

1. les polluants sont transférés de la phase gazeuse dans la phase aqueuse,
2. ils diffusent dans le milieu aqueux,
3. ils sont oxydés par des micro-organismes. Parmi ces derniers, certains possèdent la capacité à métaboliser les COV pour puiser l'énergie et le carbone nécessaire à leur croissance. Les produits finaux de cette dégradation sont des produits simples et atoxiques tels que l'eau et le dioxyde de carbone.

Il existe trois types de procédés biologiques : biofiltres, biolaveurs, et les filtres percolateurs. La distinction entre ces procédés repose sur le caractère mobile ou statique de la phase aqueuse et de la biomasse (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification des procédés biologiques de traitement d'air.

Biomasse	Phase aqueuse	
	Mobile	Stationnaire
En suspension	Biolaveur	–
Fixée	Filtre percolateur	Biofiltre

1.5.2. Biofiltres

La biofiltration proprement dite est le plus conventionnel et le plus ancien procédé pour le traitement de l'air, développée initialement en Europe et au Japon dès le début des années 1960. Les premiers biofiltres construits étaient à ciel ouvert, constitués de terre ou de compost, et traversés par un réseau de canalisations perforées, permettant la répartition de l'air.

Dans les biofiltres, la biomasse est fixée sur un matériau support (tourbe, fibres, compost, écorces, copeaux de bois, billes de céramique, etc.) au sein d'un réacteur que le flux chargé en polluant traverse de haut en bas, de bas en haut ou horizontalement. Sur ce matériau, arrosé périodiquement, se forme un film bactérien. Au passage de l'effluent, les polluants y sont

absorbés et oxydés. Un système d'alimentation du réacteur en eau permet de maintenir l'humidification optimale du support.

Afin de bien éliminer les COV, le matériau est d'une épaisseur de 0,5 à 1 mètre et son humidité relative doit être maintenue entre 40 et 60 % par l'aspersion périodique.

L'écoulement des liquides (gaz et fluides) et leur répartition uniforme peut être favorisée par l'ajout d'éléments plus légers au matériel de base (ex : copeaux, billes de polystyrène).

Lors de l'aspersion, un apport nutritif complémentaire ou un apport de chaux permet de régler le système (pH du milieu) est possible. Comme la présence d'eau et d'air et la densité de la masse ne sont pas uniformes, la capacité épurant peut considérablement varier.

La capacité d'élimination d'un tel système trouve sa limite aux alentours de 100 à 140 g de polluant par mètre de biofiltre et par heure. Au-delà, le système sature et le polluant excédentaire est rejeté (**Figure 3 a**).

1.5.3. Filtres percolateurs

Récemment, les filtres percolateurs ont été mis en œuvre à l'échelle industrielle. Ils constituent une amélioration du procédé de biofiltration classique par l'utilisation de garnissages fixes ou déposés en vrac sur lesquels percole la phase aqueuse, pour le reste, la régulation est assez similaire.

Dans les filtres percolateurs, le biofilm se développe à la surface d'un support fixe en matériau inorganique ou synthétique (**Figure 3. b**) ayant une structure garantissant une surface de contact maximale entre l'air vicié et l'eau. Il peut y atteindre plusieurs millimètres d'épaisseur. Ses microorganismes produisent des enzymes capables de détruire les COV: ils sont transformés en dioxyde de carbone, en vapeur d'eau et en masse biologique (minerais).

Ce filtre est arrosé continuellement. Les COV et l'oxygène sont absorbés d'abord par l'eau d'arrosage puis transportés sous forme aqueuse vers le matériel de support. Autour du biofilm se crée ainsi une phase liquide à travers laquelle les COV et l'oxygène sont absorbés et transférés vers le biofilm. L'eau d'arrosage peut contenir le cas échéant un complément nutritif et du NaOH (neutralisation). Par ce système, un grand nombre de COV, hydrosolubles et difficilement hydrosolubles (toluène, xylène, benzène, chlorure de méthylène, ...) peut être traité, les COV à haute concentration en chlore sont toutefois moins faciles à éliminer. Pour le traitement de certaines substances particulières, une «vaccination» de l'eau avec les souches adaptées peut être réalisée. La charge biologique est constamment renouvelée par élimination de la masse en surplus. Les boues pouvant se former sont entraînées avec la phase aqueuse. Elles sont ensuite éliminées par simple décantation. Comme pour les biofiltres, la limitation

de cette technique se situe au niveau de la solubilité des éléments à traiter. De ce fait, cette technique n'est pas adaptée aux polluants faiblement solubles dans l'eau.

A part les biofiltres percolateurs «classiques» à l'eau, il en existe également fonctionnant avec d'autres liquides comme par exemple avec une émulsion huile organique / eau. Ils sont destinés à élargir les possibilités de traitement à des composés non solubles dans l'eau ou toxiques à faible concentration, tels que le styrène, le benzène ou les solvants chlorés. Avec de l'huile de silicone, on peut par exemple obtenir une dégradation de 90% du toluène et du xylène, alors qu'elle est quasiment nulle avec de l'eau seule.

1.5.4. Biolaveurs

Le procédé de biolavage consiste en une étape de séparation physique par l'absorption en solution de composés volatils, suivie d'un traitement biologique de la phase aqueuse (**Figure 3 c**). L'air est épuré par passage dans une colonne d'absorption (contacteur gaz-liquide). Le contacteur gaz-liquide généralement préféré pour réaliser cette opération est une colonne à garnissage dans laquelle circulent à contre-courant l'effluent gazeux et l'eau. Le courant liquide en sortie de la colonne d'absorption, chargé en polluants dissous, est dirigé vers un bassin de régénération où les composés chimiques sont biologiquement dégradés. La gestion de ce type d'appareillage est toutefois très complexe et nécessite une maîtrise importante par du personnel qualifié.

Cette configuration de réacteur fait que le temps de contact des polluants avec la biomasse, déterminé par le volume du bassin d'oxydation et le débit des fluides dans la colonne de lavage, peut-être plus long que dans les biofiltres. Ce système apparaît donc particulièrement approprié dans le cadre du traitement de composés ayant des cinétiques de dégradation lentes.

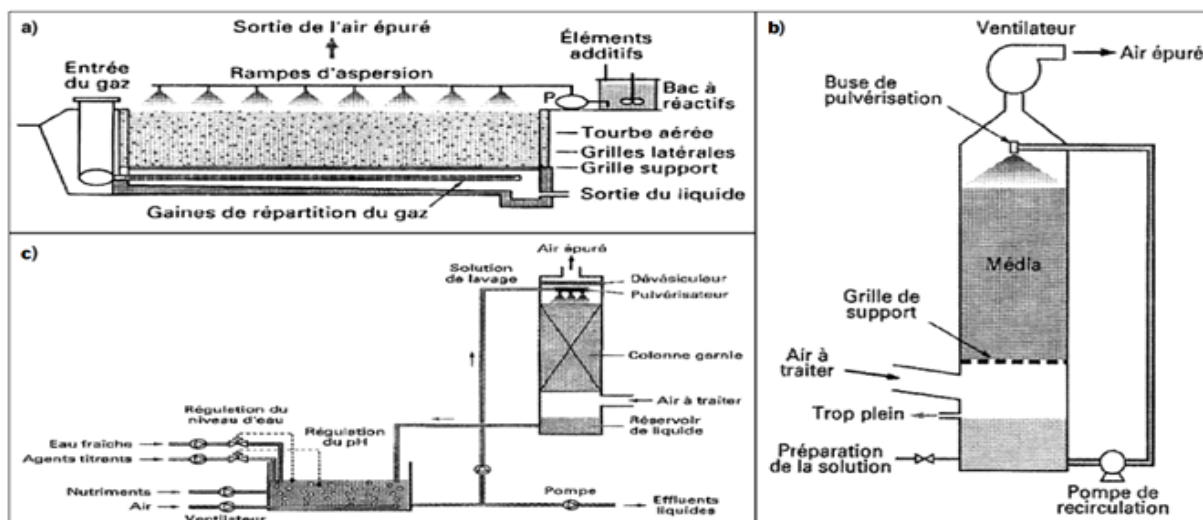


Figure 3 (a, b et c) : Les systèmes de traitement biologiques des effluents gazeux rencontrés dans l'industrie : a) biofiltre, b) filtre percolateur, c) biolaveur (Pré *et al.*, 2004).

2. Les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes)

Le terme BTEX regroupe les six hydrocarbures suivant ; le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les trois isomères de xylène qui sont le *méta-xylène* (*m-xylène*), l'*ortho-xylène* (*o-xylène*) et le *para-xylène* (*p-xylène*).

2.1. Caractéristiques physico-chimiques des BTEX

Les BTEX sont des composés organiques volatils mono aromatiques, de faible poids moléculaire saturés (Neff *et al.*, 2011). Ils sont constitués uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène et présentent tous un cycle benzène.


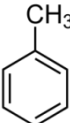

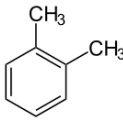
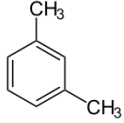
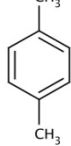
Les BTEX sont tous liquides, très volatils et sont très inflammables. Les BTEX sont les hydrocarbures les plus solubles dans l'eau mais demeurent moins solubles dans l'eau que dans les huiles et dans la plus part des solvants organiques (Walker *et al.*, 2006). Parmi ces composés le benzène est le plus soluble (1,78 g/L) suivi du toluène (0,515 g/L), des trois isomères du xylène (de 0,175 à 0,2 g/L) et de l'éthylbenzène (0,152 g/L) (Agteren *et al.*, 1998).

Leur solubilité leur confère une bonne mobilité dans les eaux et dans les sols où ils ont des importants impacts environnementaux. Ils sont facilement accessibles aux micro-organismes sous forme solubilisée (Vandecasteele, 2005). Les BTEX sont moyennement adsorbés par la phase organique du sol. Leur valeur de coefficient de partage octanol/eau (log K_{ow}) est comprise entre 2 et 4. Si la valeur du coefficient de partage est supérieure à 1, cela signifie que la substance est plus facilement soluble dans les graisses que dans l'eau, tandis que si cette valeur est inférieure à 1, la substance sera plus soluble dans l'eau que dans les graisses (Walker *et al.*, 2006).

En général, les BTEX s'accumulent à la surface des eaux avant d'être partiellement solubilisés. Ils sont volatils et leur densité de vapeur est plus importante que celle de l'air (Saada *et al.*, 2005).

Leurs structures et leurs principales caractéristiques physico-chimiques sont répertoriées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Structure et principales caractéristiques physico-chimiques des BTEX.

Composé	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	<i>o</i> -Xylène	<i>m</i> -Xylène	<i>p</i> -Xylène
Formules Moléculaires	C_6H_6	$C_6H_5CH_3$	C_8H_{10}	$C_6H_4(CH_3)_2$	$C_6H_4(CH_3)_2$	$C_6H_4(CH_3)_2$
Structures chimiques ^a						
PM ^b (g/mole)	78,11	92,13	106,16	106,16	106,16	106,16
PE ^c (°C)	80,10	110,60	136,20	144,40	139,30	137,00
PF ^d (°C)	5,50	-95,00	-94,97	-25,00	-47,40	13,00
PV ^e (mm Hg)	95,19	28,40	4,53	6,60	8,30	3,15
Densité ^f (g/mL)	0,87	0,87	0,87	0,88	0,87	0,86
Solubilité ^g (mg/L)	1791,00	535,00	161,00	175,00	146,00	156,00
Constante de Henry ^h (kPa.m ³ /mole)	0,557	0,660	0,843	0,551	0,730	0,690
Coefficient de partage ⁱ (ocatanol/eau)	1,56-2,69	2,69	3,15	3,08-3,29	3,20-3,29	3,09-3,18
Réaction globale ^j			$C_8H_{10} + 10,5O_2 \rightarrow 8CO_2 + 5H_2O$ $C_6H_6 + 7,5O_2 \rightarrow 6CO_2 + 3H_2O$ $C_7H_8 + 9O_2 \rightarrow 7CO_2 + 4H_2O$			

^b Poids moléculaire (Dean, 1985).

^c Point d'ébullition (Weast *et al.*, 1989).

^d Point de fusion (Weast *et al.*, 1989).

^e La pression de vapeur (Howard, 1990).

^f Densité (Weast *et al.*, 1989).

^g Solubilité à 25 °C (Dean, 1985).

^h Constante de Henry (Farhadian *et al.*, 2008).

ⁱ Coefficient de partage (Mackay *et al.*, 1992).

^j Réaction globale (El-Naas *et al.*, 2014).

2.2. Sources et utilisation des BTEX

Les BTEX ont une origine naturelle, on les retrouve notamment dans le pétrole brut, le gaz naturel, ou même produits par des microorganismes : c'est le cas de *Toluomonas auensis* qui produit du toluène à partir de phénylalanine (**Fischer-Romero et al., 1996**). La principale source des BTEX est d'origine anthropique.

L'essentiel des BTEX est produit par les industries pétrochimique et pétrolière, principalement lors du raffinage du pétrole. Dans l'essence, les pourcentages en benzène, toluène, éthylbenzène et xylène sont respectivement de 1 ; 1,5 ; 1-1,5 et 8-10 % (**Day et al., 2001**). Ces BTEX peuvent également être utilisés comme solvants et comme matières premières pour la synthèse de composés chimiques. Le benzène est utilisé par exemple pour la fabrication de styrène, cumène ou encore de cyclohexane. Le toluène est quant à lui utilisé par exemple dans les formulations de certaines peintures et vernis ou encore de caoutchouc, mais aussi dans de nombreux produits ménagers.

Les émissions majeures de BTEX sont les gaz d'échappement automobiles et l'évaporation de l'essence lors de son stockage, son transport et sa distribution (**Jo et Song, 2001**). Les déversements, le plus souvent accidentels, dans l'environnement, conduisent en une pollution massive des sols et des systèmes aquatiques. Une accumulation de ces composants, peut alors se produire dans les tissus de certaines plantes et animaux (**An, 2004**).

Le benzène et le xylène sont également émis dans l'environnement lors de la combustion du bois et des énergies fossiles. La plus grande majorité du toluène quant à elle est produite par la conversion catalytique du pétrole et par l'aromatisation d'hydrocarbures aliphatiques lors du raffinage du pétrole.

2.3. Pollution

Les BTEX relargués dans l'environnement auront généralement trois devenir possibles ; ils pourront (i) se volatiliser, (ii) s'adsorber aux particules du sol et (iii) se dissoudre rapidement dans les eaux de surface grâce à leur solubilité et ainsi rejoindre les eaux souterraines (**Pinedo et al., 2013**) (**Figure 4**). Ces composants auront donc un impact majeur sur les environnements terrestres se trouvant à proximité des stations-service ou des industries pétrolières mais également sur les environnements aquatiques, tels que les eaux de surface ainsi que les eaux souterraines, sources majeures d'eau potable.

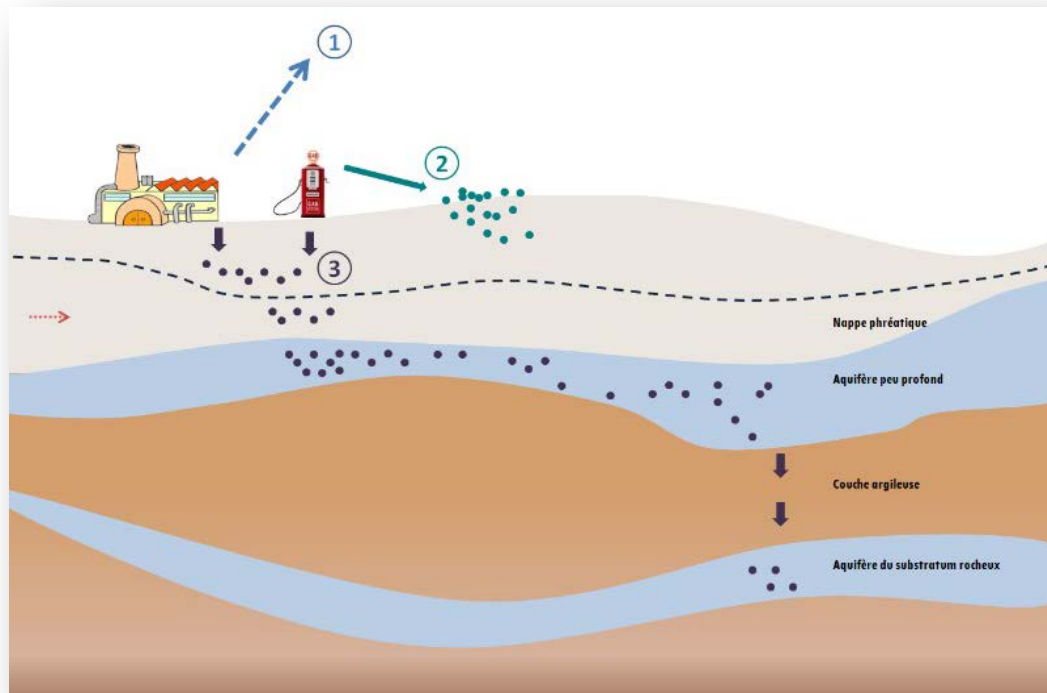


Figure 4 : Devenir des BTEX après relargage dans l'environnement. Les BTEX 1) se volatiliseront, 2) s'adsorberont aux particules du sol ou 3) se solubiliseront dans les eaux de surface pour rejoindre les eaux souterraines. La flèche rouge indique le sens du courant.

2.4. Toxicité et écotoxicité

La toxicité des BTEX est majoritairement due à la présence du cycle aromatique. En effet, les composants mono-aromatiques tels que les BTEX sont plus toxiques que les alcanes linéaires (An, 2004). Les effets sur la santé humaine sont multiples et parfois très graves. Ils provoquent des effets neurologiques comme des maux de tête, des vertiges ainsi que des tremblements. Après une durée d'exposition plus longue, ils entraînent des irritations des yeux, du nez, de la peau et de la gorge (Chen *et al.*, 2008 ; Shen, 1998). Les BTEX ont également un effet génotoxique en causant des cassures simples brins et doubles brins de l'ADN (Chen *et al.*, 2008). Il a également été démontré que certains composants du catabolisme des BTEX comme le catéchol, le benzenetriol, l'hydroquinone ou encore le benzoquinone avaient un effet cytotoxique en inhibant l'activité de l'ADN polymérase et donc indirectement en inhibant la synthèse d'ADN (Shen, 1998). Ces mêmes métabolites peuvent également conduire à la production de molécules oxygénées réactives pouvant produire des adduits d'ADN (Shen, 1998). Ces adduits d'ADN modifient l'expression des gènes et participent à la carcinogénèse (Harris, 1991).

Ainsi, le benzène peut causer des cancers chez l'homme, justifiant son classement par l'Agence de Protection Environnementale (EPA) et par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) comme substance carcinogène (Mehlman, 1992). Chez l'homme, des leucémies et des cancers des poumons, du foie, de l'estomac, du tractus respiratoire et de l'intestin ont été répertoriés (Billet *et al.*, 2010). Le toluène quant à lui peut causer des dommages sur le système nerveux, sur les reins ainsi que sur le foie (USEPA, 2008). Le toluène est d'ailleurs classé comme agent cancérigène probable pour l'homme. C'est pour ces raisons que les concentrations en BTEX dans les eaux de boisson sont réglementées. L'organisation mondiale de la santé recommande des valeurs maximales pour le benzène, toluène, xylène et éthylbenzène respectivement de 10 ; 700 ; 500 et 300 µg.L⁻¹ (OMS, 2008).

En plus d'être toxiques pour les humains, les BTEX sont également connus pour être toxiques pour de nombreux autres organismes des systèmes terrestres et aquatiques (An, 2004). Les BTEX provoquent une mortalité chez de nombreux organismes benthiques d'eau douce comme les *Daphnia magna* (Galassi *et al.*, 1988). Une inhibition de la photosynthèse a également été observée chez la microalgue *Chlorella vulgaris* quand elle est mise en présence de benzène (Hutchinson *et al.*, 1980).

2.5. Technique de dépollution biologiques des BTEX

Les processus de bioremédiation sont des techniques non invasives et relativement peu coûteuses par rapport aux techniques physico-chimiques (Leahy et Colwell, 1990). La bioremédiation microbienne est définie comme l'utilisation des microorganismes pour dégrader des polluants grâce à leurs diverses capacités métaboliques (Medina-Bellver *et al.*, 2005).

2.5.1. Atténuation naturelle

La bioremédiation *in situ* naturelle est appelée atténuation naturelle. Ce procédé est défini comme étant le processus intervenant naturellement dans les sols et les nappes phréatiques et qui s'exécute sans intervention humaine permettant ainsi de réduire la masse, la toxicité, la mobilité, le volume ou la concentration des contaminants dans ces milieux (Kao *et al.*, 2006). L'atténuation naturelle fait intervenir plusieurs processus tels que la dispersion, la volatilisation, ou encore la dissolution ; même si les principaux acteurs restent les microorganismes et leurs capacités intrinsèques à transformer ou minéraliser les polluants (Smets et Pritchard, 2003).

L'atténuation naturelle est une technique bien plus rentable que les techniques physico-chimiques, cependant la minéralisation complète des BTEX est bien plus longue dans ces

conditions. Reinhard et collaborateurs ont montré que le toluène, le *o*-xylène et *m*-xylène étaient minéralisés en moins de 30 jours alors qu'une diminution de 50% du benzène, de l'éthylbenzène et du *p*-xylène était observée en 60 à 90 jours (**Reinhard et al., 2005**). Gulensoy et Alvarez ont montré que le toluène est le composé le plus facilement biodégradable par les micro-organismes (**Gulensoy et Alvarez, 1999**). A l'inverse, le benzène et l'éthylbenzène sont les composés qui mettront le plus de temps à être métabolisés lors du processus d'atténuation naturelle (**Borden et al., 1995**).

Dans certains cas, l'atténuation naturelle peut être limitée par l'absence de nutriments nécessaires au bon fonctionnement des communautés microbiennes indigènes. Borden et collaborateurs ont également démontré que l'atténuation naturelle était limitée par la quantité et le type d'accepteurs d'électrons présents dans l'écosystème (**Borden et al., 1995**). Ceci pose un certain nombre de problèmes, notamment en ce qui concerne le benzène, qui est considéré comme espèce carcinogène et dont la minéralisation mettra beaucoup plus de temps que pour les autres hydrocarbures mono-aromatiques.

Pour pallier à cette minéralisation tardive, l'ajout dans le milieu pollué de nutriments ou d'accepteurs d'électrons, ainsi que des consortiums microbiens seront bénéfiques. Il s'agit alors de la bioaugmentation et de la biostimulation.

2.5.2. Bioaugmentation et biostimulation

La biostimulation consiste à modifier l'environnement pollué en ajoutant des éléments stimulant la croissance microbienne. L'ajout d'accepteurs d'électrons comme de l'oxygène, des nitrates et des sulfates dans des nappes phréatiques polluées ont montré une forte augmentation de la biodégradation anaérobie des BTEX (**Sublette et al., 2006**).

L'oxygène est le principal accepteur d'électrons pour les bioprocessus aérobies. Ainsi, différentes techniques ont été mises en place afin d'augmenter la concentration d'oxygène dissout dans les environnements pollués aux BTEX (**Yang et al., 2005**). Le « bioventing » ou « biosparging » est un processus de bioremédiation *in situ* qui par injection d'air, améliore l'aération des sols et nappes phréatiques et permet ainsi d'augmenter la biomasse microbienne donc d'améliorer la biodégradation des hydrocarbures.

La bioaugmentation consiste à ajouter des micro-organismes afin d'augmenter la bioremédiation des polluants. Les micro-organismes ajoutés peuvent être indigènes ou étrangers au milieu contaminé. Dans le cas où l'on utilise des micro-organismes indigènes, ces micro-organismes seront prélevés, acclimatés aux polluants et cultivés en grande quantité en laboratoire puis réinjectés sur le lieu à dépolluer.

Une technique de bioaugmentation consistant au couplage de la barrière réactive (Il s'agit de la mise en place d'une barrière en aval de la zone polluée. Grâce aux mouvements naturels de la nappe phréatique, le polluant se trouvant dans l'eau sera mis en contact avec les molécules oxydantes présentes sur les barrières réactives) avec des cultures microbiennes immobilisées sur des billes montre un grand potentiel dans la bioremédiation des BTEX. En effet, une étude a montré qu'en immobilisant des cellules de *Mycobacterium* sp. CHXY119 et *Pseudomonas* sp. YATO411 sur des billes couplées à une barrière réactive, les taux de dégradation atteignaient 84% à 97% selon les BTEX (Xin *et al.*, 2013).

Des processus de bioremédiation couplant à la fois la biostimulation et la bioaugmentation ont été testés en laboratoire. Lin et collaborateurs ont montré qu'en déterminant la quantité optimale d'azote et d'oxygène dissout nécessaire à la croissance de 4 espèces bactériennes dégradant les BTEX (*Ralstonia* sp. YABE411, *Pseudomonas* sp. YATO411, *Pseudomonas* sp. YAET411, and *Pseudomonas aeruginosa* YAMT521), le taux de dégradation des BTEX par ces bactéries atteignait 84% (Lin *et al.*, 2010).

2.6. Voies de dégradation des BTEX

Les micro-organismes présents dans l'environnement jouent un rôle clé dans la dégradation des composés organiques et ceci grâce à la présence de systèmes enzymatiques complexes et à leurs fortes capacités d'adaptations (Guerrero et Berlanga, 2006). La plupart des micro-organismes capables de dégrader les composants mono-aromatiques sont des bactéries, mais certains champignons sont également capables de métaboliser les BTEX (Yadav *et al.*, 1993). Certaines bactéries du genre *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Thauera*, *Dechloromonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, et *Marinobacter* ont été isolées de différents milieux aérobies et anaérobies contaminés aux BTEX. Cependant, seulement 3 souches bactériennes sont capables à l'heure actuelle de dégrader les 6 composants BTEX : *Pseudoxanthomonas spadix* BDa59, *Ralstonia pickettii* PKO1 et *Dechloromonas* sp. strain RCB (Choi *et al.*, 2013).

Les voies de dégradation des BTEX sont multiples et complexes. La biodégradation des BTEX peut se faire en aérobie et en anaérobie. L'utilisation d'une de ces deux voies se fera en fonction des accepteurs finaux d'électrons présents dans l'environnement. Dans la biodégradation aérobie, le dioxygène joue deux rôles majeurs qui sont (i) accepteur final d'électron pour les polluants aromatiques et (ii) l'activation du substrat pour les réactions d'oxygénation. Il a été constaté que la voie de biodégradation aérobie des polluants aromatiques était favorisée car (i) le processus est plus rapide et (ii) que les réactions sont

thermodynamiquement favorables donc que le bénéfice énergétique est meilleur (Cao *et al.*, 2009).

Mais, il a été démontré que dans les eaux souterraines, la biodégradation anaérobie pouvait jouer un rôle plus important que les processus aérobie (Farhadian *et al.*, 2008). La biodégradation anaérobie a l'avantage de produire une faible biomasse et d'avoir une bonne disponibilité en accepteurs d'électrons ; tels que le nitrate, le fer ou les sulfates (Cao *et al.*, 2009). Egalement, dans certains cas, les processus de dégradation anaérobies sont les seules possibilités pour dépolluer les eaux souterraines car il peut être très difficile d'injecter de l'oxygène dans certains environnements (Holliger *et al.*, 1997). Dans ces milieux anoxiques, tels que les nappes phréatiques, certains sols et sédiments, la biodégradation anaérobie des BTEX peut se dérouler par réduction des nitrates (Schocher *et al.*, 1991), par réduction du fer (Fe^{3+}) (Lovley *et al.*, 1995) et par réduction des sulfates (Edwards *et al.*, 1992).

2.6.1. Voies de dégradation aérobie des BTEX

La dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques tels que le BTEX suivra toujours deux étapes consécutives. Dans un premier temps, le cycle aromatique est activé et transformé en métabolites aromatiques hydroxylés comme des catéchols (ou dérivés) grâce à l'action de mono- ou di-oxygénases et de déshydrogénases (Figure 5). Cette étape correspond à l'attaque initiale des hydrocarbures. Par la suite, le cycle aromatique est ouvert grâce à l'action de catéchol-dioxygénases (ou dérivés) conduisant à la formation de composés aliphatiques insaturés et à des aldéhydes. Ces produits entreront dans le métabolisme central et participeront à la production de biomasse et d'énergie (Cao *et al.*, 2009) (Figure 6).

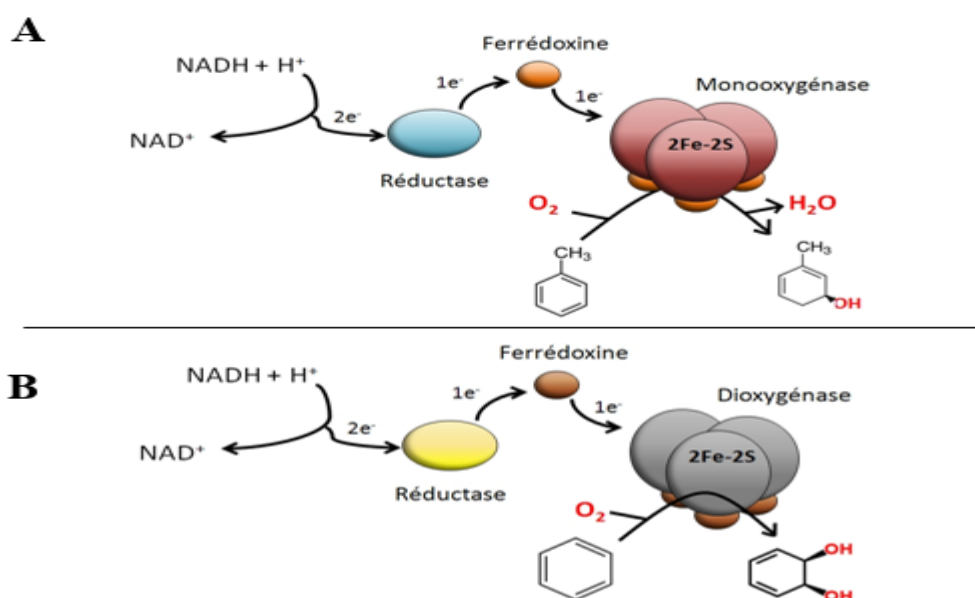


Figure 5 : Représentation schématique d'une (A) toluène-monooxygénase et d'une (B) benzène-dioxygénase. Ces enzymes multimériques sont constituées d'une ferrédoxine, d'une ferrédoxine réductase dépendante du NADH, H⁺ et d'une mono- ou di-oxygénase, généralement composée de deux sous-unités d'oxygénase : une grande (nommée α) et une petite (nommée β). Les monooxygénases catalysent l'incorporation d'un des deux atomes d'oxygène dans la molécule organique. Le second atome est réduit en eau. Dans les réactions impliquant des dioxygénases, les deux atomes d'oxygène seront incorporés à la molécule organique (**Ferraro et al., 2005**).

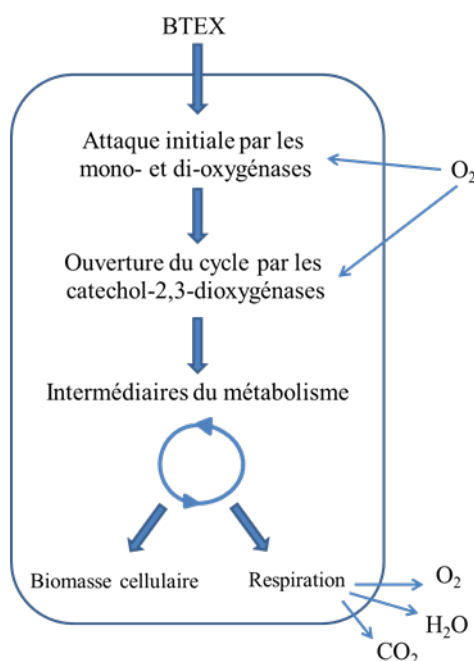


Figure 6 : Schéma général de la dégradation aérobie des hydrocarbures monoaromatiques. L'attaque initiale des BTEX est un processus oxydatif dans lequel l'activation et notamment l'incorporation des atomes du dioxygène est catalysée par les mono- ou di-oxygénases. Les voies de dégradation périphériques convertissent les polluants organiques en produits intermédiaires du métabolisme central. Par la suite, la synthèse de la biomasse cellulaire se produit à partir des métabolites précurseurs centraux tels que l'acétyl-CoA ou le pyruvate (**Das et Chandran, 2010**).

2.6.1.1. Benzène

Chez la souche *Pseudomonas sp.* ML2, les deux enzymes nécessaires au catabolisme du benzène en catéchol sont codées par le cluster *bed* porté par le plasmide pHMT112 (**Tan et al., 1993**) (**Figures 7 et 8**). Dans cette voie de dégradation, le benzène est d'abord converti en cis-1,2-dihydrobenzène-1,2-diol par la benzène 1,2-dioxygénase puis ce composé est converti en catéchol par la cis-benzène glycol déshydrogénase. Le catéchol obtenu est ensuite clivé par

la voie de clivage *mé*ta qui est l'une des principales voies de dégradation des composés aromatiques (utilisation de l'oxygène présent en position proximale à l'un des deux hydroxyles). Cette voie a largement été étudiée chez *Pseudomonas putida* où toutes les enzymes nécessaires à cette dégradation sont situées sur le plasmide TOL pWW0. Les gènes sont situés sur un opéron qui code les enzymes de conversion du benzoate au catéchol (voir la voie de dégradation IV du toluène), et du catéchol aux métabolites centraux tels le pyruvate et l'acétaldéhyde. Dans cette voie *mé*ta, le cycle aromatique est clivé par la catéchol 2,3-dioxygénase pour donner du (2E,4E)-2-hydroxy-6-oxohexa-2,4-dienoate. Ce composé est hydroxylé en 2-oxopent-4-énoate puis métabolisé en pyruvate, acétaldéhyde et acétyl-CoA.

Chez *Ralstonia picketti* PKOI, la benzène mono-oxygénase permettra de convertir le benzène en phénol qui donnera potentiellement catéchol. Cependant, les voies de dégradation impliquant des benzène mono-oxygénases ne sont pas encore parfaitement décrites.

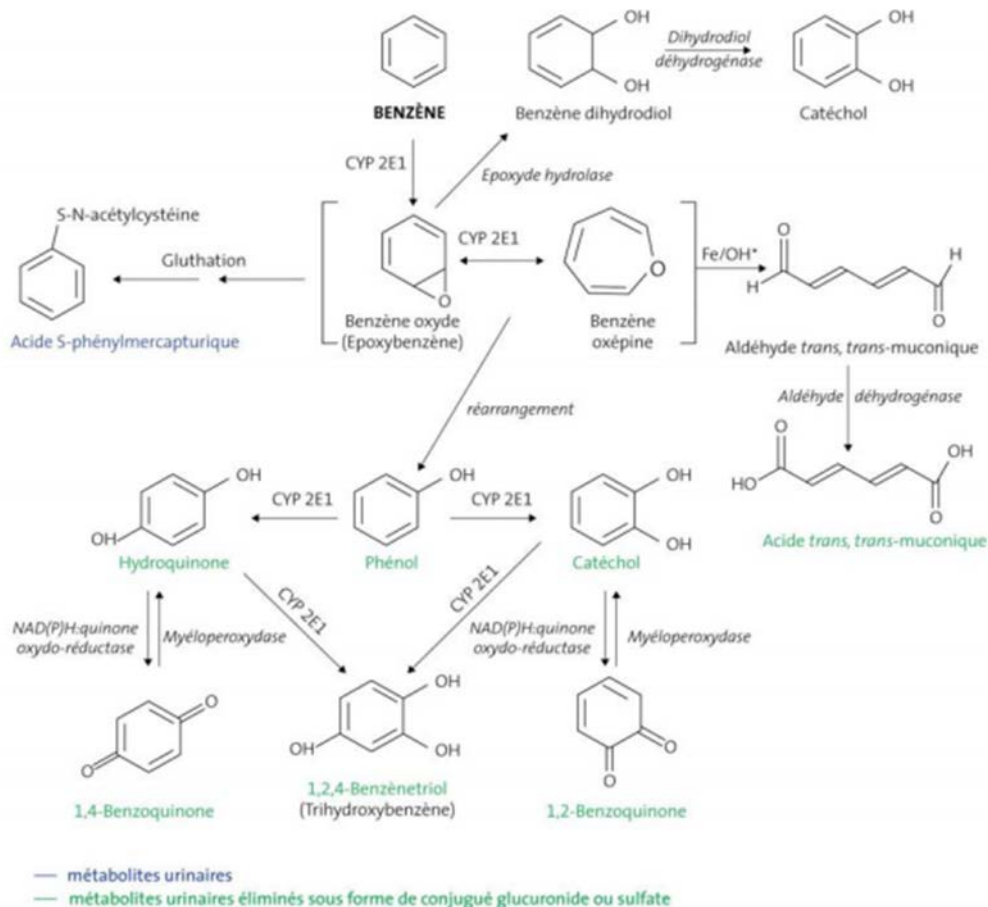


Figure 7 : Métabolisme du benzène (INRS, 2007a).

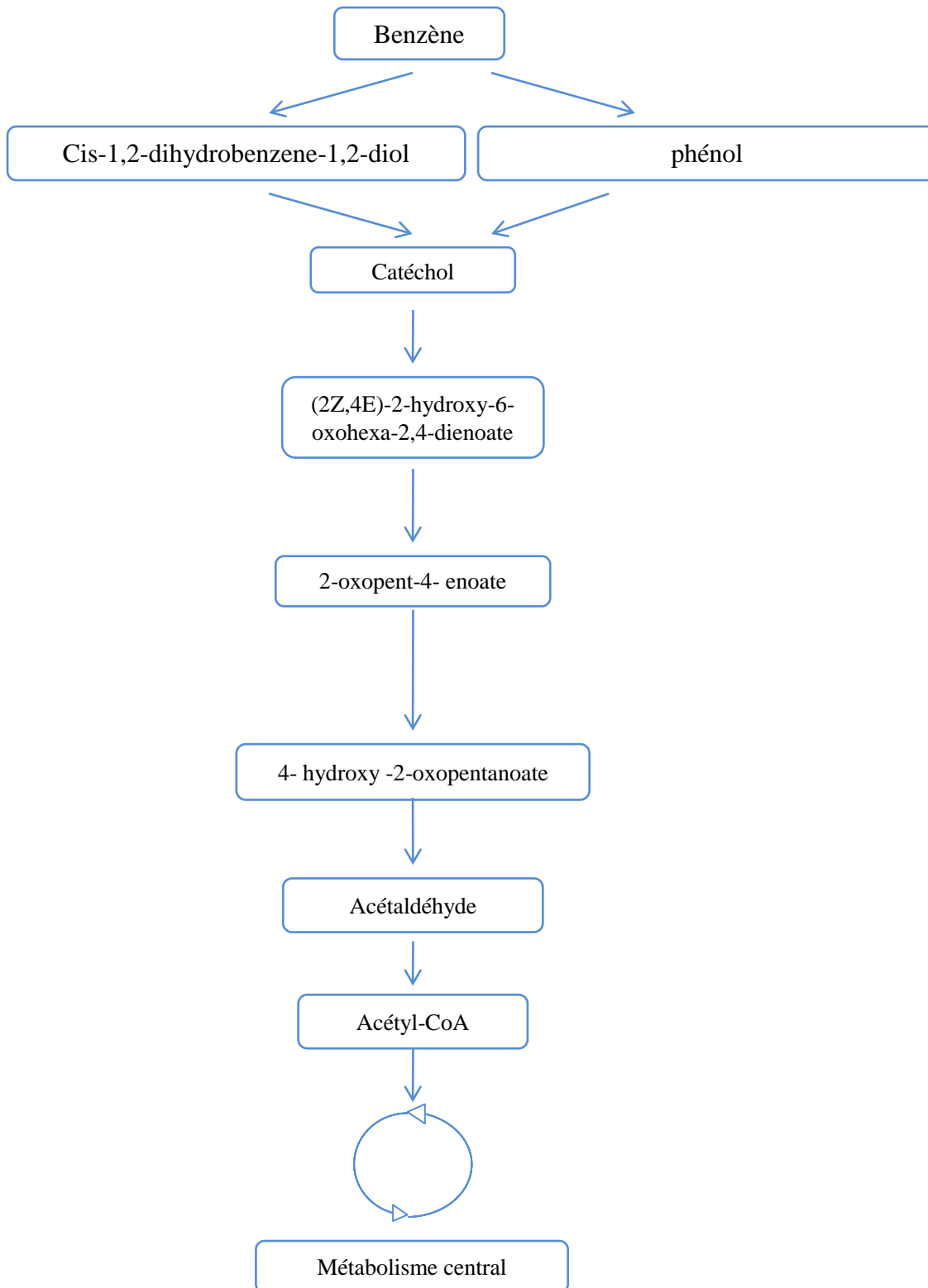


Figure 8 : Voies de dégradation aérobie du benzène (INRS, 2007a²).

² INRS (Institut national de recherche et de sécurité) (2007a). Fiche toxicologique FT 49 (benzène), Paris.

2.6.2.2. Toluène

Les voies de dégradation aérobies du toluène ont été identifiées dans diverses espèces qui impliquent différentes mono- ou di-oxygénases initiales, ainsi que différentes réactions d'hydroxylation. Ainsi, 5 voies de biodégradation aérobies du toluène, nommées de I à V ont été décrites (**Figures 9 et 10**).

- Voie de dégradation I (via *o*-cresol)

Chez *Burkholderia cepacia* G4, un plasmide de dégradation TOM a été identifié sur lequel se retrouve l'opéron tomA012345 (**Shields et al., 1995**). Cet opéron code pour la toluène-2-monooxygénase et la catéchol 2,3-dioxygénase. Le toluène est alors séquentiellement hydroxylé. La première hydroxylation en position ortho donne le *o*-cresol (ou 2-hydroxytoluène) et la seconde en position méta donne le 3-méthylcatéchol (ou 2,3-dihydroxytoluène) (**Newman et Wackett, 1995**). Le cycle sera attaqué par la catéchol 2,3-dioxygénase pour donner le cis,cis-2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate. Ce composé sera hydrolysé en 2-oxopent-4-énoate puis en 4-hydroxy-2-oxopentanoate. Les deux dernières étapes de cette voie sont hypothétiques chez *B. cepacia* G4 car les deux enzymes n'ont pas été directement détectées dans cet organisme. Chez *Pseudomonas putida* F1, des études ont pu mettre en évidence que les produits de cette voie étaient le pyruvate qui entrera dans le métabolisme central et l'acétaldéhyde qui sera converti en acétyl-CoA, autre composant clé du métabolisme (**Lau et al., 1994**).

- Voie de dégradation II (via 4-méthylcatéchol)

Chez *Ralstonia pickettii* la réaction d'hydroxylation initiale est catalysée par une toluène-3-monooxygénase suivie par le clivage en méta du cycle par la catéchol 2,3-dioxygénase (**Olsen et al., 1994**). La toluène 3-monooxygénase libère 90% de *p*-cresol (ou 4 méthylphénol) et 10% de *m*-cresol. Le *p*-cresol est hydroxylé en 4-méthylcatéchol qui est le substrat de la catéchol 2,3-dioxygénase chez *Ralstonia pickettii* (**Fishman et al., 2004**). Le produit de cette réaction est le cis,cis-2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate et les étapes suivantes sont identiques à la dégradation I.

- Voie de dégradation III (via *p*-cresol)

Pseudomonas mendocina KR1 utilise cette voie de dégradation avec pour intermédiaire le protocatchuate (**Whited et Gibson, 1991**). L'étape initiale implique l'hydroxylation du toluène par une toluène-4-monooxygénase pour former du *p*-cresol (**Yen et al., 1991**). Le *p*-cresol est ensuite converti en *p*-hydroxybenzaldéhyde par une *p*-cresol déshydrogénase. Le *p*-hydroxybenzaldehyde est oxydé en *p*-hydroxybenzoate par une déshydrogénase NAD-dépendant. L'hydroxybenzoate est par la suite hydroxylé pour former du protocatchuate qui

sera clivé par la voie de clivage *ortho* (utilisation de l'oxygène présent entre les deux substitués hydroxyles) (**Whited et Gibson, 1991**).

- Voie de dégradation IV (via catéchol)

Cette voie de dégradation du toluène a été étudiée chez *Pseudomonas putida*. Le plasmide TOL pWW0 code toutes les enzymes nécessaires à la dégradation du toluène et du xylène (**Horn et al., 1991**). Sur ce plasmide, les gènes sont organisés en 2 opérons (**Harayama et Rekik, 1990**). Dans un premier temps, la chaîne latérale du toluène sera soumise à plusieurs oxydations successives pour donner des acides carboxyliques aboutissant à la formation de catéchol. Le cycle aromatique sera alors clivé par une catéchol 2,3-dioxygénase donnant des intermédiaires du cycle de Krebs.

- Voie de dégradation V (via toluène-cis-dihydroxydiol)

Chez la souche *Pseudomonas putida* F1, un cluster de gène code les enzymes nécessaires à la dégradation du toluène (**Lau et al., 1994**). Dans cette voie, le toluène est d'abord hydroxylé en toluène-cis-1,2-dihydroxydiol par la toluène 1,2-dioxygénase. Le dérivé de toluène dihydroxylé est déshydrogéné en 3-méthylcatechol. Le clivage du cycle aromatique est réalisé par la catéchol 2,3-dioxygénase et produit du *cis,cis*-2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate. Les étapes suivantes sont identiques aux voies I et II.

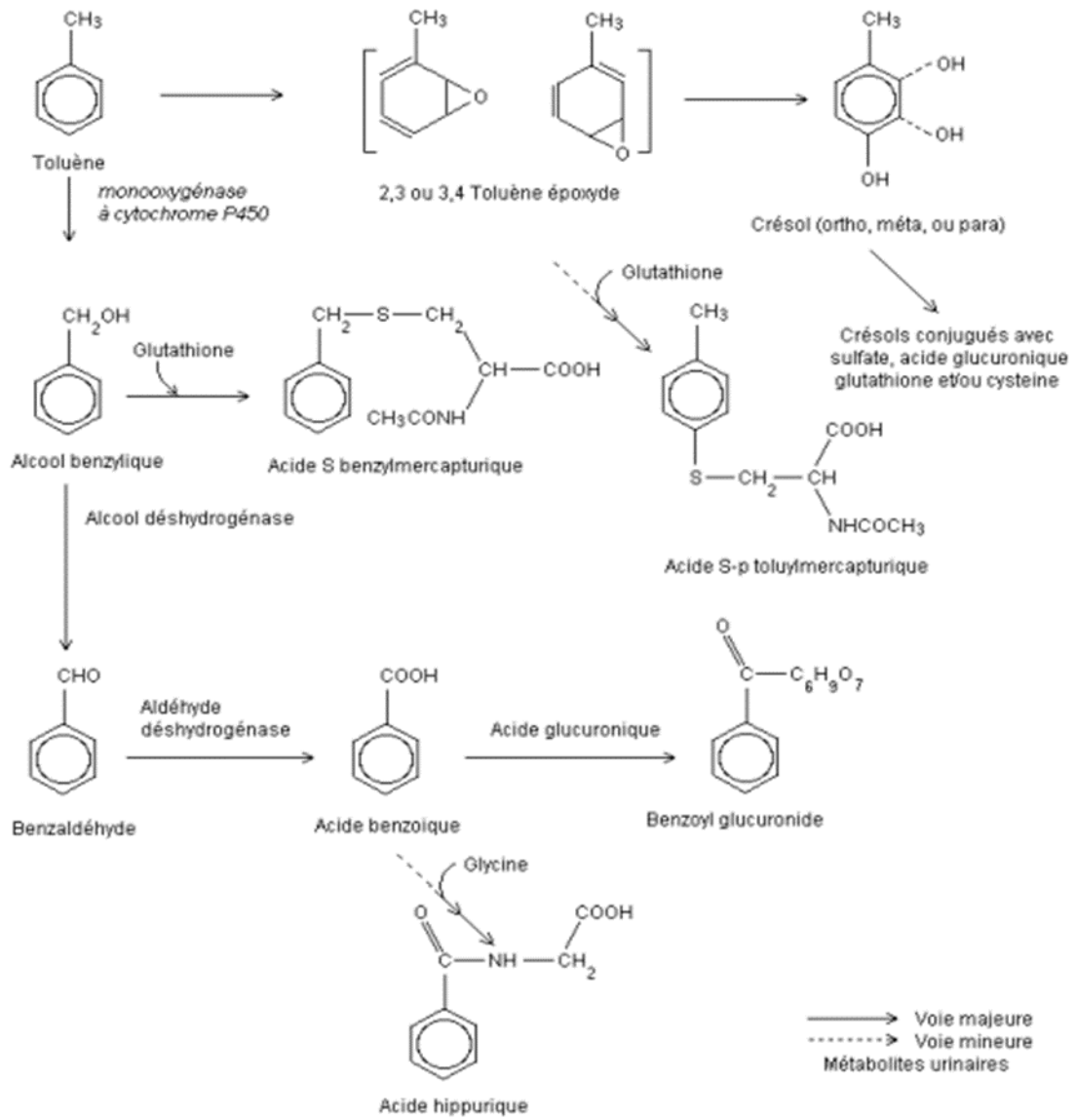


Figure 9. Métabolisme du toluène (INRS, 2008).

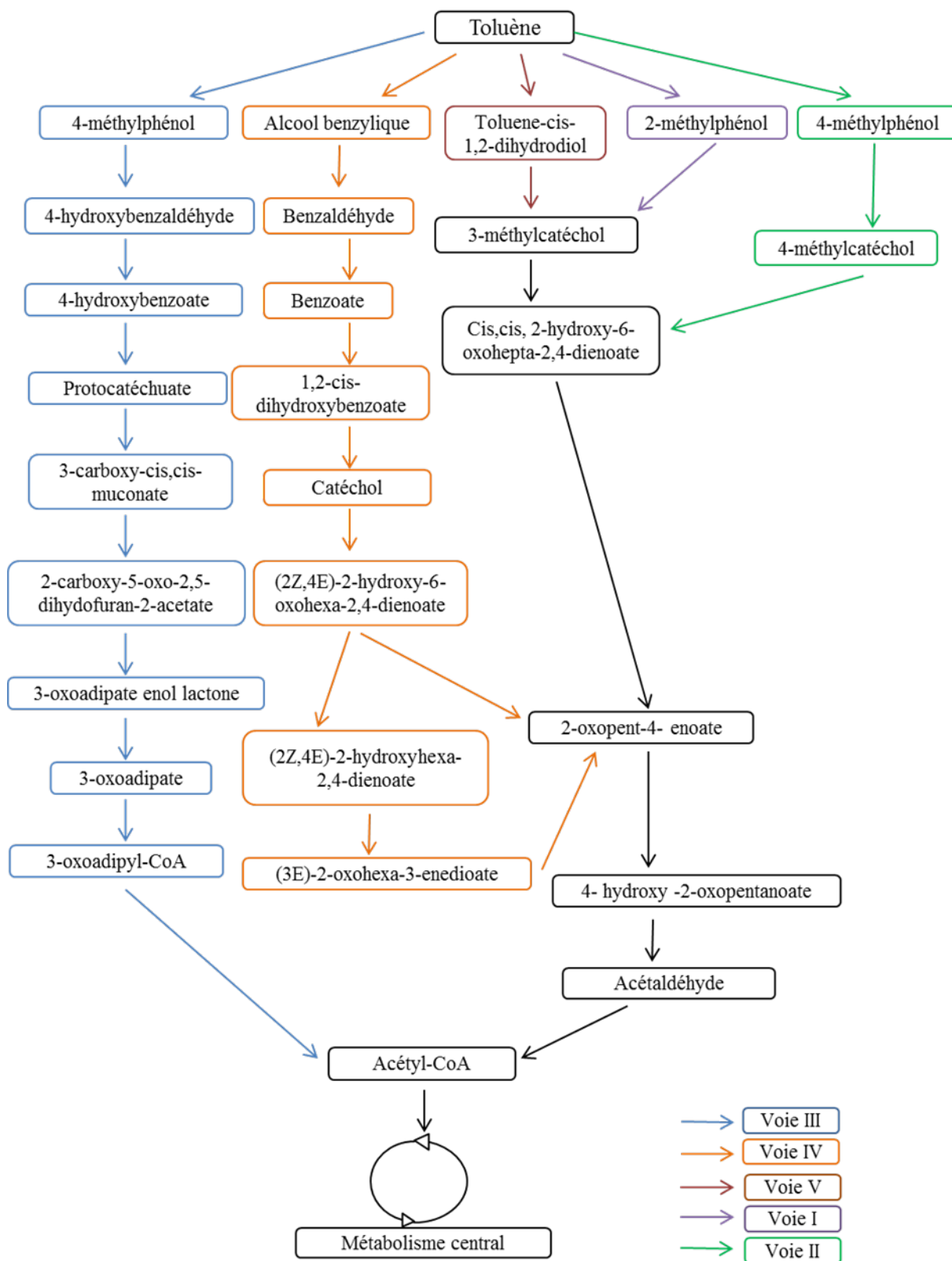


Figure 10. Voies de dégradation aérobies du toluène (INRS³, 2008)

³ (INRS) Fiches toxicologiques de l'Institut National de Recherche et Sécurité, 2008.

<http://www.inrs.fr/>.

2.6.2.3. Ethylbenzène

La dégradation aérobie de l'éthylbenzène se fait par deux voies (**Figures 11 et 12**). La première, retrouvée chez certaines souches de *Pseudomonas sp.*, implique une dioxygénation du toluène par une éthylbenzène dioxygénase (**Gibson et al., 1973**). Dans cette voie, le cycle aromatique sera clivé par une 2,3-dihydroxyéthylbenzène 1,2-dioxygénase. Le composé formé entrera dans la voie de dégradation du benzoate.

La deuxième voie, rencontrée chez *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 permet l'oxydation de l'éthylbenzène par une naphthalène dioxygénase (**Choi et al., 2013**). Deux différents composés pourront être formés le styrène ou le 1-phénétyl alcool. Le styrène entrera dans la voie de dégradation du styrène et le 1-phénétyl alcool sera converti soit en 2-hydroxyacétophénone (via une naphthalène dioxygénase) ou en benzoylacétate (via une acétophénone carboxylase). Le benzoylacétate donnera soit du benzoyl-CoA qui entrera dans la voie de dégradation du benzoate, ou soit de l'acétyl-CoA, qui entrera dans le métabolisme du pyruvate.

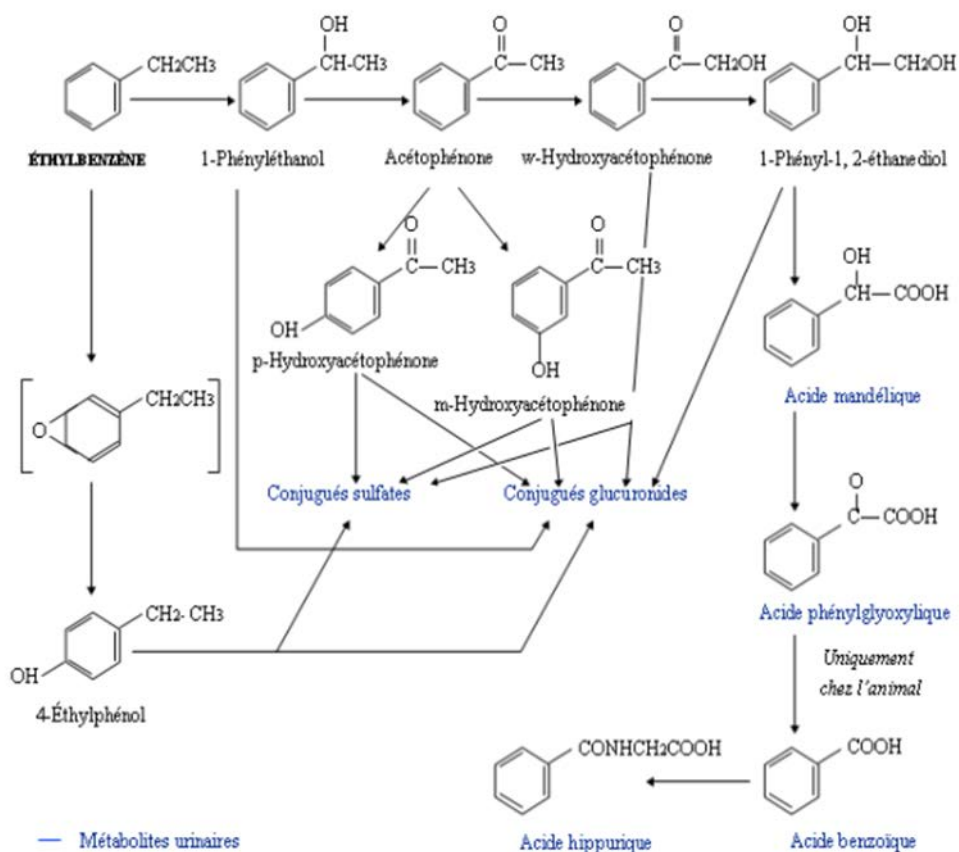


Figure 11. Métabolisme de l'éthylbenzène (INRS 2007b).

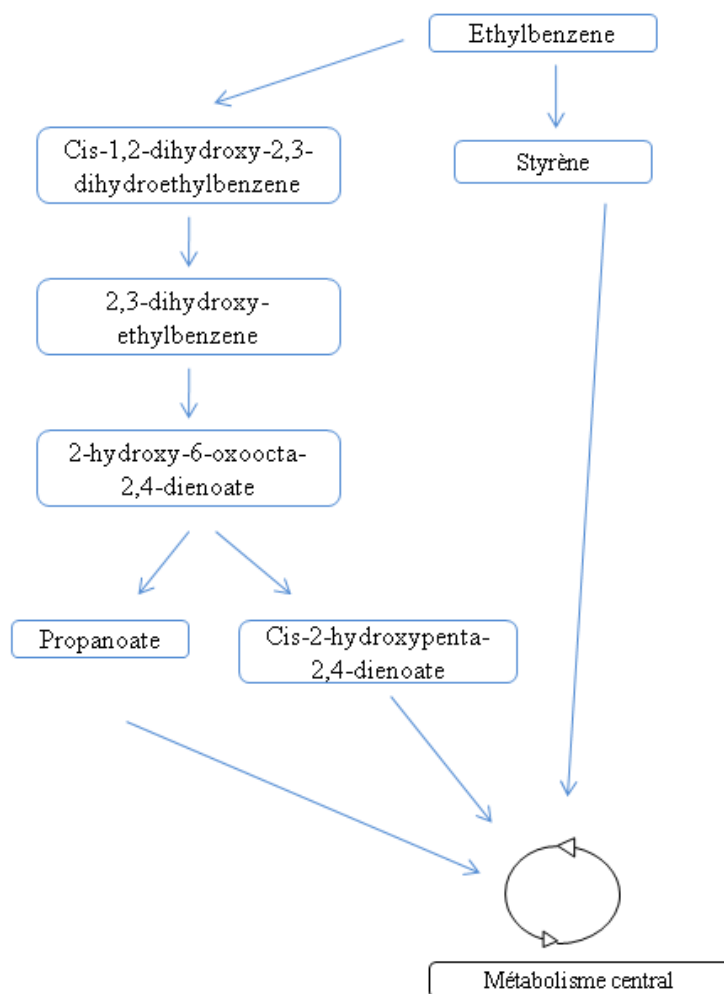


Figure 12. Voies de dégradation aérobie de l'éthylbenzène (INRS 2007b⁴).

2.6.2.4. Xylène

Chez *Pseudomonas putida* mt-2, les enzymes responsables de la dégradation du xylène sont présentes sur le plasmide TOL pWW0 où se trouvent également les enzymes de la voie de dégradation IV du toluène (Worsey et Williams, 1975). Des xylènes monooxygénases prennent en charge les *m*- *o*- et *p*-xylène pour former du 3- 2- et 4- méthylbenzylalcool (Figure 13). Plusieurs réactions de déshydrogénation ont lieu pour former soit du 3-méthylcatéchol (provenant du *o*- et *m*- xylène) soit du 4-méthylcatéchol (provenant du *p*-xylène) (Gibson *et al.*, 1974). Par la suite, ces 2 composés sont métabolisés comme décrit dans les voies de dégradation I, II et V du toluène.

⁴ INRS (Institut national de recherche et de sécurité) (2007b). Fiche toxicologique FT 50 (éthylbenzène), Paris.

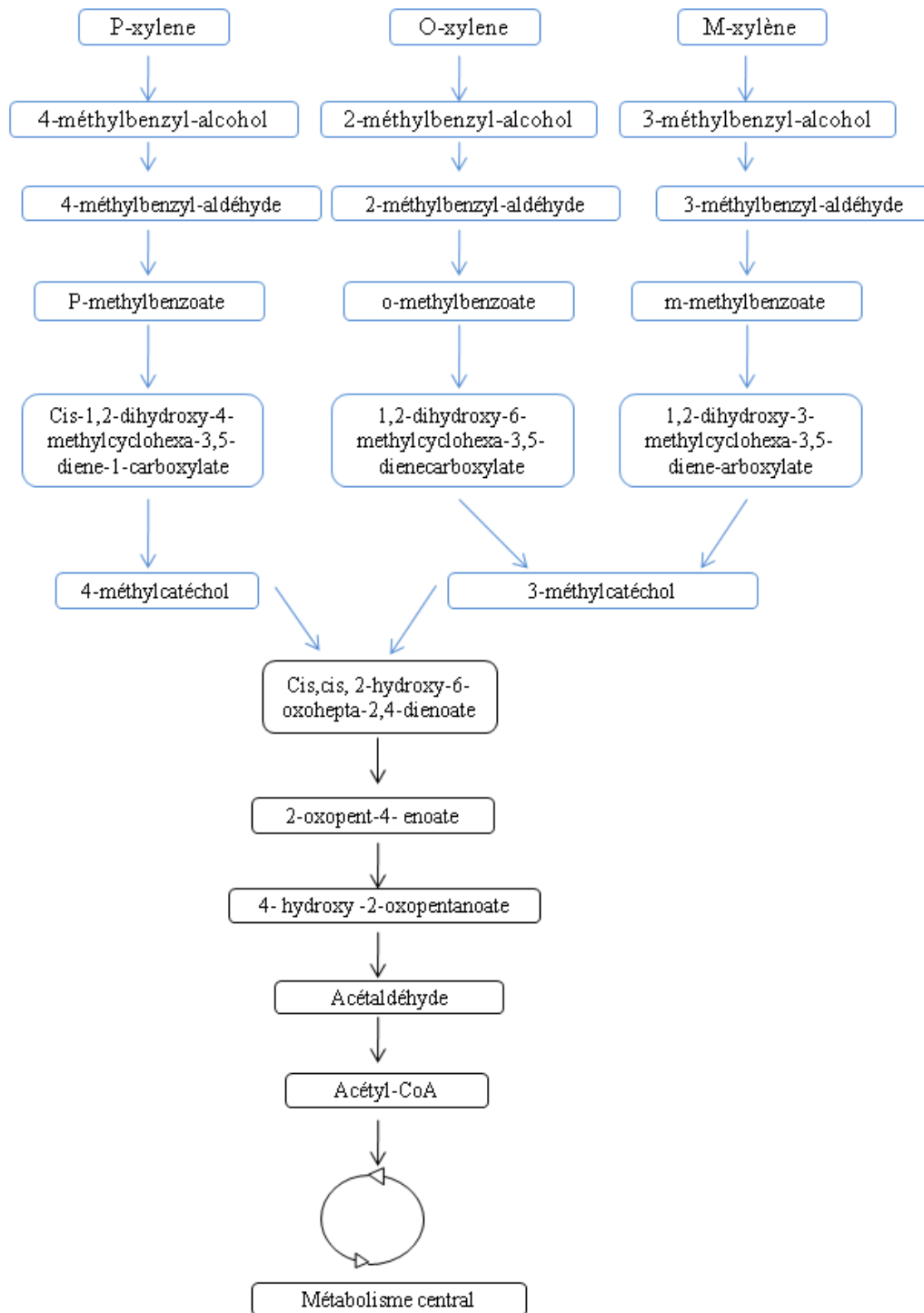


Figure 13. Voies de dégradation aérobies des différents isomères de xylène (INRS, 2008).

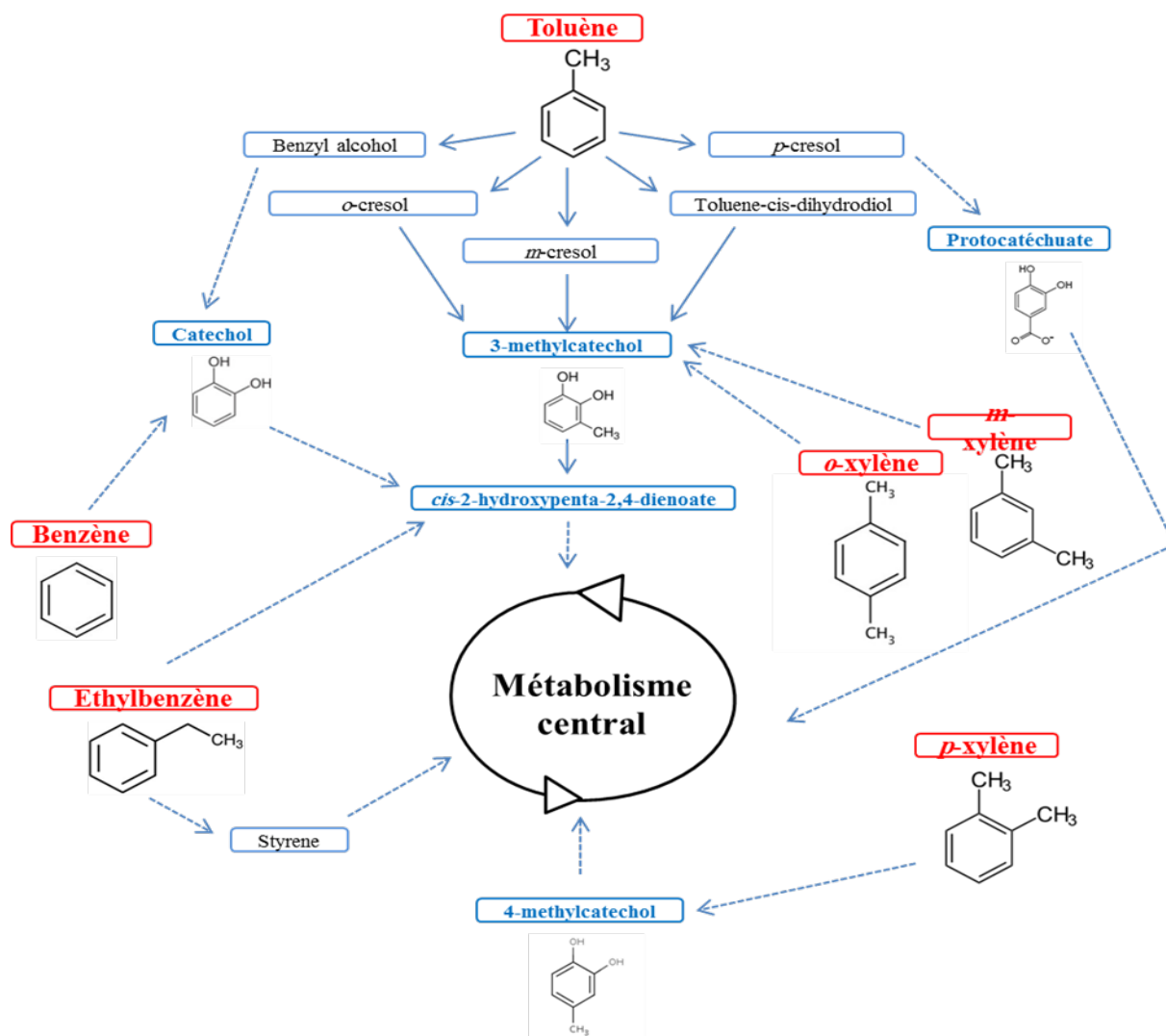


Figure 14 : Schéma général des voies de dégradation aérobies des différents BTEX. Les BTEX (en rouge) sont clivés pour donner des composés de type catéchol (ou dérivés) (en bleu) puis transformés en intermédiaires du métabolisme central. Les flèches pleines représentent une seule réaction ; à l'inverse les flèches en pointillées représentent plusieurs étapes avec plusieurs intermédiaires.

2.7. Voies de dégradation anaérobies des BTEX

Lors de la dégradation anaérobie, les BTEX sont utilisés comme donneurs d'électrons afin de produire l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire.

2.7.1. Benzène

Trois voies de dégradation anaérobies du benzène ont été décrites. La différence majeure entre ces trois voies correspond à la première étape de dégradation. Il peut s'agir d'une hydroxylation (**Chakraborty et Coates, 2005**), d'une carboxylation (**Phelps et al., 2001**) ou

d'une méthylation du benzène (Ulrich *et al.*, 2005) ; les trois menant à la formation de benzoyl-CoA qui sera dégradé en CO₂.

2.7.2. Toluène

Le toluène peut être biodégradé en présence de nitrate, de Fe(III), de sulfate ou de CO₂ comme accepteur final d'électrons par la voie de dégradation *bss*. (Chakraborty and Coates 2004). La première étape de cette voie correspond à l'addition de fumarate au toluène pour former du benzylsuccinate par la benzylsuccinate synthase (*bssABC*) (Leuthner *et al.*, 1998). Le benzylsuccinate est par la suite activé en CoA-thioester par une succinyl-CoA-dépendant CoA-transférase (*bbsEF*), et le benzylsuccinyl-CoA est converti en succinyl-CoA et benzoyl-coA. La dégradation du benzoyl-CoA est initiée par la benzoyl-CoA réductase (*bcrCABD*) et sera dégradé par la suite en CO₂.

2.7.3. Ethylbenzène

Deux voies de dégradation anaérobies ont été décrites pour l'éthylbenzène, en présence de nitrates et de sulfates. La première est semblable à la voie *bss* décrite pour le toluène. Dans cette voie, l'ajout du fumarate sur le groupement éthyle permet la formation du 1-phényléthylsuccinate (Kniemeyer *et al.*, 2003).

Dans la seconde voie, une éthylbenzène deshydrogénase va oxyder le groupement méthyle en absence d'oxygène pour donner du (S)-1-phényléthanol puis de l'acétophénone. L'acétophénone sera carboxylé pour donner du benzoylacetate qui sera converti en benzoylacétylCoA puis en benzoyl-CoA (Ball *et al.*, 1996).

2.7.4. Xylène

En anaérobie, les trois isomères de xylène peuvent être dégradés en présence de fer, de sulfates et de nitrates par la voie de dégradation *bss* décrite pour le toluène (Krieger *et al.*, 1999). La première étape de dégradation consiste à l'addition de fumarate sur l'un des deux groupements méthyles pour former du 2-, 3-, ou 4-méthylbenzylsuccinate grâce à une méthylbenzylsuccinate synthase. La dégradation de ces isomères mène également à la formation d'un dérivé de benzoyl-CoA.

2.8. Rôle des microorganismes dans la biodégradation des BTEX

Il a été montré que les BTEX pourraient être biodégradables dans l'eau (Leahy et Colwell, 1990), dans les sédiments (Sotsky *et al.*, 1994), dans le sol (Hui Li *et al.*, 2012) et dans les environnements de modérée à forte salinité (Nicholson and Fathepure, 2005). La biodégradation de ces polluants par des bactéries aérobies et anaérobies a été étudiée pendant au moins deux décennies. (Edwards *et al.*, 1992 ; Deeb et Alvarez-Cohen, 2000 ; Liou *et*

al., 2008 ; Sander Weelink *et al.*, 2010 ; Hui Li *et al.*, 2012). Au début des investigations sur la biodégradation de ces xénobiotiques, plusieurs travaux portait sur la biodégradation des composants des BTEX pris individuellement (Edwards *et al.*, 1992 ; Radniecki *et al.*, 2008). Cependant, les BTEX sont connus pour se produire sous forme de mélange dans les sites contaminés. Ainsi, pour des applications en bioremediation, un microorganisme qui dégrade simultanément tous les composants de BTEX est plus intéressant qu'un organisme qui ne dégrade que certains de ces composés (Yadav et Reddy, 1993).

2.9. Biodégradation des BTEX par les microorganismes autres que les actinomycètes

D'après la littérature, la plupart des travaux qui concernent la biodégradation des BTEX sont rapportés sur les espèces du genre *Pseudomonas* citons : *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas thivervalensis* MAH1 (Lin *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008 ; Hassen *et al.*, 2014 ; Dan Qu *et al.*, 2015) ou d'espèces proches tels que *Ralstonia* sp., *Ralstonia pickettii* et *Burkholderia* (Kato *et al.*, 1996 ; Ryan *et al.*, 2007 ; Ridgway *et al.*, 1990). *Pseudoxanthomonas spadix* strain BD-a59 (Choi *et al.*, 2013).

Des études rapportent la capacité d'autres bactéries à dégrader les BTEX comme *Moraxella* sp. (Hogx et Jaenicee, 1972), *Alcaligenes denitrificans* et *Micrococcus* sp. (Weber et Corseuil, 1994), *Escherichia coli* strain DH5a (Morlett-Chavez *et al.*, 2010), *Thermus* sp. (Chen et Taylor, 1997), *Flavobacterium* sp. (LU Si-jin *et al.*, 2006). *Dechloromonas* strain RCB (Chakraborty *et al.*, 2005), *Planococcus* sp. strain ZD22 (Li *et al.*, 2006), *Marinobacter vinifirmus* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Berlendis *et al.*, 2010). *Bacillus sphaericus* (MTCC 8103) (Rahul *et al.*, 2013), *Yarrowia* sp., *Acinetobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Sphingomonas* sp. (Jo *et al.*, 2008), *Achromobacter xylosoxidans* (Nielsen *et al.*, 2006).

Quelques espèces fongiques peuvent aussi dégrader ces composés il s'agit du basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* (Yadav et Reddy, 1993), *Cladosporium sphaerospennum* (Weber *et al.*, 1995), *Cladophialophora* sp. T1 et *Cladophialophora psammophila* (Prenafeta-Boldù *et al.*, 2002 ; Badali *et al.*, 2011) et *Paecilomyces variotii* CBS115145 (Garcia-Pena *et al.*, 2008), *Paecilomyces variotii* CBS115145 (Garcia-Pena *et al.*, 2008).

La dégradation du benzène a été signalée également chez les archées isolés d'un sol hypersalin côte du Golfe Persique utilisent le benzène comme seule source de carbone à 26% de salinité (Al-Mailem *et al.*, 2010).

Plus récemment, les études sur la dégradation du mélange BTEX ont recours à des consortiums microbiens (**Littlejohns et Daugulis, 2008**).

L'utilisation des cultures mixtes peut-être nécessaires pour la minéralisation complète des BTEX. Des études antérieures ont rapporté des modèles d'interaction complexes au cours de la biodégradation des BTEX en utilisant des cultures mixtes et/ou pures (**Jo et al., 2008**).

Oh et son collaborateur ont décrit les propriétés métaboliques complémentaires d'un consortium de deux membres, *P. putida* PPO1 et *P. putida* ATCC 33015. La souche PPO1 suit la voie de TOD pour consommer le toluène et le benzène, tandis que la souche ATCC 33015 suit la voie de TOL pour consommer le toluène et le p-xylène seulement. Cependant, lorsque les deux souches ont été utilisées conjointement en quantités égales, tous les trois composants ont été complètement éliminés (**Oh et Bartha, 1997**). Un autre rapport a montré des résultats similaires, dans lequel une co-culture de deux *P. putida* isolée n'était pas en mesure d'utiliser o-xylène; Cependant, lorsque les deux cultures ont été mélangées ensemble, tous les composés BTEX ont été dégradés collectivement avec un co-métabolisme amélioré du o-xylène (**Attaway et Schmidt, 2002**). Liu et ses collaborateurs ont évalué un des cultures pures et mixtes sur la dégradation du benzène. Les souches bactériennes de culture pure (L4, N3 et N6) ont été isolées à partir de boues d'hydrocarbures et identifiées comme *Bacillus* sp. Les investigations ont montré que les cultures des souches (L4 + N3) mélangées présentaient une grande efficacité dans la dégradation du benzène que tout autre mélange ou culture unique et la dégradation a été totale (**Liu et al., 1998**). Il est évident que dans ce cas, un mélange de deux souches bactériennes a amélioré l'efficacité de la dégradation du benzène. **Deeb et Alvarez-Cohen** ont expliqué les potentiels de minéralisation de cultures mixtes et pures. Deux isolats de leur étude ont présenté un modèle de biodégradation qui était un sous-ensemble de celui présenté par la culture mixte. Cela a été attribué soit à la présence de différentes espèces microbiennes avec un certain nombre de voies métaboliques ou à des interactions interspécifiques (**Deeb et Alvarez-Cohen, 2000**). *P. putida* F1 souche FMB08 et *Escherichia coli* souche DH5a ont été utilisées dans un consortium pour la dégradation des BTEX dans un réacteur batch (**Morlett-Chavez et al., 2010**).

Par conséquent, les cultures mixtes peuvent être plus efficaces que les cultures pures dans des systèmes de traitement biologique pour la biodégradation complète des mélanges des hydrocarbures à plusieurs composants.

2.10. Biodégradation des BTEX par les actinomycètes

Selon la littérature, les actinomycètes semblent avoir plus d'affinité pour les hydrocarbures aliphatiques et les composés cycloalkyle phényl- ou substitués par un résidu de longueur de chaîne variable d'alkyle (**Bouchez-Naitali et al., 1999**). Ce n'est pas surprenant étant donné que les BTEX sont des composés volatils et le manque d'activation de l'oxygène ou de l'anion nitrate rendant ainsi ces composés moins stables et résistants à la biodégradation.

La biodégradation du mélange BTEX par les actinomycètes est moins rapportée à ce jour. Elle se limite à quelques genres comme *Rhodococcus* (**Kim et al., 2002**), dont les espèces, *Rhodococcus rhodochrous* et *Rhodococcus pyridinovorans* (**Deeb et Alvarez-Cohen, 1999 ; Jung et park, 2004**), *Mycobacterium cosmeticum* byf-4 (**Zhang et al., 2013**), *Nocardia* sp. et *Arthrobacter* sp. (**Weber et Corseuil, 1994**), *Gordona alkanivorans* CC-JG39 (**Lin et al., 2005**) et *Streptomyces* sp. (**Djokic et al., 2011**).

3. Généralités sur les pesticides

3.1. Définition

Le mot pesticide dérive du Latin *pestis* (fléau, calamité), et *cidere* (tue) (**De Cormis, 1994**). Les pesticides sont des produits chimiques utilisés en agriculture pour détruire des ravageurs, les plantes adventices et les agents phytopathogènes (**OMS, 1991**). Selon la **FAO (1986)**, un pesticide est une substance, ou un mélange de substances, utilisé pour empêcher d'agir, détruire ou neutraliser un ravageur, un vecteur de maladie humaine ou animale, une espèce végétale ou animale nocive.

Les raisons motivant l'utilisation de ces produits sont simples. En fait, en agriculture, l'utilisation des pesticides assure une meilleure stabilité du rendement. Une autre raison importante motivant l'utilisation des pesticides est de réduire la perte des récoltes par les maladies fongiques, les insectes et les rongeurs lors de leur entreposage. Finalement, l'utilisation de pesticides pour la protection des bâtiments agricoles et des matériels d'élevage est la dernière utilisation d'importance de pesticides en agriculture (**Calvet *et al.*, 2005**).

3.2. Classification

Devant le nombre considérable de pesticides (plus de 20000 produits de pesticides avec presque 900 substances actives sont utilisés comme herbicides, insecticides, fongicides, rodenticides, miticides, préservatifs de bois, fumigène, et régulateurs de croissance des plantes) (**Weiss *et al.*, 2004**), les fabricants et utilisateurs les classent suivant la nature de l'espèce nuisible contre laquelle ils sont destinés. Les trois principales classes sont :

3.2.1. Les insecticides : sont destinés à détruire les insectes nuisibles ; ils se répartissent en trois grands groupes selon leur nature chimique : substances minérales, molécules organiques d'origine naturelle ou produits organiques de synthèse. Les insecticides appartiennent à trois grandes familles chimiques : les organophosphorés (diméthoate, malation,...), les carbamates (aldicarbe, carbofuran, et les pyréthrinoïdes de synthèse (bifenthrine, perméthrine,...).

3.2.2. Les fongicides : servant à combattre la prolifération des champignons phytopathogènes. Ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés. Le mildiou de la pomme de terre, celui de la vigne, les charbons et les rouilles des céréales, représentait autrefois de véritables fléaux. Les plus anciens fongicides connus sont des sels cupriques, le soufre et certains de ses dérivés minéraux. Depuis plusieurs décennies, les composés organiques représentent la part la plus importante : carbamates (carbendazine, mancozèbe,...), triazoles (bromuconazole,

triticonazole,...), dérivés du benzène (chlorothalonil, quintozone), dicarboximides (folpel, iprodione,...).

3.2.3. Les herbicides : ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Ils appartiennent à plus de 35 familles chimiques différentes. Les plus représentées sont les carbamates (chlorprophame, triallate,...), les urées substituées (diuron, chlortoluron,...), les triazines (atrazine, simazine,...), les chlorophenoxyalcanoïques (2,4-D, MCPA,...), les amides (alachlore, propyzamide,...).

On distingue en outre :

3.2.4. Les acaricides : contre les acariens.

3.2.5. Les nématicides : toxiques pour les vers du groupe des nématodes.

3.2.6. Les rodenticides : contre les rongeurs.

3.2.7. Les taupicides : contre les taupes.

3.2.8. Les molluscicides : contre les mollusques, limaces, escargots.

3.2.9. Les corvicides et les corvifuges : contre les corbeaux et les oiseaux ravageurs de culture.

3.3. Modes d'application des pesticides et dispersion dans l'environnement

Les pesticides peuvent être appliqués en traitement aérien, en traitements de sol mais également en traitement de conservation post-récolte (**De Cormis, 1994**). Ils sont appliqués le plus souvent sous la forme de liquides pulvérisés sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas, ils sont incorporés au sol ou y sont injectés ou sont déposés sous forme de granulés, ou encore les graines en sont enrobées (**Pimentel et Levitan, 1986**). La contamination de l'atmosphère par les pesticides survient soit au moment du traitement, soit après leur application (**Barneaud, 2002**).

Les pesticides dès leur application dans l'environnement, vont être soumis à de nombreux processus qui vont contribuer à leur dissipation. Ces principaux mécanismes sont présentés dans **figure 15**.

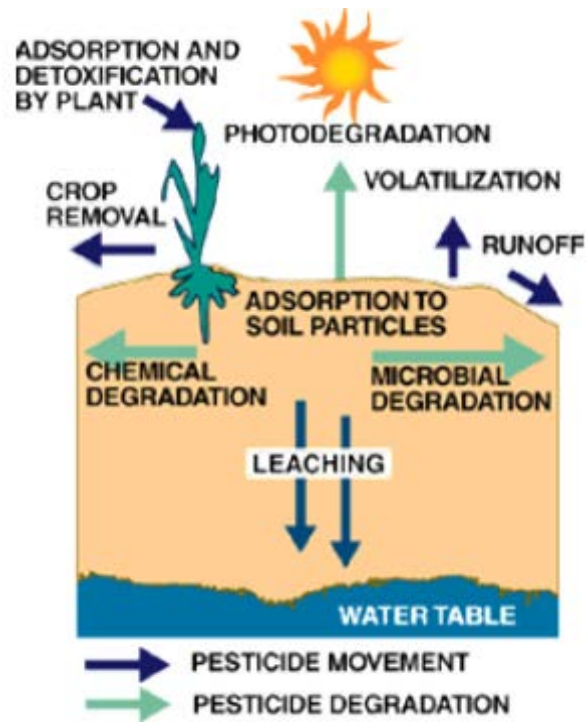


Figure 15. Schéma du devenir des pesticides dans l'environnement (**Wyoming Department of Agriculture**).

Malheureusement, une très grande partie des pesticides répandus n'atteint pas leur cible. Une partie importante des pesticides répandus est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou des sols sur lesquels ils ont été répandus (**Fenske et al., 2002**). En effet dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides commencent à disparaître : ils sont dégradés ou sont dispersés. Les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines, être absorbées par des plantes ou des organismes du sol ou rester dans le sol. Le ruissellement emporte durant la saison en moyenne 2% d'un pesticide appliqué sur le sol, rarement plus de 5 à 10% (**Schiavon et al., 1995**) ; les pertes par lessivage sont généralement moins importantes (**Schiavon et al., 1995**). En revanche, les pertes par volatilisation sont de 80 à 90% du produit appliqué, quelques jours après le traitement (**Taylor et Spencer, 1990**).

En conclusion la part qui entre en contact avec les organismes indésirables cibles ou qu'ils ingèrent est minime. La plupart des chercheurs l'évaluent à moins de 0,3%, ce qui veut dire que 99,7% des substances déversées s'en vont ailleurs (**Pimentel, 1995**).

3.4. Impact de l'utilisation des pesticides

L'utilisation de pesticides a montré ses avantages notamment dans l'augmentation des rendements de production par l'élimination ou la réduction des prédateurs des cultures.

Toutefois, derrière ces bienfaits, se cachent des effets insidieux dont les méfaits sur l'environnement (l'atteinte à la biodiversité, les déséquilibres de la faune et la résistance des cibles visées), la qualité des produits agricoles, et sur la santé des populations (**Brévault et al., 2008**).

On estime que 2,5 millions de tonnes de pesticides sont appliqués chaque année sur les cultures de la planète (**Pimentel, 1995**), cette utilisation a un impact gravissime sur la santé humaine car selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) il y a chaque année dans le monde un million d'empoisonnements graves par les pesticides, à l'origine d'environ 250 000 décès par an (**Cherin et al., 2012**).

Ces pesticides risquent d'engendrer une contamination ponctuelle ou diffuse dans l'environnement. Cette pollution diffuse semble être la source dominante d'apport de pesticides vers les eaux de surface et souterraines (**Gilliom et al., 2006**).

Leur impact dépend à la fois de leur mode d'action (certains sont beaucoup plus toxiques que d'autres), de leur persistance dans le temps (certains se dégradent rapidement que d'autres) et de leurs sous-produits de dégradation, lesquels sont parfois plus toxiques et se dégradent moins vite que la molécule mère (**Forman, 2002**).

3.4.1. Impact sur l'environnement

L'impact des pesticides sur l'environnement varie en fonction d'un grand nombre de facteurs dont :

- la persistance du pesticide dans l'environnement (durée de demi-vie)
- le temps d'exposition, la dose et la toxicité
- la sensibilité relative des organismes ou de l'écosystème exposés
- l'âge de l'organisme exposé

Les pesticides peuvent donc être responsables de pollutions diffuses chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur épandage sur les surfaces agricoles mais également lors de leur fabrication, transport ou élimination (**Margni et al., 2002**).

3.4.1.1. Contamination de l'air par les pesticides : la volatilisation et la dérive

Divers processus conduisent à la contamination de l'atmosphère par les pesticides. Lors de la pulvérisation liquide de pesticides, seule une partie de la quantité épandue atteint réellement la cible visée.

- **La dérive**

La proportion de pesticides qui passe dans l'atmosphère lors du traitement correspond à la dérive, encore appelée « spray-drift » (microgouttelettes emportées par les masses d'air) (**Van**

Der Werf et Zimmer, 1998). La dérive dépend principalement des conditions de pulvérisation, de la couverture végétale et des paramètres météorologiques (**Barneaud, 2002**).

- **La volatilisation**

C'est un passage de la phase aqueuse à gazeuse. Elle est essentiellement liée aux propriétés chimiques des molécules (**Van Der Werf et Zimmer, 1998**). Les conditions climatiques interviennent également dans ce processus, l'augmentation de la température ou du vent accroissent la volatilisation (**Klöppel et Kördel, 1997**).

3.4.1.2. Contamination de l'eau : lessivage et ruissèlement

- **Processus de transfert vers les eaux souterraines : le lessivage (lixiviation)**

Le processus de lessivage des pesticides correspond au transfert des molécules de la surface du sol, ou des couches superficielles du sol, vers les eaux de profondeur (nappe phréatique), soit de la zone non saturée à la zone saturée du sol. Ce transfert se fait essentiellement via la dilution des pesticides dans la solution du sol (**Delphin et Chapot, 2006**). Lorsque l'eau s'infiltré, elle entraîne avec elle les matières actives dissoutes dans la solution du sol ou sous forme colloïdale (**Calvet et al., 2005**). Ce transfert s'effectue sous l'action de trois processus majeurs : la diffusion moléculaire, la convection et la dispersion hydrodynamique (**Calvet et al., 2005**).

Par ailleurs, les méthodes développées pour limiter le lessivage des matières actives reposent sur l'épandage de matière organique en surface ou incorporée dans le sol (**Marín-Benito et al., 2013**). Les transferts par lixiviation peuvent également donner lieu à des redirections latérales en lien avec un fort contraste de perméabilité dans le sol ou la présence d'un réseau de drainage.

- **Processus de transfert vers les eaux de surface : le ruissellement**

Le ruissellement est défini comme l'eau et toutes les matières dissoutes ou en suspension qu'elle contient en quittant en surface, la parcelle, le champ ou le petit bassin versant. Concernant les pesticides, Les pesticides présents dans les premiers centimètres du sol peuvent être transférés par l'eau sous forme dissoute ou particulaire (associés aux particules de sol entraînées). Le transfert par ruissellement va dépendre à la fois de l'état hydrique du sol, des propriétés hydrauliques de celui-ci, de l'intensité de la pluie et des caractéristiques des matières actives (**Gril et al., 1999**).

3.4.1.3. Impact des pesticides sur le sol : la rétention

La rétention des pesticides dépend des propriétés des pesticides (K_d , K_{oc}) mais également des propriétés du sol (taux de matière organique, taux d'argiles,...). La rétention des pesticides dans le sol est un processus cinétique au même titre que la dégradation qui débute

avec l'application du pesticide et se poursuit jusqu'à atteindre un niveau de rétention seuil (Schiavon, 1988).

3.4.2. Impact des pesticides sur la faune sauvage

De nombreux pesticides sont toxiques pour les insectes bénéfiques, les oiseaux, les mammifères, les amphibiens ou les poissons. L'empoisonnement de la faune sauvage dépend de la toxicité d'un pesticide, de la quantité appliquée, de la fréquence, du moment et de la méthode de pulvérisation (par exemple, la pulvérisation fine a tendance à être emportée par le vent), du climat, de la structure de la végétation et du type de sol. Les insecticides, rodenticides, fongicides (pour le traitement des semences) et les herbicides, encore plus toxiques, menacent la faune sauvage qui y est exposée (Isenring, 2010).

3.4.3. Impact sur la santé humaine

De manière générale, nombre de pesticides sont classés CMR : cancérogènes, mutagènes (toxique pour l'ADN) ou reprotoxiques (nocifs pour la fertilité). Certaines de ces substances chimiques sont suspectées dans plusieurs maladies émergentes en lien avec le dérèglement du système hormonal : diabète de type 2, obésité, cancers hormonodépendants (sein, prostate, thyroïde) et troubles neuro-comportementaux (troubles de l'attention, hyperactivité, etc.). Sans compter l'autisme ou les atteintes au développement du cerveau, avec des conséquences sur les capacités cognitives. La maladie de Parkinson, enfin, a été reconnue en 2012 maladie professionnelle en lien avec les pesticides.

Si les effets des intoxications aiguës sont assez bien connus, les conséquences à long terme, suite à des expositions chroniques, le sont beaucoup moins (Multigner, 2005).

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion ou inhalation. Les effets peuvent être bénins à mortels (Mollier *et al.*, 2010). Le niveau de toxicité dépend de plusieurs facteurs, le plus important étant les caractéristiques chimiques du pesticide en question (Giroux, 2004).

3.4.3.1. Toxicité aiguë

Il s'agit d'une toxicité induite par une exposition ponctuelle à une dose importante de pesticides, susceptibles d'entraîner des effets immédiats ou rapprochés (manipulation de produits non dilués...).

La toxicité aiguë des pesticides résulte d'une mauvaise utilisation, d'un usage accidentel des pesticides (accidents domestiques) ou d'une intoxication volontaire souvent gravissime. Les pesticides organophosphorés et les carbamates sont à l'origine des cas d'empoisonnements par les pesticides les plus fréquents. (Cherin *et al.*, 2012).

Les symptômes les plus souvent associés à une intoxication aiguë aux pesticides sont les lésions, les irritations, les maux de tête, les nausées, les vomissements, la fatigue, les étourdissements, les troubles neurologiques et la perte d'appétit (**Giroux, 2004**).

3.4.3.2. Toxicité chronique

Il s'agit de la toxicité induite par une exposition prolongée à de petites quantités de substances incriminées et à leur accumulation dans l'organisme pouvant dépasser le seuil de concentration toxique. Les effets chroniques (faibles doses à long terme) apparaissent généralement après un délai d'une durée de quelques jours à quelques années suite à une exposition aux pesticides (**Giroux, 2004**).

La toxicité chronique peut provoquer différents problèmes de santé : cancers, problèmes de reproduction et de développement, affaiblissement du système immunitaire, troubles neurologiques et perturbation du système endocrinien (**Weinberg, 2006**).

3.5. La lutte contre les pesticides

La dépollution des sites contaminés est une préoccupation majeure, en raison d'une part, de l'impact de cette pollution sur l'environnement et la santé, liée notamment à la propagation des molécules dangereuses dans le milieu et leur transfert dans les nappes phréatiques et dans la chaîne alimentaire, et d'autre part des coûts exorbitants engendrés par les projets de réhabilitation qui exigent souvent l'excavation des sols et le transport onéreux des terres vers les installations de dépollution. Au cours des vingt dernières années on a assisté à une augmentation spectaculaire de l'intérêt pour les mécanismes de biodégradations orientées vers la protection de l'environnement (**Roger et Jacq, 2000**).

3.5.1. La dégradation

La dégradation est un processus clé dans le devenir des pesticides dans le sol. Elle est due à de nombreuses transformations abiotiques (physico-chimiques) ou biotiques (biologique). Ces modifications peuvent être partielles, par l'élimination d'un groupe fonctionnel ou complète jusqu'à la production de molécules minérales (la minéralisation) (**Calvet *et al.*, 2005**). Lorsque la transformation est partielle elle se traduit par l'apparition de nouvelles molécules : les métabolites, aux propriétés différentes des molécules mères (**Yaron, 1989**).

Normalement la dégradation biologique dans les sols est quantitativement plus importante que les transformations abiotiques, mais ces dernières peuvent être plus importantes pour certains polluants particulièrement récalcitrants à la biodégradation ou quand l'activité de la microflore du sol est réduite (**Scheneurt, 1992**).

3.5.1.1. La dégradation abiotique

Ce type de dégradation, d'origine chimique et/ou photochimique est le plus souvent considéré comme mineur (**Beestman et Deming, 1974**).

La dégradation abiotique est essentiellement associée à des réactions d'hydrolyse (**Cao et al., 2013**) qui peuvent être induites par les radiations solaires (photodégradation) mais ce processus reste négligeable dans les sols au regard de la biodégradation. Il a été démontré que les processus réactionnels sont généralement catalysés au niveau des surfaces des constituants du sol : argiles, matières organiques et oxydes métalliques (**Senesi, 1993**).

3.5.1.2. La dégradation biologique (la biodégradation)

Malgré la présence de processus abiotiques, la dégradation est dominée par l'activité biologique qui joue un rôle important dans le devenir des matières actives qui composent les pesticides (**Singh & Walker, 2006**). Parmi les nombreux microorganismes impliqués dans la dégradation des pesticides, les plus représentés sont les bactéries et les champignons (**Singh & Walker, 2006**).

Selon leur matériel enzymatique, les microorganismes vont pouvoir dégrader partiellement ou totalement les pesticides présents dans le sol. Parmi les différents mécanismes de transformation, on distingue la dégradation métabolique et la dégradation co-métabolique (**Lucas et al., 2008**).

La dégradation métabolique concerne les organismes qui ont le matériel enzymatique nécessaire pour utiliser la matière active comme source de carbone et/ou d'azote entraînant la dégradation totale du pesticide (**Soulas, 1985**). Dans le cas de la dégradation co-métabolique, les microorganismes utilisent un autre substrat dans le milieu pour dégrader la molécule. Ce processus génère une dégradation partielle du pesticide et entraîne la formation de métabolites (**Soulas, 1985**). Indépendamment des processus impliqués dans la transformation des pesticides, ils vont être influencés par différents facteurs associés aux propriétés de la molécule, aux populations de microorganismes et aux conditions du milieu (**Navarro et al., 2013**).

3.6. Biodégradation des pesticides par les microorganismes autres que les actinomycètes

Plusieurs microorganismes sont décrits dans la littérature dégradant les pesticides. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique est dégradé par différents genres, tels que : *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Mycoplana*, *Flavobacterium*, *Sporocytophaga*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium* (**Chaudhry et**

Chapalamadugu, 1991 ; Ka et al., 1994 ; Fulthorpe et al., 1996 ; Kamagata et al., 1997 ; Vallaeys et al., 1998 ; Macur et al., 2007).

Zanardini et al. (2002) et **Boschin et al. (2003)** ont rapporté des pourcentages de dégradation de l'ordre de 79 et 61% du chloresulfuron et du metsulfuron-méthyle respectivement par le champignon *Aspergillus niger* dans les conditions de laboratoire. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude sur la dégradation du pyrazosulfuron-éthyle connu pour sa haute persistance dans le sol. Cet herbicide peut être dégradé par *A. niger* et *Penicillium chrysogenum* (**Sondhia et al., 2013**). Concernant les bactéries, des espèces de plusieurs genres ont été décrites comme étant capables de dégrader et d'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie, différents pesticides. En effet, **Li-feng et al. (2007)** et **Ma et al. (2009)** ont pu isoler des souches de *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. SW4 et *Pseudomonas* sp. LW3 respectivement) qui dégradent 85% d'ethametsulfuron-méthyle (100mg/L) en seulement 6 jours et 61,3% de chlorimuron-éthyle en 30 jours dans des conditions de laboratoire. *Methylophila* sp. S113 est capable de dégrader plus de 97% de metsulfuron-méthyle (50mg/L) après 72h d'incubation (**Huang et al., 2007**). La souche *Serratia marcescens* N80 isolée d'eau polluée, dégrade 93,6% du nicosulfuron (10mg/L) en seulement 96h. Elle est capable de l'utiliser comme seule source d'azote (**Zhang et al., 2012**).

Des études récentes menées par **Yu et al. (2005)** ont réussi à isoler et caractériser des souches fongiques qui dégradent le chlopyrifos en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie, ils ont également rapporté que ces souches étaient capables de dégrader plus de 80% de cet insecticide.

En Chine, **Xiu et al. (2011)** ont abouti à l'isolement et à la caractérisation d'une souche, *Azospirillum brasilense*, capable de dégrader le cerbendazime, et étaient capables d'utiliser ce fongicide comme seule source de carbone et d'azote. Ces chercheurs avaient mentionné que ce composant est biodégradable par d'autres bactéries comme : *Ralstonia* sp. 1-1, *Pseudomonas* sp, et *Bacillus pumilus* NY97-1.

3.7. Biodégradation des pesticides par les actinomycètes

Les Actinomycètes sont parmi les groupes les plus importants qui dégradent par leurs riches systèmes enzymatiques les substrats les plus complexes et les plus variés parmi les pesticides (**Subhajt, 2012**). Les pesticides de différentes structures chimiques incluant les organochlorines, s-triazines, triazinones, carbamates, organophosphates, organophosphonates, acétanilides et sulfonyleureas sont complètement ou partiellement dégradés par ces bactéries ubiquistes (**De Schrijver et De Mot, 1999**). Le genre *Streptomyces* possède un pouvoir de

dégradation considérable. Il a été démontré que 17 souches, identifiées comme *Streptomyces* sp. ont été capables de dégrader le Diuron, qui est un puissant désherbant (Castillo *et al.*, 2006). plusieurs souches appartenant à ce genre sont capables de dégrader : le lindane, le DDT, la simazine (Anurag *et al.*, 2005 ; Benimeli *et al.*, 2007).

Dans travaux sur les actinomycètes capables de résister à la présence de pesticides, Sept espèces différentes sont capables de vivre normalement en présence de l'insecticide Carbofuran. Il s'agit de *Streptomyces alanosinicus*, *Streptoverticillium album*, *Nocardia farcinia*, *Streptomyces atratus*, *Nocardia vaccini*, *Nocardia amarae* et *Micromonospora chalcea* (Jayabarath *et al.*, 2010).

Certains pesticides persistants comme le Thiocarbamate et le S-triazine peuvent être catabolisés par des actinomycètes appartenant aux genre *Rhodococcus* (De Schrijver et De Mot, 1999).

La souche *Rhodococcus opacus* SAO101 pousse sur les milieux contenant le phénol, 4-nitrophénol, biphényl, naphthalène, dibenzofurane et dibenzo-p-dioxin qui font partie de la composition de certains pesticides (Kimura and Urushigawa, 2001).

La dégradation versatile du genre *Rhodococcus* est due à la présence de larges plasmides linéaires portants des gènes codant pour la dégradation de différents composés (Konig *et al.*, 2004).

Le genre *Nocardia* est efficace dans la dégradation de certains pesticides, tel que : l'herbicide Dalapon (Martin *et al.*, 1998) et le fongicide ortiva (Hocinat et Boudemagh, 2015).

1. Généralités

Les actinomycètes ou Actinobactéries forment un grand groupe de microorganismes procaryotes Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" (G+C%) relativement élevé dans leur ADN (généralement compris entre 60 et 75 mol %) (**Pelmont, 2005**).

Le terme actinomycète a été historiquement introduit pour définir des bactéries filamenteuses et ramifiées (**Waksman et Henrici, 1943**). Les actinomycètes forment des colonies circulaires constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Eunice et prosser, 1983**). Cela explique leur dénomination qui provient de deux substantifs grecs «aktis» et «mykes» et signifie « champignons à rayons» ou « champignons rayonnant». Ils présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a classés parmi les bactéries. En effet, leurs parois ne renferment ni cellulose ni chitine mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives). Le diamètre de leurs mycéliums est plus petit que la plupart des hyphes fongiques (généralement 0,7 à 0,8 μm). Enfin, elles sont sensibles aux antibiotiques antibactériens, aux attaques des bactériophages et des lysozymes. Cependant leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Larpent et Sanglier, 1989**).

1.1. Morphologie et Reproduction des actinomycètes

La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien (**Figure 16**). Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture, ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (**Kalakoutskii et Agre, 1976**). En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (**Pamboukian et al., 2002**). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former enfin les pellets (**Figure 17**).

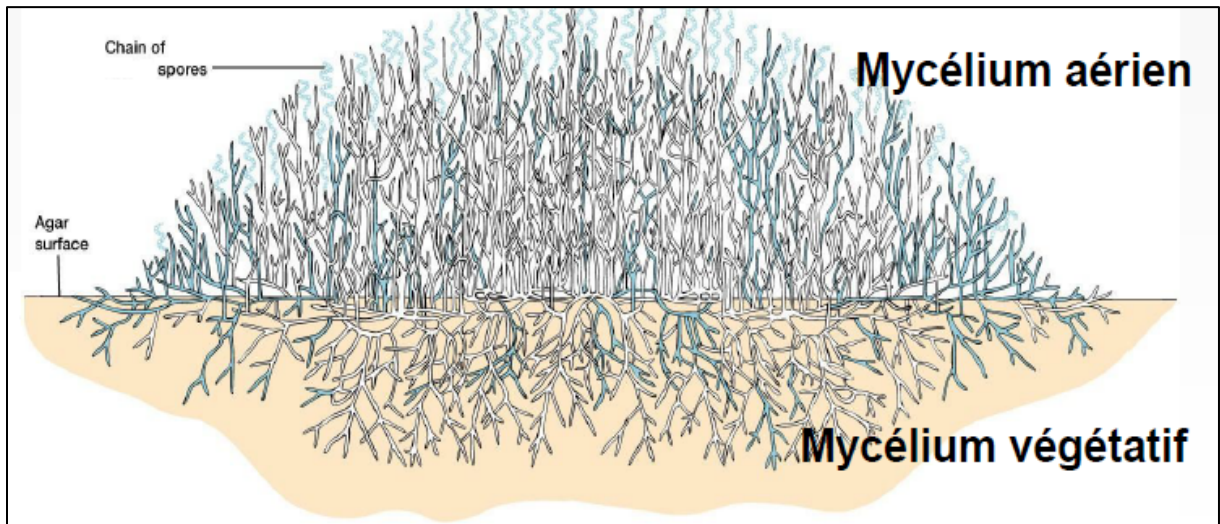


Figure 16. Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Prescott *et al.*, 2003).

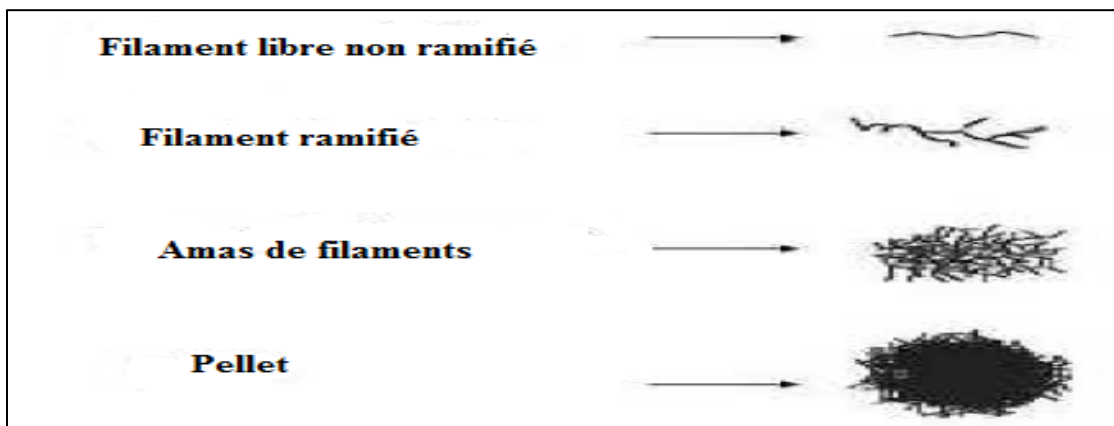


Figure 17. Les morphologies rencontrées de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002).

Le cycle de développement des actinomycètes est très similaire à celui des champignons, à la différence essentielle que ces bactéries demeurent haploïdes durant tout le cycle.

Leur cycle de vie est caractérisé par différents stades de croissance dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce, ce qui amène une grande diversité morphologique. Sur milieu solide, il y aura d'abord la germination d'une spore. Le tube germinatif en croissance se subdivisera en mycélium branché pour former un mycélium végétatif basal (mycélium du substrat) formé d'hyphes non septés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Chez beaucoup d'actinomycètes, à partir de ce mycélium primaire s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien, ce mycélium prend naissance après autolyse du mycélium de substrat (Locci et Sharples, 1984).

En réponse à une limitation de nutriments, à un stress physiologique et/ou à la densité cellulaire, la colonie en formation subira plusieurs changements tels que l'émergence d'un

mycélium aérien dont les extrémités se différencieront en chaînes de spores (**Figure 18**) (**Kieser *et al.*, 2000**). Ainsi, la composition du milieu de culture va influencer la morphologie de la colonie actinobactérienne.

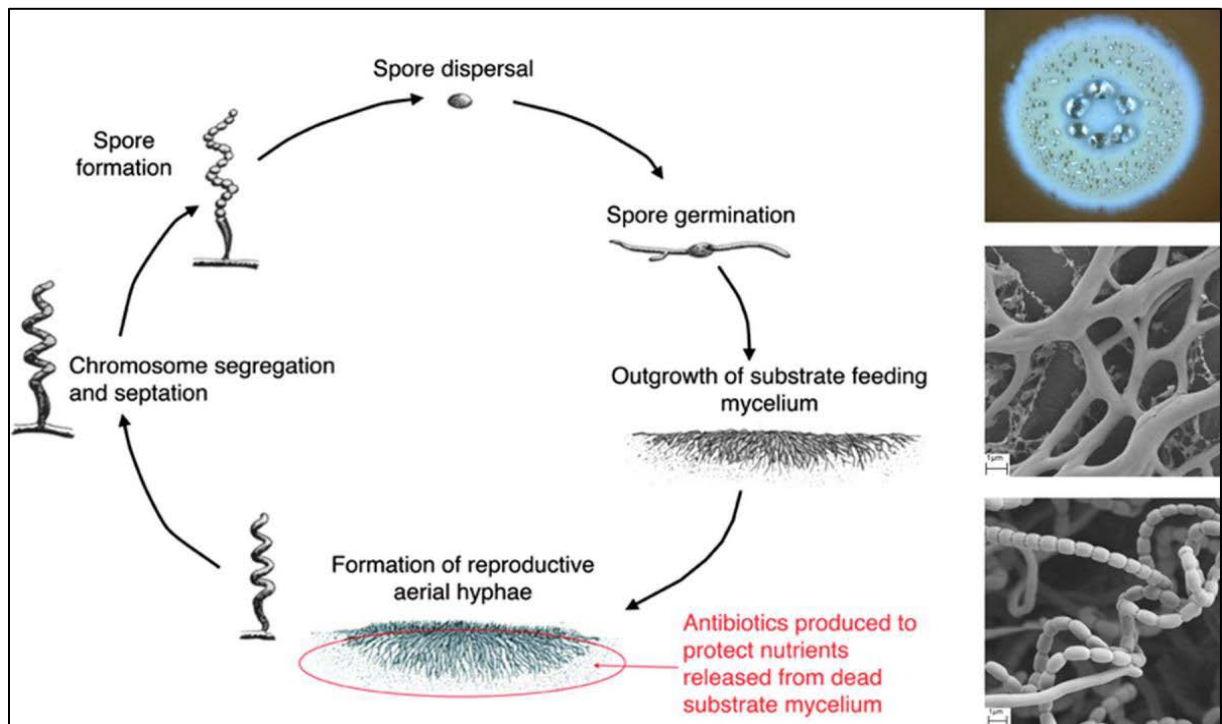


Figure 18. Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (**Breton *et al.*, 1989**).

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu,
- Des colonies pâteuses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides,
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*). D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges tels que le genre *Streptosporangium* (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

Plusieurs de ces bactéries produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Les spores des actinomycètes sont de deux sortes. Les endospores, produites par des actinomycètes thermophiles, proviennent de la cassure de la paroi de l'hyphe. Les Exospores ou les spores de « segmentation » naissent par suite de cloisonnements à l'intérieur des

hyphes (**Waksman, 1959**). D'un genre à l'autre, les spores des actinomycètes s'organisent en diverses structures :

- Les conidies, ce sont des spores asexuées. Elles peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*) ;

- les Sporangies, c'est des sacs contenant des spores. Les sporangies peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles tel que le genre *Streptosporangium* (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

- Les sclérotés trouvés chez le Genre *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés ;

- Les Synnemata, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

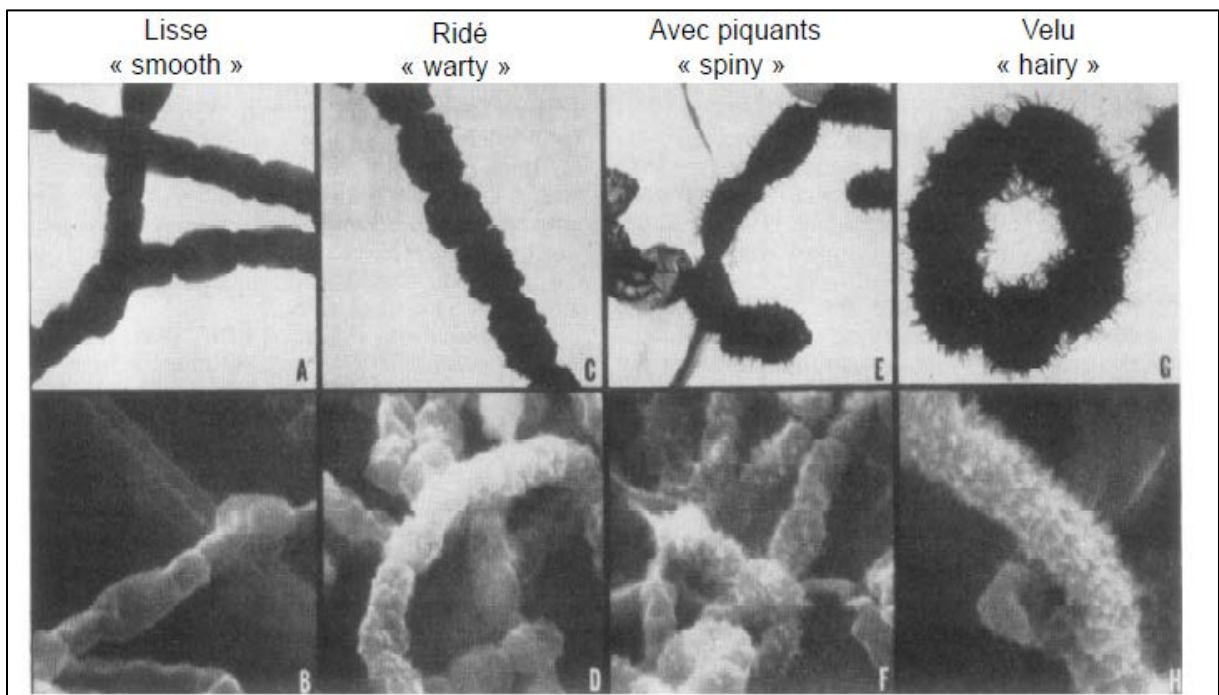


Figure 19. Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces* (**Lyons et Pridham, 1971**).

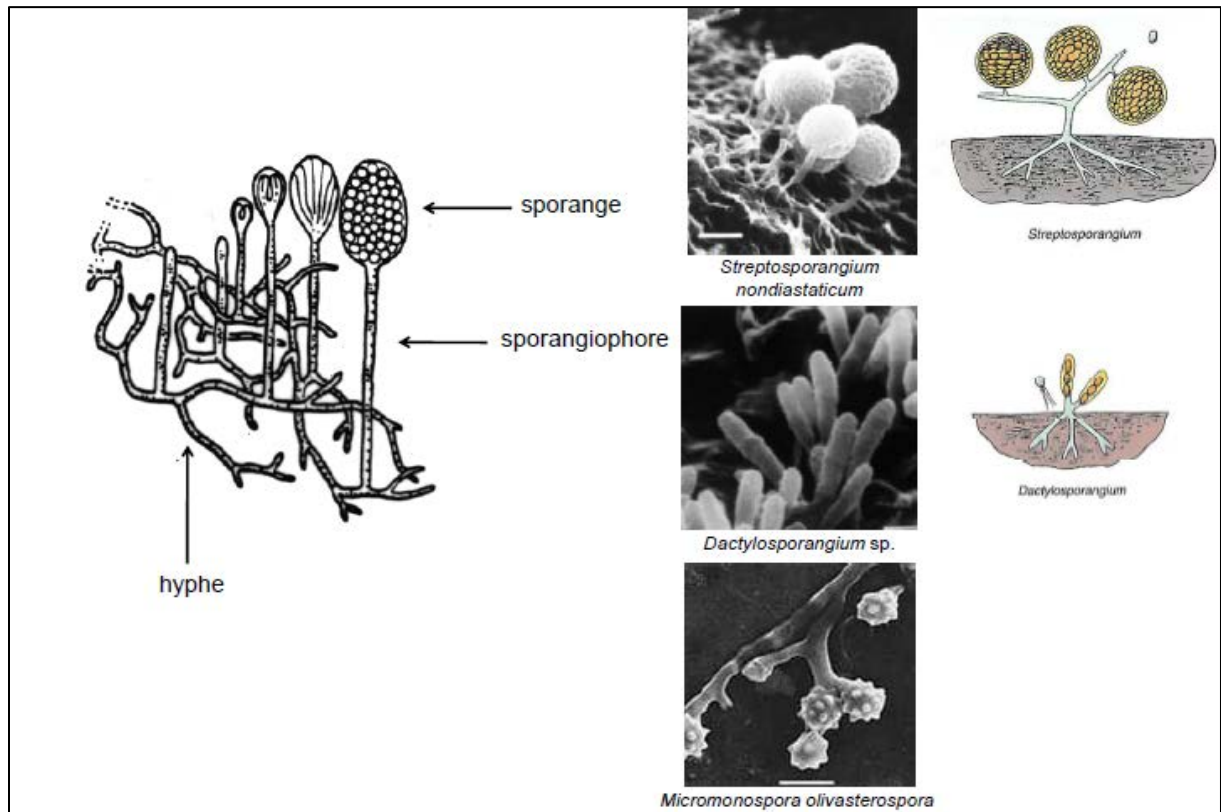


Figure 20. Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes (Lyons et Pridham, 1971).

- **Physiologie des actinomycètes**

La croissance des actinomycètes est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpent et Sanglier, 1989). Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux. Les formes oxydatives, aérobies, sont localisées principalement dans le sol à partir duquel elles sont disséminées. L'étalon de cette catégorie est le genre *Streptomyces* (Reponen et al., 1998). Les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, sont illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (Mariat et Sebald, 1990).

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces*, dont la température optimale est comprise entre 50 et 60 °C. En ce qui concerne le pH la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles leurs croissance est comprise entre pH 5 et 9. Cependant, quelques *Streptomyces*

sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides. En général, les actinomycètes sont des bactéries chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).

- **Distribution et rôle écologique des actinomycètes**

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (**Tableau 3**), et en particulier le sol (**Williams et al., 1984**). Dans le sol, de nombreuses actinomycètes sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les actinomycètes du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols humides et de l'humus (**Larpen et Sanglier, 1989**). Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols. Le nombre de ces microorganismes atteint est de l'ordre de 10^6 germes par gramme de sol séché, d'après (**Goodfellow et Williams, 1983**). D'après (**Waksman, 1959**), le rapport microorganisme totaux / actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total des microorganismes, tandis que la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40%.

Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance (**Zaitlin et al., 2003**).

Certains genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts (**Lacey, 1997**). Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes. Le genre *Frankia* s'intègre aux racines des angiospermes, fixe l'azote et forme des nodules au niveau des racines et confère donc un avantage à la plante pour croître en sol pauvre en azote. Cette association est appelée association actinorhizienne (**Prescott et al., 2010**).

Les actinomycètes sont ainsi présents dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds et les grottes naturelles (**Moncheva et al., 2002**).

Les actinomycètes jouent un rôle écologique important. Ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols. Les enzymes sont, après les antibiotiques, les produits les plus importants sécrétés par les actinomycètes. Les exemples sont multiples comme nous citons les suivants : la glucose isomérase, les protéases, les glycosidases (amylases et xylanases); les chitinases, les neuraminidases et la cholestérol oxydase (Oestergaard et Sjoeholm, 2001).

La diversité métabolique de ces bactéries est essentiellement due à la taille importante de leur génome, qui est en générale de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois plus grand que celui de *E. coli*. Les actinomycètes possèdent en outre, un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. À la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir des plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, et ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques.

Tableau 3. Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (Goodfellow et Williams, 1983).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplane</i>	Sol, Eau douce, Litière végétale
<i>Frankia</i>	Nodules de racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sols humides, Eau douce, sédiments
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière végétale, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière végétale
<i>Streptomyces</i>	Sol, Eau
<i>Steptosporangium</i>	Matière en décomposition et en fermentation
<i>Salinispora tropica</i>	Fonds Marins
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin
<i>Thermoactinomyces</i>	Compost

• **Classification des actinobactéries**

Les actinomycètes appartiennent à la classe des Actinobacteria, Le phylum des Actinobacteria est grand et complexe, Il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens. La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques, fonctionnels, chimiotaxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le manuel Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties dédié aux Actinobacteria (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2000**). Un manuel complémentaire plus succinct fournit une aide à l'identification (**Holt et al., 1994**).

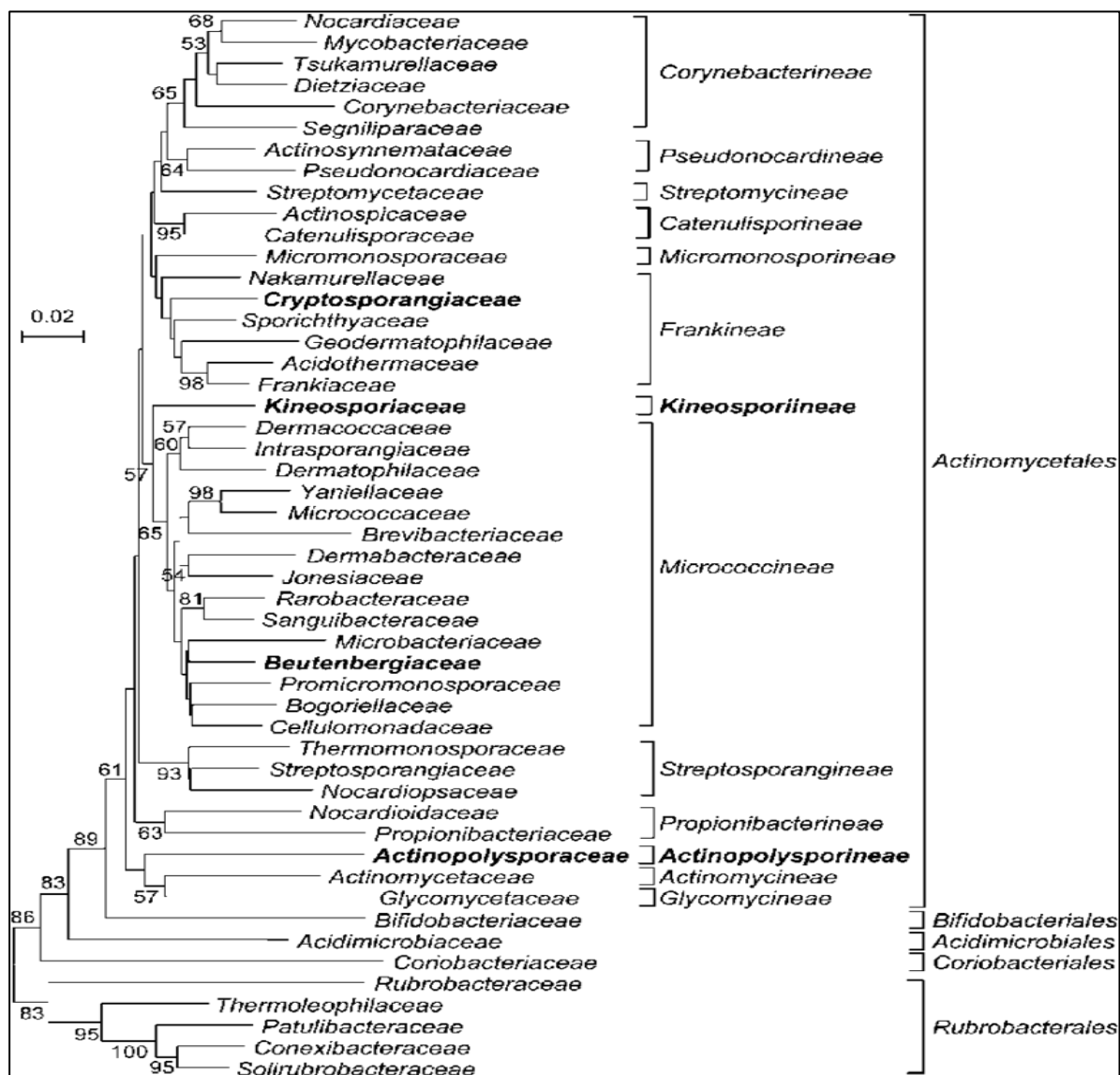


Figure 21. Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (**Zhi et al., 2009**). La barre représente 5 substitutions de nucléotides par 100 nucléotides. Les familles contenant des membres soumis au séquençage complet du génome sont représentées en gras.

Différentes approches taxinomiques sont utilisées pour la classification de ces bactéries :

❖ ***Taxinomie phénétique***

L'étude morphologique des actinobactéries se base essentiellement sur la présence ou l'absence du mycélium de substrat et du mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production et la couleur des pigments diffusibles, la production de pigments mélanoides et la structure et la forme des spores.

La plupart des actinobactéries présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Certaines actinobactéries comme les *Micromonosporaceae* sont dépourvues de mycélium aérien et ne présentent que le mycélium de substrat.

Toutes les actinobactéries forment un mycélium de substrat, sauf le genre *Sporichthya* qui présente un mycélium aérien qui se fixe au milieu de culture par des crampons. Les *Nocardiformes* ont la particularité d'avoir un mycélium de substrat qui se fragmente (**Prauser 1981**). Les spores représentent aussi un critère fondamental dans la taxinomie des actinobactéries (**Locci and Sharples, 1984**).

❖ ***Chimiotaxonomie***

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie, ajouté la production d'antibiotiques et les tests biochimiques : réduction du nitrate, hydrolyse de l'urée, hydrolyse de l'acide hippurique, synthèse de mélanine (*Streptomyces*) (**Stanek et Roberts, 1974**).

❖ ***Taxinomie phylogénétique***

La biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxinomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques. Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomal 16S et l'hybridation ADN-ADN. Le pourcentage G+C n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de nouveaux genres.

L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. Elle s'est avérée appropriée pour déterminer les relations entre des taxons étroitement liés, tels que les espèces (**Stackebrandt and Goebel 1994**).

Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquences, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex

se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses.

Les souches appartenant à la même espèce auront généralement plus de 70 % d'homologie ADN-ADN (**Stackebrandt and Goebel 1994**). Bien que l'hybridation ADN-ADN est une technique utile dans l'identification des espèces du genre *Streptomyces* (**Rong and Huang 2010**), elle ne devrait pas être employée seule, en raison de l'instabilité du génome de ces dernières, mais en combinaison avec d'autres techniques (**Anderson and Wellington 2001**).

Aussi, il existe d'autres méthodes d'analyses moléculaires dites « techniques d'empreintes génétiques ou encore de fingerprint », telle que la DGGE, RAPD, l'AFLP, la rep-PCR et la BOX. Elles sont utilisées dans le génotypage où elles permettent de façon rapide et hautement discriminante de caractériser et comparer des souches entre elles. Ces analyses moléculaires reposent sur une réaction de polymérase en chaîne (PCR), utilisant soit des amorces universelles bactériennes, soit des amorces spécifiques des Actinobacteria (**Schäfer et al., 2010**).

2. Les actinomycètes en tant qu'agents de biodégradation

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes concernent les substrats organiques les plus difficiles à dégrader car peu solubles dans l'eau (hydrocarbures, phénols et d'autres composés récalcitrants), et jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique naturelle et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes (**Lin et al., 2005**).

Les actinomycètes peuvent utiliser beaucoup de sources naturelles de carbone et d'azote. Les genres mésophiles et thermophiles et plus particulièrement : *Streptomyces* et *Thermomonospora* respectivement, ont la capacité de dégrader l'amidon par hydrolyse grâce à des complexes enzymatiques extracellulaires composés de α et β amylases.

L'amylase de *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces praecox* peuvent produire des concentrés de sirop de maltose à partir d'amidon. Elles sont capables également d'attaquer tous les composants lignocellulotiques, y compris la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

Il a été montré que *Thermomonospora fusca* peut convertir les déchets des usines de pâte hautement cellulosiques et à lignine faible, en un produit protéique à haute valeur nutritionnelle, utilisé comme complément alimentaire dans le régime alimentaire des poussins (**Martin et al., 1998**).

Une nouvelle bactérie, *Streptomyces* sp. LX, a été isolée à partir du sol, et peut décomposer totalement la cellulose cristalline (**Adam et al., 2014**).

La présence de grandes quantités de chitine dans les sols et dans les environnements marins a permis l'évolution d'une grande diversité de microorganismes capables de décomposer cette substance, dont les principaux sont les actinomycètes, par deux principaux enzymes : La chitinase et la chitobiase (**Jerome et al., 2004**).

Les actinomycètes ont le potentiel d'utiliser différents polysaccharides végétaux tels que la cellulose, la pectine, la chitine présente dans les parois des champignons et l'amidon comme sources de carbone en étant capable de produire les enzymes hydrolytiques (**Kavya et al., 2012**).

Plusieurs études sont publiées sur l'aptitude de dégradation des xénobiotiques par le genre *Gordona*, effectivement, Lin et ses collaborateurs ont réussi à démontrer que l'espèce *Gordona alkanivorans* CC-JG39 utilise des hydrocarbures monoaromatiques tels que : le benzène, le toluène, les xylènes, les phénols et les crésols comme source de carbone et d'énergie (**Lin et al., 2005**). Une des propriétés majeures de *Gordona* est son pouvoir de dégrader le caoutchouc, isoprène naturel et synthétique. Plusieurs souches appartenant au genre *Gordona* arrivent à désintégrer et minéraliser le caoutchouc naturel et le latex des gants telle que *Gordona westfalica* (**Linos et al., 2002**).

Le genre *Mycobacterium* a également un grand pouvoir dégradant. **Mrozik et al., (2003)** ont montré que la majorité des isolats capable de croître sur les HAPs appartiennent à ce genre. Plusieurs souches appartenant à l'espèce *Mycobacterium chlorophenolicum* dégradent tri-, tetra- et pentachlorophénols (**Hägglom et al., 1988**).

Le genre *Nocardia* est efficace dans la dégradation des huiles (**Jirasripongpun, 2002**), du kérosène (**Edelvio et al., 2009**) et du caoutchouc (**Emo and Roberto, 2003**).

Plusieurs études sont publiées sur l'aptitude de dégradation d'autres xénobiotiques par le genre *Gordona*, effectivement, Lin et ses collaborateurs ont réussi à démontrer que l'espèce *Gordona alkanivorans* CC-JG39 utilise des hydrocarbures monoaromatiques tels que : le benzène, le toluène, les xylènes, les phénols et les crésols comme source de carbone et d'énergie (**Lin et al., 2005**).

1. Généralités

Les actinomycètes ou Actinobactéries forment un grand groupe de microorganismes procaryotes Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" (G+C%) relativement élevé dans leur ADN (généralement compris entre 60 et 75 mol %) (**Pelmont, 2005**).

Le terme actinomycète a été historiquement introduit pour définir des bactéries filamenteuses et ramifiées (**Waksman et Henrici, 1943**). Les actinomycètes forment des colonies circulaires constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Eunice et prosser, 1983**). Cela explique leur dénomination qui provient de deux substantifs grecs «aktis» et «mykes» et signifie « champignons à rayons» ou « champignons rayonnant». Ils présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a classés parmi les bactéries. En effet, leurs parois ne renferment ni cellulose ni chitine mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives). Le diamètre de leurs mycéliums est plus petit que la plupart des hyphes fongiques (généralement 0,7 à 0,8 μm). Enfin, elles sont sensibles aux antibiotiques antibactériens, aux attaques des bactériophages et des lysozymes. Cependant leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Larpent et Sanglier, 1989**).

1.1. Morphologie et Reproduction des actinomycètes

La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien (**Figure 16**). Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture, ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (**Kalakoutskii et Agre, 1976**). En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (**Pamboukian et al., 2002**). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former enfin les pellets (**Figure 17**).

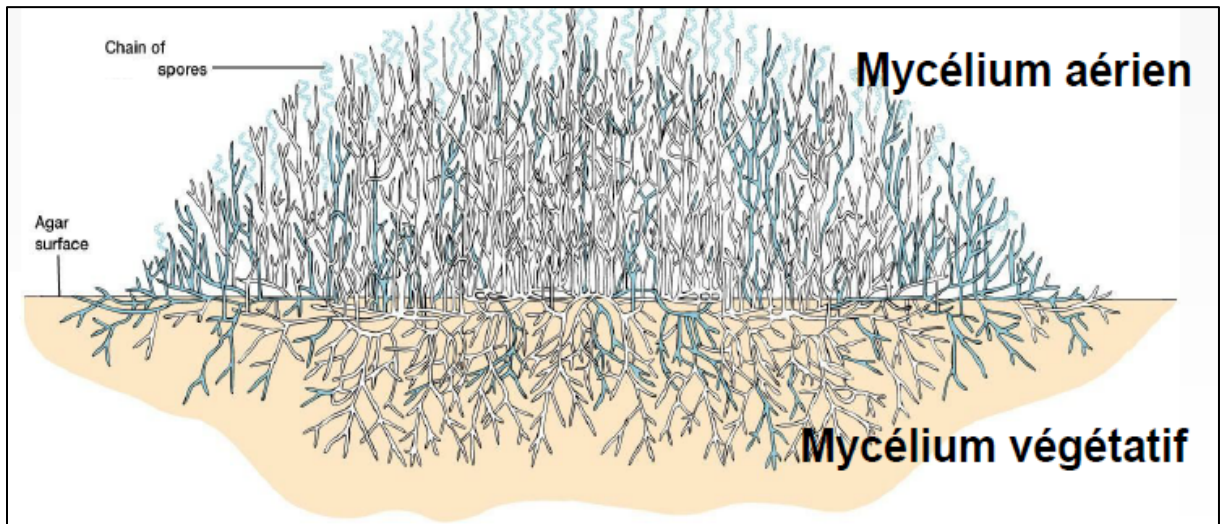


Figure 16. Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Prescott *et al.*, 2003).

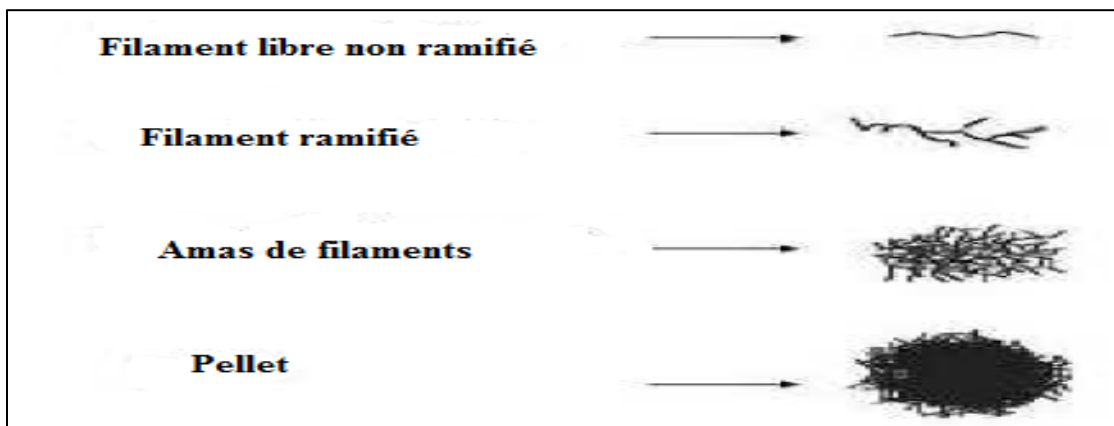


Figure 17. Les morphologies rencontrées de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002).

Le cycle de développement des actinomycètes est très similaire à celui des champignons, à la différence essentielle que ces bactéries demeurent haploïdes durant tout le cycle.

Leur cycle de vie est caractérisé par différents stades de croissance dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce, ce qui amène une grande diversité morphologique. Sur milieu solide, il y aura d'abord la germination d'une spore. Le tube germinatif en croissance se subdivisera en mycélium branché pour former un mycélium végétatif basal (mycélium du substrat) formé d'hyphes non septés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Chez beaucoup d'actinomycètes, à partir de ce mycélium primaire s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien, ce mycélium prend naissance après autolyse du mycélium de substrat (Locci et Sharples, 1984).

En réponse à une limitation de nutriments, à un stress physiologique et/ou à la densité cellulaire, la colonie en formation subira plusieurs changements tels que l'émergence d'un

mycélium aérien dont les extrémités se différencieront en chaînes de spores (**Figure 18**) (**Kieser *et al.*, 2000**). Ainsi, la composition du milieu de culture va influencer la morphologie de la colonie actinobactérienne.

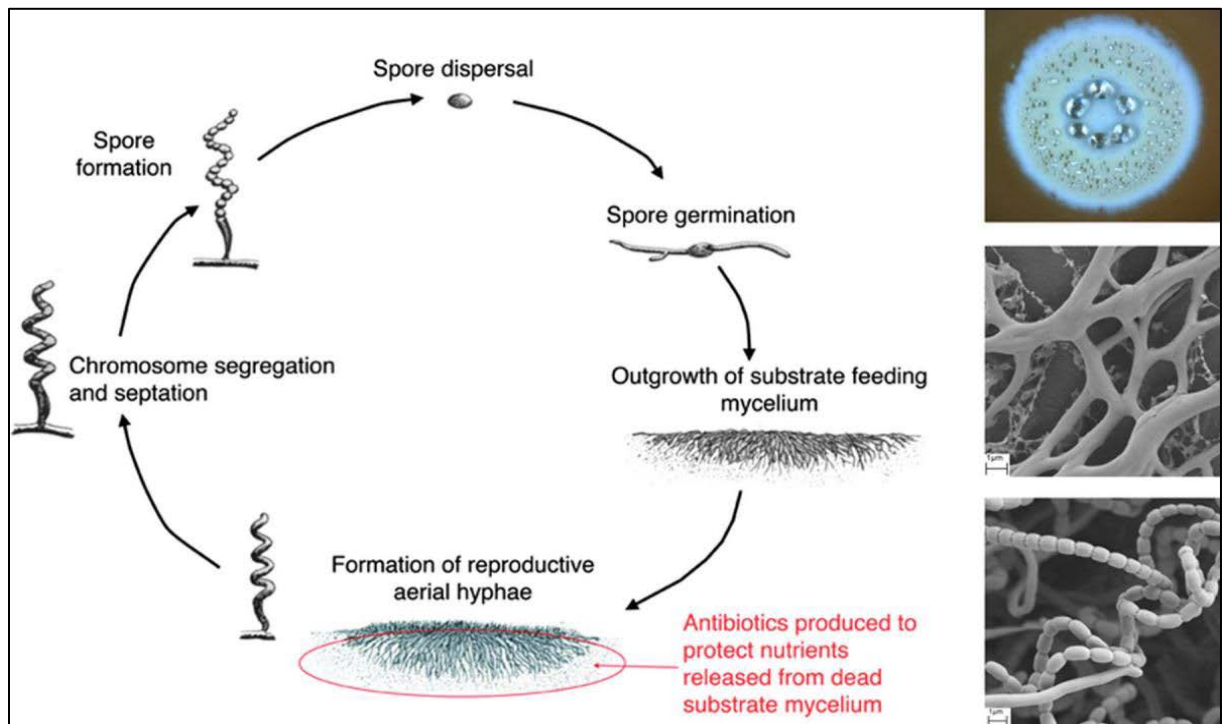


Figure 18. Cycle de développement des actinomycètes sur milieu solide (**Breton *et al.*, 1989**).

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu,
- Des colonies pâteuses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides,
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*). D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges tels que le genre *Streptosporangium* (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

Plusieurs de ces bactéries produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Les spores des actinomycètes sont de deux sortes. Les endospores, produites par des actinomycètes thermophiles, proviennent de la cassure de la paroi de l'hyphe. Les Exospores ou les spores de « segmentation » naissent par suite de cloisonnements à l'intérieur des

hyphes (**Waksman, 1959**). D'un genre à l'autre, les spores des actinomycètes s'organisent en diverses structures :

- Les conidies, ce sont des spores asexuées. Elles peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*) ;

- les Sporangies, c'est des sacs contenant des spores. Les sporangies peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles tel que le genre *Streptosporangium* (**Kalakoutskii et Agre, 1976**).

- Les sclérotés trouvés chez le Genre *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés ;

- Les Synnemata, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

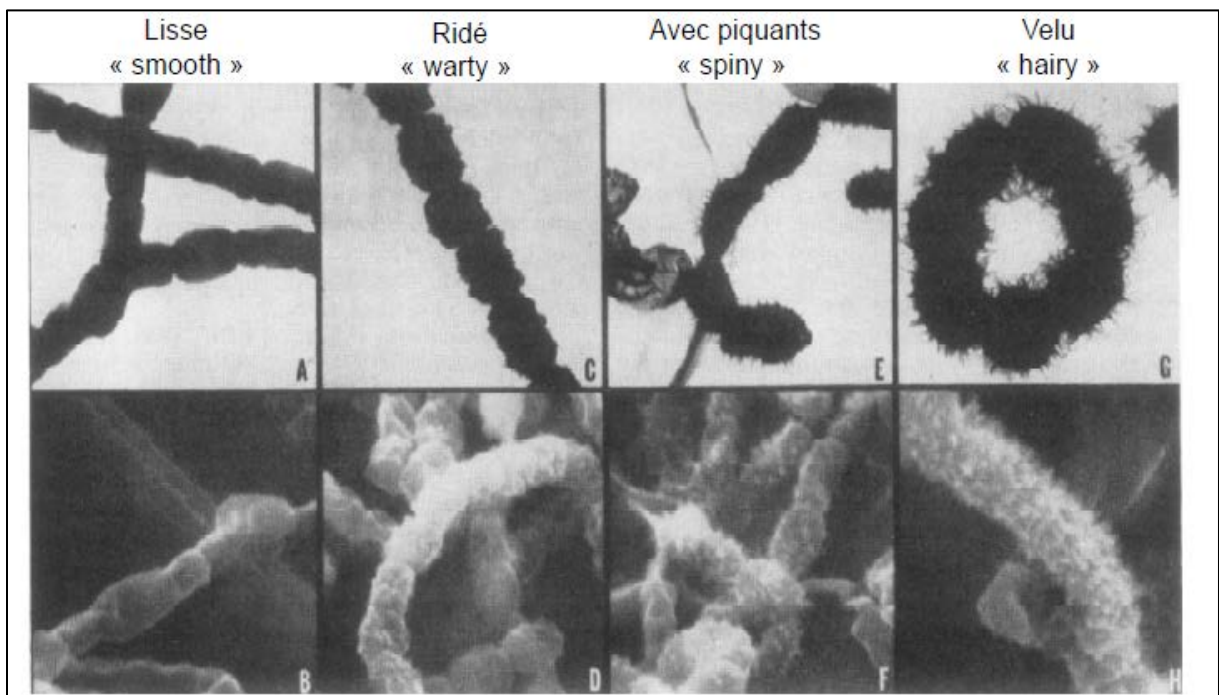


Figure 19. Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces* (**Lyons et Pridham, 1971**).

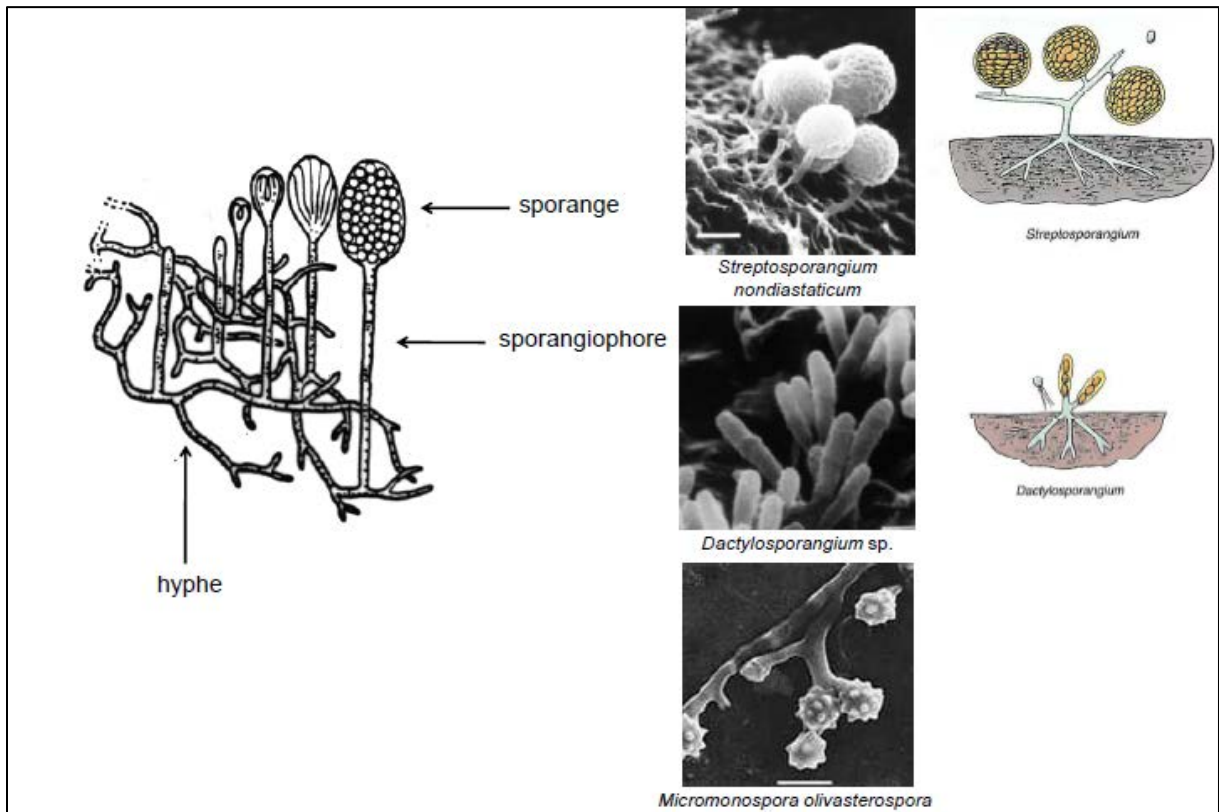


Figure 20. Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes (Lyons et Pridham, 1971).

- **Physiologie des actinomycètes**

La croissance des actinomycètes est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpent et Sanglier, 1989). Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux. Les formes oxydatives, aérobies, sont localisées principalement dans le sol à partir duquel elles sont disséminées. L'étalon de cette catégorie est le genre *Streptomyces* (Reponen et al., 1998). Les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, sont illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (Mariat et Sebald, 1990).

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles comme le genre *Thermoactinomyces*, dont la température optimale est comprise entre 50 et 60 °C. En ce qui concerne le pH la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles leurs croissance est comprise entre pH 5 et 9. Cependant, quelques *Streptomyces*

sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides. En général, les actinomycètes sont des bactéries chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).

- **Distribution et rôle écologique des actinomycètes**

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (**Tableau 3**), et en particulier le sol (**Williams et al., 1984**). Dans le sol, de nombreuses actinomycètes sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les actinomycètes du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols humides et de l'humus (**Larpen et Sanglier, 1989**). Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols. Le nombre de ces microorganismes atteint est de l'ordre de 10^6 germes par gramme de sol séché, d'après (**Goodfellow et Williams, 1983**). D'après (**Waksman, 1959**), le rapport microorganisme totaux / actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total des microorganismes, tandis que la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40%.

Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance (**Zaitlin et al., 2003**).

Certains genres d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts (**Lacey, 1997**). Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes. Le genre *Frankia* s'intègre aux racines des angiospermes, fixe l'azote et forme des nodules au niveau des racines et confère donc un avantage à la plante pour croître en sol pauvre en azote. Cette association est appelée association actinorhizienne (**Prescott et al., 2010**).

Les actinomycètes sont ainsi présents dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds et les grottes naturelles (**Moncheva et al., 2002**).

Les actinomycètes jouent un rôle écologique important. Ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols. Les enzymes sont, après les antibiotiques, les produits les plus importants sécrétés par les actinomycètes. Les exemples sont multiples comme nous citons les suivants : la glucose isomérase, les protéases, les glycosidases (amylases et xylanases); les chitinases, les neuraminidases et la cholestérol oxydase (Oestergaard et Sjoeholm, 2001).

La diversité métabolique de ces bactéries est essentiellement due à la taille importante de leur génome, qui est en générale de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois plus grand que celui de *E. coli*. Les actinomycètes possèdent en outre, un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. À la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir des plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, et ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques.

Tableau 3. Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (Goodfellow et Williams, 1983).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplane</i>	Sol, Eau douce, Litière végétale
<i>Frankia</i>	Nodules de racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sols humides, Eau douce, sédiments
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière végétale, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière végétale
<i>Streptomyces</i>	Sol, Eau
<i>Steptosporangium</i>	Matière en décomposition et en fermentation
<i>Salinispora tropica</i>	Fonds Marins
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin
<i>Thermoactinomyces</i>	Compost

• **Classification des actinobactéries**

Les actinomycètes appartiennent à la classe des Actinobacteria, Le phylum des Actinobacteria est grand et complexe, Il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens. La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques, fonctionnels, chimiotaxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le manuel Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties dédié aux Actinobacteria (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2000**). Un manuel complémentaire plus succinct fournit une aide à l'identification (**Holt et al., 1994**).

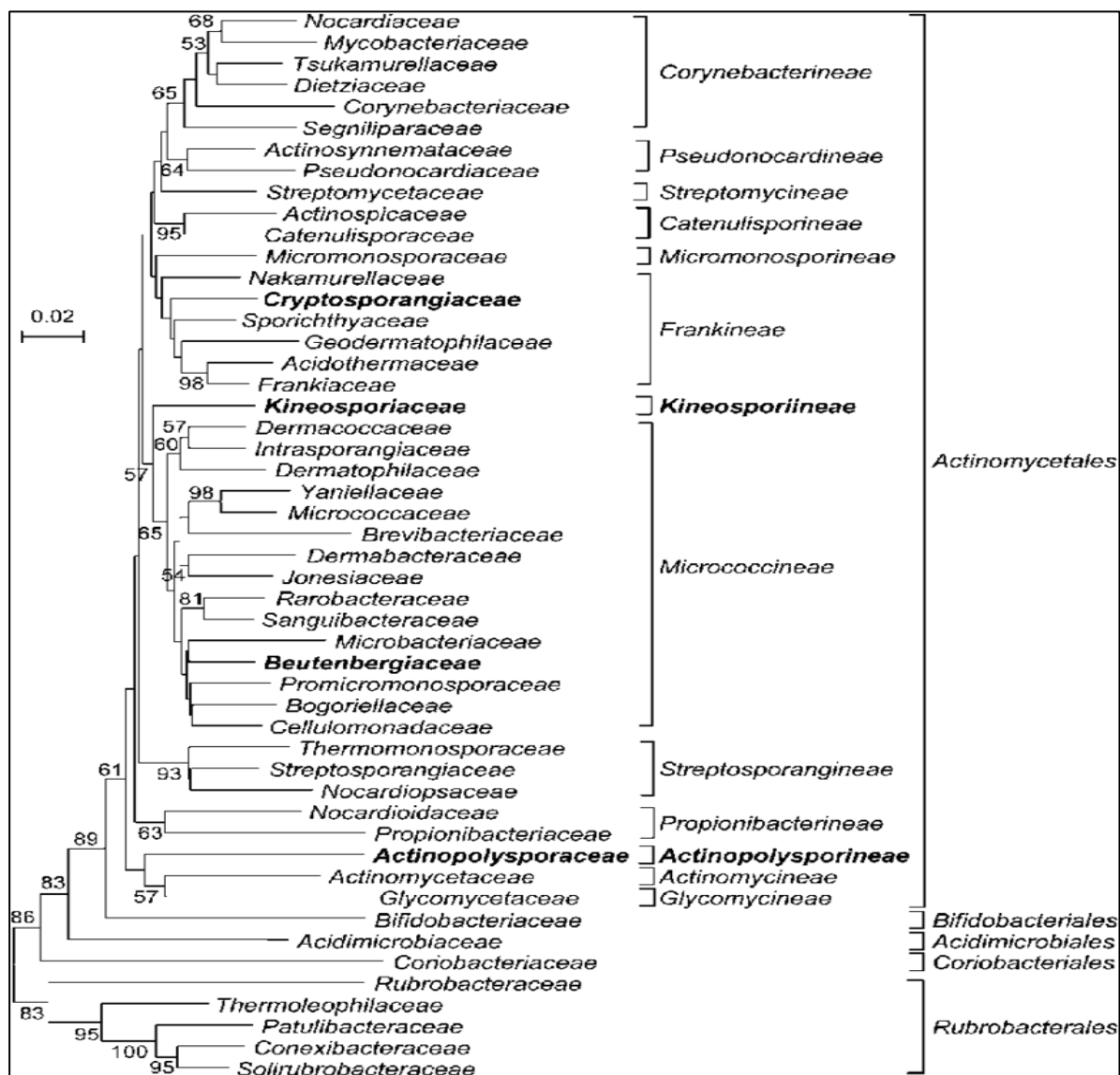


Figure 21. Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (**Zhi et al., 2009**). La barre représente 5 substitutions de nucléotides par 100 nucléotides. Les familles contenant des membres soumis au séquençage complet du génome sont représentées en gras.

Différentes approches taxinomiques sont utilisées pour la classification de ces bactéries :

❖ ***Taxinomie phénétique***

L'étude morphologique des actinobactéries se base essentiellement sur la présence ou l'absence du mycélium de substrat et du mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production et la couleur des pigments diffusibles, la production de pigments mélanoides et la structure et la forme des spores.

La plupart des actinobactéries présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Certaines actinobactéries comme les *Micromonosporaceae* sont dépourvues de mycélium aérien et ne présentent que le mycélium de substrat.

Toutes les actinobactéries forment un mycélium de substrat, sauf le genre *Sporichthya* qui présente un mycélium aérien qui se fixe au milieu de culture par des crampons. Les *Nocardiformes* ont la particularité d'avoir un mycélium de substrat qui se fragmente (**Prauser 1981**). Les spores représentent aussi un critère fondamental dans la taxinomie des actinobactéries (**Locci and Sharples, 1984**).

❖ ***Chimiotaxonomie***

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie, ajouté la production d'antibiotiques et les tests biochimiques : réduction du nitrate, hydrolyse de l'urée, hydrolyse de l'acide hippurique, synthèse de mélanine (*Streptomyces*) (**Stanek et Roberts, 1974**).

❖ ***Taxinomie phylogénétique***

La biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxinomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques. Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomal 16S et l'hybridation ADN-ADN. Le pourcentage G+C n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de nouveaux genres.

L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. Elle s'est avérée appropriée pour déterminer les relations entre des taxons étroitement liés, tels que les espèces (**Stackebrandt and Goebel 1994**).

Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquences, deux types de duplex hétérologues peuvent se former : Si les ADN des deux bactéries présentent des similarités importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex

se complète de proche en proche. Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses.

Les souches appartenant à la même espèce auront généralement plus de 70 % d'homologie ADN-ADN (**Stackebrandt and Goebel 1994**). Bien que l'hybridation ADN-ADN est une technique utile dans l'identification des espèces du genre *Streptomyces* (**Rong and Huang 2010**), elle ne devrait pas être employée seule, en raison de l'instabilité du génome de ces dernières, mais en combinaison avec d'autres techniques (**Anderson and Wellington 2001**).

Aussi, il existe d'autres méthodes d'analyses moléculaires dites « techniques d'empreintes génétiques ou encore de fingerprint », telle que la DGGE, RAPD, l'AFLP, la rep-PCR et la BOX. Elles sont utilisées dans le génotypage où elles permettent de façon rapide et hautement discriminante de caractériser et comparer des souches entre elles. Ces analyses moléculaires reposent sur une réaction de polymérase en chaîne (PCR), utilisant soit des amorces universelles bactériennes, soit des amorces spécifiques des Actinobacteria (**Schäfer et al., 2010**).

2. Les actinomycètes en tant qu'agents de biodégradation

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes concernent les substrats organiques les plus difficiles à dégrader car peu solubles dans l'eau (hydrocarbures, phénols et d'autres composés récalcitrants), et jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique naturelle et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes (**Lin et al., 2005**).

Les actinomycètes peuvent utiliser beaucoup de sources naturelles de carbone et d'azote. Les genres mésophiles et thermophiles et plus particulièrement : *Streptomyces* et *Thermomonospora* respectivement, ont la capacité de dégrader l'amidon par hydrolyse grâce à des complexes enzymatiques extracellulaires composés de α et β amylases.

L'amylase de *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces praecox* peuvent produire des concentrés de sirop de maltose à partir d'amidon. Elles sont capables également d'attaquer tous les composants lignocellulotiques, y compris la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

Il a été montré que *Thermomonospora fusca* peut convertir les déchets des usines de pâte hautement cellulosiques et à lignine faible, en un produit protéique à haute valeur nutritionnelle, utilisé comme complément alimentaire dans le régime alimentaire des poussins (**Martin et al., 1998**).

Une nouvelle bactérie, *Streptomyces* sp. LX, a été isolée à partir du sol, et peut décomposer totalement la cellulose cristalline (**Adam et al., 2014**).

La présence de grandes quantités de chitine dans les sols et dans les environnements marins a permis l'évolution d'une grande diversité de microorganismes capables de décomposer cette substance, dont les principaux sont les actinomycètes, par deux principaux enzymes : La chitinase et la chitobiase (**Jerome et al., 2004**).

Les actinomycètes ont le potentiel d'utiliser différents polysaccharides végétaux tels que la cellulose, la pectine, la chitine présente dans les parois des champignons et l'amidon comme sources de carbone en étant capable de produire les enzymes hydrolytiques (**Kavya et al., 2012**).

Plusieurs études sont publiées sur l'aptitude de dégradation des xénobiotiques par le genre *Gordona*, effectivement, Lin et ses collaborateurs ont réussi à démontrer que l'espèce *Gordona alkanivorans* CC-JG39 utilise des hydrocarbures monoaromatiques tels que : le benzène, le toluène, les xylènes, les phénols et les crésols comme source de carbone et d'énergie (**Lin et al., 2005**). Une des propriétés majeures de *Gordona* est son pouvoir de dégrader le caoutchouc, isoprène naturel et synthétique. Plusieurs souches appartenant au genre *Gordona* arrivent à désintégrer et minéraliser le caoutchouc naturel et le latex des gants telle que *Gordona westfalica* (**Linos et al., 2002**).

Le genre *Mycobacterium* a également un grand pouvoir dégradant. **Mrozik et al., (2003)** ont montré que la majorité des isolats capable de croître sur les HAPs appartiennent à ce genre. Plusieurs souches appartenant à l'espèce *Mycobacterium chlorophenolicum* dégradent tri-, tetra- et pentachlorophénols (**Hägglom et al., 1988**).

Le genre *Nocardia* est efficace dans la dégradation des huiles (**Jirasripongpun, 2002**), du kérosène (**Edelvio et al., 2009**) et du caoutchouc (**Emo and Roberto, 2003**).

Plusieurs études sont publiées sur l'aptitude de dégradation d'autres xénobiotiques par le genre *Gordona*, effectivement, Lin et ses collaborateurs ont réussi à démontrer que l'espèce *Gordona alkanivorans* CC-JG39 utilise des hydrocarbures monoaromatiques tels que : le benzène, le toluène, les xylènes, les phénols et les crésols comme source de carbone et d'énergie (**Lin et al., 2005**).

MATERIEL & METHODES

1. Isolement des actinomycètes

1.1. Echantillonnage

1.1.1. Sol

Des échantillons de sol ont été prélevés à partir d'un sol agricole, de la région Ain M'Lila durant la période de décembre 2012. À l'aide d'une grande spatule stérile, 100 à 150 g de sols sont prélevés à partir de trois endroits différents, après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, selon la technique dérivée de celle de **Pochon et Tardieux, 1962**. Les échantillons sont acheminés le jour même au laboratoire.

1.1.2. Boues

L'échantillon de boue utilisé dans cette étude provient de la station d'épuration des eaux usées Ibn Ziad, commune El Hamma Bouziane wilaya de Constantine. Les échantillons ont été prélevés à partir de trois endroits différents durant la période de décembre 2012. Ces prélèvements ont été réalisés au niveau du bassin biologique après une phase d'aération. Une centaine de millilitres récupérés dans un flacon stérile de 250 mL ont été effectués. Les flacons ont été transportés rapidement au laboratoire pour analyses.

1.2. Caractéristiques physico-chimiques

1.2.1. Sol

Les analyses concernent les paramètres physico-chimiques suivants : pH, potentiel d'oxydo-réduction, humidité, conductivité, taux de la matière organique et granulométrie.

1. Mesure du pH et du potentiel redox de l'échantillon de sol

Des suspensions de sol sont préparées (5g de sol pour 10 mL d'eau distillée). Le pH et le potentiel redox sont alors mesurés à l'aide d'un pH-mètre de marque Radiometer selon la technique de **Pochon et Tardieux, 1962**. Trois répétitions ont été réalisées.

2. Pourcentage d'humidité

Cinq à dix grammes (5 à 10 g) de sol sont séchés pendant 2 jours dans un four à 105°C, jusqu'à obtention d'un poids constant (**Lee et Hwang, 2002**). Le pourcentage d'humidité est

calculé d'après la relation : $H = \frac{PH-PS}{PH} \times 100$

H : Humidité en pourcent (%).

PH : Poids humide de l'échantillon.

PS : Poids sec de l'échantillon.

3. Mesure de la conductivité de l'extrait aqueux 1/5

Vingt grammes (20 g) de terre tamisée dans un tamis de 2 mm sont mis en suspension dans 100 mL d'eau distillée. Après une heure d'agitation dans un agitateur rotatif suivie d'une demi-heure de repos. La suspension est ensuite décantée dans un bécher et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre.

4. Détermination du taux de la matière organique

Après mesure de l'humidité, le sol de chaque échantillon est incinéré pendant 16 heures dans un four à moufle à 450°C. Le taux de matière organique est la différence entre le poids sec et le poids des cendres (Lee et Hwang, 2002).

5. Analyse granulométrique par sédimentométrie

L'analyse granulométrique a pour but de déterminer quantitativement la distribution des particules de sol par classes de diamètres.

L'analyse granulométrique utilisée est celle de la norme ASTM D 422-63. Les particules de sol sont très petites (Sol fin), le mode opératoire choisi est la sédimentométrie.

Le principe de la sédimentométrie est basé sur la loi de Stokes qui mesure la vitesse (v) de décantation des particules sphériques dans un milieu visqueux sous l'influence de la force de gravitation et de la résistance du milieu.

1.2.2. Boues activées

Les paramètres physico-chimiques sont mesurés sur place par le laboratoire de la STEP (S.P.A. société de l'eau et de l'assainissement de Constantine SEACO), les paramètres mesurés sont : le pH, le potentiel redox, la température, la salinité, la conductivité, les matières en suspension (MES), la turbidité, la DCO et la DBO₅ (Rodier *et al.*, 2009).

1. Mesure du pH, potentiel redox, température et conductivité de l'échantillon des boues

Le pH, le potentiel redox et la température ont été déterminés par un pH-mètre portable de type Hanna muni d'une sonde mesurant la température. La conductivité a été mesurée par un conductimètre portable de type Hanna.

2. Mesure de la salinité

La salinité est officiellement mesurée à partir de la conductivité électrique de l'eau. La salinité (S) d'un échantillon d'eau est donnée par le rapport K de la conductivité électrique de cet échantillon à 15°C et à la pression atmosphérique (1013 hPa), et de la conductivité d'une solution de chlorure de potassium dans laquelle la fraction en masse de KCl est 0,0324356 dans les mêmes conditions de température et de pression. Si $K = 1$ la salinité est de 35.

Comme il s'agit d'un rapport, elle s'exprime sans unité mais on trouve encore des salinités exprimées en g/kg ou en psu (practical salinity unit).

La température de la solution modifie la conductivité : plus la température est élevée, plus les ions sont agitées et favorisent ainsi, le passage du courant. La conductivité augmente dans le même sens que la température de la solution, d'environ 2% par °C.

Une petite jonglerie mathématique avec les équations de droite permet de trouver la salinité en fonction de la conductivité et la température :

$$S_a = (0,72 \times \delta - 3,06) \times (1 + 0,02(T - 25))$$

S_a : Salinité en psu.

δ : Conductivité (ms/cm).

T : Température en degré Celsius.

3. Mesure de la matière en suspension

- Une membrane GFC a été marquée avec précaution pour ne pas l'abîmer ;
- Cette membrane a été pesée et sa masse à vide M_0 a été notée ;
- La membrane a été placée sur la rampe de filtration ;
- Après avoir bien agité l'échantillon, un volume de ce dernier (500 mL) a été transvidé sur la membrane ;
- Procéder à la filtration : le volume filtré ne doit pas dépasser 1 litre et la filtration et ne doit pas durer plus d'une demi-heure.
- La membrane a été récupérée après la filtration, puis placée dans une étuve à 105°C pendant 1h30 mn pour enlever l'excès d'eau ;
- Après séchage, la membrane est pesée puis sa masse M_1 a été notée.

Le rapport entre la différence des masses et le volume filtré donne la concentration de matières en suspension dans l'échantillon. On applique la formule suivante :

$$C_{MES} = \frac{M_1 - M_0}{V}$$

C_{MES} : concentration de MES en mg/L ;

M_0 : masse de la membrane avant filtration ;

M_1 : masse de la membrane après filtration ;

V : volume d'échantillon filtré.

4. Mesure de la turbidité

L'échantillon des boues est introduit dans un flacon de mesure normalisé et mesuré dans un turbidimètre, soit un genre de photomètre qui mesure et calcule le rapport entre la lumière transmise et la lumière diffusée à 90°. Ce type d'analyse s'appelle aussi néphélogéométrie.

Le résultat est indiqué en NTU ("nephelometric turbidity unit" ou unité de turbidité néphélogométrique).

On attribue les termes "eau claire" ou "eau trouble" aux mesures approximatives suivantes :

Eau claire : moins de 5 NTU

Eau légèrement trouble : entre 5 et 50 NTU

Eau trouble : plus de 50 NTU

5. Mesure de la demande chimique en oxygène

La quantité d'oxygène utilisée par les réactions d'oxydation est évaluée (en mg/L), à partir de la mesure du résidu de réactifs au bout de 2 h. L'oxydation s'effectue à chaud, en milieu acide, en présence d'un excès d'oxydant.

-2 mL de l'eau à analyser sont prélevés et rajoutés au tube de réactifs à DCO ;

-Le tube est placé 2 heures à 150 °C ;

-Après refroidissement, la DCO est lue directement au colorimètre étalonné.

6. Mesure de la demande biologique en oxygène

On réalise une première mesure de la concentration en dioxygène dissous dans un échantillon à l'aide d'un Oxymètre portable ou sonde oxymétrique reliée à un dispositif d'acquisition informatisé immédiatement après son prélèvement et on répète l'opération cinq jours plus tard après incubation à 20°C et à l'obscurité. La différence entre les deux valeurs mesurées constitue la DBO5 (demande biologique en oxygène à cinq jours). Les résultats sont exprimés en mg/L.

Les eaux usées d'origine domestique peuvent atteindre des valeurs de près de 300 mg/L tandis que les eaux usées provenant d'industries particulièrement polluantes (laiteries, distilleries) peuvent atteindre des valeurs de plusieurs dizaines de milliers de mg/L.

1.3. Isolement, purification et conservation des actinomycètes

1.3.1. Réalisation de dilutions

Une série de dilutions décimales est effectuée allant jusqu'à la dilution 10^{-5} pour les échantillons de sol et de boues activées. Pour chaque dilution deux répétitions ont été établies.

1.3.2. Préparation des milieux d'isolement

Trois milieux sélectifs différents ont été utilisés pour l'isolement des actinomycètes : milieu Amidon-Caséine (**Küster et Williams, 1964**), milieu Olson (**Olson, 1968**) et le milieu YMEA (**Shirling et Gottlieb 1966**).

Ces milieux sont additionnés de nystatine comme agent antifongique à une concentration de 100 µg/mL et de polymexine à 10 µg/mL à action contre les bactéries à coloration de Gram négative (**Takizawa et al., 1993**).

Les antibiotiques sont stérilisés par filtration à travers un filtre millipore de 0.22 µm de porosité. Ces solutions d'antibiotiques stériles sont mélangées aux milieux sélectifs en surfusion à une température de 45 °C.

1.3.3. Ensemencement et incubation

Cent microlitres de chaque dilution sont ensemencés à la surface des boîtes de Pétri contenant les milieux d'isolement. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 28 °C pendant 3 semaines. Des observations journalières dès la fin de la première semaine sont effectuées afin de suivre la croissance des colonies et d'éviter les contaminations (**Levadoux et al., 2002**).

1.3.4. Aspect microscopique, dénombrement et purification des actinomycètes

Toutes les colonies se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes sont dénombrées et observées au microscope (Grossissement x 10) au binoculaire puis à l'état frais et après coloration de GRAM (au grossissement X100) (**Williams et Cross, 1971**). Celles appartenant aux actinomycètes sont repiquées, par la méthode des stries, sur le milieu YMEA. Cette dernière opération est répétée jusqu'à obtention de souches pures.

1.3.5. Conservation des isolats d'actinomycètes

Les isolats d'actinomycètes purifiés, sont conservés par deux méthodes :

1. Sur gélose inclinée

Les colonies d'actinomycètes isolées et purifiées sont ensemencées sur les deux milieux YMEA et Olson, exempt d'antibiotiques en gélose inclinée et sont incubées à 30 °C pendant deux semaines puis conservées à 4 °C, le repiquage est réalisé tous les deux mois (**Suzuki, 2001**).

2. Par congélation de suspensions de spores

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur les milieux gélosés YMEA et Olson, puis incubés jusqu'à sporulation. Une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de la culture puis conservée par congélation à -20°C en présence du glycérol comme cryoprotecteur à une concentration de 20 % (**Hopwood et al., 1985**).

2. Mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolés à dégrader les BTEX

2.1. Criblage des actinomycètes dégradant les BTEX

Cette étape vise à rechercher les actinomycètes qui ont une capacité à dégrader le benzène, le toluène, l'éthyle benzène et le xylène (BTEX) en tant que seule source de carbone et d'énergie. Les cinétiques de croissance des différents isolats d'actinomycètes mis en culture ont été suivies. Les courbes de croissance, ont été établies par le logiciel Excel 2010.

2.1.1. Conditions opératoires

1. Produits chimiques utilisés

Le benzène, le toluène, l'éthyle benzène et m-o-p xylènes utilisés dans cette étude sont de 99,9% de pureté, obtenus du laboratoire Sigma-Aldrich (France).

2. Milieu minimum de fermentation

Le milieu minimum utilisé dans cette étude, est celui de **Vandermesse 1996**. Ce milieu a été choisi de façon à obtenir un pH constant de 7. Il est complètement exempt de source de carbone.

3. Inoculum bactérien

Dans cette étude, 12 actinomycètes isolés à partir des boues activées et 50 à partir du sol ont été testés. A partir de chaque culture d'actinomycètes ensemencés sur milieu YMEA, 2 anses de platines ont été prélevées et transférées dans un tube à essai contenant 15 mL d'eau distillée stérile. Les tubes subissent ensuite une agitation vigoureuse au vortex pendant quelques secondes. Les bactéries dans cet état vont servir d'inoculum pour les prochaines fermentations.

4. Pré-sélection des actinomycètes capable de biodégrader les BTEX

Des Erlenmeyers de 500 mL de volume scellés avec de coton cardé et des capsules en aluminium ont été utilisés. Il s'agit dans cette étape, de tester toutes les bactéries actinomycétales isolées et sélectionner celles qui ont la capacité de vivre en présence des BTEX comme seule source de carbone et d'énergie. Une culture liquide pour chaque isolat d'actinobactérie a été lancée en introduisant 15 mL de l'inoculum bactérien, 100 mL du milieu minimum et 1500 mg/L de chaque BTEX (**Zhang et al., 2013**). Des billes en verre stériles, ont été déposées dans chaque réacteur, afin de rompre les pellets des *Streptomyces* par exemple. Les réacteurs ainsi préparés ont été incubés à 30 °C dans l'obscurité dans un incubateur avec agitation à 120 rpm pendant 5-7 jours. Des prélèvements de 2 mL à des intervalles de temps de 6-24 h sont effectués à l'aide d'une seringue stérile préalablement posée dans chaque réacteur. Ces prélèvements servent à mesurer les densités optiques en

fonction du temps d'incubation ($DO = f [t]$) moyennant un spectrophotomètre (Jenway 7509) à la longueur d'onde 620 nm pour suivre l'évolution de la croissance cellulaire. Les données ont été recueillies à un intervalle de temps régulier de 6-24 h jusqu'à six jours.

5. Test de tolérance des BTEX

L'étude de la capacité des actinomycètes à tolérer les BTEX est déterminée en observant l'effet de différentes concentrations de BTEX ajoutés séparément sur l'ensemble de ces bactéries. Des bouteilles en verre de 125 mL de capacité contenant 40 mL de milieu minimum ont été inoculées par 2 öses de chaque isolat. Les BTEX ont été ajoutés séparément comme unique source de carbone à raison de 100, 250, 500, 1000, 1500 et 2000 mg/L. Les bouteilles ont été incubées à 30 °C sous agitation orbitale à 120 tours par minute à l'obscurité. Une aliquote de 1 mL de la culture bactérienne a été transférée tous les jours dans le même milieu stérile et incubée dans les mêmes conditions. Après quatre transferts, 1 mL de chaque culture a été dilué et ensemencé sur des surfaces d'agar de milieu minimum contenant 100, 250, 500, 1000, 1500 et 2000 mg/L de BTEX ajoutés séparément et incubé pendant 96 h à 30 °C (**Fellie et al., 2012**).

2.2. Biodégradation des BTEX

Les isolats d'actinomycètes qui ont montrés une aptitude à croître en présence des BTEX ont été sélectionnés pour la poursuite des études de biodégradation. Ils ont été pris individuellement dans chaque réacteur. Deux consortiums reconstitués au hasard ont été également testés. Le premier consortia, a été préparé avec 4 isolats dégradant chacun tous les composants BTEX. Le 2^{ème} consortia, a été reconstitué de 4 isolats qui dégrade chacun un composé BTEX différent. Les deux consortiums ont été testés avec tout le mélange BTEX.

2.2.1. Pré-culture

L'objectif de cette étape vise à l'adaptation des actinomycètes aux conditions du milieu. Elle permet également de réduire le temps de la phase de latence pour offrir des cellules en pleine phase de croissance qui vont servir comme pied de cuve pour un bon démarrage de la fermentation. L'inoculum est constitué de 2 anses de platines de chaque colonie d'actinomycètes mélangées à 15 mL d'eau distillée stérile. Il est additionné à 90 mL du milieu ISP₂ (**Ali-khodja et Beldjoudi, 2005**) et 1500 mg/L de chaque BTEX. La mise en culture des réacteurs a été effectuée dans un incubateur avec agitation (innova 4430) à 120 rotations par minute et à une température de 30 °C pendant 72 heures.

2.2.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Pour toutes les fermentations la taille de l'inoculum a été fixée à 20 % (v / v) de la phase liquide. 15 mL de la pré-culture ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été éliminé et le culot est rincé avec le milieu minimum de Vandermesse. Ce même rinçage a été répété une deuxième fois. Le culot cellulaire a été repris en suspension dans 15 mL du milieu minimum puis placé dans des flacons en verre de 1 Litre de volume, scellés avec des bouchons de téflon caoutchouc de silicium et des capsules de l'aluminium contenant 75 mL du même milieu minimum et 1500 mg/L de BTE(m-o-p)X comme seule source de carbone et d'énergie. Des flacons non inoculés et des flacons inoculés sans BTEX ont été utilisés en tant que témoins. L'incubation a été effectuée à l'obscurité à 30 °C sous agitation à 120 rpm.

2.2.3. Prélèvements et préparations des échantillons

Deux prélèvements ont été réalisés à un intervalle de temps de 24 h pendant 5 jours d'incubation. Ces échantillons ont été récupérés par une seringue insérée à travers le bouchon des flacons. Ils vont servir aux mesures suivantes :

- 3 mL servent à suivre la croissance bactérienne, en calculant la concentration cellulaire en g/L.
- 2 mL sont filtrés à travers des filtres jetables de 0,20 µm de porosité; le filtrat ainsi obtenu a été stocké dans des tubes en verre et conservé à -20 °C. Cet échantillon servira à la mesure de la concentration des BTEX par chromatographie en phase gazeuse.

2.2.4. Mesure de la concentration cellulaire

La concentration de la masse cellulaire est estimée en utilisant la méthode du poids sec. Les prélèvements de chaque culture ont été effectués à partir des bioréacteurs en utilisant une pompe. Les échantillons sont filtrés à travers un papier filtre en polyamide de 0,45 de porosité puis déposé dans des coupelles préalablement pesées. Le papier est ensuite séché dans une étuve à 105 °C pendant 24 h, ensuite refroidit dans un dessiccateur à température ambiante et repesé à l'aide d'une balance analytique de type Precisa 40SM-200M jusqu'à ce qu'un poids constant sec soit obtenu. La différence entre le poids du filtre vide et celui du filtre après filtration, correspond au poids sec de la biomasse bactérienne. Un filtre de contrôle avec de l'eau distillée a été pris comme témoin.

2.2.5. Suivi de la consommation des BTEX par chromatographie en phase gazeuse

2.2.5.1. Quelques Caractéristiques techniques du chromatographe en phase gazeuse utilisé

La CPG permet d'analyser qualitativement et quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposé. Cette méthode permet la séparation par une suite d'équilibre entre une phase gazeuse (phase mobile qui entraîne les échantillons à analyser) et une phase liquide (chromatographie de partage) ou solide (chromatographie d'adsorption). L'appareil utilisé dans notre étude est de marque (Agilent technologies INV 1998/00005) muni d'une colonne capillaire DB-5 (30m x ID de 0,25 mm x 1 μ m) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un système échantillonneur de purge et piégeage automatique (**Figure 22**).

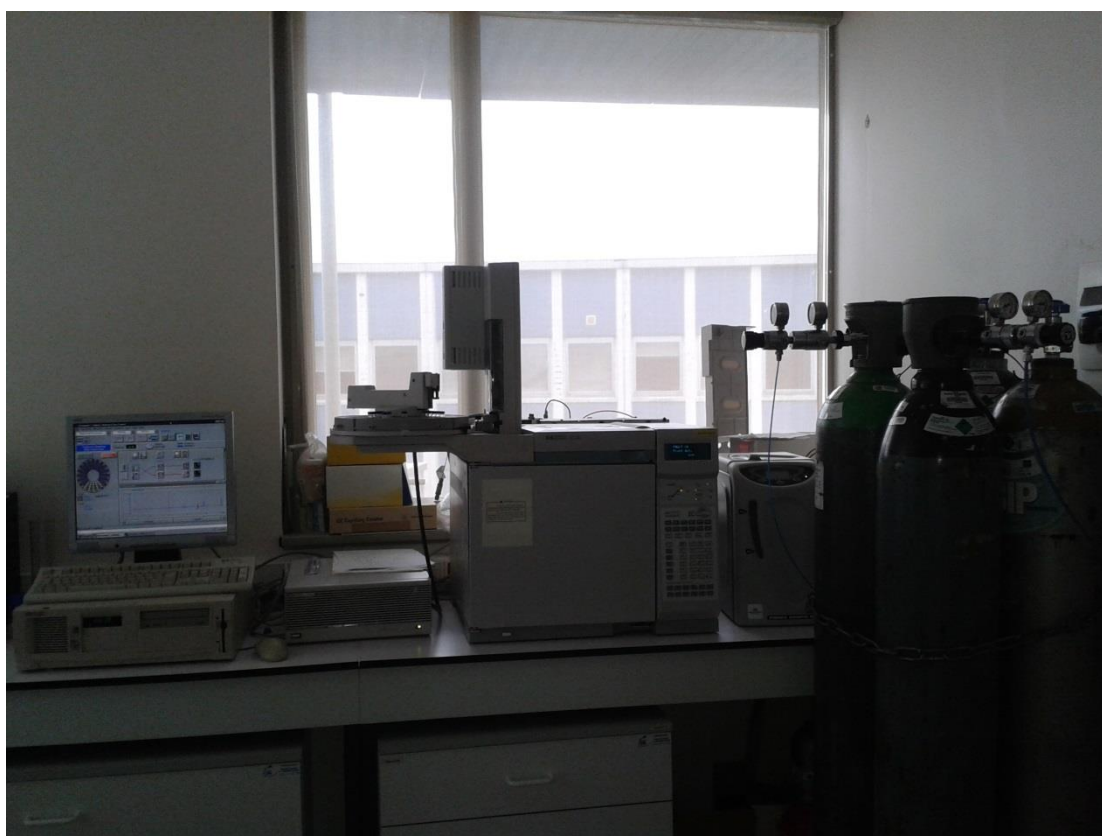


Figure 22. Chromatographe Agilent technologies INV 1998/00005 (Laboratoire CIDAM, Clermont-Ferrand)

Les composants de base de cet appareil sont décrits comme suit :

- **La seringue:** La seringue permet d'injecter un volume jusqu'à 10 μ L.
- **L'injecteur:** Il permet à la fois de vaporiser les échantillons et de les entraîner par la phase mobile.

-La colonne : La colonne est constituée d'une phase stationnaire greffée à la paroi de la colonne est qui est constituée de Poly (5% diphenyl, 95% diméthylsiloxane). Elle permet la séparation d'hydrocarbures légers en fonctions de la température. La colonne a les caractéristiques suivantes : Longueur = 30 m, Diamètre interne = 0,25 mm, épaisseur du film = 1 μm .

-Le four : Le four permet de maintenir la colonne à une température constante ou de travailler avec un gradient de température. On peut ainsi travailler à des températures allant de -99°C à 250°C .

-Le détecteur : Le détecteur est dit à ionisation de flamme. L'éluât pénètre dans une flamme obtenue par combustion d'hydrogène et d'air. Les composés organiques forment alors des ions collectés par deux électrodes, entre lesquelles on applique une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique recueilli par un électromètre qui le transforme en courant que l'on peut enregistrer.

2.2.5.2. Mesure des concentrations des BTEX

Les échantillons ont été chargés dans le concentrateur-purge et purgés avec de l'hélium gazeux à un débit de 20 mL/min pendant 5 min à température ambiante. Le gaz porteur (He) avait un taux de 2 mL/min. et un débit du gaz de split (He) de 25 mL/min. Un rapport de division (split ratio) de 20:1 est utilisé. Le flux d'hydrogène était de 30 mL/min et le débit d'air était de 250 mL/min pendant le processus en cours d'exécution. Les analyses ont été effectuées avec une température initiale du four de 60°C pendant 4 minutes, suivie de $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ à 90°C pendant 4,5 min, puis augmentée à $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à une température finale de 200°C pour 2 minutes. La température de l'injecteur et du détecteur était de 250°C et 280°C respectivement.

Le GC a été calibré avec quatre standards de BTEX de concentrations variant de 8 mg/L à 1500 mg/L. Les plus petites concentrations détectables étaient de 10 mg/L pour le benzène et le toluène et de 8 mg/L pour l'éthyle benzène et les xylènes. Cette méthode d'analyse ne pouvait pas séparer les para et méta-xylènes. En conséquence, les isomères p- et m-xylènes sont rapportés comme une seule entité représentée par un seul pic. Le temps de rétention est de 3,8 min pour le benzène, 6,5 min pour le toluène, 8,675 min pour l'éthyle benzène, 8,872 min pour les p-m- xylènes et 9,54 min pour le o-xylène.

Les échantillons de BTEX conservés au congélateur ont été décongelés dans le froid pour éviter toute perte de substrat. 1 mL est transféré dans des flacons Viales de type Agilent Vial, Screw, 2 mL, clt, cert, 100 pk. Un volume de 1 microlitre d'échantillon est automatiquement

injecté avec une seringue micro EMS 10 μ L combinée au système d'échantillonnage automatique. Les concentrations des composants BTEX ont été calculées à partir des aires des chromatogrammes.

3. Mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolés à dégrader certains pesticides

3.1. Tests de biodégradation des herbicides : Roundup, Mamba, Traxos, Axial, Zoom, Glyphosate et l'Herbasate⁵

Dans cette partie, l'objectif est de tester la capacité des actinomycètes à biodégrader quelque herbicides parmi les plus utilisés en Algérie et ce depuis des années.

-Le Glyphosate, le Roundup, le Herbasate et le Mamba qui ont comme matière active le glyphosate. Le glyphosate (N-(phosphonométhyl) glycine, C₃H₈NO₅P) est un produit phytosanitaire de la famille des Aminophosphonates, c'est un herbicide de post-levée non sélectif utilisé à large spectre en agriculture. Très soluble dans l'eau, il est peu dégradé dans l'eau des rivières, des lacs et des nappes phréatiques.

-L'Axial et le Traxos ont comme matière active le pinoxaden, qui est un composé organique de formule C₂₃H₃₂N₂O₄ qui appartient au groupe des phénylpyrazolines. Utilisé pour le contrôle sélectif post-levé des mauvaises herbes dans les cultures du blé d'hiver, le blé dur et l'orge. Il n'est pas persistant dans l'eau et le sol. Il est difficilement biodégradable.

-Zoom est la combinaison de deux substances actives systémiques : le dicamba et le triasulfuron. Il représente une solution complète contre tous les adventices dicotylédones pour les cultures de blé et de l'orge. Très soluble dans l'eau, il est peu biodégradable.

Le milieu minimum utilisé dans cette étude, est celui de Vandermesse. Il est exempt de source de carbone. La source de carbone est substituée par un herbicide à raison de 500 mg/L. L'addition des pesticides se fait par filtration à travers une membrane de 0,22 µm. Les bactéries sont ensuiteensemencées par des stries serrées sur la surface du milieu de culture. Les boites ainsi préparées sont incubées à 30 °C pendant 21 jours (**Boudemagh *et al.*, 2006**). Parallèlement deux milieux témoins ont été préparés, un milieu sans herbicide servant de témoin négatif et un autre additionné de glucose servant de contrôle positif. La dégradation des herbicides se traduit par une croissance sur le milieu et correspond à un résultat positif (**Bousbaa, 2011**).

⁵ I N E R I S - Données technico-économiques sur les substances chimiques en France (2011).

3.2. Tests de biodégradation des fongicides : Ortiva et Rodazime⁵

Pour mettre en évidence la biodégradation des deux fongicides l'Ortiva et le Rodazime, par les isolats d'actinomycète, nous avons adopté la même démarche que celle appliquée aux herbicides.

-L'ortiva commercial appartient à la famille des Strobilurines qui ont comme matière active l'azoxystrobine. Il est appliqué sur les arbres ornementaux, sur les roses et plusieurs légumes. Il cause des problèmes de résistance, ainsi sa demi-vie dans le sol est de 20 à 840 jours avec une solubilité dans l'eau de 13 à 121 mg/L. Il est difficilement biodégradable.

-Le rodazime a pour matière active la carbendazime, elle peut être considérée comme étant non facilement biodégradable. Le rodazime est hydrosoluble et bioaccumulable dans l'environnement.

3.3. Tests de biodégradation des insecticides : Karaté, Dursban, Cypemethrine et Phoenix⁵

Dans le but de tester la biodégradation de ces insecticides par les actinomycètes isolés, le même procédé cité ci-dessus a été suivi.

Le Karaté et Phoenix ont pour matière active la lambda cyhalothrine appartenant à la famille des pyréthriinoïdes ($C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$). Il cause des problèmes de résistance. Ses résidus sont observés dans les écosystèmes hydriques et telluriques et chez les organismes aquatiques.

Le Dursban a pour matière active le chlorpyriphos-éthyl qui appartient à la famille chimique des organophosphorés organochlorés. Sa formule chimique est : $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$. Le chlorpyriphos semble se dégrader lentement dans les sols. A cause de la faible solubilité de cette substance et de sa forte capacité d'adsorption particulaire, un retour potentiel du chlorpyriphos aux eaux de surface ne semble possible que via l'érosion.

Le commercial Cypermethrine a pour matière active la cypermethrine ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$), un pyréthriinoïde photostable à large spectre d'activité, présentant une persistance d'action prolongée et des propriétés de biodégradabilité. Pour ces raisons la Cyperméthrine a été très largement utilisée à travers le monde pour la protection d'une grande variété de cultures (céréales, coton, café, etc.)

3.4. Essai de Biostimulation (Effet du pH et de la température)

Cette technique a été utilisée afin de stimuler les bactéries qui présentent une absence de dégradation de ces pesticides. Le pH et la température sont parmi les facteurs physico-chimiques les plus importants pour la biodégradation de ces xénobiotiques (Nyyssönen *et al.*, 2009).

Dans notre étude nous avons varié le pH et la température d'incubation de 3 isolats ayant montré une faible croissance à 30°C et à pH 7, contenant le fongicide Ortiva et l'herbicide Glyphosate.

Les isolats en question ont été ensemencés par des stries serrées sur ces milieux en variant à chaque fois le pH (6, 7 et 8). Chacun de ces milieux est incubé à trois températures différentes (30, 37 et 45°C) pendant une période de 21 jours. Le résultat positif se traduit par une bonne croissance bactérienne sur les milieux contenant les deux pesticides.

4. Identification morphologique, physiologique et moléculaire des actinomycètes actifs

4.1. Etudes de quelques caractères phénotypiques

4.1.1. Observation macroscopique

Sur le milieu ISP2 (**Shirling et Gottlieb 1966**), une öse de chaque isolat d'actinomycète est ensemencée en surface. Les boîtes sont incubées à 28°C, pendant 15 jours. La présence ou l'absence de spores, la présence ou l'absence de pigments ainsi que la couleur des spores de surface sont notés.

4.1.2. Observation microscopique (Technique de culture sur lamelle)

Des lamelles stériles sont insérées dans le milieu ISP2 en faisant un angle de 45° environ avec la surface du milieu. Dix microlitres de l'inoculum de chaque isolat sont déposés au point de contact de la lamelle et de la gélose. Après 15 jours d'incubation à 28°C, les lamelles sont soigneusement retirées, puis déposées sur des lames propres et observées au microscope optique au grossissement $G \times 100$ (**Williams and Cross, 1971**).

4.2. Détermination de quelques caractères physiologiques

❖ Préparation de l'inoculum général

Chaque isolat d'actinomycète a été ensemencé en stries serrées sur milieu ISP2 et incubé à 28°C pendant 7 jours. Après croissance, ils servent à inoculer des tubes coniques contenant 15 mL du milieu ISP2 stérile liquide. 20 µL de chaque culture sont pris comme inoculum pour tous les tests (**Crawford et al., 1993**).

4.2.1. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des actinomycètes

20 µL de l'inoculum général de chaque isolat d'actinomycète sont déposés sur plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu ISP5 (annexe 2) additionné de différentes concentrations d'NaCl. Les concentrations testées sont 2%, 5%, 9% et 15% (p/v). La croissance des actinomycètes sur ces milieux est comparée avec celle d'un milieu sans NaCl pris comme témoin.

4.2.2. Test de croissance sur les différentes sources de carbone

Le milieu ISP9 (annexe 2) a été utilisé dans cette étude. Ce milieu est exempt de toutes formes de carbone, Les différentes sources de carbone testées sont celles recommandées par **Shirling et Gottlieb, 1966** et par **Pridham et Gottlieb, 1948**, elles sont les suivantes: D-fructose, D-glucose, galactose, lactose, arabinose et le propionate de sodium.

Des solutions de ces sources de carbone, à 10 % (p/v) de concentration, sont préparées et stérilisées par filtration. L'ensemble des sources de carbone sont additionnées aseptiquement au milieu de base de manière à obtenir une concentration finale de 1 % (p/v). Ces différents milieux ont été répartis dans des boîtes de Pétri,ensemencés par 20 μ L de l'inoculum général et incubés pendant sept jours à 28°C. La croissance sur ces milieux est comparée avec un témoin négatif (milieu sans source de carbone) et un témoin positif (milieu avec glucose). Si la croissance obtenue est supérieure à celle du témoin négatif, le résultat est considéré positif.

4.2.3. Test de la croissance sur différentes sources d'azote

Ce test est utilisé afin de déterminer les préférences nutritionnelles en sources d'azote des isolats actinomycètes testés. Les différents composés azotés testés dans cette étude sont les suivants : cystéine, arginine, méthionine, proline, asparagine, tyrosine, acide aspartique.

Chaque source d'azote est mise en solution dans de l'eau distillée puis stérilisée à 100°C pendant 15 minutes ensuite additionnée au milieu ISP9 en raison de 0.1 % (p/v). 20 μ L de l'inoculum général sont déposés dans chaque boîte contenant une seule source d'azote. La lecture des résultats est effectuée après incubation des boîtes à 28°C pendant sept jours. Le résultat est considéré comme étant positif, si la croissance est plus abondante que celle obtenue sur le milieu de base sans source d'azote (témoin négatif).

4.2.4. Hydrolyse de l'amidon

L'ensemencement est effectué sur un ISP9 (annexe 2) additionné d'amidon soluble à 2%, et de 20 μ L de l'inoculum général à pH 7. Les boîtes sont déposées sur ces boîtes et incubés à 28°C pendant sept jours. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'inondation des boîtes avec une solution de lugol. L'absence de la coloration autour des colonies indique que l'amidon a été hydrolysé. Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Tatsinkou et al., 2005**).

4.2.5. Hydrolyse de la caséine

Ce test a été réalisé sur un milieu gélosé ISP9 (annexe 2) additionné de 0,5 % de caséine selon la méthode de **Williams et Cross, 1971**. Les boîtesensemencées ont été observées après 14 jours d'incubation à 28°C. La clarification autour de colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

4.2.6. Hydrolyse de la gélatine

20 μ L de l'inoculum général des isolats d'actinomycètes sont ensemencés sur la gélose nutritive (annexe 2) contenant 0,4% de gélatine, puis incubés 14 jours à 28°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient en présence d'une solution de chlorure mercurique à 15%. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Larpen et Larpen, 1985**).

4.2.7. Action sur lait écrémé

Des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10 % dans l'eau distillée sont ensemencés par les isolats bactériens et incubés à 30°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les actinomycètes (**Williams et Cross, 1971**).

4.2.8. Dégradation de la cellulose

Ce test est réalisé sur le milieu de base ISP9 (annexe 2) contenant la cellulose cristalline à une concentration de 1% (p/v) comme seule source de carbone et d'énergie.

Pour chaque souche, 20 μ L de l'inoculum général est déposés à la surface des boîtes de Pétri. La lecture est effectuée après 21 jours d'incubation à 30°C. La révélation de l'activité cellulolytique se fait par une coloration au Gram Iodine (**Maki et al., 2011**). 10 mL de la solution iodine sont coulés dans la boîte, les colonies développant une auréole montrent que les isolats testés sont des cellulase positif par rapport à un témoin négatif *E. coli* qui est cellulase négatif.

4.2.9. Dégradation de la pectine

20 μ L de l'inoculum général de chaque isolat sont déposés à la surface des boîtes contenant le milieu pectine agar (annexe 2). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les boîtes sont recouvertes par une solution de CTAB (bromure d'héxadecyl triméthyl ammonium) à 1% (p/v) et laissées à température ambiante pendant quelques minutes, puis lavées à l'eau distillée stérile, ou par une solution d'acétate de cuivre (verdet) à 7,5 %. L'activité pectinolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Hankin et al., 1971**).

4.2.10. Dégradation de la chitine

20 µL de l'inoculum général de chaque isolat sont déposés à la surface des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum Vandermesse (annexe 2) additionné de 0,2 % de la chitine colloïdale comme seule source de carbone. Après incubation à 30°C pendant 5 jours. L'activité chitinolytique est mise en évidence par l'apparition d'halo clair autour des colonies. Les boîtes ont été inondées d'une solution Gram Iodine pour contraster la transparence des halos des colonies produisant la chitinase (**Kavya et al., 2012**).

4.2.11. Mise en évidence de l'activité lipasique

Ce test est réalisé sur le milieu Sierra (annexe 2) additionné de Tween 80 (le mono-oléate de sorbitol) à raison de 1%. Le milieu liquéfié est bien homogénéisé avant de le couler en boîtes de Pétri. 20 µL de l'inoculum général de chaque isolat sontensemencé en surface de la gélose. Après incubation à 30°C pendant 5 jours, L'activité lipolytique est mise en évidence par l'apparition d'halo d'opacification autour de la culture qui se traduit par une production d'acides gras, par hydrolyse du tween 80, qui ont réagi avec le chlorure de calcium pour donner des sels calciques insolubles.

4.2.12. Sensibilité aux antibiotiques

La mise en évidence de la sensibilité des actinomycètes aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par la méthode de la diffusion en milieu gélosé. Les différents antibiotiques utilisés sont : l'Imipénème (IPM), l'Amikacine (AK), la Gentamicine (CN), l'Erythromycine (E), l'Amoxicilline plus acide Clavulanique (AMC), l'Ampicilline (AM), la Ceftazidime (CAZ), la Chloramphénicol (C), l'Acide Nalidixique (NA) et la Péfloxacine (PEF).

À partir d'une culture pure d'une souche d'actinomycète, une suspension à 0,5 Mac Farland en eau physiologique est préparée. La suspension est diluée au 1/100e avant d'êtreensemencée par inondation sur milieu Bennett (annexe 2). Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose par une pince flambée à une flamme du bec bunsen.

Après une pré-diffusion des antibiotiques de 30 min à 4°C, les boîtes sont ensuite mises à incuber dans l'étuve à 28°C pendant une semaine. Après cette incubation, la résistance ou la sensibilité est notée.

4.2. Identification moléculaire des actinomycètes actifs

4.2.1. Extraction de l'ADN à partir des actinomycètes

Chaque isolat d'actinomycète a été ensemencé en stries serrées sur milieu gélose au sang (Difco Columbia-annexe 2) et incubé à 28°C pendant 2 jours, dans le but d'avoir des cultures jeunes. L'ADN est extrait selon la technique de PCR sur colonie.

❖ PCR sur colonie

Des tubes PCR selon le nombre des actinomycètes à identifier plus deux tubes pour le témoin positif et le témoin négatif ont été annotés et stérilisés 20 min sous une hotte à UV.

Les réactifs suivants ont été mélangés ensemble ; en ajoutant toujours l'enzyme en dernier lieu : 5 µL 5X Tampon, 0,5 µL forward primer (10µM), 0,5 µL reverse primer (10µM), 0,5 µL dNTPS (10mM), 17,3 µL MilliQ Filtred H₂O, 0,2 µL GoTaq Polymerase DNA (5U/µL).

Pour tous les échantillons, un aliquote de 24 µL du mélange sont déposés dans chaque tube PCR. Les tubes subissent un mélange au Vortex et une centrifugation en moyennant une centrifugeuse de paillasse. Ensuite le mix est stérilisé 2 min sous la hotte à UV.

Pour la lyse cellulaire : Pour chaque souche, une colonie est prélevée avec un cône stérile et diluée dans 50 µL d'eau MilliQ hyper pure, la solution subit un choc thermique dans un incubateur (Peltier Thermal cyler) à 98°C pour 5 à 10 minutes. Après avoir agité vigoureusement au vortex, 1 µL a été ajouté à chaque tube PCR contenant le mix PCR. Le témoin négatif (24 µL du mix PCR + 1 µL de l'eau MilliQ) et le témoin positif (24 µL du mix PCR + 1 µL de l'ADN 16S de *Pseudomonas aeruginosa* 1/1000^e) ont été inclus.

4.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne

Les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S des souches d'actinomycètes ont été amplifiés en utilisant les amorces ci-dessous (Heuer et al., 1997) :

- **27F_YM** (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
- **R1492** (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')

Les réactions ont été réalisées dans un de Mastercycler Gradient (Eppendorf) équipé d'un bloc à gradient pour l'optimisation de la température d'hybridation.

Chaque programme d'amplification est initié par un cycle de dénaturation à 95 °C pendant 5 min, ensuite 35 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95 °C, 30 secondes d'hybridation à 52 °C, 1 min, 30 secondes d'élongation à 72 °C et finis par un cycle d'élongation finale de 7 min à 72 °C.

4.2.3. Migration électro phorétique

- **Préparation du gel d'agarose**

1 g d'agarose ont été mélangés à 100 mL de tampon TBE 1X. Le mélange a été chauffé jusqu'à ébullition dans un four micro-ondes, puis refroidi sous l'eau froide du robinet, ensuite additionné de l'intercalant d'ADN syber safe à 1% (5 µL pour 100mL de gel). La préparation a été versée dans une cuve munie d'un applicateur (peigne) et un générateur du courant électrique. Après solidification de gel, le peigne a été enlevé pour que les puits apparaissent.

- **Migration**

Après amplification, les échantillons ont été analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% avec Syber safe. Dans une plaque de 96 puits, 10 µL de chaque produit PCR + 4 µL du tampon de charge préalablement déposés dans les puits de la plaque sont refoulés à l'aide d'une micropipette. Les puits ainsi sont remplis avec le mélange amplicons + tampon de charge pour une analyse par électrophorèse horizontale pendant 40 min à 100 V, dans un tampon TBE 1X. Dans le premier puit 3,5 µL d'un marqueur de poids moléculaire Lambda EcoRI HindIII (Promega) ont été déposé comme échelle.

- **Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Après migration, le gel a été examiné sous une lumière ultraviolette pour visualiser les bandes amplifiées. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de (1500 paires de base) utilisé comme témoin. Les photos ont été révélées par le système de photo-documentation "BioCap".

4.2.4. Purification des produits PCR

La purification des produits PCR consiste à éliminer les amorces et les dNTPs non utilisées au cours de la réaction PCR. Elle est réalisée selon le protocole du kit de purification kit MinElute PCR.

- **Vérification des produits PCR purifiés**

Les produits PCR purifiés ont été vérifiés par révélation sur gel d'électrophorèse. Après migration, le gel a été examiné sous la lumière ultraviolette pour détecter les bandes amplifiées et purifiées. Les photos ont été affichées par le système de photo-documentation "BioCapt".

4.2.5. Séquençage

La méthode utilisée est celle de séquençage automatisé en utilisant un séquenceur automatique capable de réaliser à la fois les réactions et la détermination de la séquence nucléotidique du fragment d'ADN étudié. Dans ce travail, nous avons utilisé le séquenceur automatique **ABI 3130 genetic analyzer (16 capillaries sequencer from Applied Biosystems)**. La méthode utilisée est celle de Sanger (**Sanger et al., 1997**) basée sur la technologie de ddNTPs (Société Applied Biosystems). Les réactions de séquençage ont été effectuées dans des plaques PCR à 96 puits en utilisant le kit de séquençage (**Big Dye Terminator version 3.1 or version 1.1 cycle sequencing -Applied Biosystems**).

4.2.6. Analyse des séquences d'ADNr 16S

Les résultats du séquençage des fragments d'ADNr amplifiés ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts, visualisés par **SequenceScanner** software (Applied Biosystems) et analysés par **Gap 4** softwares (**The GAP Group (2012)**, <http://www.gap-system.org>). Les alignements du couple des séquences sens / antisens sont effectués par **DNAMAN** software pour définir la séquence consensus (**Jyrki et al., 2000**).

4.2.7. Comparaison des séquences avec la banque informatique

Les séquences obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel (Basic Local Alignment Search Tool) pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée « GenBank » (**Altschul et al., 1997**), pour déterminer leur affiliation phylogénétique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les taxons les plus proches.

4.2.8. Arbre phylogénétique

L'alignement de séquences homologues des ADNr 16S avec d'autres séquences de GenBank est effectué en utilisant le logiciel Clustal X (**Gibson et al., 1994**) pour définir la séquence consensus. Après avoir aligné les séquences, l'arbre phylogénétique est construit à l'aide du programme Mega version 5.05 (**Tamura et al., 2013**). Selon la méthode du "Neighbor Joining" (NJ) (**Saitou and Nei 1987**), la matrice de distance est calculée selon le model Kimura à deux paramètres (**Kimura 1980**). Les valeurs de bootstrap ont été déterminées à partir de 1000 répliques (**Felsenstein 1985**).

RESULTATS & **DISCUSSION**

1. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol et des boues activées

1.1. Sol

Les propriétés physicochimiques de l'échantillon de sol prélevé (pH, potentiel d'oxydo-réduction, humidité, conductivité, taux de la matière organique, et granulométrie) sont résumées dans les tableaux suivants :

Table 4. Paramètres physicochimiques de l'échantillon de sol agricole étudié.

	1 ^{ère} répétition	2 ^{ème} répétition	3 ^{ème} répétition	Moyenne	Ecart type
pH	7,95	8,04	8,03	8,006666667	0,049328829
Potentiel d'oxydo-réduction (mV)	-78	-82	-82	-80,666666667	2,309401077
Pourcentage d'Humidité (%)	1,83	1,87	1,79	1,83	0,04
Conductivité (µS/cm)	160	150	150	153,333333333	5,773502692
Taux de matière organique (%)	9,9	10,2	10,1	10,06	0,3328663395

Table 5. Analyse granulométrique (Annexe 4).

Taille du grain (ϕ en mm)	Pourcentage %
Graviers + galets > 2.0	0.0
2.0 > Gros sable > 0.2	11.0
0.2 < Sable fin < 0.02	64.4
0.02 < Limon < 0.002	21.8
Argile < 0.002	2,8
Contenu en CaCO₃ (%)	19,2

Il est intéressant de noter que l'échantillon examiné représente un sol agricole des cultures maraichères contaminé par les pesticides, il se caractérise par une présence très abondante de végétation. Cet échantillon se caractérise par une valeur de pH allant de 7,95 à 8,30. C'est un sol qui tend vers l'alcalinité.

Selon **Lee et Hwang (2002)** le taux d'humidité d'un sol est considéré comme faible si le pourcentage d'humidité est compris entre (2,0 et 9,0) ; modéré dans le cas où le pourcentage d'humidité varie de 9,1 à 13,0 et élevé si les valeurs sont comprises entre 13,1 et 20,0. Les résultats présentés dans le tableau 4 nous permettent de conclure que l'échantillon de sol est caractérisé par un taux d'humidité faible (inférieur à 2,0%). Ce résultat peut être expliqué par le fait que cette terre est assoiffée par des cultures répétées.

En se basant sur les résultats de la conductivité électrique de l'extrait aqueux 1/5^{ème}, présentés dans le tableau 4, nous avons pu classer l'échantillon de sol, dont la conductivité est de 0,153 mS/cm comme un sol non salé vu que sa conductivité est nettement inférieure à 0,6 mS/cm.

Le taux de matière organique dans un sol est considéré comme faible si le pourcentage est compris entre (4,0- 7,0), modéré entre (7,1-9,0) élevé entre (9,1-11,0) (Lee et Hwang, 2002). L'échantillon de sol étudié à un taux moyen de 10.06, il est considéré selon cette classification un sol à concentration élevée de matière organique. Selon l'analyse granulométrique, le sol du site d'analyse de cette région est de nature argilo-marneuse.

1.2. Boues activées

Les propriétés physicochimiques de l'échantillon des boues activées prélevé (pH, potentiel d'oxydo-réduction, température, conductivité, salinité, taux de la matière organique, turbidité, DBO5 et DCO) sont résumées dans le tableau suivant :

Table 6. Paramètres physicochimiques de l'échantillon des boues activées étudié.

Débit (L/s)	pH	Rv (mv)	T (°C)	Con (µS/cm)	Salinité	MES (mg/L)	Turbidité (NTU)	DBO5 (mg/L)	DCO (mg/L)
379	8,3	-67	15	1667	1	194	186	141	301

L'analyse initiale du pH de l'échantillon brut des boues activées représente le degré d'acidité ou d'alcalinité du milieu. Les organismes vivants sont très sensibles à ses variations. Le développement correct de la faune et de la flore aquatique n'est possible que si la valeur du pH est comprise entre 6 et 9. Son influence se fait également ressentir par le rôle qu'il exerce sur les autres éléments comme les métaux dont il peut diminuer ou augmenter la solubilité et donc la disponibilité et la toxicité éventuelle. (Gaujous, 1995). Le pH des boues étudiées est de nature alcaline il est de 8,3, il permet donc une croissance importante de la flore microbienne.

La température influe la densité de l'eau et joue donc un rôle primordial dans les phénomènes de satisfaction des lacs et des mers, appelé thermocline. Certains rejets présentent des écarts de température importants avec le milieu récepteur, par exemple cas des eaux de refroidissement des centrales nucléaires. Une élévation de la température peut perturber fortement le milieu (pollution thermique) mais elle peut aussi être un facteur d'accroissement de la productivité biologique.

La température est donc un facteur écologique important du milieu. Elle permet de corriger les paramètres d'analyse dont les valeurs sont liées à la température (conductivité notamment). Il est important de connaître la température de l'eau avec une bonne précision, en effet celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissociation des sels dissous donc sur la conductivité électrique, dans la détermination du pH, pour la connaissance de l'origine de l'eau et des mélanges éventuels. Elle agit aussi comme un facteur physiologique agissant sur le métabolisme de croissance des micro-organismes vivant dans l'eau (**Gaujous, 1995**). La température de l'eau usée analysée est de 15°C ce qui est lié à la période et l'heure du prélèvement, néanmoins la valeur de la température moins favorable pour le développement des bactéries mésophiles.

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau (**Gaujous, 1995**).

En se basant sur le résultat de la conductivité électrique de l'échantillon de boues, présenté dans le tableau 4, nous avons pu classer l'échantillon, dont la conductivité est de 1,667 mS/cm comme une eau salée vu que sa conductivité est nettement supérieure à 1,2 mS/cm.

Ce résultat est d'après nous l'effet de l'entassement dans les boues de matières organiques et minérales que la station peut accumuler. La biodiversité microbienne dans cette niche écologique peut d'après nous être affectée positivement, car ces matières sont une source nutritionnelle importante pour les microorganismes. Cependant l'accumulation de certains polluants inhibe le développement microbien, mais favorise paradoxalement l'apparition de microorganismes résistants. L'apparition de ce type d'organisme microbien résistant est une aubaine pour la recherche, car elle permet de s'approvisionner de microbes résistants et multi-résistants très importants dans la bioremédiation, la bioaccumulation des métaux lourds...etc.

Les MES sont les matières non dissoutes contenues dans l'eau. Elles comportent à la fois des éléments minéraux et organiques. Les MES comprennent les matières décantables et les colloïdes mais pas les matières dissoutes. Elles comportent souvent dans les cours d'eau des particules de nature argilo-humique provenant de l'érosion des sols, ainsi que d'autres constituants, en particulier d'origine organique. Les MES sont la cause essentielle de la turbidité de l'eau (**Bousseboua, 2005**). L'échantillon de boues étudié a un taux élevé de matière organique de 19,4%. Ce résultat peut nous renseigner sur le degré élevé de pollution de l'échantillon en question. Cette MES est un réservoir d'éléments nutritifs, qui grâce à la

minéralisation peuvent être libérés et rendus disponibles pour l'absorption par les microorganismes de l'eau.

La DBO₅ correspond à la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation biologique des matières organiques. Soit donc leur biodégradation qui reproduit en fait leur autoépuration naturelle. Elle permet d'évaluer corrélativement les matières biodégradables présentes dans les eaux. Dans les conditions naturelles, celles-ci mettent de plusieurs jours (glucides) à plusieurs mois (composés azotés) pour être dégradées. C'est pourquoi la mesure a été standardisée à un délai raisonnable de 5 jours, considéré comme significatif. Quant à la DCO, elle représente la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation par processus chimique des matières oxydables existantes dans l'eau. Sa mesure correspond donc à une estimation corrélatrice des matières oxydables présentes dans l'eau, quelle que soit leur origine : organique ou minérale.

Le rapport DCO/DBO₅ donne une première estimation à la fois de la biodégradabilité de la matière organique des effluents et de leur teneur en substances non biodégradables. Pour cet échantillon, ce ratio est compris entre 2 et 3. Cela signifie que la matière organique présente dans l'eau polluée peut être à cet instant du prélèvement de l'échantillon partiellement biodégradable (**Bliefert et Perraud, 2001**).

2. Isolement et purification des actinomycètes

Au bout de 7 jours d'incubation à 30 °C, les colonies d'actinomycètes apparaissent, et se développent lentement, elles sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique, (colonies d'aspect poudreux ou des colonies dures incrustées dans la gélose) et leur aspect microscopique (aspect filamenteux à coloration de Gram positive). (**Goodfellow et al., 1987**). Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage dans le milieu YMEA et incubées à 28 °C pendant 7 jours (**figure 23**). L'isolement des bactéries actinomycétales à partir des deux échantillons, le sol agricole de la région de Ain M'Lila et les boues activées de la station d'épuration Ibn Ziad, sur les trois milieux de cultures a conduit aux résultats rassemblés dans le **tableau 7**.

Table 7. Nombre d'actinomycètes isolés, à partir de différents milieux d'isolement.

Echantillons	Sol agricole			Boues activées		
Milieux d'isolement	Olson	AC	YMEA	Olson	AC	YMEA
Nombre D'actinomycètes isolés	46	14	20	10	3	5
Total	80			18		

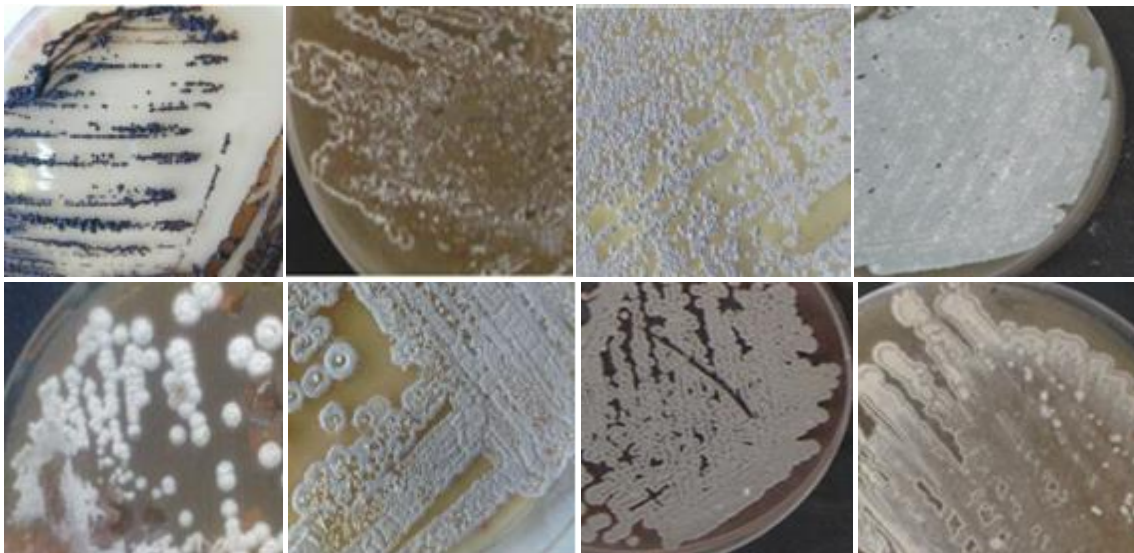


Figure 23. Photographies représentant les différents aspects de colonies actinomycétales purifiées sur milieu YMEA.

Selon les résultats rassemblés dans le **tableau 7**, quatre-vingt-dix-sept colonies différentes d'actinomycètes ont été isolées et purifiées. Ces résultats font apparaître une variation importante du nombre des actinomycètes isolés à partir de chaque échantillon. Sur l'ensemble des 98 actinomycètes isolés, 80 proviennent de l'échantillon du sol agricole et 18 actinomycètes de l'échantillon de l'eau.

D'autre part, d'après les résultats présentés dans le même **tableau 7**, il apparaît que le milieu de culture (Olson) permet l'isolement d'un nombre considérable d'actinomycètes par rapport aux milieux YMEA et Amidon-Caséine.

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinomycètes n'existe pas. Il faut toujours varier les stratégies et les milieux d'isolement dans un même screening, afin de réussir l'isolement de la plupart de la flore actinomycétale qui compose l'échantillon étudié (**Cross, 1982**).

Ainsi, l'isolement sélectif des actinomycètes à partir de leur habitat, pose problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (**Crawford et al., 1993**). Leur sélection doit passer par l'élimination de ces microorganismes qui, par leurs facultés d'envahissement, gênent la croissance des actinomycètes. Le rapport actinomycètes / microorganismes d'un échantillon augmente soit :

- ❖ Par prétraitement chimique à titre d'exemple le carbonate de calcium et le phénol ou physique comme la centrifugation différentielle des échantillons ou le traitement à la chaleur (**El-Nakkeeb et Lechevalier, 1963**).

- ❖ Par l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (la chitine, l'amidon, le glycérol, l'arginine, l'asparagine, la caséine et les nitrates) rendant les milieux moins favorables à la croissance des bactéries autres qu'actinomycétales. (**Williams et Davies, 1965**).

Pour cela, le milieu Amidon-Caséine a été utilisé dans cette étude, il contient des substrats sélectifs pour la croissance des actinomycètes (l'amidon et la caséine) et il est utilisé dans de nombreux travaux d'isolement d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés. **Williams et Davies (1965)** ont utilisé ce milieu pour un isolement sélectif des actinomycètes de sol. De même **Hagedorn (1976)** a pu isoler une variété de *Streptomyces* à partir de sols arides. **Suzuki (2001)** a utilisé ce milieu pour l'isolement des actinomycètes appartenant aux genres rares comme *Actinomonospora*, *Actinopolyspara*, *Planomonospora* et *Planobispora*. Ce

milieu a été également utilisé par **Benimeli et al., (2007)** pour l'isolement des actinomycètes à partir des eaux usées contaminées par les pesticides organochlorés.

Le milieu Olson, utilisé dans cette étude est efficace pour l'isolement des actinomycètes à partir de ces écosystèmes. Contenant le sodium caséinate et l'asparagine favorisant la croissance des actinomycètes, le glycérol présente une source de carbone facile, et le sodium propionate agit comme anti fongique et présente une source de carbone et de minéraux. Ces deux composants sont connus d'être favorables pour l'isolement des actinomycètes à partir des sols et des écosystèmes aquatiques (**Hillali et al., 2002**).

Le troisième milieu sélectif utilisé pour l'isolement des actinomycètes est le milieu YMEA, ce milieu de par sa composition en substrats complexes (extrait de malt et glucose comme sources de carbone et extrait de levure comme source d'azote) favorise le développement des actinomycètes mais n'est pas un milieu sélectif pour ces bactéries. Ce milieu favorise également le développement des levures et des champignons. Ces microorganismes sont considérés comme source de contamination par leur croissance plus rapide qui empêcherait l'apparition des colonies d'actinomycètes. Par ailleurs, il a été, aussi, démontré que les branchements des hyphes du mycélium de substrat des actinomycètes favorisent l'incorporation de cellules contaminantes à l'intérieur du réseau formé, ce qui rend très difficile l'obtention d'actinomycètes en cultures pures (**Bushell, 1988**). Ce problème a été rencontré dans d'autres travaux de purification comme ceux de **Lacey (1997)**. Pour toutes ces raisons, la purification des souches, sur ce milieu YMEA favorable, a été très longue et fastidieuse.

❖ Ou encore par l'emploi de substances antibiotiques qui permettent d'inhiber le développement des flores bactériennes fongiques et antagonistes (**Boudemagh et Bensouici, 2014 ; Takizawa et al., 1993**).

Dans ce but, nous avons choisi une méthode d'isolement des bactéries actinomycétales à partir de nos deux échantillons, par l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs. Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon **Porter et al., (1960)** la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Williams et Davies (1965)**, recommandent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour l'isolement des actinomycètes. L'actidione (Cyclohexémide) à 50-100 µg/mL, la Piramicine et la Nystatine à une concentration respectivement de 10 et 100 µg/mL sont les antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isollements des actinomycètes (**Porter et**

al., 1960 ; Boudemagh et Bensouici, 2014). Les antibactériens les plus utilisés dans l'isolement sélectif des actinomycètes, sont la Polymixine à 10 µg/mL, la Pénicilline à 1 µg/mL et l'Acide Nalidixique à 10 µg/mL (Williams et Davies, 1965 ; Takizawa *et al.*, 1993).

Dans nos investigations, l'ensemencement des différents échantillons a été effectué sur trois milieux de culture (Olson, YMEA et Amidon Caseine) complétés en nystatine à raison de 100 µg/mL et en polyméxine à raison de 10 µg/mL. Cela a conduit d'une part à une augmentation considérable du nombre des colonies d'actinomycètes isolées, et d'autre part, à une diminution de la flore fongique et des bactéries à croissance rapide.

Malgré toutes les précautions prises, quelques colonies de champignons ont pu croître, ceci peut être expliqué par le fait que la nystatine n'est pas un anti fongique à large spectre de plus il existe des champignons résistant à ce dernier d'où la nécessité d'utiliser des antifongiques à large spectre ou une combinaison d'antifongiques.

Le problème délicat lors de l'isolement des actinomycètes reste le développement des bactéries à coloration de GRAM positive dont la croissance est envahissante, comme les bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile voire, même, impossible. L'addition d'antibiotique anti-Gram positif permet de réduire de façon considérable le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ne sont pas sans effets sur les actinomycètes qui appartiennent au groupe de bactéries à coloration de GRAM positif.

Les genres les plus importants d'actinomycètes présents dans le sol sont *Streptomycetes*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Actinosynnema*, *Dactylosporangium*, *Rhodococcus*, *Actinosynnema Kitasatospora*, *Gordona*, *Intrasporangium* et *Streptoalloteichus* (Lechevalier et Lechevalier, 1967). Mais le genre *Streptomyces*, est un des grands groupes bactériens les plus abondants dans le sol (Nooshin et Janardhana, 2015).

Les boues contiennent des milliards de microorganismes vivants qui jouent un rôle essentiel dans les processus d'épuration (Sahlström *et al.*, 2006).

Les actinomycètes sont également présents dans les boues activées d'épurations (Shuppler *et al.*, 1998). Le genre *Nocardia* est le plus abondant ; les bactéries appartenant à ce genre présentent une importance particulière dans l'épuration des eaux usées ; leur capacité à former des flocons, facilite la précipitation des particules (Schuppler *et al.*, 1998). Le genre *Gordona* a également été isolé (Kampfer, 1997). Ainsi que le genre *Arthrobacter*, Adamse (1970) en a isolé à partir de boues activées de laiterie, Nand et Rao (1972), et Seiler *et al.*,

(1980) à partir de stations urbaines. Par contre, en étudiant des boues activées d'un site papetier, **Fulthorpe et al., (1993)** n'ont pas signalé d'activité particulière de bactéries à GRAM positif. Dans les boues activées, les actinomycètes font partie des bactéries accumulant les polyphosphates (**Seviour et al., 2003**).

Cependant, il est à noter, que les travaux portant sur l'isolement des *Streptomyces* dans les boues activées sont moins rapportés (**Lin et al., 2011 ; Hocinat et Boudemagh, 2016 ; Silini et al., 2016**).

Ce sont les anciens travaux sur l'isolement des actinomycètes qui ont montré que les sols agricoles et les boues activées ne sont pas stériles et qu'ils sont peuplés d'une microflore très variée. Ces écosystèmes riches de grandes quantités d'humus et de matière organique, peuvent renfermer une flore microbienne et compris actinomycétale très variée qui s'est adaptée à des conditions défavorables.

3. Résultats de la capacité des actinomycètes isolés à dégrader les BTEX

3.1. Croissance des isolats sur les BTEX

Sur l'ensemble des actinomycètes isolés à partir du sol agricole et des boues activées, vingt sont capables de se développer sur au moins un des BTEX comme seule source de carbone et d'énergie (Tables 8 et 9).

Table 8. Isolats provenant des boues activées capables de se développer sur au moins un des composés BTEX comme seule source de carbone et d'énergie.

Isolats	Substrats			
	Benzène	Toluène	Ethyle benzène	Xylène
U	+	+	+	+
F	+	+	+	+
V	+	+	+	+
X	+	-	-	-
G	-	+	-	-
S	+	+	+	+

Table 9. Isolats provenant du sol agricole capables de se développer sur au moins un des composés BTEX comme seule source de carbone et d'énergie.

	Substrats			
	Benzène	Toluène	Ethyle benzène	Xylène
SA13	+	+	+	+
SAIB1	+	-	-	-
SA3	+	-	-	-
SA31	+	-	-	-
SA55	+	-	-	-
SAI3B	+	-	-	-
SAI2BX	+	-	-	-
SAIC3	+	-	-	-
SAI3T	-	+	-	-
SAIG3	-	-	+	-
SAI6X	-	-	-	+
SAI10X	-	-	-	+
SAIXB	-	-	-	+
SAI5X	-	-	-	+

Parmi ces bactéries, les isolats U, F, V, S et SA13 sont les meilleurs et peuvent se développer sur le mélange des composés BTEX. Les quatre premiers proviennent des boues

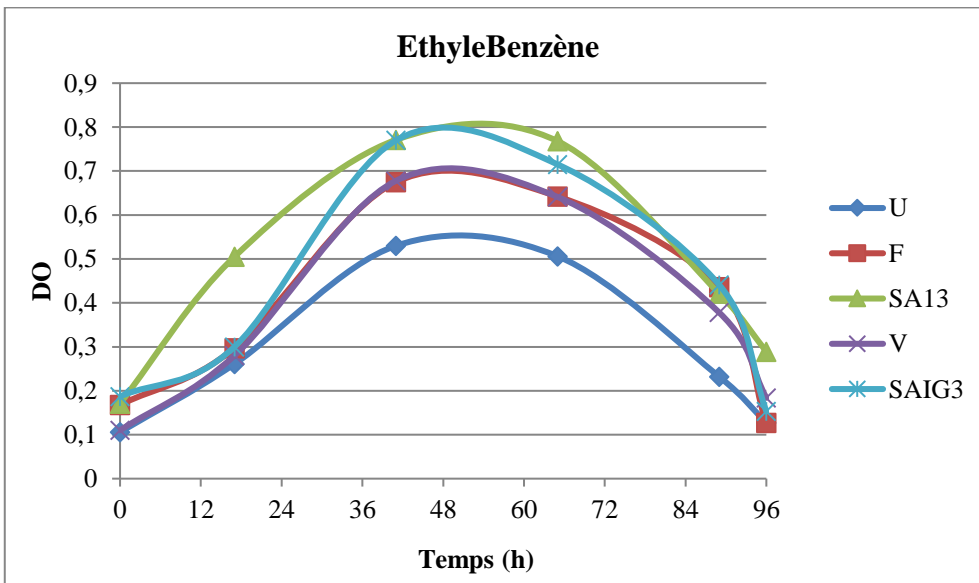
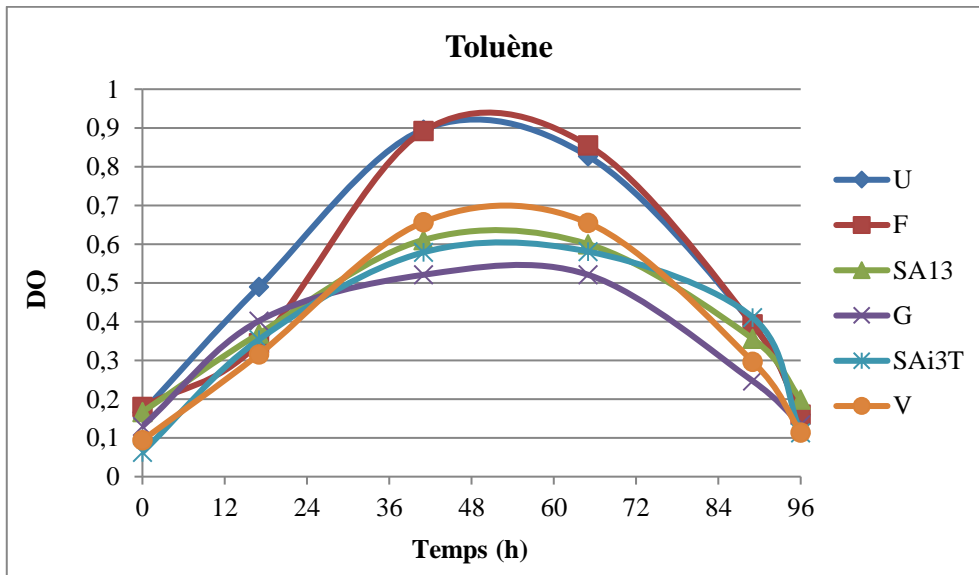
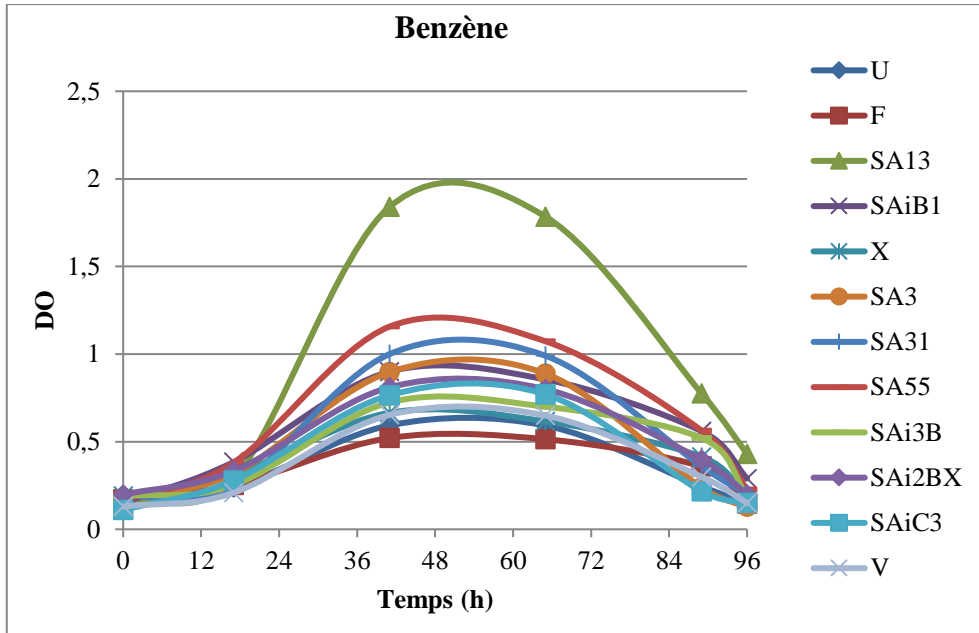
activées. Ce résultat est d'après nous très important, il montre que les actinomycètes présents dans les stations d'épuration des eaux usées sont capables d'utiliser les composés BTEX comme seule source de carbone et d'énergie. D'après une étude menée en Chine par **Zheng et al., 2007**, ils ont testés la dégradation du nitrobenzène dans des conditions de salinité élevée et en présence d'aniline ou de phénol. Selon les auteurs, les résultats indiquent que la souche *Streptomyces Z2* a un potentiel plus élevé de dégradation de nitrobenzène dans les eaux usées industrielles.

Selon **Xu et al., 2014**, une souche bactérienne, QWE-5, capable d'utiliser le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie, a été isolée et identifiée en tant que *Streptomyces* sp. Cette bactérie est à coloration Gram positif, formant des spores avec un flagelle, avec des colonies lisses, convexes et humides. La température et le pH optimal pour QWE-5 était de 35 °C et 7, respectivement. La souche QWE-5 était capable de dégrader le naphthalène complètement à une concentration aussi élevée que 100 mg/L. A des concentrations de naphthalène initiales de 10, 20, 50, 80 et 100 mg/L, la dégradation complète a été obtenue au bout de 32, 56, 96, 120 et 144 heures, respectivement.

L'isolat SA13 est le seul parmi ceux qui proviennent du sol agricole testé dans cette étude, qui est capable de croître sur tous les composés BTEX.

Parmi les BTEX, le Benzène avec un pourcentage d'environ 65 %, est le composé organique volatil le plus utilisé par nos isolats. Parmi eux, 8 isolats soit un pourcentage d'environ 61,53 % proviennent du sol agricole. L'Éthyle benzène est le composé le moins utilisé par nos bactéries.

Les cinétiques de croissance des isolats à croissance positive sur le Benzène, le toluène, l'éthyle-benzène et le xylène sont représentées dans la **figure 24**. Le profil de croissance de l'ensemble des bactéries testées, montre une phase d'adaptation assez lente, qui varie de 12 à 17 heures d'incubation. (Sauf l'isolat SA13 cultivé sur l'éthyle benzène). Alors qu'aucune phase de latence n'a été observée pour les isolats testés sur le toluène. En effet, **Gülensoy et Alvarez (1999) et Cao et al., (2009)** ont rapporté que le toluène était le composé le plus facilement biodégradable par certaines espèces des genres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Clavibacter* et *Rhodococcus*. A l'inverse, le benzène et l'éthyle benzène prennent plus de temps à se dégrader (**Kao et Wang, 2000**). Néanmoins, la croissance maximale a été observée avec la souche SA13 sur le benzène. La phase logarithmique de croissance se produit juste après et dure de 31 à 36 heures, pour la totalité des isolats.



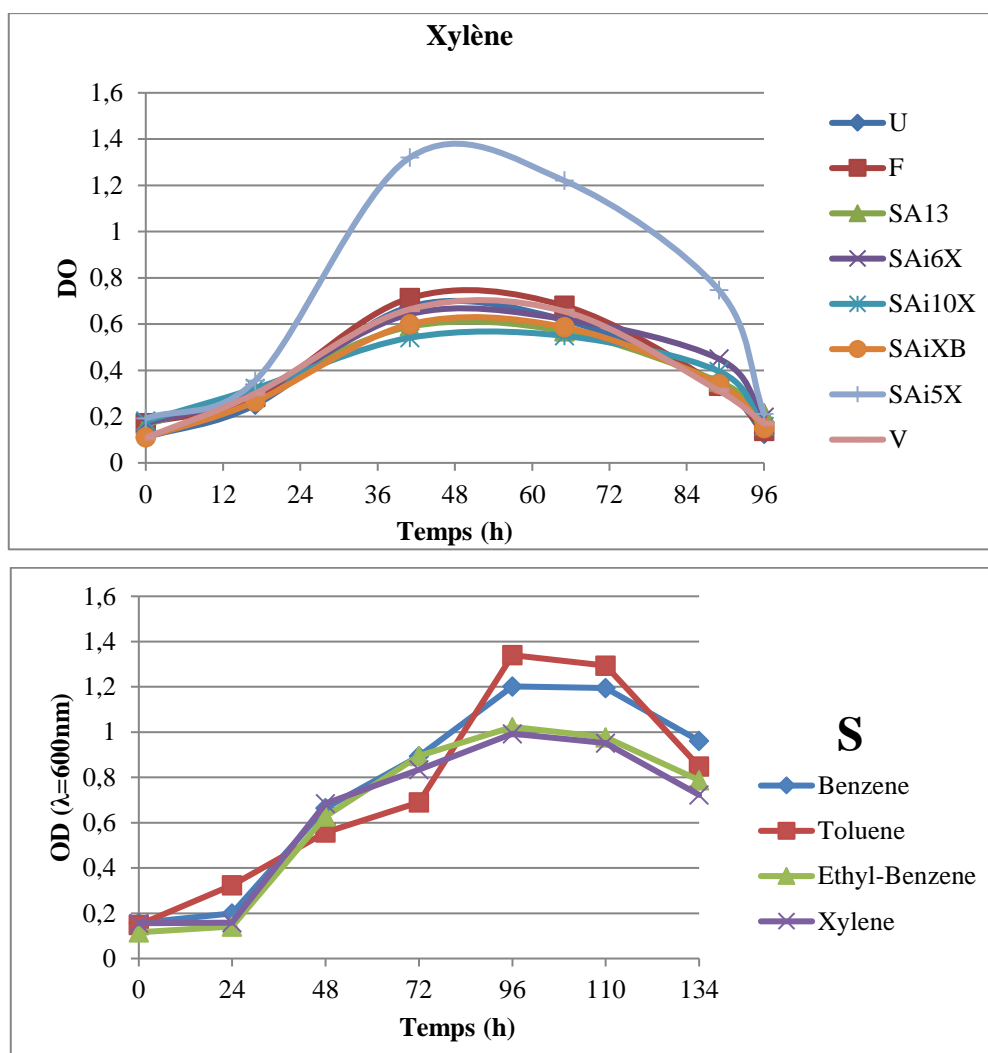


Figure 24 : Cinétiques de croissance des vingt isolats sélectionnés capable de se développer sur les composés BTEX pris comme seule source de carbone et d'énergie.

III.2. Tolérance de différentes concentrations de BTEX par les actinomycètes actifs

Comme le montre le tableau 10, tous les isolats testés ont présenté une croissance microbienne sur les BTEX à la concentration initiale de 100 mg/L. Pour la majorité de ces bactéries, nous n'observons aucune inhibition de la croissance à une concentration de BTEX de 250, 500, 1000 et 1500 mg/L. Cependant, la concentration de 2000 mg/L inhibe la croissance des dix-neuf isolats, ce qui indique une tolérance maximale de 1500 mg/L de BTEX pour presque la majorité des actinomycètes testés.

L'inhibition de la croissance à de fortes concentrations de BTEX peut être attribuée à la toxicité et au stress évoqués par les BTEX sur la bactérie. Ceci peut également être démontré par le fait qu'à des concentrations élevées, les enzymes cataboliques appropriées peuvent être

réprimées. Un résultat similaire a été trouvé lors du test de différentes concentrations initiales de BTEX sur la tolérance bactérienne (Singh et Celin, 2010 ; Fellie *et al.*, 2012).

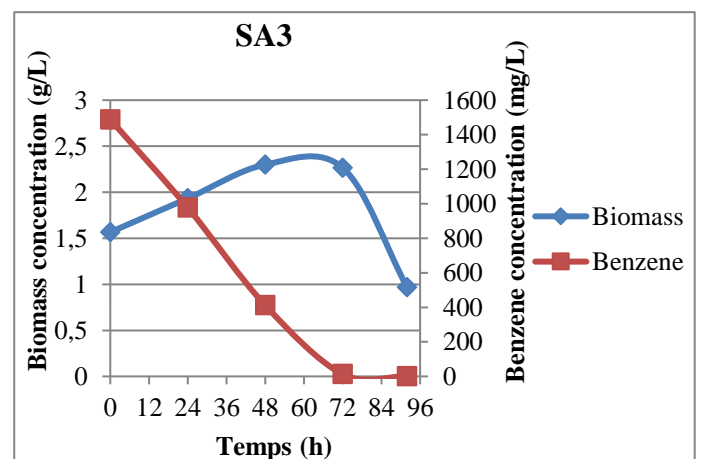
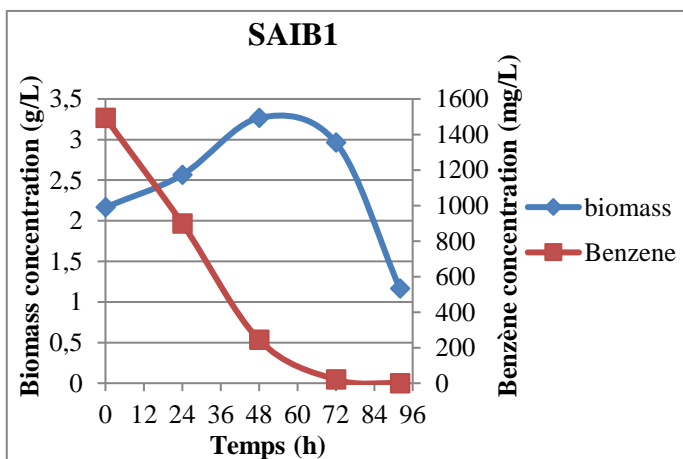
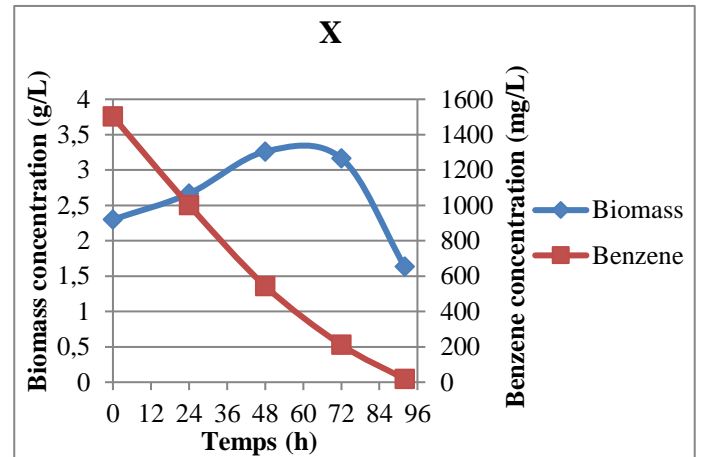
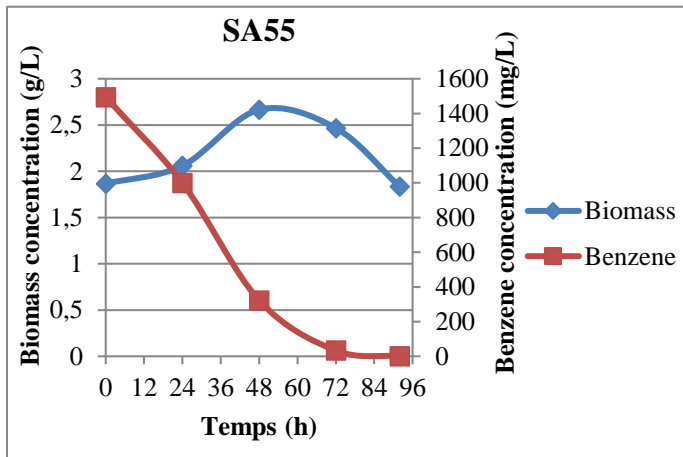
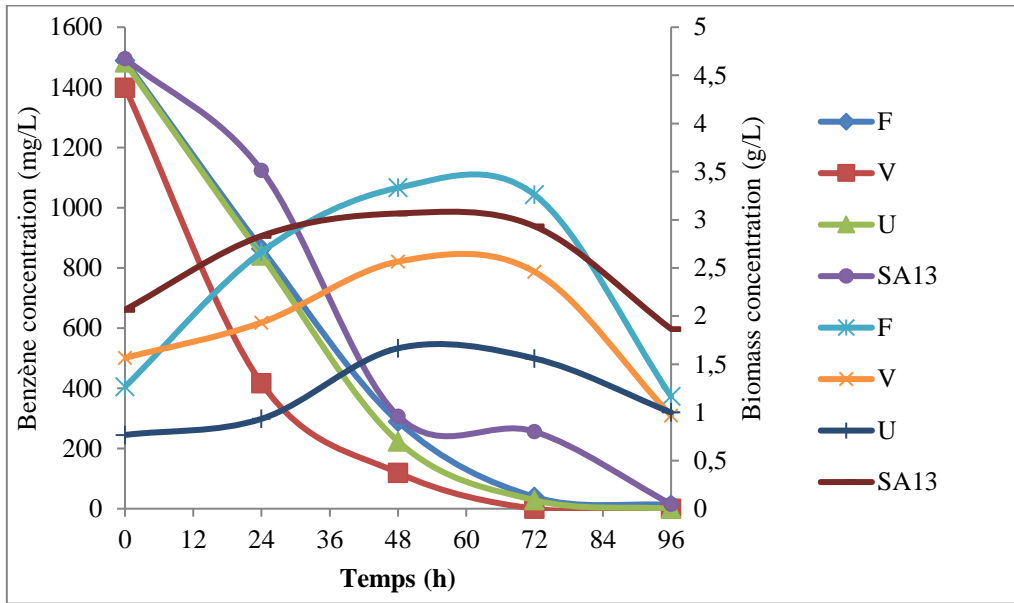
Table 10. Croissance des actinomycètes actifs sur diverses concentrations de BTEX.

BTEX (g/L)	Benzène						Toluène						Ethylbenzène						Xylène					
	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2
Isolats																								
U	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
F	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
V	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
X	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SAI3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SAIB1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA31	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA55	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAI3B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAI2BX	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAIC3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAI3T	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAIG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SAI6X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
SAI10X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
SAIXB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
SAI5X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

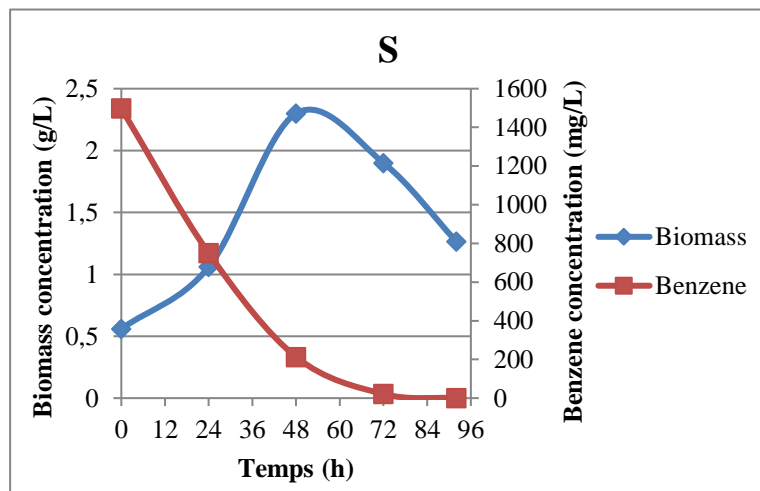
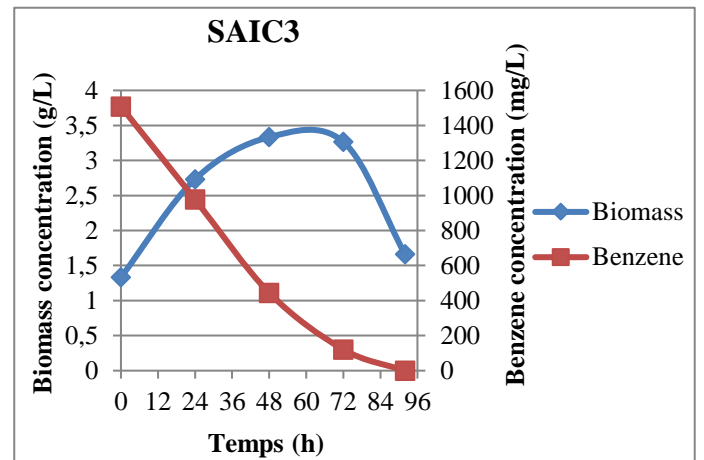
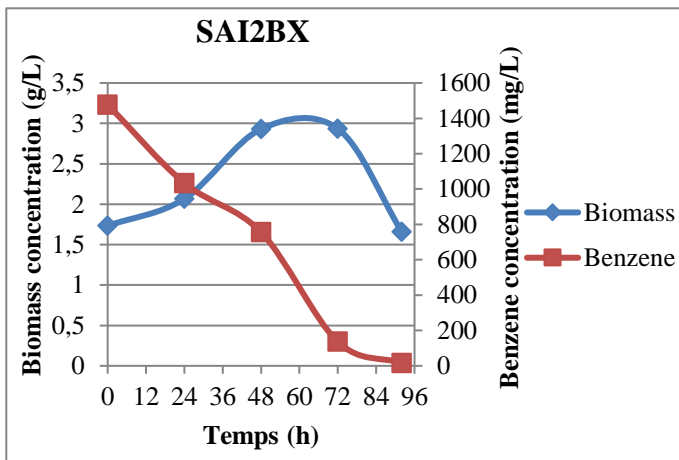
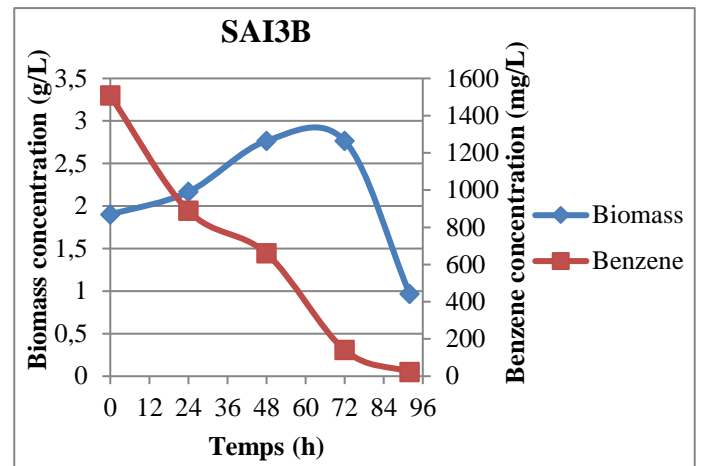
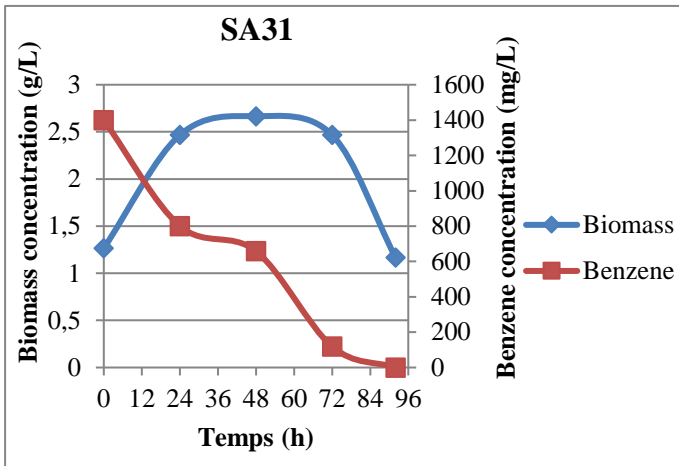
2.3. Etude de la biodégradation des BTEX par des cultures individuelles et mixtes des actinomycètes

Cinquante-cinq fermentations en batch ont été réalisées en utilisant chaque composant BTEX comme seul substrat limitant pour les actinomycètes. Une concentration initiale de 1500 mg/L de BTEX est utilisée pour chaque test de biodégradation. Le taux de dégradation est déterminé à partir de la surface des pics de l'analyse chromatographique (CPG). Les profils de dégradation des BTEX ainsi que la biomasse correspondante en fonction du temps par des cultures individuelles ou mixtes des souches les plus actives sont représentés dans les figures 25, figures 26. Les résultats des 4 isolats (F, V, U, SAI3) capables de dégrader à la fois tous les 4 composés BTEX sont regroupés dans un même graphe. La figure 27 représente les résultats du contrôle abiotique.

❖ **Benzène (a)**



Figures 25. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) du Benzène (a), en fonction du temps (h) pour les 13 monocultures.



Figures 25. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) du benzène (a), en fonction du temps (h) pour les 13 monocultures (Suite).

❖ Toluène (b)

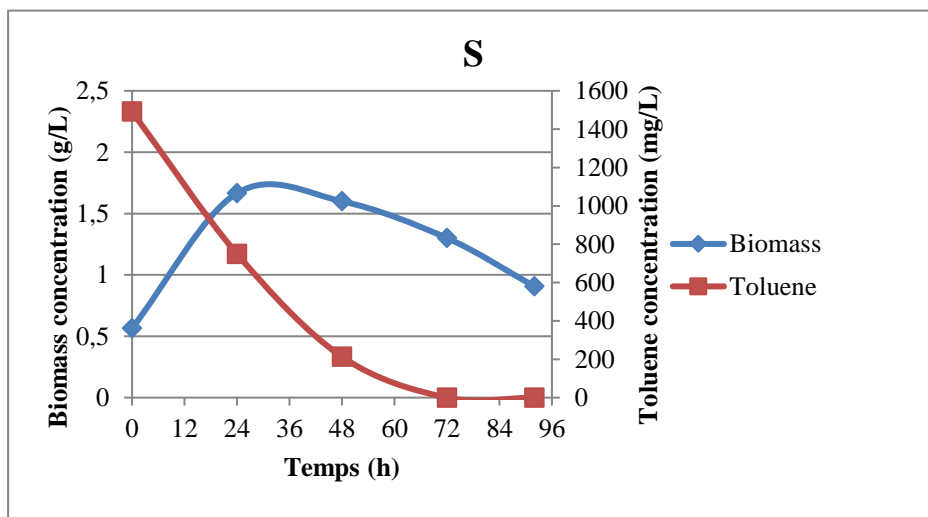
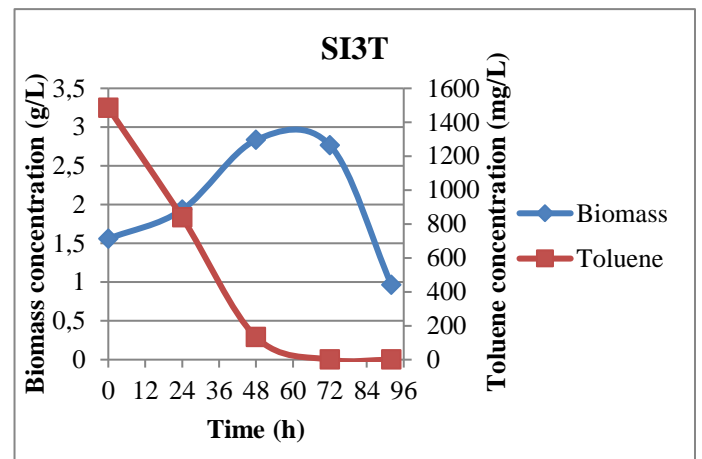
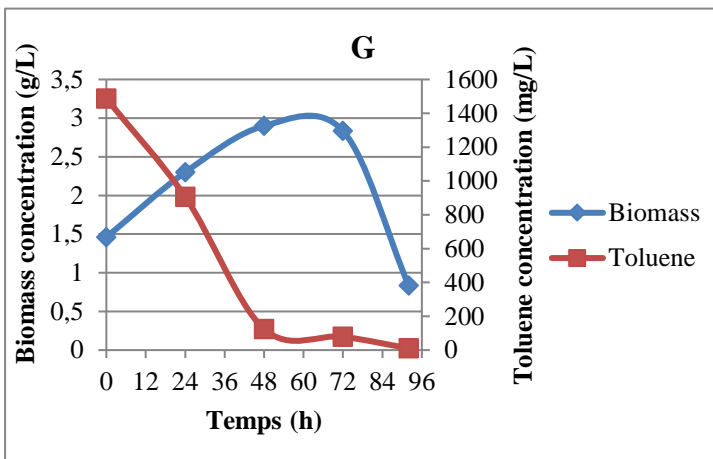
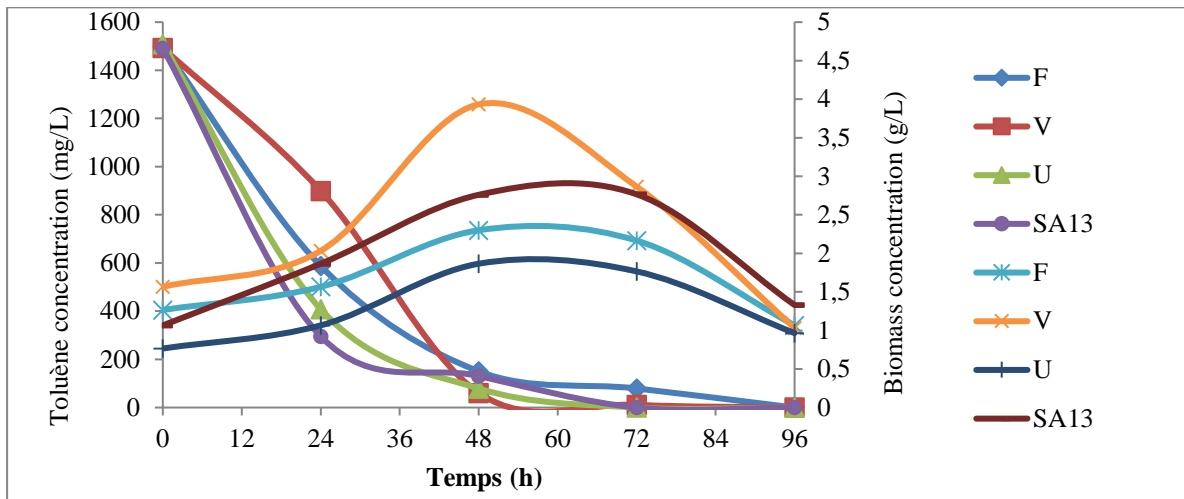


Figure 25. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) du toluène (b), en fonction du temps (h) pour les 7 monocultures (Suite).

❖ Ethylbenzène (c)

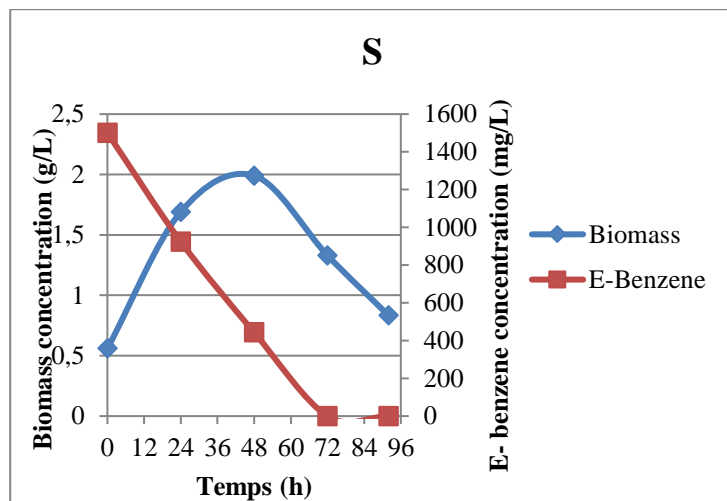
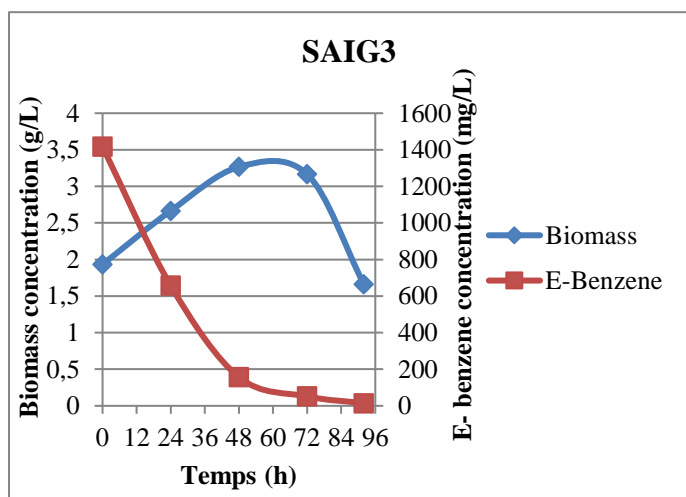
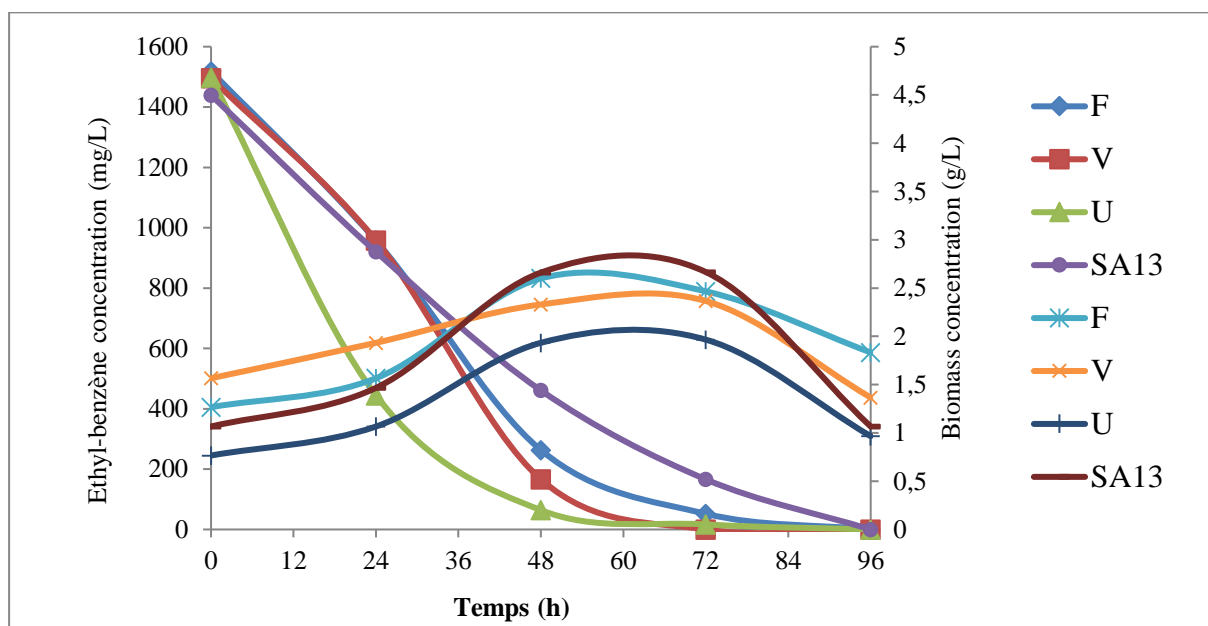
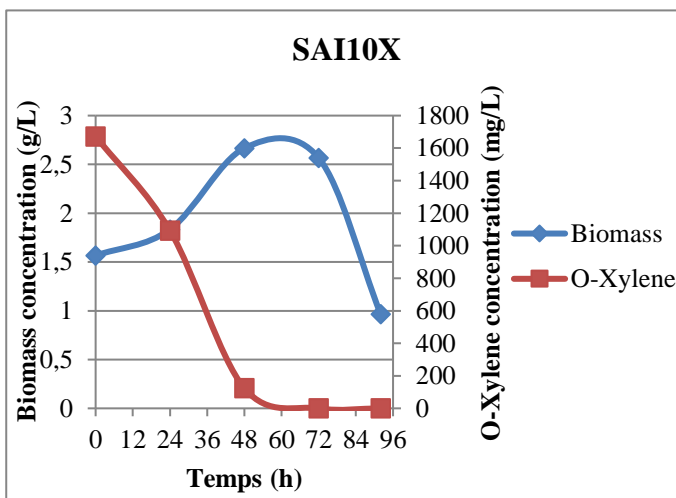
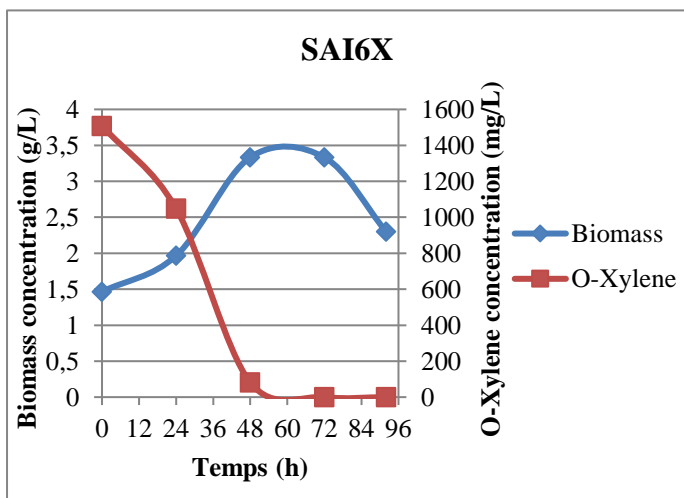
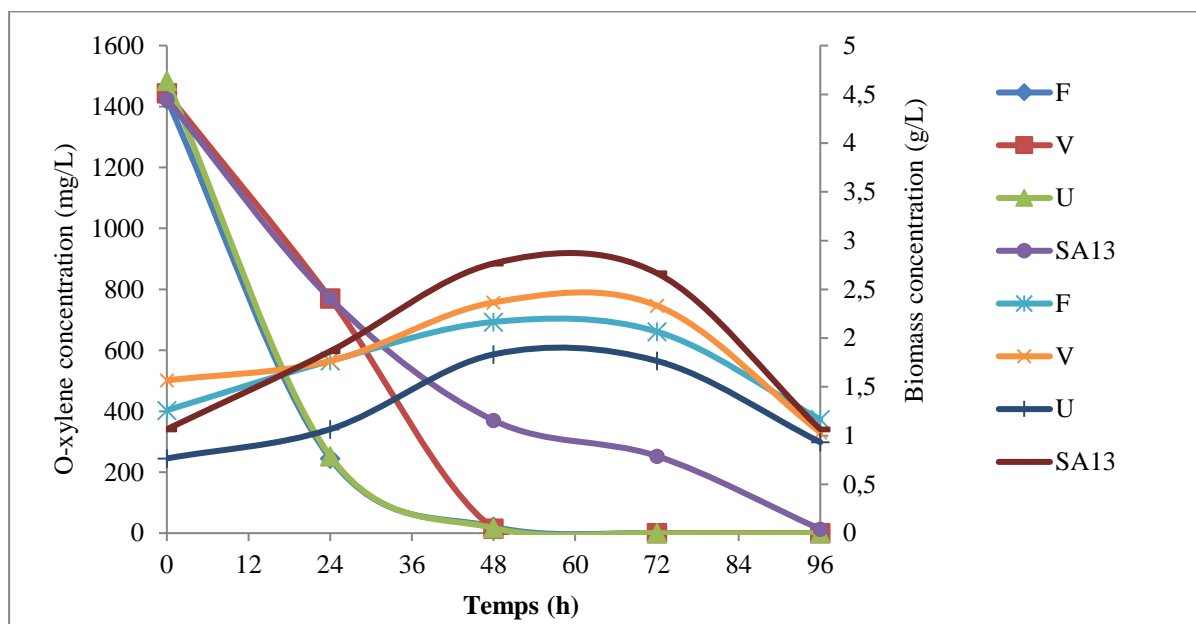
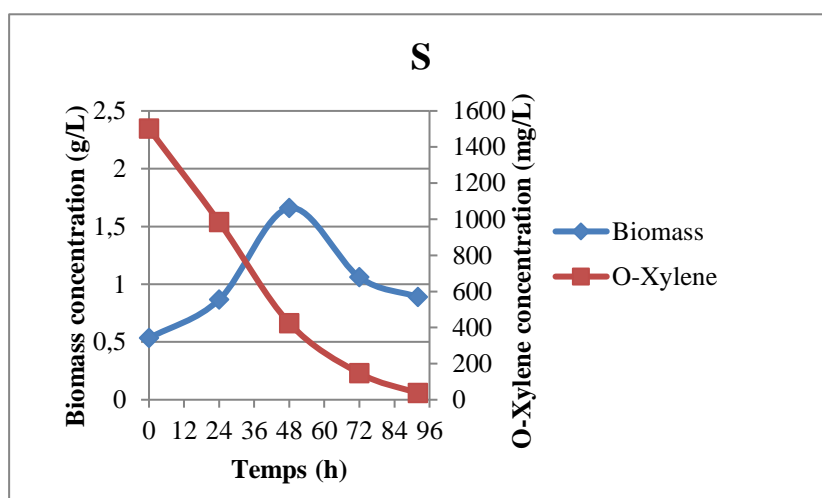
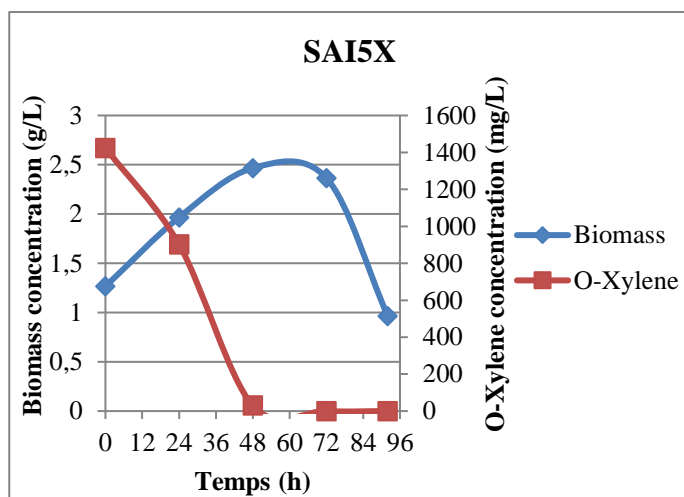
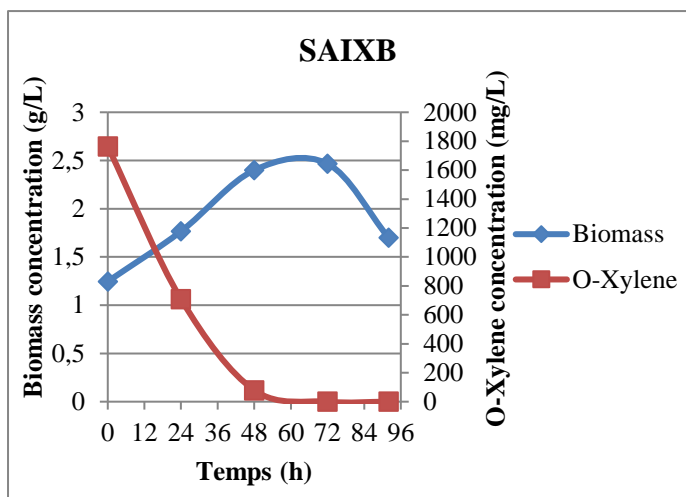


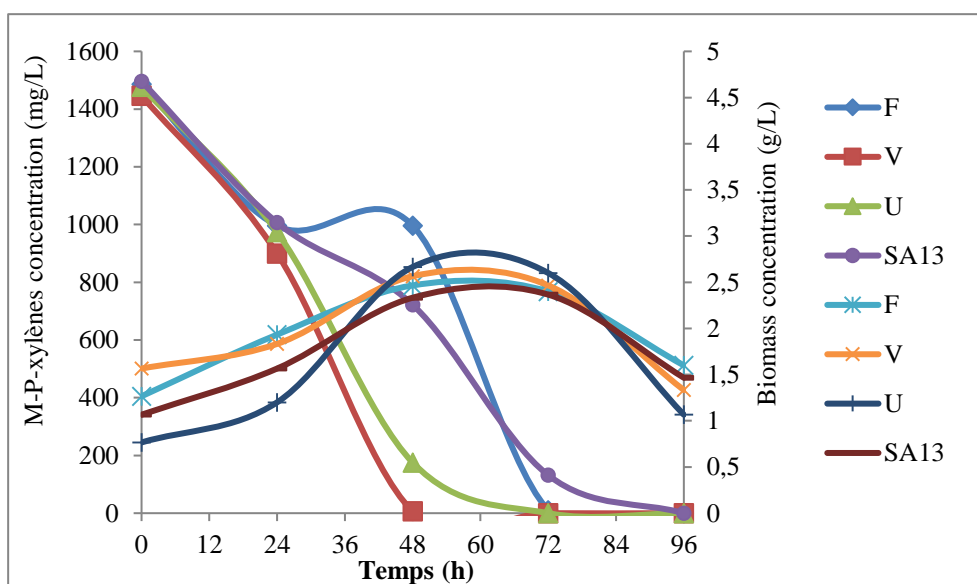
Figure 25. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) de l'éthyle-benzène (c), en fonction du temps (h) pour les 6 monocultures (Suite).

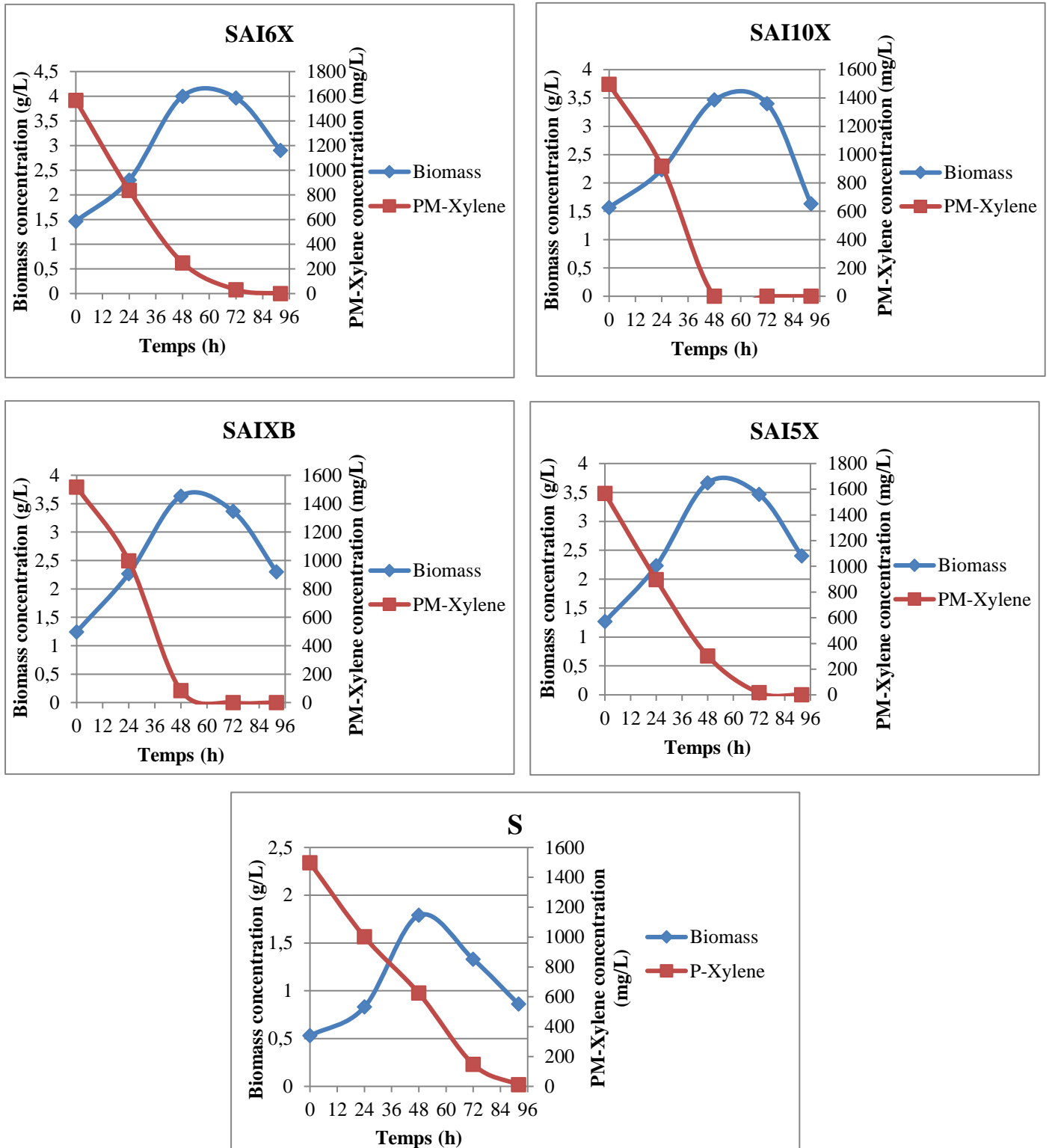
❖ Ortho-Xylène (d)



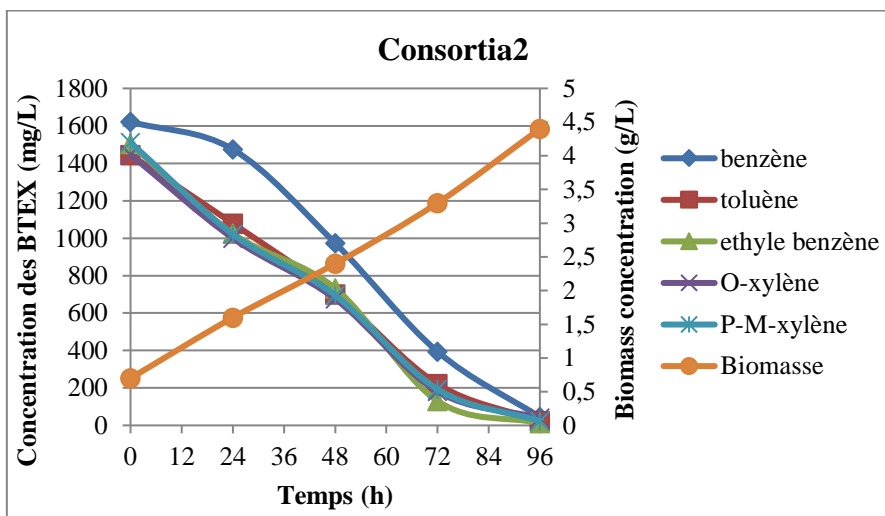
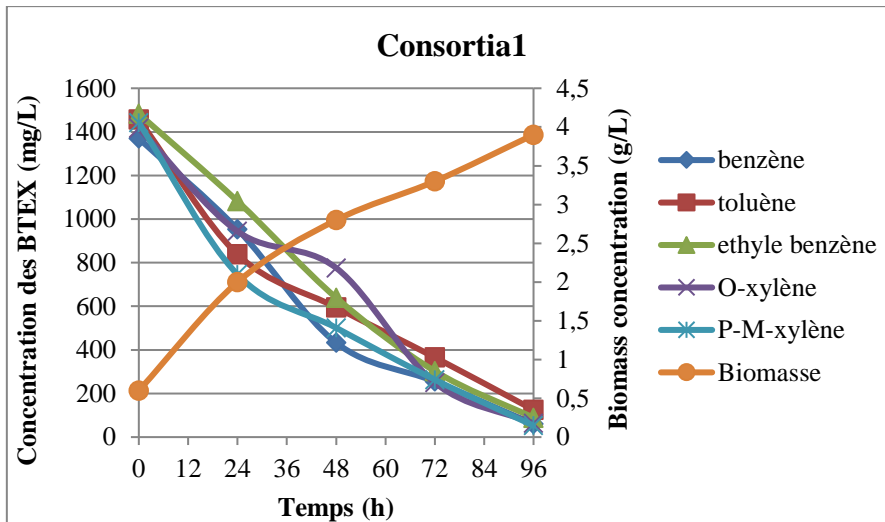


❖ Para/Meta Xylènes (e)





Figures 25. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) du O-Xylène (d) et P-M-Xylène (e) en fonction du temps (h) pour les 9 monocultures.



Figures 26. Evolution de la concentration en biomasse X (g/L) et la concentration (mg/L) des BTEX en fonction tu temps (h) des 2 consortiums reconstitués.

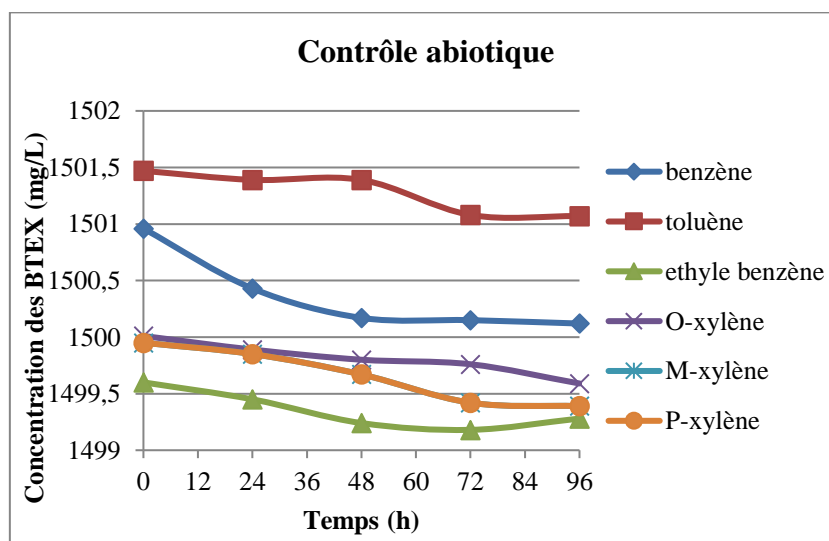


Figure 27. Contrôle abiotique des BTEX.

Les courbes de croissance de ces bactéries présentent des phases exponentielles et stationnaires typiques. Toutes les données expérimentales montrent une élimination complète des composés BTEX, **les figures 25** montrent que la concentration en BTEX de 1500 mg/L est complètement consommée dans un intervalle de temps allant de 48 à 96 h pour la plupart des cultures, alors que chez les témoins abiotiques, les concentrations de BTEX sont restées constantes (pas de dégradation des composés (**Figure 27**)). Et qu'au même moment les biomasses correspondantes augmentent à leur maximum. Il faut noter que pour toutes les cultures, la phase de latence paraît relativement absente, ceci est probablement dû au fait que l'ensemencement du milieu provenant d'une pré-culture de 3 jours. Cet inoculum a permis aux cellules bactériennes de mieux s'adapter au nouveau milieu.

En plus de cela, on observe qu'après la dégradation complète ou la conversion des BTEX, il n'y a plus d'augmentation de la biomasse au niveau des cultures individuelles. A l'inverse des cultures mixtes, ou une augmentation de biomasse est visible après dégradation des BTEX. Les courbes de croissance cellulaire et de dégradation des BTEX sont superposables. La dégradation des BTEX est donc associée à la croissance.

Pour le benzène on peut voir sur les **figures 25(a)** que la concentration de 1500 mg/L est complètement consommée à partir de 72h à 96h d'incubation pour les isolats V, U, SAIB1, SA3, SA31, SAIC3 et les cultures mixtes 1 et 2, F, SA13, X, SA55, SAI3B, SAI2BX et S respectivement. Et qu'à la même période, la biomasse correspondante augmente à un seuil maximum de 2,56 g/L, 1,66 g/L, 3,26 g/L, 2,3 g/L, 2,66 g/L, 3,33 g/L, 3,9 g/L, 4,4 g/L, 3,33 g/L, 3,06 g/L, 3,26 g/L, 2,66 g/L, 2,76 g/L, 2,93 g/L et 1,9 g/L respectivement.

Pour la concentration de toluène de 1500 mg/L (**figures 25 (b)**), elle est totalement dégradée après 72 h pour toutes les cultures, et la biomasse correspondante augmente jusqu'à un maximum de 3,9 g/L, 4,2 g/L, 2,3 g/L, 2,93 g/L, 1,86 g/L, 2,76 g/L, 2,9 g/L, 2,83 g/L et 1,66 g/L pour la culture mixte 1 et 2, F, V, U, SA13, G, SAI3T et S respectivement.

De même pour l'éthyle benzène (**figure 25 (c)**), il est totalement consommé après 72 h pour toutes les cultures et la biomasse correspondante est de 3,9 g/L, 4,4 g/L, 2,6 g/L, 2,33 g/L, 1,93 g/L, 2,66 g/L et 3,26 g/L pour la culture mixte 1 et 2, F, V, U, SA13 et SAIG3 respectivement. Et après 48 h pour l'isolat S et la biomasse correspondante atteint 1,9 g/L.

L'ortho-xylène est complètement dégradé par les actinomycètes testés après 72 heures (**figure 25 (d)**) également et pendant ce temps, la biomasse atteint 2,16 g/L, 2,36 g/L, 1,83 g/L, 2,76 g/L, 3,33 g/L, 2,66 g/L, 2,4 g/L, 2,46 g/L, 3,9 g/L et 4,4 g/L pour les souches F, V, U, SA13, SAI6X, SAI10X, SAIXB, SAI5X, culture mixte 1 et 2 respectivement. L'isolat S dégrade l'ortho-xylène après 96 h et la biomasse maximale atteint 1,66 g/L.

On peut voir aussi dans les **figures 25(e)**, que les différentes cultures dégradent en totalité le m- p-Xylènes à des intervalles différents pour chaque culture, allant de 48 h à 96 h, en parallèle la croissance bactérienne augmente pour atteindre les valeurs de 2,66 g/L, 3,06 g/L, 2,76 g/L, 2,16 g/L, 3,2 g/L, 2,93 g/L, 3,66 g/L, 2,76 g/L, 3,9 g/L, 4,4 g/L et 1,79 g/L pour les souches F, V, U, SA13, SAI6X, SAI10X, SAIXB, SAI5X, et les cultures mixtes 1 et 2 et S respectivement. On a également observé qu'une fois la dégradation totale du BTEX est atteinte, il n'y avait plus d'augmentation de la biomasse.

Ces isolats appartenant aux actinomycètes décrits dans les résultats, métabolisent tous les composants BTEX soit individuellement, soit en culture mixte dans des consortiums en CO₂ en conditions aérobies. La reprise significativement élevée du taux de carbone, indique que le sort prédominant pour les composés BTEX est minéralisé et incorporé dans les structures cellulaires (**Jin et al., 2013**).

Les enzymes en jeu sont les mono-oxygénases ou di-oxygénases. Ces enzymes permettent d'activer la réaction de dégradation. Ainsi, l'hydrocarbure est oxydé, de l'énergie est produite et une partie de l'hydrocarbure est assimilée par la cellule. **La figure 28** décrit l'équation type de la biodégradation d'un hydrocarbure en milieu aérobie (**Widdel et Rabus, 2001**).

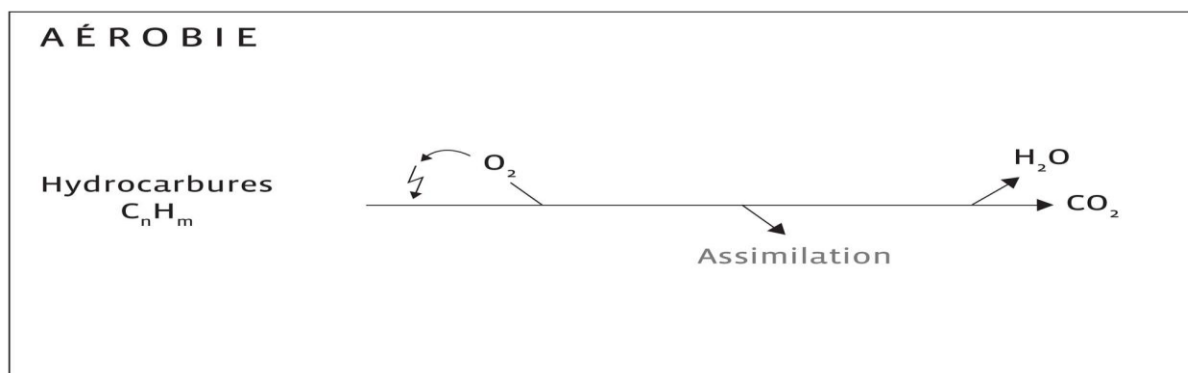


Figure 28. Dégradation d'un hydrocarbure en milieu aérobie. L'hydrocarbure est oxydé, une partie est assimilée par la bactérie et une autre partie permet de produire de l'énergie (catabolisme). Même s'il n'est pas toujours le substrat utilisé, l'oxygène est nécessaire pour activer la réaction.

La capacité de certains microorganismes à métaboliser ces composés a été rapportée depuis longtemps (**Tableau 11**). Des observations similaires pour des expériences de cultures individuelles sont rapportées pour les isolats de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* et *Mycobacterium cosmeticum* byf-4 (**Littlejohns and Daugulis, 2008 ; Zhang et al., 2013**), et les isolats *Flavobacterium* sp., *Rhodococcus* sp. et *Pseudomonas* sp. pour les consortiums (**Littlejohns and Daugulis, 2008**).

Table 11. Exemples de microorganismes dégradant les BTEX.

Microorganisme	Substrat	Références
Bactérie		
<i>Pseudomonas putida</i>	BTE(o-)X	(Shim and Yang, 1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BTE(o-)X	(Shim and Yang, 1999)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B	(Kim <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	BT	(Alagappan and Cowan, 2004)
<i>Pseudomonas putida</i> YNS1	BTEX	(Otenio <i>et al.</i> , 2005)
<i>Burkholderia pickettii</i> PKO1	BT	(You <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59	BTE(o- m- p-)X	(Alagappan and Cowan, 2004)
<i>Alcaligenes (Achromobacter)</i> <i>xylooxidans</i>	BTEX	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thermus</i> sp.	BTEX	(Chen and Taylor, 1997)
<i>Bacillus sphaericus</i>	BTEX	(Rahul <i>et al.</i> , 2013)
<i>Flavobacterium</i> sp.	BTEX	(Lu Si-jin <i>et al.</i> , 2006)
<i>Planococcus</i> sp. strain ZD22	BTEX	(Li <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	BTEX	(Deeb and alvares-Cohen 1999)
<i>Mycobacterium cosmeticum</i> byf-4	BTE(o-)X	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
<i>Nocardia</i> sp.	BTX	(Weber and Corseuil, 1994)
<i>Arthrobacter</i> sp.	BTX	(Weber and Corseuil, 1994)
<i>Streptomyces</i> sp. PS12	BTEX	(Djokic <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptomyces</i> sp. PN1	BTEX	(Djokic <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptomyces</i> sp.	B	(Zilli <i>et al.</i> , 2005)
Archée		
<i>Haloferax</i> sp.	BT	(Al-Mailem <i>et al.</i> , 2010)
<i>Halobacterium</i> sp.	BT	(Al-Mailem <i>et al.</i> , 2010)
<i>Halococcus</i> sp.	BT	(Al-Mailem <i>et al.</i> , 2010)
Champignon		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	BTEX	(Yadav and Reddy, 1993)
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS115145	BTE (o-, m-, p-)X	(Garcia-Peña <i>et al.</i> , 2008)
<i>Cladophialophora psammophila</i>	TEX	(Badali <i>et al.</i> , 2011)

Les Proteobacteries composent le principal groupe bactérien cultivable dégradant les BTEX. La plupart des rapports de dégradation, le métabolisme et la génétique des dégradeurs de BTEX concernent des espèces du genre *Pseudomonas* (Arenghi et al., 2001 ; Yu et al., 2001 ; Jahn et al., 2005 ; Wang et al., 2008 ; Hassen et al., 2014) ou d'espèces connexes proches tels que *Ralstonia* et *Burkholderia* (Kato et al., 1996). 86,9 % des espèces bactériennes isolées à partir d'échantillons de pétrole brut ou ses dérivés tels que les BTEX sont des espèces appartenant au genre *Pseudomonas* (Ridgeway et al., 1990). D'autres études rapportent la capacité d'autres bactéries à dégrader les BTEX comme *Moraxella* sp. (Hogx et Jaenicee, 1972), *Dechloromonas* strain RCB (Chakraborty et al., 2005), *Planococcus* sp strain ZD22 (Li et al., 2006), *Marinobacter vinifirmus* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Berlendis et al., 2010). *Alcaligenes denitrificans* (Weber et Corseuil, 1994), *Thermus* sp (Chen et Taylor, 1997), *Escherichia coli* DH5 (Morlett-Chavez et al., 2010) et *Bacillus* sp. (Rahul et al., 2013).

Les Proteobacteries comprennent principalement les γ -Proteobacteries, plus particulièrement le genre *Pseudomonas* (Hendrickx et al., 2006). Cavalca et al., 2003 ont pu isolés à partir d'un milieu aquifère pollué par les BTEX, après traitement par injection d'air, des bactéries appartenant aux deux classes, Proteobacteria (*Pseudomonas*, *Azoarcus* et *Bradyrhizobium*) et Actinobacteria (*Microbacterium* et *Mycobacterium*). D'autre part, Stapleton et Saylor (2000), ont principalement isolés des Proteobacteries et aucune Actinobactérie. La prolifération des Proteobacteries dégradant les BTEX semble être une caractéristique majeure de l'adaptation de ces bactéries dans les sites contaminés aux BTEX.

Cependant, la dégradation des BTEX par des espèces d'actinomycètes est moins rapportée à ce jour. Selon la littérature, les actinomycètes semblent avoir plus d'affinité pour les hydrocarbures aliphatiques et les composés cycloalkyle phényl- ou substitués par un résidu de longueur de chaîne variable d'alkyle (Bouchez-Naiitale et al., 1999). Ce n'est pas surprenant étant donné que les BTEX sont des composés volatils et le manque d'activation de l'oxygène ou de l'anion nitrate rendant ainsi ces composés moins stables et résistants à la biodégradation.

Les Actinobacteries sont représentées principalement par les espèces du genre *Rhodococcus*, *Arthrobacter* et *Nocardia*, à l'exemple de *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. (Weber et Corseuil, 1994), *Rhodococcus rhodochrous* (Deeb et Alvarez-Cohen, 1999). Les travaux portant sur la dégradation de l'ensemble des BTEX sont rare, à l'exception des expérimentations réalisées par Zilli et al., 2005, avec une poudre compost composé des

bactéries Gram positif et négatif et des *Streptomyces*, utilisée dans un biofiltre pour traitement de l'air pollué par du benzène.

Bien que des groupes diversifiés de microorganismes capables de dégrader le m- et le p-xylène soient rapportés, seuls quelques organismes ont été signalés pour métaboliser l'o-xylène : des Gram négatif : *Pseudomonas stutzeri* (Baggi *et al.*, 1987), *Ralstonia* sp. PHS1 (Lee and Lee, 2002) et *Corynebacterim* C125 (Schraa *et al.*, 1987) et trois bactéries *Rhodococcus* (Kim *et al.*, 2002 ; Gennaro *et al.*, 2001 ; Bickerdike *et al.*, 1997) provenant des bactéries Gram-positives. Cela a permis de suggérer que le groupe méthyle présent en position ortho rend la dégradation de l'o-xylène difficile chez les bactéries. Nos actinomycètes sont capables de dégrader 1500 mg/L d'o-xylène *in situ* après 48-96 heures d'incubation. Comparativement, l'oxydation partielle de l'o-xylène par *Nocardia corallina* (Gibson and Subramanian, 1984) conduit à des intermédiaires qui ne sont pas utilisés pour la croissance, ces résultats indiquent que l'o-xylène n'est pas complètement dégradé par cette souche.

Cette concentration élevée (1500 mg/L) de biodégradation de BTEX par des actinomycètes n'a jamais été démontrée dans les travaux précédents. En effet, Jin *et al.*, (2013) ont obtenu une efficacité de biodégradation de 45,5% de BTEX à 240 mg/L par *Janibacter* sp. SB2 après 60 heures d'incubation. *Mycobacterium* sp. CHXY119 et *Pseudomonas* sp. YATO411 ont pu dégrader complètement 24,68 mg/L de benzène, 23,67 mg/L de toluène, 21,97 mg/L d'éthyle benzène et 29,68 mg/L de p-xylène au bout de 24 heures (Xin *et al.*, 2013). Zhang *et al.*, (2013) ont isolé une souche dégradante des BTEX, *Mycobacterium cosmeticum* byf-4, et ils ont observé une efficacité de dégradation de 100 mg/L de BTEX entre 82 et 100%. *Pseudomonas putida* F1 libre pourrait dégrader complètement 15 et 30 mg/L de benzène et de toluène respectivement et un taux de 60-80% de 60 mg/L d'o-xylène après un temps de contact de 6 à 14 heures (Robledo-Ortíz *et al.*, 2011). De même, Djokic *et al.*, ont isolés à partir de la rhizosphères de deux plantes, *Streptomyces* sp. PS12 et *Streptomyces* sp. PN1 capables de métaboliser une grande variété de composés aromatiques comprenant un mélange de 600 µL de benzène, de toluène, d'éthylbenzène et de xylènes avec un ratio volumique de 1: 1: 1: 1: 1. (Djokic *et al.*, 2011). Dans une autre étude, *Streptomyces* sp. Z2, isolé des boues activées, a pu dégrader jusqu'à 150 mg/L de phénol, mais n'a pas pu utiliser le benzène, le toluène et le chlorobenzène (Zheng *et al.*, 2007).

Il est important de noter que la capacité de dégradation d'une culture microbienne mixte n'est pas nécessairement le résultat d'une simple addition des capacités des souches individuelles. Les avantages des cultures mixtes dans la bioremédiation sont largement démontrés (Surzhko *et al.*, 1995 ; Syoko *et al.*, 1996 ; Koma *et al.*, 2001; Ijaha et Antaib,

2003). Ces avantages peuvent être attribués aux effets des interactions synergiques des différents microorganismes. Certaines espèces sont capables d'éliminer les métabolites toxiques, qui entravent les activités des autres espèces. Ensuite, il est possible que les autres espèces dégradent totalement les composés complexes (**Ghazali et al., 2004**).

La dégradation des BTEX par des cultures mixtes dans cette étude a montré une dégradation des BTEX après 96 h d'incubation pour le consortia 1 et après 96 h pour le benzène, 72 h pour le toluène et le xylène. Des résultats similaires ont été observés que ce soit dans des conditions aérobies ou anaérobies, une co-culture de *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* peut permettre de dégrader tous les hydrocarbures BTEX (**Shim et al., 2001**). Nous avons utilisés les consortiums dans le but d'accélérer le processus de biodégradation en rassemblant dans un groupe 4 actinomycètes capables de dégrader tous les composants BTEX chacune (isolats: U, F, V, SA13), et dans l'autre groupe, 4 isolats chacune dégrade l'un des composés BTEX (isolats : SAIB1, SAI3T, SAIG3, SAI5X) dans le but de vérifier le résultat de l'addition des souches ayant une capacité de dégrader les BTEX individuellement. On peut remarquer de **la figure 26**, la concentration de la biomasse maximale du consortia 2 (4,4 g/L) est plus élevée que celle du consortia 1 (3,9 g/L). Ce résultat est dû probablement au phénomène de compétition entre les bactéries de la culture mixte 1, vu que chacune de ces bactéries a montré une aptitude à dégrader tous les composants BTEX. **Littlejohns and Daugulis, (2008)** ont étudié la dégradation d'un mélange de BTEX par un consortium constitué de 7 *Pseudomonas*. Les observations des résultats comprennent l'inhibition de la dégradation du benzène en présence de toluène et en présence d'éthylbenzène. De plus, une dégradation accrue du benzène a été observée en présence de o-xylène et la dégradation du toluène a été améliorée en présence de benzène.

Quelques espèces fongiques peuvent aussi dégrader ces composés il s'agit du basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* (**Yadav et Reddy, 1993**), *Cladosporium sphaerospennum* (**Weber et al., 1995**) et *Cladophialophora* (**Prenafeta-Boldù et al., 2002**). La dégradation du benzène a été signalée également chez les archées (**Al-Mailem et al., 2010**).

Dans cette étude, nous avons étudié la capacité de dégradation des BTEX par le groupe le plus abondant du microbiote tellurique à savoir les actinomycètes. Ce groupe bactérien possède une croissance plus au moins rapide avec une variété d'activités métaboliques très impressionnante. Les résultats obtenus indiquent que l'ensemble des actinomycètes de cette étude peuvent contribuer significativement à la bioremédiation des sites pollués par les

BTEX. Cependant, les études sur la dégradation des composés BTEX par les membres de ce genre restent très limitées.

4. Tests de la biodégradation des pesticides

Afin de déterminer la capacité de dégradation de ces pesticides, les isolats purifiés ont été étalés sur un milieu minimum **Vandermesse** additionné de l'un des pesticides testés comme seule source de carbone et d'énergie.

La capacité des souches à dégrader ces pesticides se traduit par une bonne croissance sur le milieu, néanmoins une faible dégradation se manifeste par un nombre assez restreint de colonies, ceci est expliqué par la production des enzymes de biodégradation. L'absence totale de croissance sur le milieu est expliquée par l'incapacité de ces bactéries à produire des enzymes de biodégradation et à utiliser ces pesticides comme seule source de carbone.

Afin de confirmer la dégradation, les mêmes isolats ont été étalés en même temps sur le même milieu minimum exempt de pesticide.

4.1. Test de la biodégradation des herbicides

Les résultats de la biodégradation des herbicides (Roundup, Glyphosate, Mamba, Zoom, Traxos, Axial et Herbasate), sont rassemblés dans les **tableaux 12, 13 et 14** (annexe) et les **figures 29 et 30**.

Parmi les 72 isolats du sol agricole testés, 38 sont capables de croître sur le milieu contenant le Roundup alors que 15 isolats présentent une faible croissance correspondant respectivement à un pourcentage de 52,77% et 20,83%. Sur les 18 isolats des boues activées, 9 soit 52,94 % ont dégradé le Roundup.

Concernant l'herbicide Zoom 41 isolats du sol ont pu le dégrader soit un taux de 56,94% et 21 isolats (de 29,16%) manifestent une faible dégradation. 9 isolats des boues (de 52,94) ont pu croître sur le Zoom.

Pour le Glyphosate 54 isolats du sol soit 75% sont incapables de l'utiliser comme seule source de carbone et uniquement 18 isolats (25%) ont cette aptitude dont deux isolats présentant une faible croissance sur ce xénobiotique. 15 (88,23%) actinomycètes des boues activées ont manifesté une bonne croissance sur le Glyphosate.

On a constaté également, que sur le milieu contenant le Mamba, 43 isolats du sol soit un pourcentage de 59,72% sont capables de croître sur cet herbicide et 18 isolats soit 25% présentent une absence totale de croissance. 12 isolats des boues activées soit 70,58% ont pu croître sur le Mamba.

Concernant le Traxos, le nombre de bactéries capables de le dégrader est de 31 isolats du sol ce qui correspond à 43,05%. 16 isolats n'ont pas cette aptitude. 9 isolats des boues ont pu dégrader le Traxos (52,94%).

D'autre part, seulement 21 bactérie provenant du sol agricole ont l'aptitude de dégrader l'Axial alors que 27 bactéries (37.5%) manifestent une faible dégradation. 9 bactéries des boues (52,94%) ont pu l'utilisé comme seule source de carbone.

Enfin 39 isolats du sol et 10 isolats des boues ont pu croitre sur le milieu contenant l'Herbasate ce qui correspond à un pourcentage de 54.16% et 58.82% respectivement.

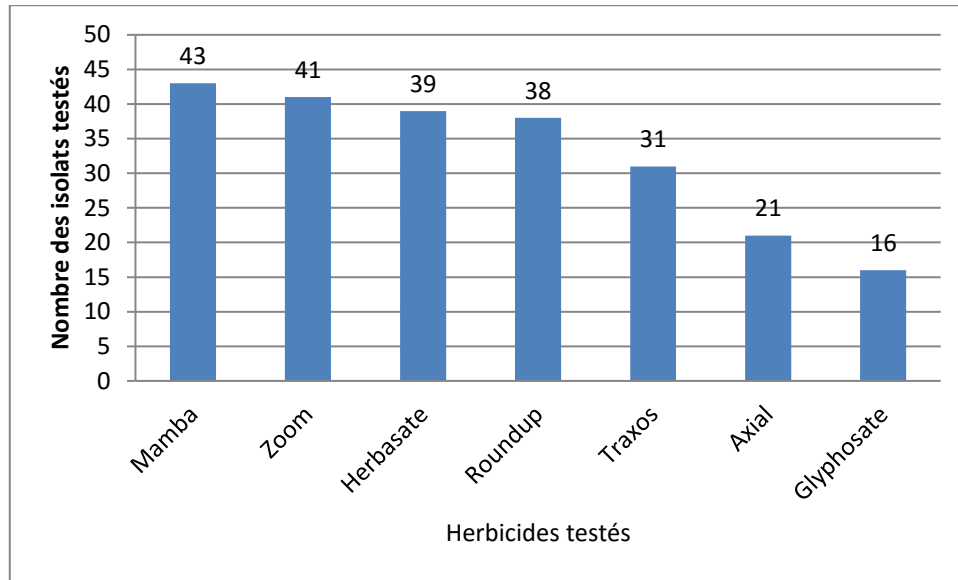


Figure 29 : Nombre des isolats d'actinomycètes provenant du sol agricole ayant dégradé les herbicides testés.

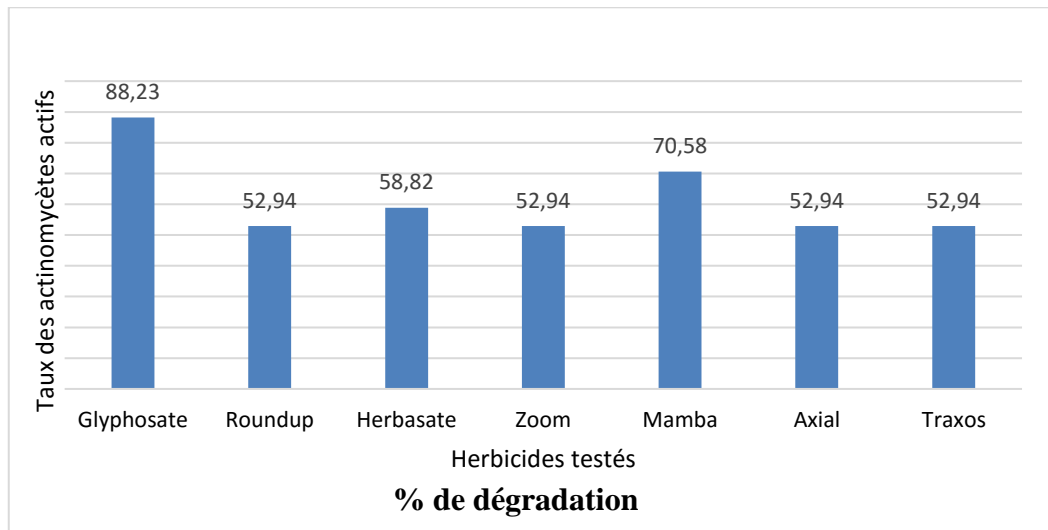


Figure 30. pourcentage des isolats d'actinomycètes provenant des boues activées ayant dégradés les herbicides testés.

On constate d'après ces histogrammes que les herbicides Mamba et Glyphosate sont les plus dégradé par les actinomycètes du sol et des boues testés respectivement.

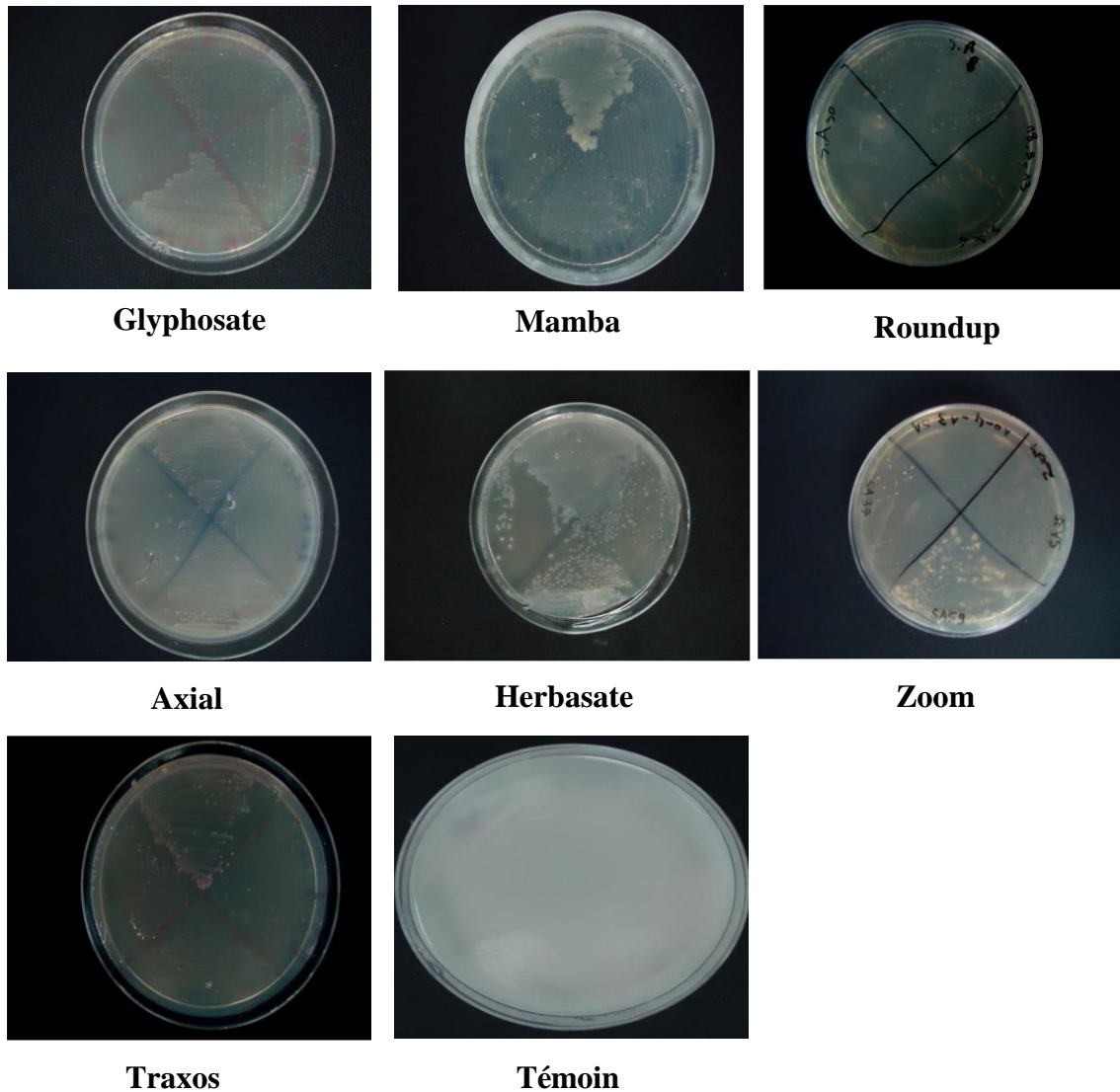


Figure 31. Photographies représentant la croissance des actinomycètes isolés sur le milieu minimum additionné des différents insecticides.

4.2. Test de la biodégradation des fongicides

Les résultats de la biodégradation des deux fongicides Ortiva et Rodazime sont rassemblés dans les **tableaux 12, 13 et 14** (annexe) et **figures 32 et 33**. On a constaté une bonne croissance sur le milieu contenant le Rodazime par rapport à celui contenant l'Ortiva pour les actinomycètes du sol contrairement aux actinomycètes des boues activées. En effet 37 isolats sont capables de le dégrader, 33 isolats présentent une faible croissance et uniquement 2 isolats en sont incapables de l'utiliser comme seule source de carbone. 7 isolats des boues soit 41,17% sont capable de croître sur le milieu contenant le fongicide Rodazime.

Pour l'Ortiva, 29 isolats du sol (40.27%) et 15 des boues activées ont l'aptitude de l'utiliser comme seule source de carbone et 17 isolats du sol (23.61%) manifestent une faible croissance.

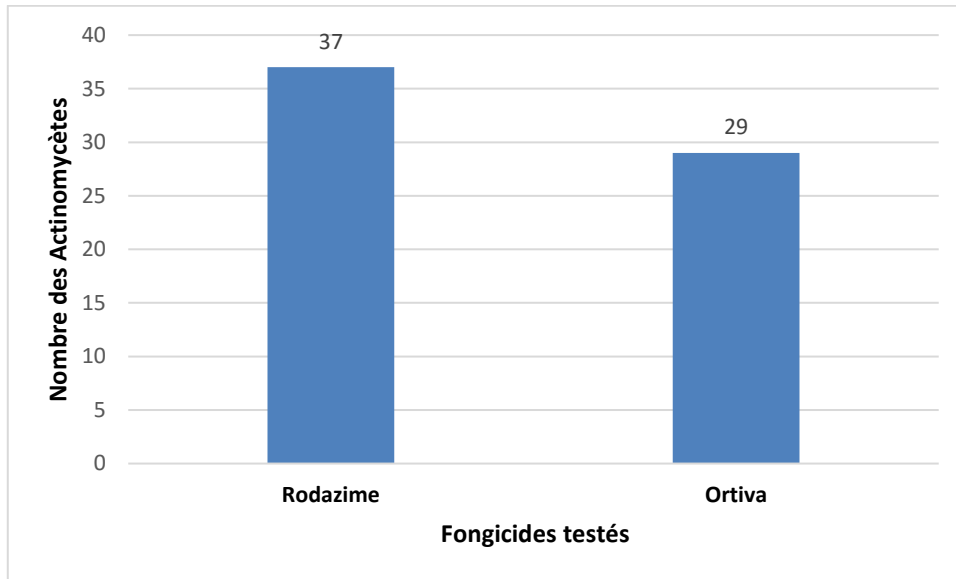


Figure 32. Nombre des actinomycètes isolés du sol agricole ayant dégradés les fongicides testés.

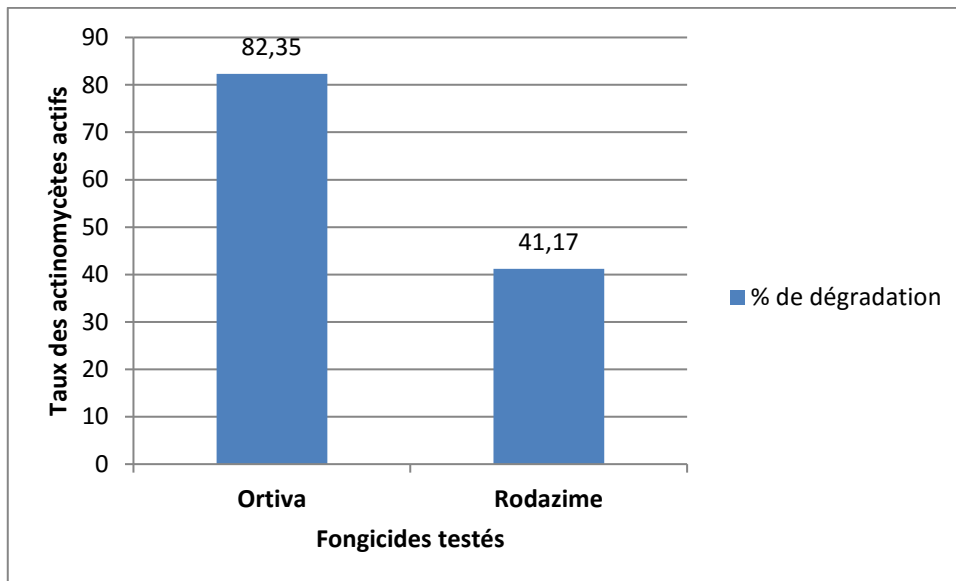
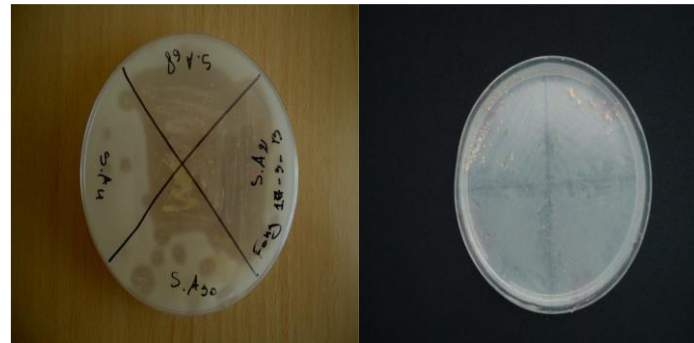


Figure 33. Taux des actinomycètes des boues activées ayant dégradés les fongicides testés.

Ces Histogrammes montrent que le fongicide le plus utilisé chez les actinomycètes du sol agricole est le Rodazime. Pour les actinomycètes des boues activées est l'Ortiva.



Ortiva

Rodazime

Figure 34. Photographies représentant la croissance des actinomycètes isolés sur milieu minimum additionné de l’ortiva et Rodazime comme seule source de carbone par rapport au témoin.

4.3. Test de la biodégradation des insecticides

Les résultats de la biodégradation des insecticides (Karaté, Phoenix, Cyperméthrine et Dursban) sont rassemblés dans les **tableaux 12, 13 et 14** (annexe), et **figures 35 et 36**.

Parmi les 72 isolats du sol agricole testés, la moitié a la capacité de dégrader le Karaté et 17 isolats présentent une faible croissance. Sur 18 actinomycètes des boues activées 12 soit 70.58% ont pu dégrader cet insecticide.

Pour le Phoenix, on a constaté que 35 isolats du sol soit un pourcentage de 48.61% et 15 isolats des boues activées (82,35%) sont capables de l’utiliser comme seule source de carbone et 15 isolats du sol (20.83%) manifestent une faible croissance.

Concernant le Cyperméthrine, la plupart des bactéries soit 48 isolats correspondant à un pourcentage de 66.66% sont incapables de le dégrader et 24 isolats (33.33%) en sont capables dont 11 isolats uniquement présentent une bonne croissance. 75.47% des isolats (13) provenant des boues activées ont pu croître sur le milieu minimum additionné de Cyperméthrine.

Et enfin, pour le Dursban, le nombre d’actinomycètes du sol et des boues ayant une bonne croissance est de 21 et 12 isolats respectivement. 27 isolats telluriques présentent une faible croissance.

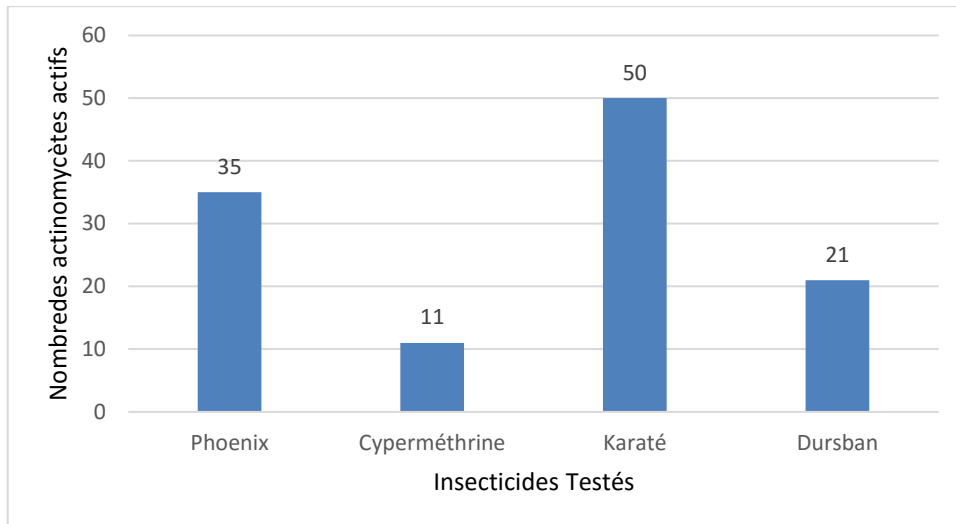


Figure 35. Nombre des actinomycètes isolés du sol agricole ayant dégradé les insecticides testés.

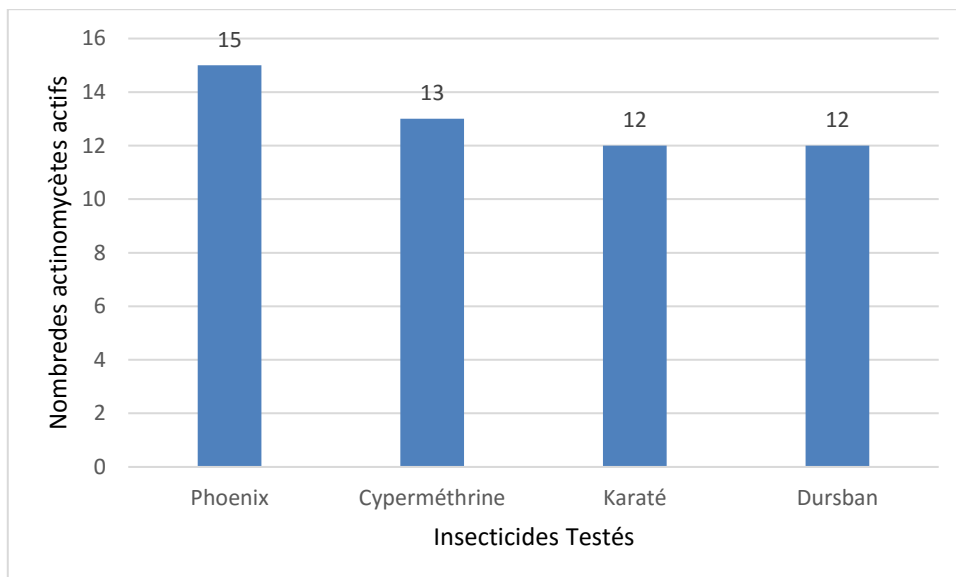


Figure 36. Nombre des actinomycètes provenant des boues activées capable d'utiliser les insecticides testés.

D'après ces histogrammes, on constate que l'insecticide le plus dégradé est le Karaté pour les actinomycètes du sol et le Phoenix pour les actinomycètes des boues activées.

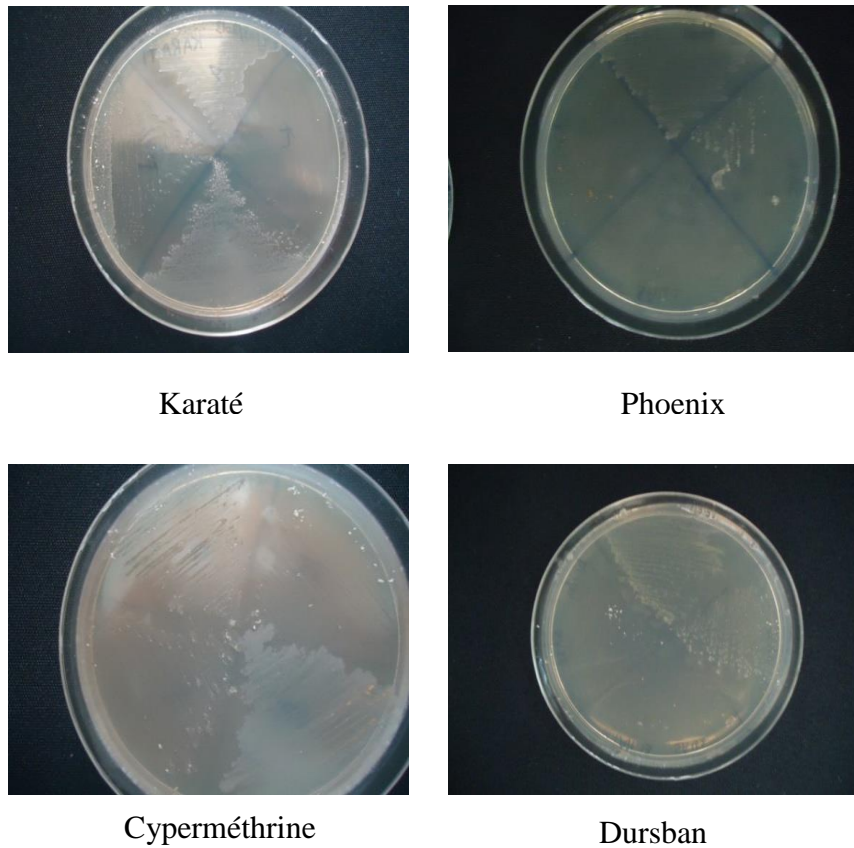


Figure 37. Photographies représentant la croissance des actinomycètes sur milieu minimum additionné des insecticides testés.

4.4. Essai de Biostimulation

Cette méthode a été employée pour vérifier si la variation des conditions physicochimiques à savoir le pH et la température ont une influence sur l'utilisation des composés de synthèse. Cette technique est appliquée sur des actinomycètes manifestant une faible dégradation. Parmi les souches ayant une faible croissance, les isolats SA37, SA1 et A ont été sélectionnés et ensemencés sur deux milieux, l'un contient le fongicide Ortiva et l'autre contenant l'herbicide Glyphosate avec une concentration de 500 mg/L.

Les résultats de la biostimulation sont rassemblés dans le **tableau 15 et Figure 38** ci-dessous.

Table 15. Résultats de la biostimulation des isolats SA1, SA37 et A sur milieu contenant l'Ortiva et le Glyphosate.

❖ **L'isolat SA1**

• **Ortiva**

pH/T°	6	7	8
30 °C	-	-	-
37 °C	+	-	-
45 °C	+	-	-

• **Glyphosate**

pH/T°	6	7	8
30 °C	-	-	-
37 °C	+/-	-	-
45 °C	-	-	-

Pour l'isolat SA1, la croissance maximale a été observée à pH 6 pour 37°C et 45°C, alors qu'elle n'est pas en mesure de croître à pH 7 et 8.

Une croissance plus au moins absente sur le Glyphosate par l'isolat SA1 a été observée à pH 6 et ce pour les trois températures testées. La croissance est très faible, à pH 7 quel que soit la température d'incubation.

❖ **L'isolat SA 37**

• **Ortiva**

pH/T°	6	7	8
30 °C	+/-	+/-	+/-
37 °C	+	-	+
45 °C	+	-	+

• **Glyphosate**

pH/T°	6	7	8
30 °C	+	+/-	+
37 °C	-	-	-
45 °C	-	-	-

Pour le fongicide Ortiva, à pH 6, à pH 8 et à une température de 30°C, on a constaté un résultat négatif qui se traduit par une faible croissance. Alors qu'à une température de 37 °C

et 45°C à pH 6 et 8, l'isolat SA37 a développé une bonne croissance. À pH 7, les résultats étaient négatifs quel que soit la température.

Concernant l'herbicide Glyphosate, dans les trois pH et à une température de 37 et 45°C, on a observé une absence totale de croissance. À pH 7 et à une température de 30°C, la croissance était faible. Et enfin, à une température de 30°C et dans les pH 6 et 8, la souche manifeste une bonne croissance.

❖ **L'isolat A**

• **Ortiva**

pH/T°	6	7	8
30 °C	+	-	+
37 °C	+	-	+
45 °C	+	-	+

• **Glyphosate**

pH/T°	6	7	8
30 °C	+/-	-	-
37 °C	-	-	-
45 °C	-	-	+/-

Pour l'isolat A, une bonne croissance a été observée à pH 6 et 8 et pour les températures testées, alors qu'elle n'est pas en mesure de croître à pH 7. Une croissance très faible sur le Glyphosate par l'isolat A a été observée au différents pH et températures testés.

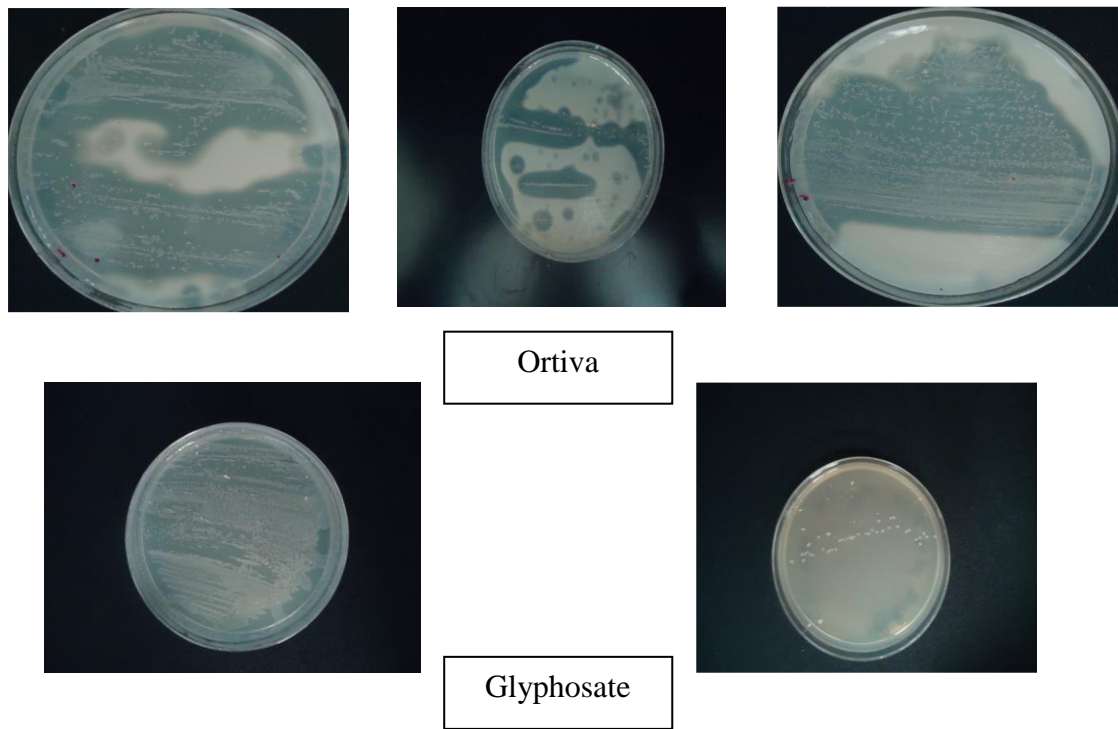


Figure 38. Photographies représentant la croissance des isolats sur milieu minimum additionné du Glyphosate et d’Ortiva après une biostimulation du pH et température.

L’utilisation des pesticides par l’agriculture présente deux aspects aux conséquences totalement opposées. Le premier consiste à combattre les organismes phytopathogènes et les adventices nuisibles aux cultures pour augmenter les rendements agricoles. Alors que le deuxième tient à la nature même des pesticides qui en fait, dans certaines conditions, peuvent devenir des polluants eux-mêmes de l’air, des eaux, des aliments et des sols (**Calvet et al., 2005**).

Plusieurs travaux ont démontré que les microorganismes du sol et de boues activées étaient capables de dégrader les pesticides. En effet cette action est réalisée par les bactéries, les actinomycètes et les champignons (**Bhat et al., 1998**).

Zboniska et al., (1992) ont rapporté que l’espèce *Pseudomonas fluorescens* pouvait utiliser divers pesticides appartenant aux classes des organophosphates comme source de carbone, d’azote et de phosphore.

Une étude effectuée par **Bhadbhad et al., (2002)** a démontré que deux espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, isolées à partir du sol, et **Varma et Gaikwad, (2008)**, ont rapporté que les deux champignons *Aspergillus awamori* et *Candida tropicalis*, étaient capables d’utiliser des pesticides organophosphorés comme seule source de carbone.

Les actinomycètes sont parmi les plus importants groupes possédant une activité considérable dans la dégradation des composés naturels et de synthèses comme les pesticides et autres xénobiotiques dans l'environnement. Ils jouent ainsi un rôle majeur dans la dépollution des sols contaminés par ces composants. **De Schrijver et De Mot, (1999)** ont montré que les genres *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Nocardioides*, et *Streptomyces* sont capables de dégrader les pesticides. **Hanne et al., (1993)** ont démontré que les genres *Arthrobacter* et *Nocardia* appartenant aux actinomycètes, étaient capables de dégrader le p-Nitrophénol et autres composés phénoliques qui sont utilisés en tant qu'herbicides, fongicides et insecticides.

Dans notre étude nous avons voulu tester la capacité de 72 actinomycètes isolés à partir d'un sol agricole à Ain M'lila et 18 isolats à partir des boues activées à dégrader certains pesticides. Le lieu d'isolement a été choisi du fait que les sols agricoles sont régulièrement traités par les pesticides avec des quantités souvent abusives. Concernant les stations d'épuration des eaux usées sont les structures de dépollution par excellence. Elles sont et peuvent être le réservoir de microorganismes capables de supprimer l'effet toxique de différents polluants. En outre, la présence de ces polluants dans ses endroits est inévitable et contribue donc à offrir des microorganismes adaptés à ces xénobiotiques.

Les pesticides utilisés pour cette étude sont parmi les pesticides les plus utilisés en Algérie dans les cultures à grande échelle, maraichère et à petite échelle.

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont conduits à constater que l'usage fréquent des pesticides procurait une adaptabilité incroyable aux microorganismes du sol et des écosystèmes hydriques contaminés. Cette caractéristique aboutit à une adaptation génétique de biodégradation de ces substances xénobiotiques. Cette action est probablement due à l'acquisition des nouveaux gènes codant pour des enzymes de dégradation. Ces activités de biodégradation peuvent être effectuées par un microorganisme ou en association de plusieurs microbes en formant un consortium. Ces activités peuvent être conservées au fil des temps grâce à la formation des spores ou d'autres formes de résistance (**Monard, 2008**). Il semblerait que certains pesticides (cas des Triazines) échappent à la dégradation microbienne parce qu'ils subissent surtout une décomposition chimique rapide. En revanche, leurs produits de transformation peuvent être soumis par la suite à une dégradation microbienne. Cependant, la présence à faible quantité des pesticides (quelques $\mu\text{g/L}$ à quelques mg/L) lors des pollutions diffuses peut se traduire par une absence d'effet sur la microflore. Par conséquent, de faibles concentrations peuvent ne pas être suffisantes pour induire la production ou la modification d'un système enzymatique (**Borriuso et al., 1996**).

Dans notre travail, nous avons constaté que les pesticides les plus dégradés par les actinomycètes testés sont :

Dans la classe des herbicides, le Mamba est l'herbicide le plus utilisé par les actinomycètes du sol et le glyphosate par les actinomycètes des boues activées.

Dans la classe des insecticides, le Karate est l'insecticide le plus utilisé par les isolats du sol et le Phoenix par les bactéries testées des boues activées.

Dans la classe des fongicides, le Rodazime est le fongicide le plus utilisé par les actinomycètes du sol et l'Ortiva par les isolats des boues activées.

Parmi les 72 actinomycètes du sol agricole testés, 59,72 % ont pu croître sur l'herbicide Mamba, 54,16 % sur l'herbicide Herbasate, 52,77% sur l'herbicide Roundup et 22,22% sur l'herbicide Glyphosate tout au moins dans les conditions du laboratoire.

En outre, pour les actinomycètes des boues activées, le Glyphosate a été dégradé à 88,23 %, l'Herbasate à 58,82 %, le Roundup à 52,94 % et le Mamba a été dégradé par 70,58 % des isolats.

Pour le Glyphosate, une étude réalisée au Brésil menée par **Araújo et al., (2003)** qui consiste à mettre en évidence l'effet du Glyphosate sur l'activité microbienne dans deux types de sol brésiliens, par l'évaluation du CO₂ dégagé, ils montrent que des grandes quantités de dioxyde de carbone ont été libérées en présence de glyphosate, ils suggèrent que le microbiote du sol est capable d'utiliser le Glyphosate comme seule source de carbone. Cette matière active subissait une dégradation par l'action des champignons et des actinomycètes donnant le principal métabolite du Glyphosate qui est l'AMPA (aminométhyl phosphonic acid), ce dernier a été détecté par l'HPLC. Mêmes résultats ont été rapportés par **Wardle en 1990**. Aux Etats Unis, **Duke, (2010)** a mentionné dans son étude que les souches de *Streptomyces* sp. pouvaient utiliser le Glyphosate comme seule source de carbone et de phosphore en le dégradant en deux résidus : l'AMPA et la sarcosine, cette dégradation se fait sous l'action de l'enzyme C-P lyase sécrétée par ces souches, il a également rapporté que l'AMPA était moins phytotoxique que le Glyphosate. Quant à la durée de sa dégradation **Souza en 1999**, a montré que le Glyphosate a été dégradé rapidement au bout de 10 jours d'incubation, tandis que **Nomura en 1977** rapporte une dégradation rapide du Glyphosate dans les premiers jours d'incubation.

L'analyse des données disponibles représentent de nombreuses études qui indiquent que la demi-vie du glyphosate dans un milieu aquatique typique varie de 7 à 14 jours. Des études ont établi que les micro-organismes des eaux de surface décomposent le glyphosate au fil du temps. En outre, en raison de sa forte affinité pour le sol, le glyphosate se lie aux particules en

suspension de sédiments qui sont présents dans les eaux naturelles. Comme les particules se déposent au fond, la dégradation microbienne continue mais d'autres microorganismes et mécanismes s'effectuent (**Giesy, 2000**). Dans certaines cultures comme le riz par exemple, le glyphosate est appliqué contre les mauvaises herbes qui poussent dans l'eau. L'exposition des espèces aquatiques non ciblés devrait être réduite en raison de l'interception par la végétation cible et la dissipation au fil du temps par l'intermédiaire de la liaison à sédiments et à la dégradation microbienne (**Giesy, 2000**).

Le Glyphosate est l'herbicide le plus utilisé au niveau mondial (**Duke, 2010**). Cet herbicide est utilisé à raison de 6 à 8 L/ha pour traiter essentiellement les agrumes, les vignes et les arbres fruitiers. La superficie de ces cultures avoisine les 452 000 ha soit 5,6% de la surface agricole de l'Algérie (**Nadjaoui, 2003**). La consommation annuelle de ce pesticide est très importante, elle est comprise entre 271200 et 3616000 litres. D'après la société française Agrilisa, un litre de glyphosate coûte 4,99 €, on peut donc estimer que le traitement de cette superficie agricole revient à un prix allant jusqu'à 18043840 €. Si ce chiffre est extrapolé en Algérie, il constitue une dépense énorme. Cette quantité consommée annuellement, uniquement pour ce pesticide et pour ces cultures, est vraiment alarmante et effrayante. Le problème de l'accumulation de ces produits surtout dans les environnements terrestres et hydriques est également très préoccupant.

Pour l'herbicide Zoom qui fait partie de la famille chimique des sulfonylurées, nous avons observé que plus de 50 % des isolats ont pu le dégrader, ces résultats de biodégradation sont similaires à ceux obtenus par **He et al., (2006)** qui ont réussi à isoler à partir d'un sol traité par le metsulfuron-méthyl (appartenant à la même famille chimique que Zoom), 20 souches actinomycétales, 4 souches bactériennes et 9 souches fongiques précisément *Penicillium* sp. Ces chercheurs ont également souligné l'effet positif de la présence des espèces de *Penicillium* sp. dans la dégradation du metsulfuron-méthyl. **Boschin et al., 2003** ont trouvé que *Pseudomonas* joue un rôle important dans la dégradation des Sulfonylurées. La souche *Serratia marcescens* est capable de dégrader les Sulfonylurées (**Bidlan et Manonmani, 2002**). **Lin et al., en 2010** ont démontré que les bactéries appartenant au genre *Bacillus* possèdent aussi la capacité à dégrader les herbicides de cette famille.

Pour Traxos et Axial, ces deux herbicides sont à base du Pinoxaden, premier représentant de la famille des Phénylpyrazolines. Dans le milieu terrestre, le Pinoxaden se volatilise relativement peu dans les conditions naturelles. Il ne persiste pas dans le milieu terrestre, car il est vulnérable à l'hydrolyse et il est facilement biotransformé dans des sols tant aérobie

qu'anaérobies. Les résultats obtenus dans nos investigations montrent que les isolats testés peuvent utiliser ces deux herbicides comme seule source de carbone. Les rares travaux réalisés sur la biodégradation de la molécule active Pinoxaden de ces deux herbicides sont menés par **Saini et al., (2013)**. Ils ont démontré les effets du Pinoxaden et autres herbicides sur les microorganismes notamment les actinomycètes du sol dans le système riz-blé en IGP à Ludhiana en Inde. Les résultats de ces travaux, montrent qu'après plusieurs jours de pulvérisation de ce produit, il y a eu une augmentation du nombre d'actinomycètes indiquant ainsi la dégradation de cet herbicide.

Globalement, plusieurs recherches ont révélé que la biodégradation par les actinomycètes pouvait s'étendre sur plusieurs herbicides. Ainsi **Shelton et al., (1996)** ont démontré que *Streptomyces* (souche PS1/5) a la capacité de dégrader douze herbicides : Alachlore, Métachlore, Prométryne, Amétryne, Linuron, Tébutiuron, Bromacile, Cyazine, Métribuzine, Imazapyre, Atrazine et Diuron.

La biodégradation de l'Atrazine a été élucidée dans le travail de recherche de **Monard, (2008)** qui a évoqué l'adaptation des bactéries du sol à utiliser l'Atrazine comme source de carbone et/ou d'azote. En effet, de nombreux actinomycètes ont été isolés à partir des sols largement traités avec l'Atrazine et différentes voies de dégradation ont été élucidées, impliquant différents gènes fonctionnels, parmi les actinomycètes capables de biodégrader cet herbicide, on trouve : *Nocardioides* sp., la souche *Rhodococcus* TE1, la souche *Rhodococcus* NI86/21, la souche *Rhodococcus corallinus* 11 et le genre *Nocardia*.

Esposito et al., (1998) ont démontré que trois souches d'actinomycètes isolées à partir d'un sol traité avec le 2,4-D étaient capables de dégrader l'herbicide Diuron *in vitro*. Ils ont également révélé que la souche CCT 4916 était la plus efficace en dégradant 37 % du Diuron appliqué soit 100 mg/kg sol en 7 jours.

Une étude menée en Belgique par **Nagy et al., (1994)** a permis de mettre en évidence la capacité de la souche *Rhodococcus* NI86/21 à dégrader l'herbicide Thiocarbamate et à l'utiliser comme seule source de carbone et d'azote.

Concernant la biodégradation des fongicides, nous avons voulu mettre en évidence la capacité des isolats d'actinomycètes de croître sur les milieux contenant les deux fongicides Ortiva et Rodazime. Pour le milieu contenant l'Ortiva dont la matière active est l'azoxystrobine. Nous avons constaté que 40,27 % des isolats du sol ont manifesté une bonne croissance, contre 82,35 % des boues activées. Selon la **EFSA, 2009 ; EFSA, 2010 et US-EPA, 1997**, aucune étude portant sur la biodégradation de l'azoxystrobine (produit actif de

l'ortiva) n'est disponible. Mais depuis, certains travaux ont étudié la biodégradation de l'azoxystrobine mais restent toutes fois rares, surtout concernant les monocultures. La plus part des travaux concernent les consortiums microbiens. Dans une étude menée par **Garau et al., 2002** sur la disparition de l'azoxystrobine, appliqué sur les tomates en serre a montré que les résidus de ce dernier sont restés stables, aucune action de dégradation n'a été détecté au cours de toutes les expériences. Dans un sol traité par un fongicide ayant l'azoxystrobine comme matière active en Russie, **Osman et al., (1999)** ont démontré que le nombre des actinomycètes augmentait dans ce sol traité, il s'agissait des genres : *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Micromonospora*, ils ont également rapporté que le nombre total des *Mycobacterium* était supérieur comparant aux autres genres. Une autre étude menée également par **Osmane, (2006)** au Soudan (Khartoum) a permis de mettre en évidence la capacité des genres *Nocardia*, *Arthrobacter* et *Mycobacterium* d'utiliser l'azoxystrobine comme l'unique source de carbone et d'azote. Parmi ces genres, il a démontré que *Nocardia* avait la capacité la plus importante à décomposer l'azoxystrobine et il a identifié les isolats comme *Nocardia brasiliensis*, *Arthrobacter terregens*, *Mycobacterium Parafortuitum* et *Mycobacterium pheli*. **Novaka et al., en 1997** ont trouvé que l'Azoxystrobine était utilisée par *Nocardia* et *Bactoderma* comme source de nutriment. **Golovleva, (1992)** a montré que *Micromonospora* et *Arthrobacter* ont la capacité de dégrader l'Azoxystrobine. Selon **Flindt Jørgensen et al., 2013** l'azoxystrobine et son produit de dégradation R234886 peuvent s'infiltrer dans les sols limoneux pour une longue période de temps après l'application du pesticide et de ce fait pose une menace potentielle pour les ressources en eau potable et les milieux aquatiques vulnérables.

Concernant le milieu contenant le Rodazime, qui a pour matière active le carbendazime, nous avons observé que le pourcentage de nos isolats d'actinomycètes ayant une bonne croissance sur ce fongicide est de 51.38% et un taux de 41,17 % des isolats provenant des boues activées. Nous remarquons que presque la moitié des actinobactéries isolées à partir du sol et des boues ont cette aptitude métabolique. Ce résultat n'est pas singulier, car ces mêmes résultats ont été rapportés par plusieurs chercheurs. **Jing-Liang et al., (2007)** en Chine, ont isolé à partir d'un sol contaminé par le carbendazime des souches actinomycétales capables de dégrader ce composant, en se basant sur des analyses chimiotaxonomiques, ils ont trouvé que ces souches appartenaient au genre *Rhodococcus*. Un autre travail de recherche effectué en Chine par **Xiu et al., (2011)** a abouti à l'isolement et à la caractérisation de deux souches capables de dégrader le carbendazime, ces souches ont été identifiées comme *Rhodococcus*

Erythropolis et *Azospirillum brasilense*, et étaient capables d'utiliser ce composant comme seule source de carbone et d'azote. Les travaux de **Xu et al., (2006)** réalisés sur la matière active de ce fongicide est dégradé par l'actinomycètes *Rhodococcus qingshengii* sp. Nov. D'autres travaux montrent le rôle d'un autre actinomycète *Rhodococcus erythropolis* et *Ralstonia* sp. à dégrader ce même fongicide (**Zhang et al., 2005**).

La dernière classe des pesticides testés dans notre étude concerne les insecticides. Nous avons constaté que 29.16 % des isolats du sol et 70,58 % des isolats des boues activées ont pu croître sur le milieu contenant le Dursban comme seule source de carbone et d'énergie. Cet insecticide dont la matière active est le chlorpyrifos, est également rapporté dans certains travaux ; pour sa biodégradation par d'autres microorganismes. Par exemple, ceux obtenus par **Sasikala et al., (2012)** qui ont isolé à partir d'un sol contaminé par le chlorpyrifos un actinomycète, deux souches fongiques et neuf souches bactériennes différentes, ces microorganismes avaient des aptitudes de biodégradation de cet insecticide. **Briceño et al., (2012)** qui ont rapporté que deux souches actinomycétales nommées *Streptomyces* sp. AC5 et *Streptomyces* sp. AC7 prélevées à partir d'un sol agricole, ont dégradé le Chlorpyrifos avec un taux de 90%. **Guha et al., (1997)** ont trouvé que l'espèce actinomycétale *Micrococcus* sp. isolée à partir du sol avait la capacité de dégrader le chlorpyrifos dans un milieu liquide. **Mallick et al., (1999)** ont également mis en évidence une activité de biodégradation effectuée par deux espèces bactériennes *Arthrobacter* sp. et *Flavobacterium* sp. appartenant aux actinomycètes et *Arthrobacter* sp. dégrade complètement l'insecticide après 24 h d'incubation alors que *Flavobacterium* sp ATCC 27551 le dégrade après 48 h d'incubation. Dans un sol inondé, la biodégradation de l'insecticide était constatée au bout de 15 jours par *Flavobacterium* sp. et au bout de 28 jours par *Arthrobacter* sp. Alors que dans un sol sec, cet insecticide a été complètement dégradé au bout de 28 jours par *Flavobacterium* sp., entre autre *Arthrobacter* sp. manifestait une dégradation lente sous ces conditions. **Singh et al., (2006)** ont démontré que l'espèce *Enterobacter* sp. était capable d'utiliser le chlorpyrifos comme source de phosphore. Des études menées par **Yu et al., (2005)** ont réussi à isoler et caractériser des souches fongiques qui dégradait le chlorpyrifos en l'utilisant comme seule source de carbone et d'énergie, ils ont également rapporté que ces souches étaient capables de dégrader plus de 80% de cet insecticide.

Dans notre travail, nous avons observé que seulement une minorité des isolats du sol à savoir 11 isolats étaient capables de manifester une bonne croissance sur le milieu contenant comme seule source de carbone l'insecticide Cyperméthrine. En revanche 76,47 % des isolats

des boues activées ont pu croître sur cet insecticide. Ces résultats sont les mêmes obtenus par **Lin et al., (2011)** en Chine, qui ont révélé une nouvelle souche actinomycétale appartenant au genre *Streptomyces*, capable de dégrader cet insecticide. Cette souche a été isolée à partir des boues activées et été identifiée comme *Streptomyces* sp. HU-S-01 appartenant probablement à l'espèce *Streptomyces parvulus*. Une autre étude menée également en Chine par **Chen et al., (2011)** a abouti à la découverte d'une nouvelle souche actinomycétales dégradante du Cyperméthrine avec une grande efficacité. Cette souche s'est avérée appartenir au genre *Streptomyces*, elle a été identifiée comme *Streptomyces aureus* HP-S-01. Cette étude a été poursuivie et les chercheurs ont réussi à démontrer que la souche *Streptomyces aureus* HP-S-01 récemment découverte manifeste une biodégradation plus importante du Cyperméthrine et ceci en association avec la souche *Bacillus cerus* ZH-3 (**Chen et al., 2012**).

Nous avons constaté également, que la plus part des isolats testés manifestaient une bonne croissance sur les milieux contenant le Karate et le Phoenix, comme seule de carbone et d'énergie. Avec respectivement les pourcentages de 50 et 48,61 % par les isolats telluriques et 70,58 % et 82,35 % par les isolats hydriques. La matière active de ces deux insecticides est le Lambda Cyhalothrin. Les rares investigations trouvées dans bibliographie, montrent que la biodégradation du lambda cyhalothrine par des microorganismes autres que les actinomycètes. (**Benimeli et al., 2007**). **WuHao et al., (2009)** ont démontré la dégradation de Cyhalothrine utilisé comme seule source de carbone par huit bactéries, dont la souche *Sphingobacterium* sp. a présenté le taux de dégradation le plus élevé à une fréquence de 77,2 %. **Zheng et al., (2012)** avaient trouvé ces mêmes résultats de biodégradation mais sous l'action de la souche *Citrobacter braakii* F37.

Dans notre étude nous avons varié deux conditions physicochimiques à savoir le pH et la température qui étaient respectivement de 7 et 30°C.

L'isolat SA37 manifestait une bonne croissance à pH 6 et pH 8 sous les températures 37 et 45°C pour le milieu additionné du fongicide Ortiva.

L'isolat SA37 manifestait une bonne croissance à pH 6 et pH 8 sous la température 30°C pour le milieu additionné de l'herbicide Glyphosate.

L'isolat SA1 manifestait seulement une bonne croissance sur l'Ortiva au pH 6 sous les températures 37 et 45 °C.

L'isolat A manifestait une bonne croissance à pH 6 et 8 sous les températures 30, 37 et 45°C pour le milieu additionné du fongicide Ortiva. La variation des conditions du pH et de

température n'a pas d'effet sur la croissance de l'isolat A sur le milieu contenant le Glyphosate.

D'après cette expérience, nous avons constaté que la variation des facteurs physicochimiques a un effet positif sur la biodégradation. En effet nous avons observé que la croissance sur le milieu contenant l'Ortiva est plus importante et ce quel que soit la température 37 ou 45°C. Ce même résultat est observé quand le pH est acide (6) ou basique (8). Contrairement, le milieu additionné de l'herbicide glyphosate, les températures élevées semblent ne pas avoir un effet positif sur cette activité, néanmoins la biodégradation de ce pesticide est augmentée mais pas influencée par les pH acides ou basique testés. Cela est observé pour l'isolat SA37. D'ailleurs **Zheng et al., (2012)** dans leur étude de la détermination et la dégradation microbienne de la matière active lambda-cyhalothrine de l'insecticide Karaté par la souche *Citrobacter braakii* F37, ont utilisé cette méthode de biostimulation pour augmenter le taux de dégradation de cet insecticide en variant le pH, la concentration du saccharose et celle de l'extrait de levure contenus dans le milieu de culture. Les analyses de la dynamique de la dégradation ont démontré que la demi-vie de la dégradation de lambda cyhalothrin était de 5.7, 1.9 et 4.9 jours à un pH 9, 7 et 5, respectivement. Suite à ces résultats il a observé que la souche *Citrobacter braakii* F37 révélait une forte activité de dégradation à un pH compris entre 6.5 et 8. En effet il a trouvé qu'à pH 7 la dégradation atteignait les 81.1%, il a également constaté que la meilleure dégradation de cette matière active était obtenue à des concentrations de 3 et 4 g/L de l'extrait de levure et du saccharose respectivement. La méthode de biostimulation a été également utilisée par **Fang et al., (2010)** dans la biodégradation de l'herbicide DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthanepar) l'espèce *Sphingobacterium* sp. La variation de la température, du pH, de la concentration de DDT et avec une source de carbone additionnée. Parmi les températures testées 20, 30 et 40°C, et les pH 5, 7 et 9, ils ont trouvé que la dégradation était importante à une température de 30°C et à un pH neutre. En revanche, ces chercheurs ont révélé que les pH faibles et élevés inhibaient la dégradation. Ils ont également trouvé que l'addition du glucose comme source de carbone diminuait le temps de dégradation du DDT.

5. Identification morphologique, physiologique et moléculaire des actinomycètes actifs

L'identification des genres d'actinomycètes repose principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien, la présence de spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sporanges de sclérotés,

ou de synnémata. En plus, d'autres examens au microscope électronique doivent également être effectués afin de déterminer l'ornementation des parois sporales (Larpent *et al.*, 1989). La chimiotaxonomie est un système de classification basé sur les caractères chimiques de la paroi cellulaire, les composants des acides aminés, des glucides, des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (O'donnell, 1988).

L'identification des espèces appartenant aux genres d'actinomycètes, nécessite en plus des caractères morphologiques et chimiques, des caractères physiologiques (température, pH optimaux et utilisation des sources carbonées et azotées...) et biochimiques (dégradation de certains substrats comme la gélatine, l'amidon, la caséine, les nitrates, les lipases, etc.). Ces méthodes d'identification ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires.

5.1. Etudes de quelques caractères phénotypiques

5.1.1. Observation macroscopique et caractères cultureux

Les isolats peuvent être rassemblés en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance, les colonies des isolats (F, V, U, G, X, M, H, SAIB1, SA13, SA3, SA31, SA55, SAI3B, SAI2BX, SAIC3, SAI3T, SAIG3, SAI6X, SAI10X, SAIXB, SAI5X, SA5 et SA10) apparaissent après 2 à 3 jours d'incubation alors que les colonies des isolats (S, D, L, O, SA9, A et I) requièrent 5 à 7 jours d'incubation pour apparaître. Pour tous les isolats, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Après 15 jours d'incubation la majorité des isolats donnent des colonies poudreuses, crayeuses ou granuleuses de différentes couleurs (blanc, beige, crème, marron, gris, vert, orange et rose) (Figure 23), cet aspect est particulier pour les isolats développant un mycélium aérien. Les colonies des isolats (S, D, L, O, SA9 et I) restent toujours pâteuses. L'observation du revers de la colonie (dos de la boîte de Pétri) permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être (blanc, beige, rouge, orangé, jaune, vert, violet, marron, brun ou noir).

Les pigments mélanoïdes sont produits seulement par l'isolat G ; ils sont de couleur noire. Les pigments diffusibles sont produits par les isolats SA55, SA3 et SA31 ; et sont de couleur rouge, de couleur brune pour les isolats V, U et F et de couleur rouge brune à orange pour les isolats S, D, O et SA9.

5.1.2. Observation microscopique (Technique de culture sur lamelle)

Trente (30) isolats d'actinomycètes actifs sur les BTEX et certains pesticides (Tables 8, 9, 12, 13 et 14) sont tous positifs à la coloration de GRAM. L'étude microscopique par la

technique de culture sur lamelles a permis d'apprécier la morphologie du mycélium aérien et du mycélium de substrat des 30 isolats d'actinomycètes.

Il apparaît que tous les isolats développent un mycélium de substrat. Les hyphes des mycéliums végétatifs des isolats (F, V, U, G, X, M, H, L, SAIB1, SA13, SA3, SA31, SA55, SAI3B, SAI2BX, SAIC3, SAI3T, SAIG3, SAI6X, SAI10X, SAIXB, SAI5X, SA5 et SA10) sont fins non fragmentés, et peu ramifiés. Ils se développent en surface et pénètrent dans la gélose, puis donnent naissance à un mycélium aérien, long fin et très ramifié. Il porte de longues chaînes de spores cylindriques plus de 15 à 20 spores par chaîne, donnant un aspect poudreux à la surface des colonies. Les chaînes de spores sont droites de type spirale, droite ou rectiflexible. Les spores isolées ne présentent aucune mobilité.

Les isolats (S, D, O, SA9) présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien fragmenté, les chaînes de spores sont droites de forme cylindrique.

L'isolat (A) produit un mycélium du substrat non fragmenté surmonté par un mycélium aérien où l'on note la présence de chaînes de spores (3 à 10 par chaîne) portées par de courts sporophores. Les chaînes sont droites ou disposées en crochets.

L'isolat (I) présente un mycélium aérien peu développé se forme de nombreux groupe globuleux. Mycélium de substrat est long, non fragmenté, portant des sporangiophores qui comportent des sporanges.

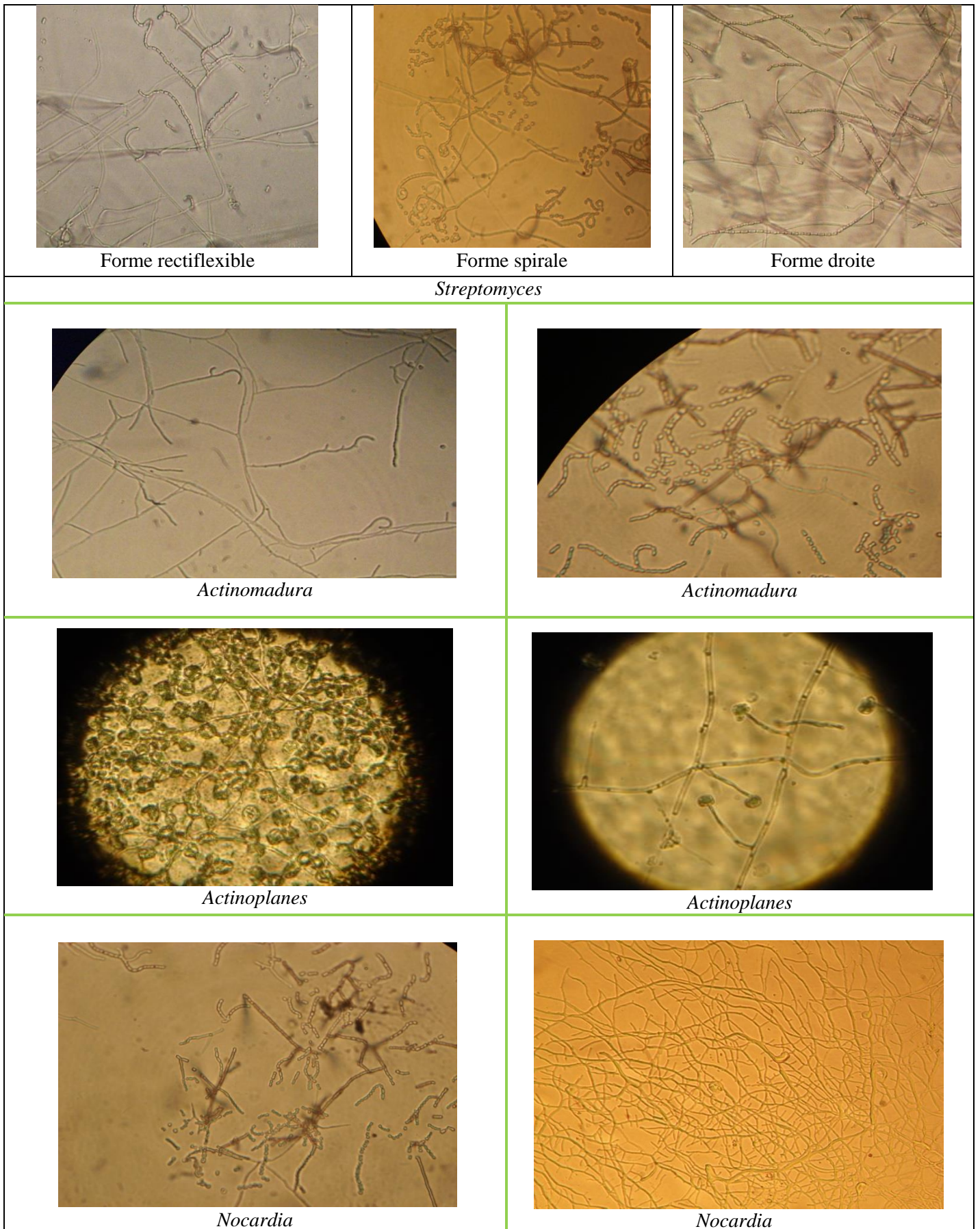


Figure 39. Photographie montrant les différents aspects microscopiques des isolats.

Les critères de détermination que nous avons utilisés sont ceux préconisés par le guide pratique de l'identification générique des actinomycètes « **Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie, 1994** ».

Les isolats (F, V, U, G, X, M, H, L, SAIB1, SA13, SA3, SA31, SA55, SAI3B, SAI2BX, SAIC3, SAI3T, SAIG3, SAI6X, SAI10X, SAIXB, SAI5X, SA5 et SA10) développent des colonies après 48 heures d'incubation. C'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide. En effet, **Nodwel et Losick (1998)** ont constaté que la colonie de *Streptomyces coelicolor*, érige des hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être, donc, principalement rapprochées du genre *Streptomyces*. Ces isolats présentent des chaînes de spores spirales (2 à 6 spires), droites et flexibles. Ces formes sont typiques des *Streptomyces* (**Myadoh et al., 2002**). De plus, la forme cylindrique des spores de ces souches est une caractéristique exclusive des *Streptomyces* (**Ezra et al., 2004**).

En revanche, la période de 5 à 7 jours est requise pour les actinomycètes à croissance relativement lente, ce qui est le cas dans cette étude du reste des isolats.

Les isolats (S, D, O, SA9) présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien fragmenté en éléments bacillaires de courte taille. Cette caractéristique permet de les rapprocher au genre *Nocardia*.

Selon **Perry et al., (2004)**, les actinomycètes produisant les acides mycoliques dans leur paroi, se développent lentement à cause de l'hydrophobicité de ces acides qui forment un obstacle à l'absorption des nutriments solubles. **Fiss et Brooks (1991)** ont rapporté que les genres d'actinomycètes produisant les acides mycoliques sont *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* et *Micromonospora*.

L'isolat (A) a la particularité d'avoir une croissance assez lente. Le diamètre des colonies n'atteint que 3 à 5 mm même après 15 à 20 jours d'incubation à 30 °C sur le milieu ISP2. L'observation microscopique a révélé un mycélium aérien avec des chaînes de spores droites ou disposées en crochets, ce qu'il le rapproche d'après le **Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie, (1994)** du genre *Actinomadura*.

Les colonies de l'isolat (I) sont rondes, d'un diamètre de 1 à 2 mm, et d'un contour régulier. Elles ont une surface lisse et une consistance crémeuse sur le milieu ISP2. L'examen microscopique a révélé des structures sous forme de sporanges, avec un mycélium de substrat non fragmenté. Ces caractéristiques le rapprochent du genre *Actinoplanes*.

Les pigments rouges produits par les actinomycètes isolés, peuvent être des substances bioactives (**Margalith, 1992**). Ils peuvent être soit des phénazines (rouge brun), des prodigiosines (rouge) ou caroténoïdes (jaune ou orange). Les prodigiosines sont des pigments

rouges élaborés par *Streptomyces* sp., *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelleteri*, les pigments orange sont produits par plusieurs espèces de *Streptomyces*. Alors que les phénazines sont des pigments rouges bruns secrétés par *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium* et *Streptosporangium*.

L'isolat G, secrète un pigment brun noir qui est la mélanine, la production des pigments mélanoides est une caractéristique très importante pour les actinomycètes. **Shirling et Gottlieb (1972)** l'on considérés comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Selon **Margalith (1992)** la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat, la tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénilalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation le produit final est l'acide 5,6-dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur noir.

D'autre part, il est possible que certains pigments de couleur foncée masquent les autres pigments de couleurs plus claires qui sont produits simultanément, **Omura et al., (2001)** ont rapporté que le génome de *Streptomyces overmitilis* code pour 25 métabolites secondaires (mélanine, caroténoïdes, siderophores ect.).

Les résultats de l'étude macroscopique et de l'étude microscopique permettent de rapprocher les 30 isolats d'actinomycètes aux genres suivants :

- **Les *Streptomyces*** : vingt-quatre isolats d'actinomycètes ont été rapprochés à ce genre, d'autant huit actinomycètes isolés des boues activées. Le genre *Streptomyces*, est un des grands groupes bactériens les plus abondants dans le sol. Parmi les actinomycètes, Il est le genre bactérien le plus répondu dans le sol (**Hotam et al., 2013**). Cependant la prévalence des *Streptomyces* dans les environnements aquatiques, ainsi que leur caractère d'autochtone a longtemps été sujette à discussion. Les *Streptomyces* sont connus pour être les habitants naturels des sols au niveau desquels ils prédominent. On estime qu'ils constituent 1 à 20% de la biomasse tellurique (**Schrempf, 2006**).

Néanmoins, de nombreuses études tendent pourtant à confirmer leur présence dans des environnements aquatiques. **Terkina et al. (2002)** ont révélé la prédominance des genres *Streptomyces* et *Micromonospora* dans le lac Baikal (Russie) ; ils ont observé que les eaux du lac étaient dominées par *Streptomyces* (66 % des isolats) et les sédiments par *Micromonospora* (59 % des isolats). Les mêmes constatations ont également été rapportées par **Rifaat (2003)** au niveau de la rivière du Nile (Egypte).

Une étude réalisé par (**Singh et al., 2014**) sur les sédiments du lac Loktak, qui se situe dans une importante zone humide de Manipur (Inde), a montré que sur 172 isolats, la majorité

appartenait au genre *Streptomyces* et des actinomycètes nocardioformes. Ces résultats sont différents de **Terkina (2002) et Rifaat (2003)**, mais peuvent s'expliquer par le caractère trophique des lacs étudiés. En effet, le lac Baikal présente un caractère oligotrophique alors que le lac Loktak est eutrophique et fortement pollué par des courants d'entrée des rivières voisines chargées de déchets et les eaux de ruissellement agricoles. Le degré d'activité des *Streptomyces* dans les environnements aquatiques est également non clairement défini. **Jhonston et cross (1976)** isolent des souches de *Streptomyces* sous forme de spores et suggèrent alors leur présence dans cet environnement sous forme de dormance résultant d'un processus de lessivage des sols. Pourtant quelques années plus tôt, **Willoughby (1974)** révèle que de nombreux phages isolés à la surface du lac Mud (Royaume Uni) ont non seulement montré une spécificité au *Streptomyces* mais il est également apparu qu'ils étaient différents des phages isolés de sol. Ceci indique que certaines espèces de *Streptomyces* sont actives dans les milieux lacustres d'eau douce. Durant les dernières années les Streptomycètes ont été activement recherché et isolés d'un certains nombres de milieux aquatiques (**Bredholt et al., 2008**). Il apparait donc que les *Streptomyces* aquatiques grâce à leur capacité à dégrader un certain nombre de macromolécules tel que protéines, polysaccharides, lipides...etc., jouent également un rôle important dans le turnover des matières organiques et même toxiques dans les environnements aquatiques (**Schrempf, 2006**).

Il est à noter que les travaux portant sur l'isolement des *Streptomyces* dans les boues activées sont moins rapportés (**Zheng et al., 2007 ; Lin et al., 2011 ; Xu et al., 2014 ; Silini et al., 2016**). Ce qui nous a motivés à rechercher des *Streptomyces* dans les boues activées.

- **Les *Nocardia*** : 3 actinomycètes provenant des boues activées (S, D, O) et seulement un du sol (SA9) ont été rapproché à ce genre. Le genre *Nocardia* existe souvent dans les boues activées, il forme des floccs qui facilitent la sédimentation des particules présentant une importance particulière (**Schuppler et al., 1998 ; Lechevalier et Lechevalier, 1994**). Plusieurs espèces appartenant à ce genre sont pathogènes pour l'homme, cependant une seule est beaucoup plus décrite en pathologie humaine que les autres, il s'agit de *Nocardia asteroides*. Selon **Mc neil et Brown (1994)**, cette espèce est la seule de ce genre a présenté un mycélium aérien.

Ces bactéries sont impliquées dans les phénomènes de la production de mousses et du bulking sludge, provoquant la floculation des boues ce qui gêne considérablement le bon fonctionnement des stations d'épuration des eaux. Afin de minimiser les effets négatifs de ces bactéries, les techniciens des stations interviennent constamment en ajoutant des concentrations précises de l'eau de javel ou en raclant ces filaments bactériens

mécaniquement (**Jenkins et al., 2003**). Cependant, les caractéristiques filamenteuses des *Nocardia* peuvent être un atout majeur dans les techniques de bioremédiation des différents sites écologiques. En effet, les filaments ont tendance à se propager horizontalement et verticalement dans les zones les plus lointaines dans les sols et dans les eaux contaminés. Cette caractéristique n'est pas des moindres, elle permet d'éviter dans le cas des sols, le retournement de la terre après ensemencement des sites telluriques contaminés. Pour cette raison principale ces bactéries sont d'après nous très intéressantes et c'est pour ça qu'elles sont recherchées pour leur pouvoir d'utiliser les différents polluants et jouent ainsi un rôle majeur dans la bioremediation et la bioaugmentation des différents écosystèmes contaminés.

- **Les *Actinomadura*** : l'isolat (A) provenant des boues activées peut être identifié à ce genre, d'après leurs chaînes de spores en forme de crochets.

- **Les *Actinoplanes*** : L'isolat (I) provenant des boues activées peut être identifié à ce genre.

Les actinomycètes ne sont pas adaptés pour la croissance dans les habitats aquatiques, mais ils peuvent néanmoins être récupérés facilement de l'eau douce, de l'eau de mer, des eaux usées et à partir des sédiments et des boues. L'isolement des actinomycètes à partir de l'eau ne signifie pas qu'elles sont réellement aquatiques, une provenance à partir d'un environnement terrestre avoisinant ou même atmosphérique doit toujours être prise en considération. Les genres *Actinomadura* et *Actinoplanes* peuvent être retrouvés dans le sol avec une fréquence de 0,1% et 0,2% respectivement selon **Lechevalier et Lechevalier, (1967)** et dans les eaux douces selon **Williams et al., (1984)**.

En dehors des Streptomycètes, les actinomycètes sont présents dans les boues activées d'épurations (**Seviour et al., 1990**). Le genre *Nocardia* est le plus abondant. Le genre *Gordona* a également été isolé (**Kampfer, 1997**). Ainsi que le genre *Arthrobacter*. **Adamse (1970)** en a isolé à partir de boues activées de laiterie, **Nand et Rao (1972)**, et **Seiler et al., (1980)** ont isolés à partir de stations urbaines des actinomycètes. Par contre, en étudiant des boues activées d'une station d'épuration des eaux usées d'une papeterie, **Fulthorpe et al., (1993)** n'ont pas signalé d'activité particulière de bactéries à Gram positif. Dans les boues activées, les actinomycètes font partie des bactéries accumulant les polyphosphates (**Seviour et al., 2003**).

Les genres *Nocardia*, *Actinomadura* et *Actinoplanes* sont considérés comme des genres rares par rapport aux *Streptomyces*. Sur trente actinomycètes isolés et identifiés, Vingt-quatre souches sont identifiées comme appartenant au genre *Streptomyces*, les autres souches restantes appartiennent à d'autres genres.

5.2. Etudes de quelques caractères physiologiques et biochimiques

5.2.1. Tolérance au chlorure de sodium

Les résultats de ce test sont présentés dans le **Tableau 16**.

Tableau 16. : Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu ISP5 et à différentes concentrations de NaCl.

Isolats	Concentrations de NaCl				
	0%	2%	5%	9%	15%
F	+	+	+	+	-
V	+	+	+	+	-
G	+	+	+	+	-
U	+	+	+	+	-
X	+	+	+	+	-
SA31	+	+	+	+	+
SAIG3	+	+	+	+/-	-
SA3	+	+	+	+/-	-
SAIB1	+	+	+	+	-
SA13	+	+	+	+	-
SA55	+	+	+	+	-
SA10	+	+	+	+	-
SAIC3	+	+	+	+	-
SAI2BX	+	+	+	+	-
SAI3B	+	+	+	+	+
SAIXB	+	+	+	+	+
SAI6X	+	+	+	+	-

(+) Croissance abondante, (+/-) Croissance modérée, (-) Pas de croissance.

Selon les résultats rassemblés dans le **Tableau 16**, les actinomycètes isolés du sol agricole de Ain M'Lila et des boues activées de la station épuration ne poussent pas à des concentrations très élevées en NaCl dépassant les 9 %, une bonne croissance est observée aux concentrations de 2, 5, et 9 %, avec un optimum à 5 %. A l'exception des actinomycètes dénommés SA31, SAI3B et SAI3B qui sont aptes à tolérer une concentration de 15 % de NaCl dans leur milieu de culture.

Sur la base de la définition des bactéries halophiles et halotolérantes apportée par **Yoshida, (1991)**, Ce sont des actinomycètes halotolérantes modérées.

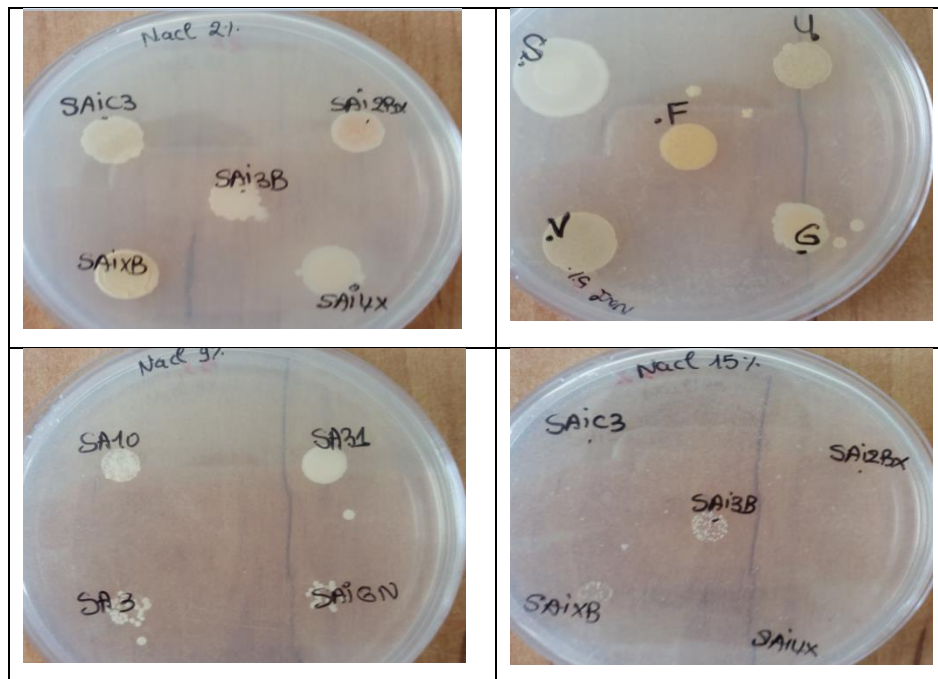


Figure 40. Photographie montrant la croissance des actinomycètes sur les différentes concentrations de NaCl étudiées.

5.2.2. Croissance des actinomycètes sur les différentes sources de carbone

Les Résultats des sources de carbone utilisées par les actinomycètes sont rassemblés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17. Utilisation des différentes sources de carbone par les actinomycètes actifs.

Isolats	Sources de carbone						
	ISP9	Glucose	Fructose	Galactose	Lactose	Arabinose	Propionate de sodium
F	-	+	+	+	+	+	+
V	-	+	+	+	+	+	+
G	-	+	+	+	+	+	+
U	-	+	+	+	+	+	+
X	-	+	+	+	+	+	+
SA31	-	+	+	+	+	+	+
SAIGN	-	+	+	+	+	+	+
SA3	-	+	+	+	+	+	+
SAIB1	-	+	+	+	+	+	+
SA13	-	+	+	+	+	+	+

SA55	-	+	+	+	+	+	+
SA10	-	+	+	+	+	-	+
SAIC3	-	+	+	+	+	+	+
SAI2BX	-	+	+	+	+	+	+
SAI3B	-	+	+	+	+	+	+
SAIXB	-	+	+	+	+	+	+
SAI6X	-	+	+	+	+	+	+

(+) Bonne croissance, (-) Pas de croissance.

L'ensemble des actinomycètes testés sur les différentes sources de carbone, ont présentés une bonne croissance sur le D-fructose, le galactose, le lactose, l'arabinose et le propionate de sodium à l'exception de l'isolat SA9 qui présente une absence de croissance sur l'arabinose. Par rapport au témoin négatif (ISP9 exempte de source de carbone) et le témoin positif (ISP9 additionnée du glucose comme seule source de carbone).

5.2.3. Croissance des actinomycètes sur les différentes sources d'azote

Les Résultats des sources d'azote utilisées par les actinomycètes sont rassemblés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Utilisation des différentes sources d'azote par les actinomycètes actifs.

Isolats	Sources d'azote						
	Cystéine	Arginine	Méthionine	Proline	Asparagine	Tyrosine	acide aspartique
F	+	+	+	+	+	+	+
V	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+
U	+	+	+	+	+	+	+
X	+	+	+	+	+	+	+
SA31	+	+	+	+	+	+	+
SAIGN	+	+	+	+	+	+	+
SA3	+	+	+	+	+	+	+
SAIB1	+	+	+	+	+	+	+
SA13	+	+	+	+	+	+	+
SA55	+	+	+	+	+	+	+
SA10	+	+	+	+	+	+	+

SAIC3	+	+	+	+	+	+	+
SAI2BX	+	+	+	+	+	+	+
SAI3B	+	+	+	+	+	+	+
SAIXB	+	+	+	+	+	+	+
SAI6X	+	+	+	+	+	+	+

D'après les résultats rassemblés dans le **Tableau 18**, les actinomycètes du sol agricole et des boues activées actifs sur les BTEX et certains pesticides de cette étude, ont présenté une bonne croissance sur les différentes sources d'azotes testées (cystéine, arginine, méthionine, proline, asparagine, tyrosine, acide aspartique), en comparant avec un milieu de culture exempt de source d'azote.

5.2.4. Mise en évidence de la capacité des actinomycètes actifs à dégrader certains composés organiques complexes naturels

Les résultats de l'hydrolyse de l'amidon, la caséine, la gélatine, et la dégradation de la cellulose, la pectine, la chitine et l'action sur le Tween 80 et l'action sur le lait écrémé figurent dans le **Tableau 19**.

Tableau 19. Résultats de la dégradation de certains composés organiques naturels complexes.

Isolats	Les composés organiques							Action sur lait écrémé
	Amidon	Caséine	Gélatine	Cellulose	Pectine	Chitine	Tween80	
F	+	+	+	+	-	+	-	Peptonisation
V	+	+	+	+	-	+	-	Peptonisation
G	+	+	+	+	-	+	+	Coagulation
U	+	+	+	+	-	+	+	Coagulation
X	+	+	+	+	+	-	+	/
SA31	+	+	+	+	+	-	+	/
SAIGN	+	+	+	+	+	+	+	/
SA3	-	+	+	+	+	-	+	/
SAIB1	+	+	+	+	+	+	+	/
SA13	+	+	+	+	+	-	+	/
SA55	-	+	+	+	+	+	+	/

SA10	–	+	+	+	–	–	+	Sans action
SAIC3	–	+	+	+	–	+	+	/
SAI2BX	–	+	+	+	–	–	–	/
SAI3B	–	+	+	+	+	–	+	/
SAIXB	–	+	+	+	–	+	+	/
SAI6X	–	+	+	+	–	–	–	/

(+) Bonne croissance, (–) Absence de croissance, (/) Non déterminé.

Dix isolats sont amylolytiques, pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les isolats, nous avons utilisé un milieu gélose à l'amidon à 2% d'amidon, l'amidon se colore en bleu par l'iode. Lorsque l'amidon est hydrolysé, les produits de dégradation (dextrines, maltose, et glucose) ne donnent plus de réaction.

Dix-sept actinomycètes sont capables de dégrader la caséine, la mise en évidence de l'hydrolyse de la caséine a été réalisée sur un milieu faiblement gélosé additionné de 5% de lait écrémé, La clarification autour de colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

Dix-sept actinomycètes sont capables de dégrader la gélatine, ce test a été réalisé sur le milieu ISP9 additionné de gélatine à 0,4% comme seule source de carbone. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique à 15% est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine.

L'ensemble des isolats testés ont tous une activité cellulolytique, la mise en évidence repose sur l'utilisation de ce dernier comme unique source de carbone et d'énergie dans le milieu, ainsi, si les souches sont incapables d'utiliser ce substrat, leur croissance est faible ou absente, qui est un indice d'absence d'enzymes cellulolytiques chez ces souches. Dans le cas contraire les souches présentant une bonne croissance sont donc capables de dégrader la cellulose et produisent ainsi des enzymes cellulolytiques (Cellulases) et lorsqu'une solution de Gram Iodine est versée sur la gélose, les zones claires autour des colonies correspondent aux zones d'hydrolyse de la cellulose. Cette méthode a été utilisée par **Lekchiri et al. (2006)** comme un test préliminaire pour la mise en évidence de l'activité cellulolytique des champignons filamenteux et qui ont trouvés que les souches présentant une bonne croissance sur le milieu cellulose-Agar sont les meilleures souches productrices de cellulases.

8 isolats montrent une activité pectinolytique, toutes les souches ayant une bonne croissance sur milieu pectine agar sont entourées par des zones claires après la couverture des cultures, sur milieu gélosé contenant de la pectine, par le bromure d'héxadécyl triméthyl ammonium (CTAB) ou par une solution d'acétate de cuivre (**Biely et Slavikova, 1994**).

9 isolats dégradent la chitine et présentant ainsi une activité chitinolytique. Les isolats dégradant la chitine présentant des halos clairs autour des colonies.

Sur les Dix-sept isolats testés sur le milieu Sierra additionné de Tween 80, treize actinomycètes sont lipolytiques.

Sur les 5 isolats testés, deux types d'actions peuvent être induites par les actinomycètes isolés :

1. Une coagulation du lait écrémé est remarquée par les isolats G et U ;
2. Une peptonisation du lait écrémé et notée pour les isolats F et V.

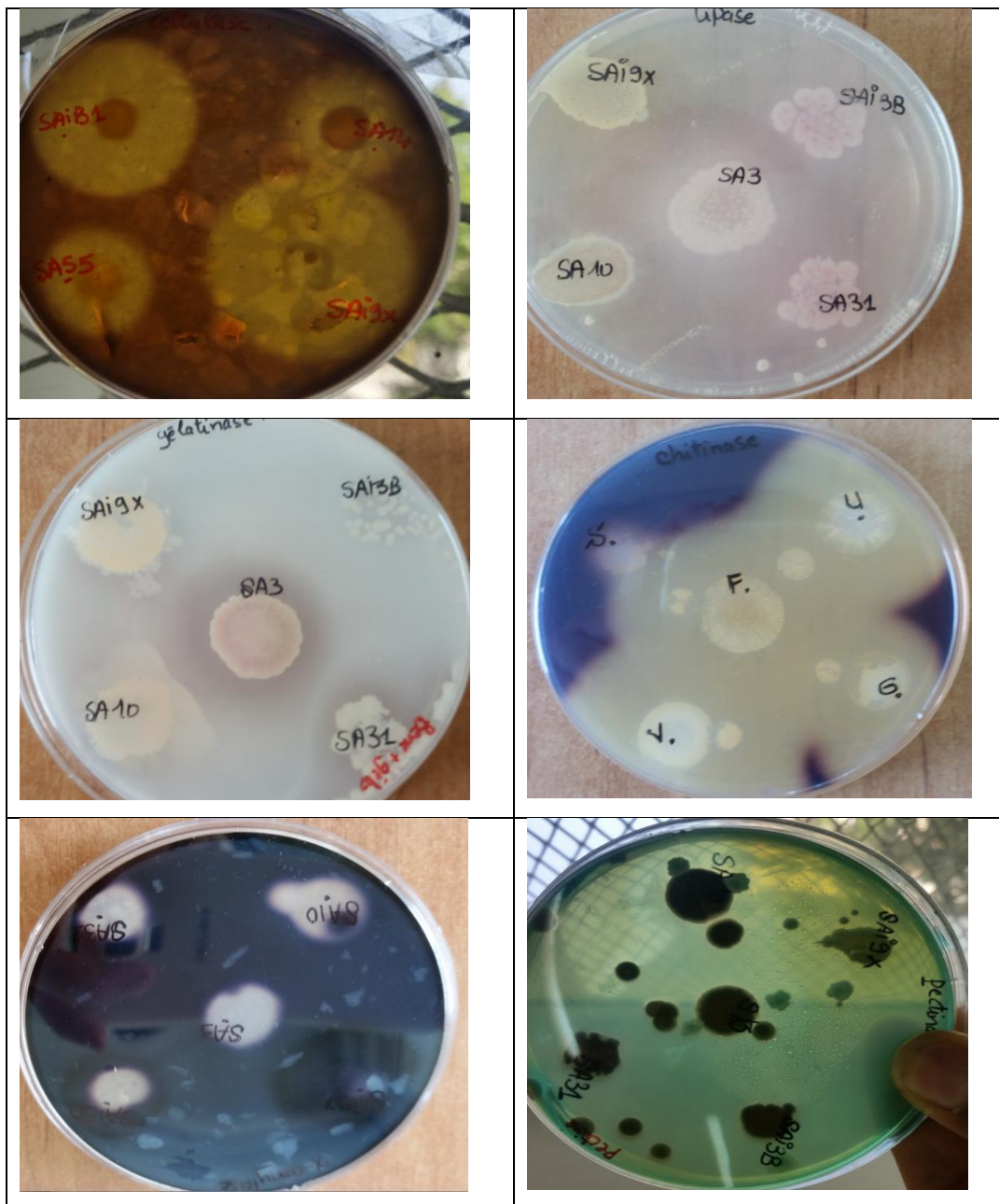


Figure 41. Photographie montrant l'activité hydrolytique de la cellulase, la lipase, la gélatinase, la chitinase, l'amylase et la pectinase produites par les actinomycètes.

Les actinomycètes isolés dans cette étude, montrent des aptitudes supplémentaires en plus de leurs capacités à biodégrader les BTEX et certains pesticides. Ils possèdent des aptitudes à produire des enzymes hydrolytiques, de la cellulase, la pectinase, la gélatinase, les amylases et la chitinase. D’après les résultats obtenus, il apparaît une biodiversité métabolique remarquable selon les actinomycètes isolés. Ces prédispositions métaboliques sont bien connues chez ces bactéries, mais suscitent encore un intérêt croissant surtout concernant les souches extremophiles.

5.3. Sensibilité aux antibiotiques des souches actinomycétales identifiées

La sensibilité aux antibiotiques est considérée comme un critère taxonomique additionnel de grande valeur pour l’identification des actinomycètes. Les résultats de la caractérisation morphologiques et physiologiques des actinomycètes corrént avec ceux de la sensibilité aux antibiotiques, selon **Williams (1967)**. Pour cela, la sensibilité de 5 souches actinomycétales vis-à-vis de 10 antibiotiques différents a été testée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Tableau 20. Antibiogramme de certaines souches d’actinomycètes.

N° de souches	Antibiotiques									
	E 15 µg	CN 10 µg	IPM 10 µg	AK 30 µg	AMC 30 µg	AM 25 µg	NA 30 µg	C 30 µg	CAZ 30 µg	PEF 5 µg
SA9	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S
G	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
U	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S
V	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
F	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S

S : Sensible, R : Résistante.

La majorité des actinomycètes sont sensibles ou résistantes à au moins un des dix antibiotiques utilisées. Les cinq souches sont sensibles à l’Amikacine (AK), la Gentamicine (CN), la Chloramphénicol (C) et la Péfloxacine (PEF). Les cinq souches sont résistantes à l’Amoxicilline plus ac. Clavulanique (AMC), la Ceftazidime (CAZ) et l’Acide Nalidixique (NA). 2 souches sont résistante à l’Erythromycine (E), deux souches à l’Imipénème (IPM), trois souches sont résistantes à l’Ampicilline (AM).

La majorité des souches d’actinomycètes ont montrés une multi-résistance vis-à-vis des macrolides, des Fuoroquinoles, des Cephalosporines et des Penicillines. Les *Streptomyces* sont des germes multi-résistants aux antibiotiques et ont la capacité de modifier l’antibiotique ou sa cible (**Rigali, 2008**), la majorité des β -lactamines, des céphalosporines, et des

macrolides sont inefficaces contre eux (**Veysier, 1979**). La raison, à cette multi-résistance, est que la plupart des classes de ces antibiotiques cités sont produits par le genre *Streptomyces*. Ils sont résistants pour éviter leur propre destruction. Les souches qui ont été rapprochées par caractérisation morphologique au genre *Streptomyces* corrélerent bien avec le profil antibiotique.

Les *Nocardia* sont eux aussi des germes multi-résistants. Selon **Boiron et Provost (1988)**, les *Nocardia* sont résistantes aux β -lactamines, aux penicilines, aux céphalosporines et aux macrolides ; cependant elles sont sensibles envers l'Amikacine (AK), la Gentamicine (CN), la Chloramphénicol (C), la Péfloxacin (PEF), l'Erythromycine (E) et à l'Imipénème (IPM). Ces résultats sont ceux de la souche SA9 précédemment rapprochée par caractérisation morphologique, au genre *Nocardia*.

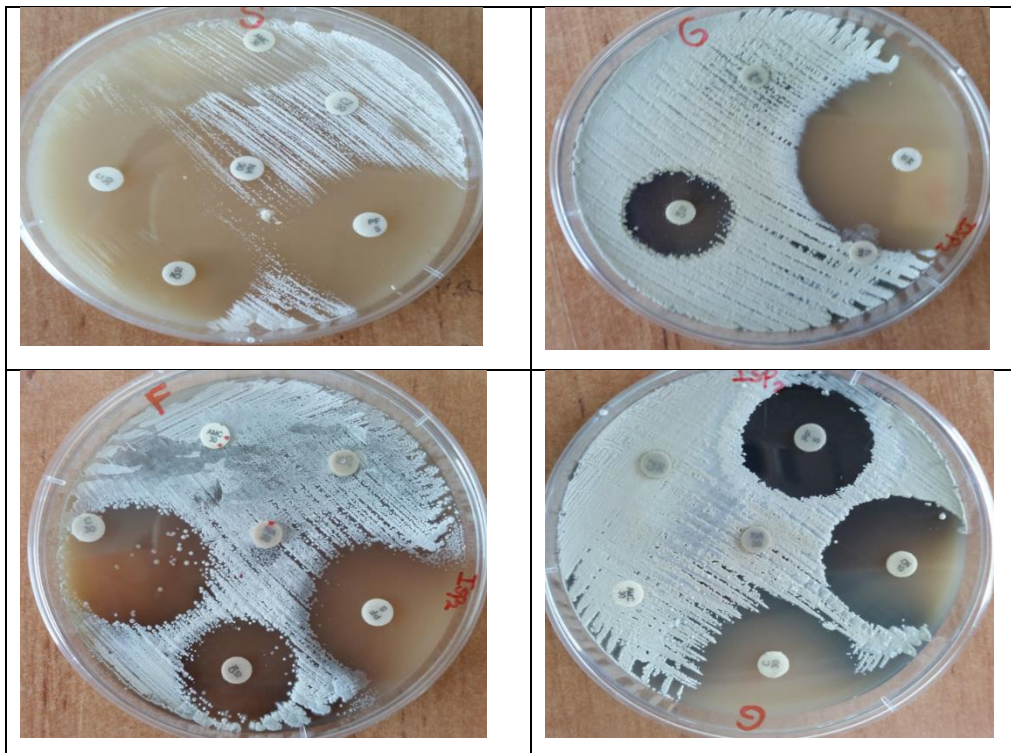


Figure 42. Photographies montrant la sensibilité des souches aux antibiotiques testés.

5.4. Identification moléculaire des actinomycètes actifs

Les protocoles employés pour l'extraction de l'ADN génomique des isolats ainsi que l'amplification du gène 16S ont permis l'obtention de séquences nucléotidique de 1300-1500 paires de bases en moyenne (**Figure 43**).

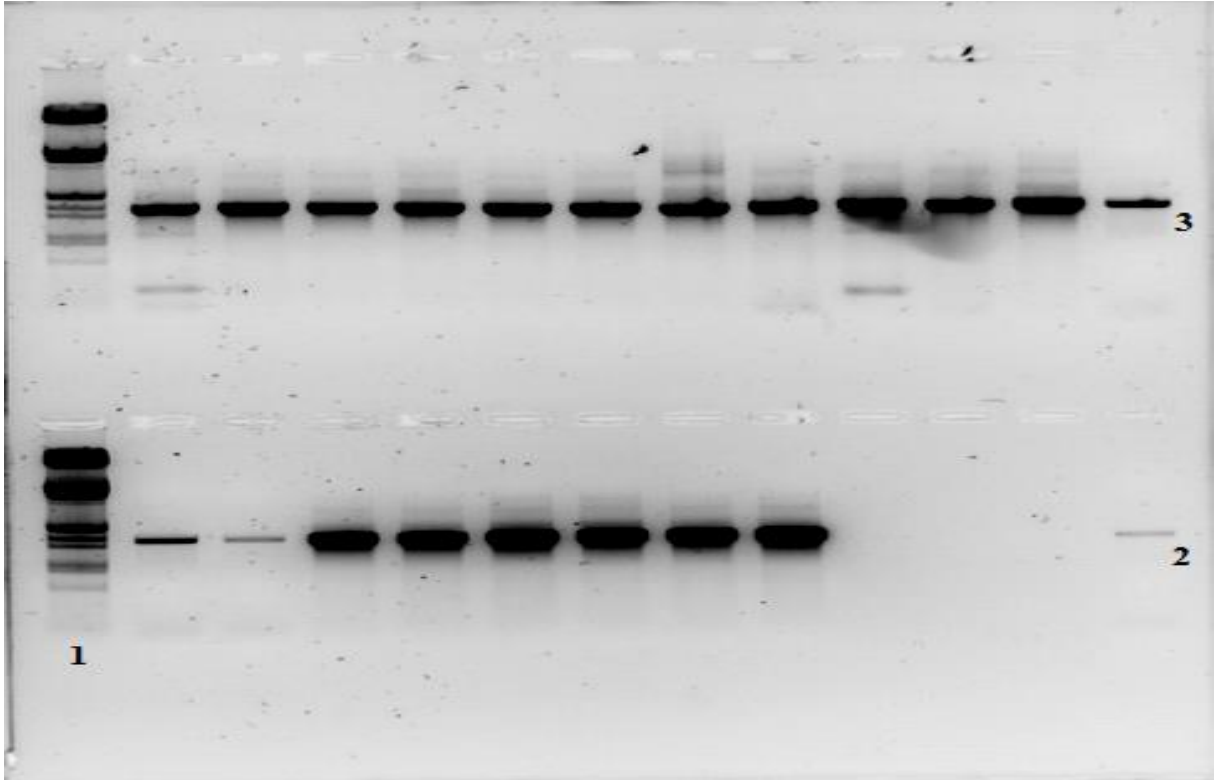


Figure 43. Amplification du gène 16S rDNA à partir des échantillons d'ADN extraits des isolats sélectionnés. **1** : Marqueur de poids moléculaire. Echelle 1 kb DNA ladder (Invitrogen) ; **2** : Témoin négatif ; **3** : Témoin positif.

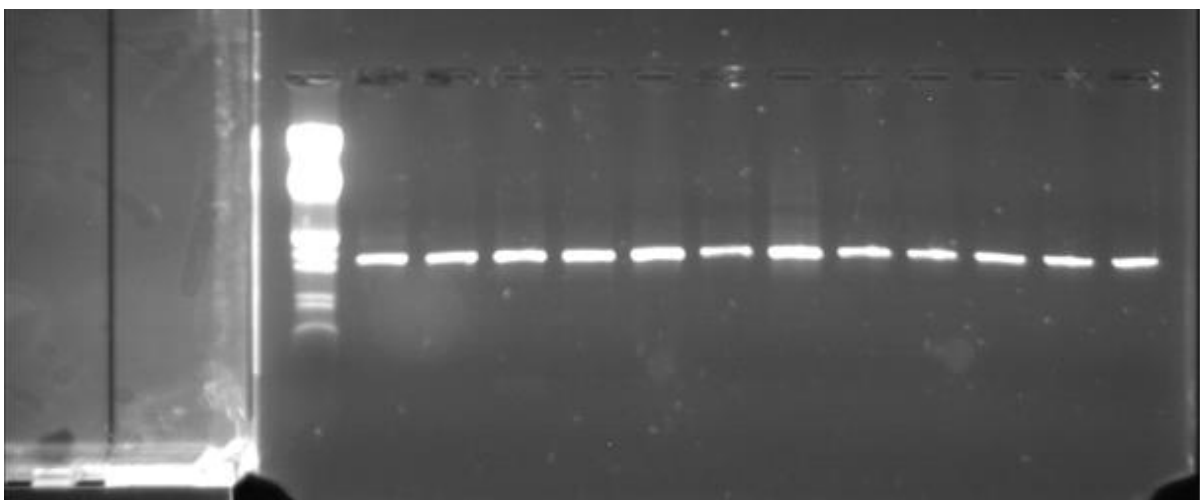


Figure 44. Vérification de la purification des produits PCR.

Les résultats du séquençage des fragments d'ADNr amplifiés des 25 souches d'actinomycètes par les amorces universelles **27F_YM** (5'AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') et **R1492** (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') ont été obtenus sous forme d'électrophorégrammes bruts, visualisés par **Sequence Scanner** software (**Applied Biosystems**) et analysés par **Gap 4** software. Les alignements du couple des séquences sens / antisens sont effectués par **DNAMAN** software pour définir la séquence consensus.

Les séquences ainsi obtenues sont soumises via Internet à l'aide du logiciel Blast (**Basic Local Alignment Search Tool**) pour comparaison avec les séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale dénommée « **GenBank** » (**Altschul et al., 1997**), pour déterminer leur affiliation phylogénétique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec le taxon le plus proche (**Tableau 21 et 22**).

Table 21. Identification moléculaire selon NCBI des actinomycètes isolés des boues actives.

Isolat	Espèce la plus proche	Pourcentage d'identité	Accession	Longueur des séquences (pb)
U	<i>Streptomyces griseobrunneus</i> strain FSHH12	99%	KC626002.1	1403
F	<i>Streptomyces</i> sp. SAI-13	100%	KM220609.1	1342
V	<i>Streptomyces flavogriseus</i> strain P.S.461	100%	KF991651.1	1400
X	<i>Streptomyces</i> sp. Sn-23	100%	KJ742904.1	1402
G	<i>Streptomyces microflavus</i> strain 126182	100%	JN180196.1	1394
S	<i>Nocardia nova</i> strain GTC 86116S	99,9%	AB292584.1.	1490
L	<i>Streptomyces lavendulae</i> strain FSHJ9	99,9%	KC626003.1	1408
D	<i>Nocardia asteroides</i> strain Z12-8	100%	KJ571110.1	1415

Table 22. Identification moléculaire selon NCBI des actinomycètes provenant du sol agricole.

Isolat	L'espèce la plus proche	Pourcentage d'identité	Accession	Longueur séquences (pb)
SA13	<i>Streptomyces setonii</i> NBRC 13085(T)	98,34%	AB184300	1389
SAIB1	<i>Streptomyces luteus</i> TRM 45540(T)	99,93%	KN039946	1401
SA3	<i>Streptomyces coeruleus</i> ISP 5146(T)	99%	AY999720	1401
SA31	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399(T)	99%	AB184650	1398
SA55	<i>Streptomyces griseorubens</i> NBRC 12780(T)	99,86%	AB184139	1397
SAI3B	<i>Streptomyces caeruleus</i> NRRL B-24802(T)	99,5%	KQ948975	1397
SAI2BX	<i>Streptomyces roseoviolaceus</i> ISP 5277(T)	99,29%	AJ399484	1423
SAIC3	<i>Streptomyces mutabilis</i> NBRC 12800(T)	100%	AB184156	1370
SAI3T	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5183(T)	98,78%	AY999737	1405
SAIG3	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> NRRL B-16365(T)	99,71%	DQ026641	1400
SAI6X	<i>Streptomyces violaceus</i> NRRL B-2867(T)	99,93%	KL569104	1377
SAI10X	<i>Streptomyces alfalfae</i> XY25(T)	100%	KR080524	1401
SAIXB	<i>Streptomyces bellus</i> ISP 5185(T)	99,86%	AJ399476	1421
SAI5X	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> NRRL B-24455(T)	99,93%	LIQV01000394	1372
SA10	<i>Streptomyces rochei</i> strain CA4	99%	JN707687.1	1352
SA5	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877(T)	99,63%	CP012382	1363
SA9	<i>Nocardia neocaledoniensis</i> JCM 12604(T)	99,93%	CLG_48665	1391

Contrairement aux méthodes d'identification traditionnelles des actinomycètes, qui sont lentes, laborieuses et très coûteuses, les approches moléculaires de l'identification sont souvent utilisées pour leurs rapidité et efficacité.

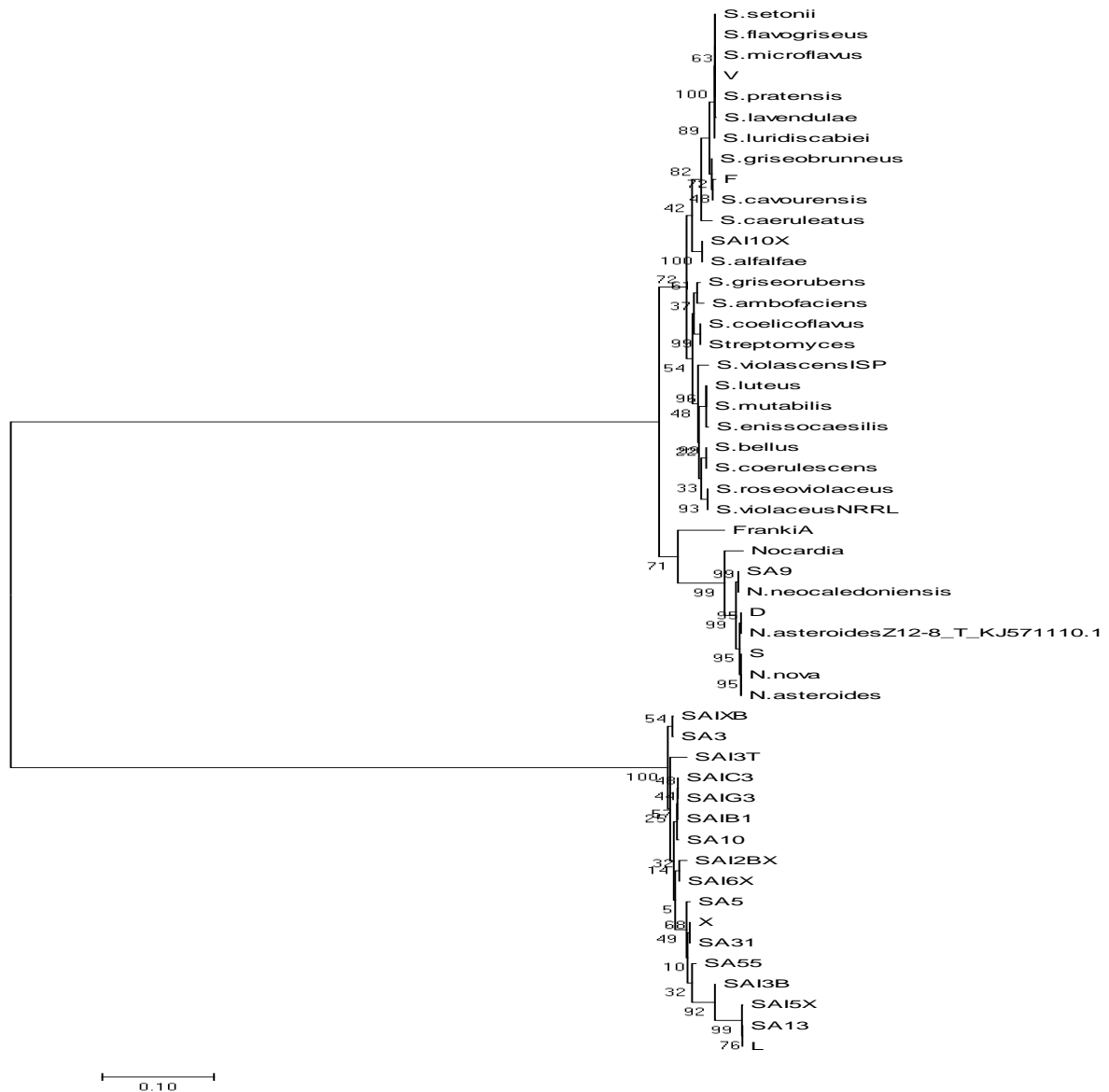


Figure 45. Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega version 7.0 montrant la position phylogénétique de 25 souches. La matrice des distances est calculée selon le model Kimura à 2 paramètres. Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide. La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Frankia alni* ACN14a a été utilisée comme outgroup.

L'amplification et le séquençage du gène de l'ADNr 16S des 25 souches sélectionnées nous a permis d'identifier toutes ces bactéries. La comparaison des séquences obtenues avec celles disponibles dans les banques de données internationales nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ces souches. La plupart des bactéries ont été identifiées jusqu'au stade de l'espèce, pour d'autres, seule l'appartenance au genre est vérifiée. Pour certaines souches, le pourcentage d'identité avec les souches de références les plus proches est inférieur à 99%, ce qui pourrait représenter selon Meier-Kolthoff *et al.* (2013), de nouvelles espèces. Il est possible aussi que le fragment d'ADN amplifié n'ait pas une taille suffisante pour une identification fine de ces souches (**Meier-Kolthoff *et al.*, 2013**). Cependant, afin de confirmer ces résultats, il est nécessaire de réaliser d'autres analyses génomiques.

L'arbre phylogénétique obtenu (**figure 45**) représente les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et celles de référence. On distingue différents clades éloignés. 91% des isolats appartiennent au genre *Streptomyces* et 9% au genre *Nocardia*.

Il ressort de l'arbre obtenu que les souches (SAIXB, SA3, SAI3T, SAIG3, SAIB1, SA10, SAI2BX, SAI6X, SA5, SA55, SAI3B, SAI5X et SA13) (Tables 21 et 22), occupent des lignes phylogénétiques indépendantes, ce qui nous permis de conclure que ces souches sont différentes des souches de références.

Ce résultat confirme l'abondance des *Streptomyces* dans les écosystèmes telluriques et d'une manière plus innovante dans les boues activées de la station d'épuration testée.

La présence de ces actinobactéries, dans les boues activées est un résultat très intéressant. Ce sont plutôt connus comme colonisateurs abondants des écosystèmes telluriques (**Waksman, 1967**). Ces bactéries sont des producteurs incontestables de métabolites secondaires et de composés chimiques très diversifiés. Ces microorganismes possèdent la capacité de se sporuler et de former des mycéliums ces deux caractéristiques sont très importante et très avantageuses pour ce genre de microorganismes.

Les travaux portant sur l'isolement des *Streptomyces* à partir des boues activées sont moins rapportés à ce jour.

En outre, selon notre connaissance, nos souches n'ont jamais été connues comme agents de dégradation de BTEX.

CONCLUSION &
PERSPECTIVES

Les BTEX sont très toxiques pour l'homme. La toxicité est variable selon la concentration, la durée de l'exposition et la sensibilité des personnes. Ils sont retrouvés dans les écosystèmes telluriques dans l'air et dans les stations d'épuration des eaux usées suite aux différentes activités pétrolières et pétrochimiques. Les véhicules sont aussi une source très importante. L'inhalation, est parmi les voies essentielles par laquelle ces composés arrivent dans le corps humains. L'agriculture par l'emploi de différent pesticide, est le deuxième grand producteur de polluants très toxiques pour l'environnement et spécialement pour les êtres humains. En effet, et par ignorance, les agriculteurs ajoutent, généralement au sol des quantités plus que suffisantes, laissant des quantités importantes de ces pesticides s'accumuler au fil des années. Ces pratiques irréfléchies contribuent à des désastres environnementaux quelques fois irréparables ou nécessitant plusieurs années pour se résorber. Paradoxalement, ces deux grands secteurs générateurs de BTEX et de pesticides, ont contribué à l'apparition de microorganismes adaptés à ces polluants. Ces aptitudes d'adaptations ont été employées par les chercheurs, afin de dépolluer les différents sites contaminés par ces xénobiotiques. Les actinomycètes sont des bactéries qui possèdent un patrimoine métabolique très diversifié pouvant contribué à remédier les écosystèmes contaminés par ces deux importants groupes de polluant. Ce travail met en exergue le rôle de ces bactéries isolés à partir d'un sol agricole et des boues activées, dans la biodégradation des BTEX et de certains pesticides parmi les plus utilisés en Algérie.

L'utilisation de milieux spécifiques nous a permis d'isoler et de purifier 97 isolats présentant les caractéristiques macroscopiques des actinomycètes. Le milieu Olson est d'après cette étude, le plus favorable pour l'isolement des actinobactéries. Ces bactéries sont très abondantes dans ces écosystèmes. L'écosystème tellurique est cependant beaucoup plus riche en actinobactéries (81%) que les boues activées (18%). Le genre *Streptomyces* est l'actinobactérie la plus retrouvée dans ces deux sites écologiques. L'isolement des *Streptomyces* à partir des boues activées est un résultat très important. Leur présence n'a été signalée que dans de rares travaux, contrairement aux *Nocardia*, *Gordona* et *Arthrobacter*.

La plus grande majorité de ces isolats obtenus a montrés des aptitudes à vivre en présence sur au moins un des composés BTEX et sur une diversité importante de pesticides.

Quatorze isolats qui proviennent du sol agricole et 6 qui proviennent des boues ont un pouvoir de dégradation des BTEX. Parmi ces actinobactéries, 4 isolats désignées sous le nom de code U, F, V et S, qui proviennent des boues activées et une bactérie dénommée SA13 récoltée du sol agricole, sont les plus performants. Ils peuvent dégrader 1500 mg/L de ces composés organiques volatils en condition aérobie. Cette concentration des BTEX

métabolisés par ces bactéries est considérée très élevée. Elle montre une aptitude très singulière jamais rencontrée chez les autres bactéries. La présence des actinobactéries dans les stations d'épuration des eaux usées est aussi un résultat important. Ce résultat contribue à enrichir les données bibliographiques, concernant la diversité bactérienne des eaux des stations d'épuration. La présence dans ces deux sites des actinomycètes capables d'utiliser les composés BTEX indique qu'il existe des possibilités de bioremédiation naturelle.

Concernant les pesticides testés dans cette étude, sur les 72 actinomycètes telluriques plusieurs bactéries ont montrées des capacités de croissance sur les milieux de base contenant tous les herbicides, les insecticides et les fongicides testés. Sur les 18 actinomycètes isolés à partir des boues activées, plusieurs isolats sont aptes à croître sur les milieux contenant les herbicides les fongicides et les insecticides testés. Cependant, l'activité de dégradation des pesticides par les actinomycètes des boues activées est observée mais elle est relativement réduite par rapport à celle notée chez les mêmes bactéries isolées à partir du sol agricole testé.

L'identification des isolats à pouvoir de dégradation, réalisée sur les bactéries les plus actives montre la dominance du genre *Streptomyces* dans ces deux sites.

L'analyse des propriétés physiologiques de ces microorganismes a mis en évidence des capacités supplémentaires de dégradations. En effet, en plus d'avoir les aptitudes de dégradation et de croissance sur les différents polluants testés, nos bactéries peuvent dégrader la plupart des glucides et acides aminés. Certaines sont des halotolérantes capables de croître en présence de différentes concentrations du chlorure de sodium. Ces actinobactéries possèdent par conséquent, une caractéristique des plus intéressantes. Elles peuvent dégrader les xénobiotiques testés même dans les sols salins. Nos bactéries sont également capables de dégrader certains composés organiques complexes grâce à la production d'enzymes hydrolytiques tels que les amylases, les caséinases, les gélatinases, les chitinases, les pectinases, les cellulases et les estérases.

Les caractéristiques morphologiques et physiologiques et biochimiques de ces actinomycètes suggéraient un rapprochement des isolats sélectionnés aux genres *Streptomyces* et *Nocardia*. Cette même identification a été confirmée pour la plupart des isolats, par l'analyse moléculaire du gène ADNr S16. Une étude phylogénique nous a permis par le biais de programmes informatiques spécifiques d'établir l'arbre phylogénétique de tous les isolats. La position de certaines espèces dans l'arbre révèle des possibilités de la présence de nouvelles souches.

En perspective, il serait intéressant de réaliser un GC % et une hybridation ADN/ADN des souches isolées. Il serait très intéressant également d'utiliser les nouvelles techniques de

Métagénomique. Ces dernière, permettent le screening de la diversité microbienne de ces écosystèmes en évitant les inconvénients de la mise en culture et d'inclure les bactéries viables non cultivables. D'autres méthodes peuvent également être réalisées telle qu'une analyse par PCR quantitative pour montrer la présence des gènes de dégradation des BTEX et des pesticides dans les échantillons de sol et de boues pollués.

Des études complémentaires sur la dégradation des pesticides peuvent être réalisées. Il s'agit d'analyser les produits intermédiaires et de déterminer leurs degrés de toxicité. Des tests *in situ* et sur champ peuvent également être envisagés.

Notre étude constitue un thème original qui entre dans le cadre de l'exploration et la valorisation de la biodiversité en actinomycètes des écosystèmes telluriques et aquatiques.

Les résultats obtenus se sont révélés prometteurs et nous incitent à poursuivre nos efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces douées d'activités métaboliques de dégradation intéressantes pouvant être exploitées en bioremédiation.

Références

Bibliographiques

A

- Adam J. Book, Gina R. Lewin, Bradon R. McDonald, Taichi E. Takasuka, Drew T. Doering, Aaron S. Adams, Joshua A. V. Blodgett, Jon Clardy, Kenneth F. Raffa, Brian G. Fox, and Cameron R. Currie. (2014). Cellulolytic *Streptomyces* Strains Associated with Herbivorous Insects Share a Phylogenetically Linked Capacity To Degrade Lignocellulose ». *Appl Environ Microbiol.* 80(15): 4692–4701.
- Adamse, A.D. Some Characteristics of *Arthrobacters* from a Dairy Waste Activated Sludge. *Water Res.* 4 : 797–803.
- Agteren M. Keuning H., et Janssen D.S. (1998). *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*. Springer. 504 pp.
- Alagappan, G. and Cowan R.M. Effect of Temperature and Dissolved Oxygen on the Growth Kinetics of *Pseudomonas Putida* F1 Growing on Benzene and Toluene.(2004). *Chemosphere.* 54:1255-1265.
- Alba Álvarez-Martín, María J. Sánchez-Martín, José M. Ordax, Jesús M. Marín-Benito, et M. Sonia Rodríguez-Cruz. (2013). *Leaching of Two Fungicides in Spent Mushroom Substrate Amended Soil: Influence of Amendment Rate, Fungicide Ageing and Flow Condition.* 584–585 : 828-837.
- Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H., Eliyas M., et Radwan S. (2010). Biodegradation of Crude Oil and Pure Hydrocarbons by Extreme Halophilic Archaea from Hypersaline Coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles.* 14:321-328.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Chun Gibson T, Higgins D, et Thompson J. *Clustal*. Vol. X program. EMBL, Heidelberg, 1994.
- Alvares-cohen L, Deeb R.A. (1999). Temperature Effect and Substrate Interaction during the Aerobic Biotransformation of BTEX Mixtures by Toluene- Enriched Consortia and *Rhodococcus Rhodochrous* ». *Biotechnol. Bioeng.* 62(5): 526–536.
- An Y. (2004). Toxicity of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Mixtures to *Sorghum Bicolor* and *Cucumis Sativus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 72 : 1006-1011.
- Anderson A.S. et E. Wellington. (2001). The Taxonomy of *Streptomyces* and Related Genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 797–814. doi: 10.1099/00207713-51-3-797.
- Anurag P., Anupam S., et Majumdar S. K. (2005). Utilization of Carbon and Nitrogen Sources by *Streptomyces kanamyceticus* M27 for the Production of an Anti-Bacterial Antibiotic. *African Journal of Biotechnology* 4, n° 9 (2005): 909–910.
- Araújo F.A.S., Monteiro R.T.R. et Abarkeli R.B. (2003). Effect of Glyphosate on the Microbial Activity of Two Brazilian Soils. *Chemosphere.* 59(10) :3505-3508.
- Arengi, F.L.G., Berlanda D., Galli E., Sello G., et Barbieri P. (2001). Organization and regulation of meta cleavage pathway genes for toluene and oxylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3304-3308.
- Arrêté du 29 mai 2000 publié le 13 août 2000, portant modification de l'arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toutes natures des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation ». *Journal Officiel de la République Française.*
- Attaway H. and Schmidt M. « Tandem Biodegradation of BTEX Components by Two *Pseudomonas* sp. ». *Curr. Microbiol.* 45 (2002): 30–36.

B

- Badali, H., F.X. Prenafeta-Boldu, J. Guarro, C.H. Klaassen, J.F. Meis, et G.S. de Hoog. (2011). *Cladophialophora Psammophila*, a Novel Species of *Chaetothyriales* with a Potential Use in the Bioremediation of Volatile Aromatic Hydrocarbons. *Fungal Biol* 115: 1019–1029.

- Baggi, G., P. Barbieri, E. Galli, and S. Tollari. (1987). Isolation of a *Pseudomonas Stutzeri* Strain That Degrades O-Xylene ». *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2129–2132.
- Ball, H., H. Johnson, M.Reinhard and A. Spormann. (1996). Initial Reactions in Anaerobic Ethylbenzene Oxidation by a Denitrifying Bacterium, Strain EB1. *J. Bacteriol.* 178 : 5755–5761.
- Ballerini D. et Vandescateele J.P. *La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In Biotechnologie, Coordinateur R. Scriban, 5ème édition, édition Tech et Doc, 1999.*
- Barneaud, A. (2002). Eléments d'évaluation de l'exposition des habitants du vignoble nantais aux pesticides dans l'atmosphère. Mémoire de fin d'études : Génie Sanitaire : Ecole Nationale de la Santé Publique.
- Beestman G. B., Deming J. M. Dissipation of acetanilide herbicides from soils. *Agronomy J.* 66(1974) : 308-311.
- Beldjoudi M.F et Ali-khodja H. (2005). Biodégradation du méthanol en réacteur batch, influence de la présence de l'éthanol et des conditions de culture initiales. *Journal de la société Algérienne de chimie.* 15(2): 251–261.
- Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P. and Amoroso M.J. (2007). Lindane Uptake and Degradation by Aquatic *Streptomyces* sp. Strain M7 ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 59(2): 148–155.
- Berhin Y. C., Janssens M. et Wauters G. (2006). Determiation of Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Nocardia* Spp. from Clinical Specimens by Etest ». *Clin. Microbiol. Infect.* 12 : 905–912.
- Berlendis S., Lascourreges J.F., Schraauwers B., Sivadon P. and Magot M. « Anaerobic Biodegradation of BTEX by Original Bacterial Communities from an Underground Gas Storage ». *Aquifer. Environ. Sci. Technol* 44 (2010): 3621–3628.
- Bhadbhad J.B., Sarnaik S. S., et Kanekar P. P. « Bioremediation of an Industrial Effluent Containing Monocrotophos ». *Curr. Microbiol* 45 (2002): 346–349.
- Bhat M.A., M. Tsuda, K. Horhike, M. Nozaki, C.S.Vaidyanathan & T. Nakazawa. (1994). Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *pseudomonas cepacia* CSV90. *Applied and Environmental Microbiology.* 60(1): 307–312.
- Bickerdike, S.R., Holt R.A. and G. M. Stephens. Evidence for Metabolism of O-Xylene by Simultaneous Ring and Methyl Group Oxidation in a New Soil Isolate. (1997). *Microbiology* 143: 2321–2329.
- Bidlan Rajkumar and Manonmani Krishnan. «Aerobic Degradation of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia Marcescens* DT 1P». n°1, 38(2002):49-56.
- Biely P. and Slavikova E. « New Search for Pectolytic Yeasts ». *Folia Microbiol.* 6, n° 39 (1994): 485–488.
- Billet S., V. Paget, G. Garçon, N. Heutte, V. André, P. Shirali and F. Sichel. (2010). Benzene-Induced Mutational Pattern in the Tumour Suppressor Gene TP53 Analysed by Use of a Functional Assay, the Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast, in Human Lung Cells. *Arch Toxicol* 84: 99–107.
- Bliefert C. et Perraud R. *In : Chimie de l'environnement. 2ème Édition.* Paris: De Boeck, 2008.
- Boiron P. et Provost F. « *In Vitro* Susceptibility Testing of *Nocardia* spp. and Its Taxonomic Implication ». *J. Antimicrob. Chemother.* 22 (1988): 623–629.
- Borden R., C.Gomez and M. Becker. Geochemical Indicators of Intrinsic Bioremediation. *Groundwater.* 33: 180–189.

- Borriuso E., Eklo O. M., Iglesias E., Huot S. Modification de la mobilité des pesticides dans les sols après addition de matière organique exogènes. 5ème journées nationales de l'étude des sols. AFES, Rennes. (1996) :99-101.
- Boschin G., A. D'Agostina, A. Arnoldi, E. Marotta, E. Zanardini, M. Negri, A. Valle, et C. Sorlini. (2003). Biodegradation of Chlorsulfuron and Metsulfuron-Methyl by *Aspergillus Niger* in Laboratory Conditions. *J. Environ. Sci. Health*. 38(6): 737–746.
- Bouchez-Naïtali, M., H. Rakatozafy, R. Marchal, J.Y. Leveau, et J.P. Vandecasteele. (1999). Diversity of Bacterial Strains Degrading Hexadecane in Relation to the Mode of Substrate Uptake ». *J Appl Microbiol*. 86: 421–428.
- Boudemagh A. and Bensouici K. The effect of thermic pretreatment and antibiotics on the selective isolation of the culturable actinomycetes from the Algerian desert soil. *Sciences et Technologies*. 39 (2014): 25-32.
- Boudemagh A., Alikhodja H., Beldjoufi M.F., Bensouici K., Kitouni M., Boulahouf A., Mahboul M., Zaatout H., et Larkem N. (2006). Biodegradation of Methanol in a Batch Reactor by a Microbial Flora Isolated from a Wastewater Treatment Plant Sludge. 15(12): 1590-1594.
- Bousseboua, H. In : *Eléments de Microbiologie. 1ère édition*. Constantine: Ed. Campus-Club, 2005.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., & Viobis G. (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In *Biotechnologie des Antibiotiques. Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson, Paris* : Pp : 33–70.
- Brevault T., Achaleke J., Sougnabe S. P., et Vaissayre M. « Tracking Pyrethroid Resistance in the Polyphagous Bollworm, *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In the Shifting Landscape of a Cotton-Growing Area ». *Bulletin of Entomological Research* 98 (2008): 565–573.
- Briceno G., Fuentes M.S., Palma G., Jorquera M.A., Amoroso M.J., et Diez M.C. Chlorpyrifos Biodegradation and 3, 5, 6-Trichloro-2-Pyridinol Production by Actinobacteria Isolated from Soil. *International biodeterioration & biodegradation*. ISSN: 0964-8305.
- Brown J.M, McNeil M.M. (1994). The Medically Important Aerobic Actinomycetes : Epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev*. 7(3): 357–417.
- Bushell M.E. Growth, Product, Formation and Fermentation Technology. *Actinomycetes in Biotechnology*, 1988.

C

- Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., et Charnay M.P. and Coquet Y. « Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales ». *Editions France Agricole*, 2005, 637.
- Cao B., K. Nagarajan and K. Loh. (2009). Biodegradation of Aromatic Compounds: Current Status and Opportunities for Biomolecular Approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 85: 207–228.
- Cao J., Diao X.P., et Hu J.U. (2013). Hydrolysis and Photolysis of Herbicide Clomazone in Aqueous Solutions and Natural Water under Abiotic Conditions ». *Journal of Integrative Agriculture*. 12(11): 2074–2082.
- Castillo M.A, Felis N., Aragón P., Cuesta G. and Sabater C. (2006). Biodegradation of the Herbicide Diuron by Streptomycetes Isolated from Soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 58(3-4) : 196-202.
- Chakraborty R. and J.Coates. (2004). Anaerobic Degradation of Monoaromatic Hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 64: 437–446.

- Chakraborty, R. and J. Coates. (2005). « Hydroxylation and Carboxylation- Two Crucial Steps of Anaerobic Benzene Degradation by *Dechloromonas* Strain RCB ». *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5427–5432.
- Chaudhry G.R. and Chapalamadugu S. « Biodegradation of Halogenated Organic Compounds ». *Microbiological Reviews.* 55, n° 1 (1991): 59–79.
- Chen C., Y. Hseu, S. Liang, J.Kuo and S. Chen. (2008). Assessment of Genotoxicity of Methyl-Tert-Butyl Ether, Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene to Human Lymphocytes Using Comet Assay. *J. Hazard. Mater.* 153: 351–356.
- Chen C.I. et Taylor R.T. (1997). Batch and Fed-Batch Bioreactor Cultivations of a Species with Thermophilic BTEX-Degrading Activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:726–733.
- Chen S., Lai K., Li Y., Hu M., Zhang Y., et Zeng Y. « Biodegradation of Deltamethrin and Its Hydrolysis Product 3-Phenoxybenzaldehyde by a Newly Isolated *Streptomyces Aureus* Strain HP-S-01 ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, n° 4 (2011): 1471–1483.
- Chen S., Luo J., Hu M., Lai K., Geng P., et Huang H. « Enhancement of Cypermethrin Degradation by a Coculture of *Bacillus Cereus* ZH-3 and *Streptomyces Aureus* HP-S-01 ». *Bioresour Technol* 110 (2012): 97–104.
- Cherin P., Voronska E., Fraoucene N., et De Jaeger C. « Exposition chronique aux pesticides, santé et longévité. Rôle de notre alimentation ». *Médecine & Longévité* 4, n° 2 (2012): 68–74.
- Choi E., H. Jin, S. Lee, R. Math, E. Madsen and C. Jeon. (2013). Comparative genomic analysis and benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, et and m- xylene (BTEX) degradation pathways of *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Appl Environ Microbiol* 79: 663–671.
- Christian M., Véronique C. et Paul G. « Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques l'intérêt des champignons filamenteux ». *Les traitements actuels.* 28(1996) : 52.
- Crawford D.L., J.M. Lynch, J.M. Whipps, et M.A. Ousley. (1993). Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a Fungal Root Pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59:3899–3905.
- Cross T., Williams S.T. “*Actinomycetes*”. In: *Methods in Microbiology*. Édité par C. Booth. Vol. 4. London: Academic Press, 1971.

D

- Dan Qan, Yongsheng Zhao, Jiaqiang Sun, Hejun Ren, et Rui Zhou. « BTEX Biodegradation and Its Nitrogen Removal Potential by a Newly Isolated *Pseudomonas Thivervalensis* MAH1 ». n°1, 61(2015): 699. 2015.
- Das, N. and P.Chandran. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int.* 2011: 941810.
- Daugulis A.J and Littlejohns J.V. (2008). Response of a solid–liquid two-phase partitioning bioreactor to transient BTEX loadings. *Chemosphere* 9(73): 1453–1460.
- Day, M., Reinke R. and J. Thomson. (2001). Fate and Transport of Fuel Components below Slightly Leaking Underground Storage Tanks. *Environ. Forensics.* 2, 21-28.
- De Cormis L., « Qualité de l'environnement, pesticides et pratiques agricoles. Enjeux et contradiction des procédures de contrôle ». *Etud. Rech. Sys. Agraires. Dév.* 28 (1994): 65–7.
- De Mot René et De Schrijver A. (1999). Degradation of Pesticides by Actinomycetes. 25(2): 85-119.

- Dean J.A. Lange's *Handbook of Chemistry, Thirteenth Edition*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1985.
- Décret 2006-623 du 29 mai 2006 relatif à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certains vernis et peintures et dans les produits de retouche de véhicules. Journal Officiel n° 124 du 30/05/2006 texte numéro 62.
- Décret exécutif n°06-138 du 15 avril 2006 réglementant l'émission dans l'atmosphère de gaz, fumées, vapeurs, particules liquides ou solides, ainsi que les conditions dans lesquelles s'exerce leur contrôle,. Journal Officiel de la république algérienne n° 24 du 16/04/2006.
- Décret exécutif n°06-198 du 31 mai 2006 définissant la réglementation applicable aux établissements classés pour la protection de l'environnement. Journal Officiel de la république algérienne N° 37 du 04/06/2006.
- Deeb R.A. and Alvarez-Cohen L. (2000). Aerobic Biotransformation of Gasoline Aromatics in Multi-Component Mixtures. *Bioremediation*. 4 (2): 171–179.
- Delphin J.E and Chapot J.Y. (2006). Leaching of Atrazine, Metolachlor and Diuron in the Field in Relation to Their Injection Depth into a Silt Loam Soil. *Chemosphere*. 64 (11): 1862–1869.
- Dharmaraj S., Ashokkumar B. and Dhevendaran K. (2009). Fermentative Production of Carotenoids from Marine Actinomycetes ». *Iranian Journal of Microbiology* 1(4).
- Di Domenico B. (1999). Novel Antifungal Drugs. *Curr. Opin. Microbial*. 2: 509-519.
- Directive 1999/13/CE du conseil du 11 mars 1999 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations ». *Journal Officiel des Communautés Européennes*. N° L85.
- Directive NEC (National Emission Ceilings) n° 2001/81/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 », 2001.
- Djokic L., narancic T, Nikodinovic-runic J., Savic M., et Vasiljevic B. « Isolation and Characterization of Four Novel Gram-Positive Bacteria Associated with the Rhizosphere of Two Endemorelict Plants Capable of Degrading a Broad Range of Aromatic Substrates ». *Microb. Biotechnol*. 91, n° 4 (2011): 1227–38.
- Duke Stephen O. « Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and Susceptible Crops and Weeds ». *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59, n° 5835 (2010): 5841.
- Duraipandiyar V., Sasi A.H., Islam V.I.H., Valanarasu M. et Ignacimuthu S. « Antimicrobial Properties of Actinomycetes from the Soil of Himalaya ». *J. Myc. Med* : (2010): 15–20.
- Dusserre G., Cabridenc R. and Cloirec P. L. (1998). Chapitre 6 : écotoxicologie des COV. In : Les Composés Organiques Volatils (COV) dans l'environnement. Ed: L.T.E. DOC. pp 163-186.

E

- Edelvio de Barros G., Adriana U.S., Rita de Cássia Mendonça de Miranda., Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa. and Nei Pereira J.r. (2009). Biodegradation of Stored Jet Fuel by a *Nocardia* sp. Isolated from Contaminated Soil. *Biology and Technology*. 52(5):1279-1284.
- Edwards E., L. Willis, M.Reinhard and D. Grbic-Galic. (1992). Anaerobic Degradation of Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms under Sulfate-Reducing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol* 3: 794–800.
- EFSA, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azoxystrobin, EFSA J. 8(4) (2010):15-42. Available from: <http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision>.

- EFSA, Council directive 91/414/EEC, Azoxystrobin, Report and proposed decision of the United Kingdom made to the European Commission under commission regulation (2009) 737/2007. Available from: [http:// dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision](http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision).
- El-Naas Muftah H., Janice A. Acio, et Ayat E.El Telib. « Aerobic Biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects ». *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2 (2014): 1104–1122.
- EL-Nakeeb M.A. et Lechevalier H.A. « Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes ». *Appl Microbiol.* (1963):75–7.
- Emo C. and Roberto S. « Biodegradable Polymers and Plastics ». *Kluwer Academic/Plenum Publishers*. New York. 395P. 2003.
- Emtiazi G., M. Hassanshahian, et N. Golbang. (2005). Development of a Microtiter Plate Method for Determination of Phenol Utilization, Biofilm Formation and Respiratory Activity by Environmental Bacterial Isolates. *Int. Biodeter. Biodegr.* 56: 231–235.
- Esposito E., Paulillo S., et Manfio G. « Biodegradation of the Herbicide Diuron in Soil by Indigenous Actinomycetes ». *Chemosphere* 37, n° 3 (1998): 541–548.
- Eunice J.A. and Prosser J.I. « Mycelial Growth and Branching of *Streptomyces Coelicolor*. A3 (2) on Solid Medium ». *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983): 2029–2036.
- Ezra D., Castillo U.F. et Strobel G.A. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic *Monstera*. *Microbiol.* 150: 785-793.

F

- Fang H., Dong B., Yan H., et Tang F. and Yunlong Y. « Characterization of a Bacterial Strain Capable of Degrading DDT Congeners and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soil ». *Journal of Hazardous Material*. 184 : (2010): 1–3.
- FAO. *L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture*, 1986.
- Farhadian M., C. Vachelard, D. Duchez, et C. Larroche. (2008). *In Situ* Bioremediation of Monoaromatic Pollutants in Groundwater: A Review. *Bioresource Technology*. 99: 5296-308.
- Fellie E.A., P. Sannasi, K.K. Wong, S. Salmijah, et J. Kader. (2012). Tolerance and Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes (BTEX) by a Metal Acclimatized Bacterial Consortium Culture. *Res. J. Biotech.* 7: 52-58.
- Felsenstein J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39:783.
- Fenske R.A, Kedan G., Lu C., Fisker-Andersen J.A., and Curl C. (2002). Assessment of Organophosphorus Pesticide Exposures in the Diets of Preschool Children in Washington State ». *J. Exposure Analysis Environ. Epidemiol.* 12: 21–28.
- Ferraro D.J., L.Gakhar and S. Ramaswamy. (2005). Rieske Business: Structure–function of Rieske Non-Heme Oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:175.
- Fischer-Romero C., B.J. Tindall, et F. Juttner. (1996). *Tolomonas Auensis* Gen. Nov., sp. Nov., a Toluene-Producing Bacterium from Anoxic Sediments of a Freshwater Lake. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 183–188.
- Fishman, A., Y.Tao and T. Wood. (2004). Toluene 3-Monooxygenase of *Ralstonia Pickettiii* PKO1 Is a Para-Hydroxylating Enzyme. *J Bacteriol.* 186:3117–3123.
- Fiss E. et Brooks G.F, (1991). Use of a Siderophore Detection Medium, Ethylene Glycol Degradation and β -Galactosidase Activity in the Early Presumptive Differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and Rapidely Growing *Mycobacterium* Species. *J. Clin. Microbiol* 29: 1533–1535.

- Forman S., Novák J., Tykva R., Kás J., Wimmer Z., et Ruml T. *Evaluation of Toxicity of Pesticides and Their Biodegradation Products Using Human Cells. Chemosphere. Vol. 46, 2002.*
- Fulthorpe R., et A.N.Rhodes and J. M. Tiedje. « Pristine soils mineralize 3 chlorobenzoate and 2,4-dichlorophenoxyacetate via different microbial populations ». *Applied and Environmental Microbiology. Apr. 62, n° 4 (1996): 1159–1166.*
- Fulthorpe R.R., Allen D.G., Liss S.N. Characterization of Bacteria Isolated from a Bleached Kraft Pulp Mill Wastewater Treatment System. *Can. J. Microbiol* 39(1993): 13–24.

G

- Galassi, S., M. Mingazzini, L. Vigano, D. Cesareo, et M. and. « Tosato 1988. Approaches to modelling toxic responses of aquatic organisms to aromatic hydrocarbons ». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16: 158–169.
- Garau V.L., A. Angioni, A.A.Del Real, M. Russo, et P. Cabras. « Disappearance of Azoxystrobin, Pyrimethanil, Cyprodinil, and Fludioxonil on Tomatoes in a Greenhouse ». *J. Agric. Food. Chem.* 50, n° 7(2002):1929-1932.
- Garcia-Peña I, Ortiz I, Hernandez S, Revah S. « Biofiltration of BTEX by the Fungus *Paecilomyces Variotii* ». *Int Biodeter Biodegr* 62 (2008): 442–447.
- Gaujous, D. « In : La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire. 2ème édition ». *Lavoisier. Paris.* (1995). 220 P.
- Gennaro, P.D., E. Rescalli, E. Galli, G. Sello, and G. Bestetti. « Characterization of *Rhodococcus Opacus* R7, a Strain Able to Degrade Naphthalene and o-Xylene Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil ». *Res. Microbiol.* 152 (2001): 641–651.
- Ghanavati, H., G. Emtiazi, et M. Hassanshahian. « Synergism Effects of Phenol Degrading Yeast and Ammonia Oxidizing Bacteria for Nitrification in Cokewastewater of Esfahan Steel Compagny ». *Waste Manage. Res* 26, n° 2 (2008): 203–208.
- Ghazali, F.M., R.N.Z. Abdul Rahman, A.B. Salleh, et M. Basri. *Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. Int Biodeterio Biodegrad.* 54 (2002):61-67.
- Gibson, D., B. Gschwendt, W.Yeh and V. Kobal. « Initial Reactions in the Oxidation of Ethylbenzene by *Pseudomonas Putida* ». *Biochemistry* 12 (1973): 1520–1528.
- Gibson, D.T.and V.Subramanian. « Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons ». Édité par D.T. Gibson, 181–252. New York, U.S.A: Marcel Dekker, Inc, 1984.
- Giesy, J.P., S. Dobson, et K.R. Solomon. « « Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide » ». *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 167 (2000): 35–120.
- Gilliom J.R., Barbash J. E., Crawford C. G., Hamilton P. A., Martin J. D., Nakagaki N., Nowell L. H., Scott J. C., Stackelberg P. E., et Thelin G.P. and Wolock D.M. « The Quality of Our Nation's ». *Waters Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water*, (2006) :121–172.
- Giroux, I. *La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec.* Québec: ministère de l'Environnement du Québec. (2004). 40 P.
- Golovleva, L.A., Maltseva, O.V. and Solyanikova, I.P. Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (Galli, E., Silver, S., Witholt, B.eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, 1992. pp. 231-238.
- Goodfellow M., Lacey J. and Todd C. « Numerical Classification of Thermophilic Streptomycetes ». *J Gen Microbiol.* 133 (1987): 3135–3149.

- Gril, J.J., V. Gouy, et N. Carluer. *Processus de transfert superficiel des produits phytosanitaires, de la parcelle au bassin versant. La Houille Blanche*. Vol. 5(1999) :76-80.
- Gu, Li-feng, J. Jian-dong, L. Xiao-hui, S.W. Ali, et L. and Shun-peng. « Biodegradation of Ethametsulfuron-Methyl by *Pseudomonas* Sp. SW4 Isolated from Contaminated Soil ». *Curr. Microbiol* 55 (2007): 420–426.
- Guerrero, R. and M. Berlanga. « Life's Unity and Flexibility: The Ecological Link ». *Int Microbiol*. 9 (2006): 225–235.
- Guha A., Kumari B. et Roy M.K. (1997). Possible Involvement of Plasmid in Degradation of Malathion and Chlorpyrifos by *Micrococcus* sp. ». *Folia Microbiol*. 42: 574–576.
- Gülensoy, N. and P. Alvarez. « Diversity and Correlation of Specific Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Capabilities ». *Biodegradation*. 10 (1999): 331–340.

H

- Hagedorn, C. « Influences of Soil Acidity on *Streptomyces* Populations Inhabiting Forest Soils ». *Appl Environ Microbiol* 32, n° 3 (1976): 368–75.
- Häggbloom M.M. Liisa J. Nohynek, and Mirja S. Salkinoja-Salonen. « Degradation and O-Methylation of Chlorinated Phenolic Compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* Strains. *Applied and environmental microbiology* ». n° 12, 54(1988):3043-3052.
- Hankin L., Zucker M. and Sands D. C. « Improved Solid Medium for the Detection and Enumeration of Pectolytic Bacteria ». *Appl. Microbiol* 22 (1971): 205–209.
- Hanne L. F., Kirk L. L., Appel S. M., Narayan A. D. and Bains K. K. (1993). Degradation and Induction Specificity in Actinomycetes That Degrade P-Nitrophenol. *Applied and Environmental Microbiology* 59(10): 3505–3508.
- Harayama, S. and M. Rekik. The meta cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes ». *Mol Gen Genet*. 221 (1990): 113–120.
- Harrad, S.J., Sewart A.P., Alcock R., Boumphrey R., Burnett V., Duarte-Davidson R., Halsall C., et al. (1994). *Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the British Environment: Sinks Sources and Temporal Trends. Environ. Pollution*. 85 131-146.
- Harris, C. « Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990's ». *Cancer. Res*. 51 (1991): 5023–5044.
- Hassan, H.A., A.A. ZainEldein, et N.M.H. Risk. « Cloning and Kinetic Properties of Catechol 2, 3-Dioxygenase from Novel Alkaliphilic BTEX-Degrading *Pseudomonas* Sp ». *HB01. Life Science Journal* 11, n° 2 (2014): 376–384.
- Hassen H.A., Aly A.A., et Ebeid M.E. « Cloning and Expression of Gene Encoding Meta-Cleavage Enzyme of BTEX Degradation Pathway from Haloalkaliphilic *Pseudomonas* Sp ». *HA10. Life Science Journal*. 5 (2014):403-411.
- He, Y.H., Shen D. S., Fang C. R., et Zhu Y. M. « Rapid Biodegradation of Metsulfuronmethyl by a Soil Fungus in Pure Cultures and Soil ». *World Journal of Microbiology*. 22, n° 10 (2006): 1195–1104.
- Hendrickx, B., W. Dejonghe, W. Boenne, M. Brennerova, M. Cernik, T. Lederer, M. Bucheli, et al., ed. L, Springael D, in Press. Dynamics of an Oligotrophic Community during Contact with a BTEX Contaminated Ground Water Plume: An *in Situ* Microcosm Study ». *Appl Environ Microbiol*.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, et E.M.H. Wellington. « Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S RNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients ». *Appl. Environ. Microbiol*. 63, n° 8 (1997): 3233–3241.

- Hilali L., Khattabi A., Assobhei O. et Gavini F. (2002). Isolement de micro-organismes d'origine marine antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev. Biol. Biotech* 2(2): 28–32.
- Hilali, L., A. Khattabi, N. Nssarlah, A. Malki, et C. Finance. « Isolement des nouvelles souches d'actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel Marocain ». *Rev Biol Biotech* 2 (2002): 49–53.
- Hocinat A. et Boudemagh A. Biodegradation of Commercial Ortiva Fungicide by Isolated Actinomycetes from the Activated Sludge. *Desalination and Water Treatment*. (2016): 1-7. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1022799>.
- Hogx, T., et L. Jaenicee. « Benzene Metabolism of *Moraxella* Species ». *Eur J Biochem*. 30 (1972): 369–375.
- Holliger, C., S.G.C. Heijman, W. Schumacher, R.Schwarzenbach and F. Vazquez. *Contaminated environments in the subsurface and bioremediation*, 1997.
- Holt, J.G., N.R. Kreig, P.H.A. Sneath, J. Staley, et S.T. Williams. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th. Ed) (Wilkins, W). USA, 1994.
- Hong K., Gao A.H., Xie A.Y., Gao H., Zhuang L., Lin H.P., Yu H.P., Li J., Yao X.S., Goodfellow M. et Ruan J.S. « Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China ». *Mar. Drugs*. 7: (2009): 24–44.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, F. Chaterk, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, et H. Schrepf. *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. Norwich: United Kingdom: John Inne Foundation, 1985.
- Horn, J., S.Harayama and K. Timmis. « DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) xylGFJ genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism ». *Mol Microbiol* 5 (1991): 2459–2474.
- Hotam Singh C., Bhavana S., Anju Rawat S. et Saurabh S. « Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production ». *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. n° 8 Suppl 1, 3(2013): 83-94.
- Howard, P.H. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. New York: Lewis Publishers, 1990.
- Huang X., He J., Sun J.Q., Pan J.J., Sun X.F., and Li S.P. « Isolation and Characterization of a Methylsulfonyl-Methyl Degrading Bacterium *Methylopila* sp. S113». *Int Biodeter Biodegr*. 60 (2007): 152–158.
- Hutchinson, T.C., J. Hellebust, D. Tam, D. Mackay, R. Mascarenhas, et W. Shiu. « The Correlation of the Toxicity to Algae of Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons with Their Physical-Chemical Properties ». *Environ. Science Pollut. Res* 16 (1980): 577–586.

I

- Ijaha, U.J.J., et S.P. Antaib. « Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period ». *Int Biodeterio Biodegrad*. 51(2002): 93-99.
- Isenring, R. *Les Pesticides et La Perte de La Biodiversité. Pesticide Action Network Europe*. 2010.

J

- Jahn M.K., S.B. Haderlein, et R.U. Meckenstock. « Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene in sediment-free iron-reducing enrichment cultures ». *Appl Environ Microbiol*. 71 (2005): 3355–3358.
- Jayabarath J., Musfira S., Giridhar A., Sundar R., Shyam S., R Arulmurugan. «Biodegradation of Carbofuran pesticide by saline soil actinomycetes ». *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. (2010):187-192.

- Jenkins D., M.G. Richard and G.T. Daigger. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems*. 3rd Edition. New York. Lewis publishers, 236 P. 2003.
- Jerome P.J., James T.S., et Stephen Lory. « *Microbiologie, Cours et questions de révision* ». Ed: Dunod. paris, 2004.
- Jin H.M., E.J. Choi, et C.O Jeon. « Isolation of a BTEX-Degrading Bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a Sea-Tidal Flat and Optimization of Biodegradation Conditions ». *Bioresource Technol.* 14 (2013): 57–64.
- Jing Liang X., Jian H., Zhi Chun W., Kun W., Wen Jun L., Shu Kun T., et and Shun Peng L. « *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazimdegrading bacterium ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 (2007): 2754–2757.
- Jirasripongpun K. « The Characterization of Oil-Degrading Microorganisms from Lubricating Oil Contaminated (Scale) Soil ». *Applied Microbiology* 35, n° 4 (2002): 296–300.
- Jo, M.S., Rene E.R., Kim S.H. et Park H.S. « An Analysis of Synergistic and Antagonistic Behavior during BTEX Removal in Batch System Using Response Surface Methodology ». *J Hazard Mater.* 152 (2008): 1276–84.
- Jo, W. and K.Song. « Exposure to VOCs for Individuals with Occupations Associated with Potential Exposure to Motor Vehicle Exhaust and/or Gasoline Vapor Emissions ». *Sci. Total Environ.* 269 (2001): 25–37.
- Johonston, D.W. et T. Cross. « The Occurrence and Distribution of Actinomycetes in Lakes of the English Lake District ». *Freshwater Biol.* 6, n° 5 (1976): 457–463.
- Jørgensen, L.F., Kjær, J., Olsen, P. and Rosenbom A.E. Leaching of azoxystrobin and its degradation product R234886 from Danish agricultural field sites. *Chemosphere*. n°5, 88(2013), 554-562.
- Jung, I.G., et C.H. Park. « Characteristics of *Rhodococcus Pyridinovorans* PYJ-1 for the Biodegradation of Benzene, Toluene, m-Xylene (BTX), and Their Mixtures ». *J Biosci Bioeng.* 97 (2004): 429–431.
- Jyrki Kaukonen, Jukka K. Juselius, Valeria Tiranti, Aija Kyttälä, Massimo Zeviani, Giacomo P. Comi, Sirkka Keränen, Leena Peltonen, and Anu Suomalainen. 2000. Default parameters was used for multiple sequence alignment, and DNAMAN software (Lynnon Biosoft...default parameters was used for multiple sequence alignment, and DNAMAN software (Lynnon Biosoft) for graphical enhancement. *Science* 782-785.
- Jüttner, F. and J. Henatsch. « Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene ». *Nature*. 323 (1986): 797–798.

K

- Ka J.O., Holben W.E. and Tiedje J.M.. « Genetic and Phenotypic Diversity of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degrading Bacteria Isolated from 2,4-d-Treated Field Soils ». *Applied Environmental Microbiology*. 60, n° 4 (1994): 1106–1115.
- Kalakoutskii L.V. and Agre N.S. Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes ». *Bacteriol. Rev* n° 2, 40(1976):469–524.
- Kamagata, Y., R.R. Fulthorpe, K. Tamura, H. Takami, L.J. Forney et J.M. Tiedje, « Pristine Environments Harbor a New Group of Oligotrophic 2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology*. 63, n° 6 (1997): 2266–2272.
- Kampfer, P. « Detection and Cultivation of Filamentous Bacteria from Activated Sludge ». *Fems. Microbiol. Ecol.* 23 (1997): 169–181.
- Kao, C. and Wang, C. « Control of BTEX Migration by Intrinsic Bioremediation at a Gasoline Spill Site ». *Water Res* 34 (2000): 3413–3423.

- Kao, C., W. Huang, L. Chang, T. Chen, et H.Chien and F. Hou. Application of monitored natural attenuation to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site ». *Water Sci. Technol.* 53 (2006): 321–328.
- Kato, C., A. Inoue, et K. Horikoshi. « Isolating and characterizing deep sea marine microorganisms ». *Trends Biotechnol.* 14 (1996): 6–12.
- Kavya M. Deepthi, M. Solomon Sudhakar and M. Nagalakshmi Devamma. « Isolation and screening of streptomycetes sp. From coringa mangrove soils for enzyme production and antimicrobial activity ». *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences.* n° 2, 1(2012):110-116.
- Kesraoui-Abdessalem A. Dégradation des pesticides chlortoluron, carbofurane et bentazone en milieux aqueux par les procédés d'oxydation avancée. Thèse de doctorat : Géomatériaux : Universités Paris-Est et Tunis El Manar. (2008). p. 169.
- Kieser, T., M. Bibb, K. Chater, et D. Hopwood. *Practical Streptomyces Genetics (The John Innes Foundation.* United Kingdom, Norwich, 2000.
- Kim D., Kim Y.S., Kim S.K., Kim S.W., Zylstra G.J., Kim Y.M. and Kim E. (2002). Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3270–3278.
- Kim, D., Y.S. Kim, S.K. Kim, S.W. Kim, G.J. Zylstra, Y.M. Kim et E. Kim. « Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17 ». *Appl Environ Microbiol* 68 (2002): 3270–3278.
- Kim, J.M., N.T. Le, B.S. Chung, J.H. Park, J.W. Bae, et E.L. Madsen. « Influence of Soil Components on the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Pseudoxanthomonas Spadix* BD-A59 ». *Appl. Environ. Microb.* 74 (2008): 7313–7320.
- Kim, S.B., C.H. Park, D.J. Kim, et W.A. Jury. « Kinetics of benzene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*: parameter estimation ». *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003): 1038–1045.
- Kimura N. et Urushigawa Y. « Metabolism of Dibenzo-p-Dioxin and Chlorinated Dibenzo-p-Dioxin by a Gram-Positive Bacterium, *Rhodococcus Opacus* SAO 101 ». *J. Biosci. Bioeng.* 92 (2001): 138–143.
- Kimura, M. « A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences ». *J Molec Evol.* 16 (1980): 111–120.
- Klöpffer, W. « Environmental hazard assessment of chemicals and products. Part V. Anthropogenic chemicals in sewage sludge ». *Chemosphere.* 33 (1996):1067-1081.
- Kniemeyer, O., T. Fischer, H. Wilkes, F.Glöckner and F. Widdel. « Anaerobic Degradation of Ethylbenzene by a New Type of Marine Sulfate-Reducing Bacterium ». *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003): 2760–76.
- Koma, D., F. Hasumi, E. Yamamoto, T. Ohta, S.Y. Chung, et M. Kubo. « Biodegradation of Long Chain N-Paraffins from Waste Oil of Car Engine by *Acinetobacter* sp. ». *J Biosci Bioengin.* 91 (2001): 94–96.
- Konig, C., D. Eulberg, J. Groning, S. Lakner, V. Seibert, S.R. Kaschabek, et M. Schlomann. « A Linear Megaplasmid, P1CP, Carrying the Genes for Chlorocatechol Catabolism of *Rhodococcus Opacus* 1CP ». *Microbiology.* 150 (2004): 3075–3087.
- Kördel W, Klöppel H. and. « Pesticide volatilization and exposure of terrestrial ecosystems ». *Chemosphere.* 35, n° 6 (1997): 1271–1289.
- Krieger, C. « Initial Reactions in Anaerobic Oxidation of M-Xylene by the Denitrifying Bacterium *Azoarcus* sp. Strain T ». *J. Bacteriol.* 181 (1999): 6403–6410.
- Küster, E. et S. Williams. « Selection of Media for Isolation of Streptomyces ». *Nature.* 202 (1964): 928–929. <https://doi.org/doi: 10.1038/202928a0>.

L

- Lacey, J. « Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ* ». *Med* 4 (1997): 113–121.
- Lalancette, A. *Méthodes de lutte à la contamination des eaux de surface en Montérégie par les pesticides. Maître d'environnement: Environnement*. Université de Sherbrooke, 2012.
- Langenhove H.V. and Dewulf J.O. « Analysis of Volatile Organic Compounds Using Gas Chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 21 (2002): 9–10.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson, Paris.
- Larpent-Gourgand M, Larpent J.P. *Mémento Technique de Microbiologie*. 2^{ème} édition. Édité par Technique et documentation. Lavoisier, 1990.
- Lau, P., H. Bergeron, D. Labbé, Y. Wang, R. Brousseau and D. Gibson. « Sequence and Expression of the TodGIH Genes Involved in the Last Three Steps of Toluene Degradation by *Pseudomonas Putida* F1 ». *Gene*. 146 (1994): 7–13.
- Le Cloirec P., « Les composés organiques volatils dans l'environnement ». In *Éditions Tec & Doc*. 1998. 734 P.
- Le Cloirec, P. *Chapitre 1: Introduction*. In: *les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement*. Édité par L.T.E. DOC, 1998.
- Le Cloirec, P., et J.-L.Fanlo and J. R. Degorce-Dumas. *Chapitre 4: procédés de traitement des nuisances olfactives*. In: *Traitement des odeurs et désodorisation industrielle*. 1 128. Édité par Paris (France), 1991.
- Leahy, J.G., et R.R. Colwell. « Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment ». *Microbiol. Rev.* 5 (1990): 305–315.
- Lechevalier H. A. et Lechevalier M.P., « Biology of actinomycetes ». *Ann. Rev. Microbiol* 21 (1967): 71–100.
- Lechevalier H.A, Lechevalier M.P. « Chemical Composition as a Criterion in the Classification of Aerobic Actinomycetes ». *Inter.J. Sys.Bacteriol.* 20, n° 4 (1970): 435–443.
- Lechevalier H.A, Lechevalier M.P. « *Nocardia Amarae* sp. Nov. an Actinomycete Common in Foaming Activated Sludge ». *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24 (1994): 278–288.
- Lee J.Y. and Hwang B.K. « Diversity of Antifungal Actinomycetes in Various Vegetative Soils of Korea ». *Can. J. Microbiol.* 48 (2002): 407–417.
- Lee J.Y. and Hwang B.K. « Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea ». *Can. J. Microbiol.* 48 (2002): 407-417.
- Lee, Sung-Kuk, et Sun Bok Lee. « Substrate Utilization Patterns during BTEX Biodegradation by an O-Xylene-Degrading Bacterium *Ralstonia* sp. PHS1 ». *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, n° 6 (2002): 909–915.
- Lekchiri S., Moueqqit M. and Lekchiri A. « Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f.sp albedinis induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée ». *Congrès International de Biochimie*. Agadir, 2006.
- Leuthner, B., C. Leutwein, H. Schulz, P. Horth, W. Haehnel, E. Schiltz, H.Schägger and J. Heider. « Biochemical and Genetic Characterization of Benzylsuccinate Synthase from *Thauera Aromatica*: A New Glycyl Radical Enzyme Catalysing the First Step in Anaerobic Toluene Metabolism ». *Mol. Microbiol* 28 (1998): 615–628.
- Li, H., Y.H. Liu, N. Luo, X.Y. Zhang, T.G. Luan, J.M. Hu, Z.Y. Wang, P.C. Wu, M.J. Chen, et J.Q. Lu. « Biodegradation of Benzene and Its Derivatives by a Psychrotolerant and Moderately Haloalkaliphilic *Planococcus* sp strain ZD22 ». *Res. Microbiol.* 157 (2006): 629–636.
- Li, Hui, Qian Zhang, Xiao-Li Wang, Xing-Yuan Ma, Kuang-Fei Lin, Yong-Di Liu, Ji-Dong Gu, Shu-Guang Lu, et Lei Shi. Qiang Lu, Ting-Ting Shen. « Biodegradation of benzene

- homologues in contaminated sediment of the East China Sea». *Bioresource Technology*. 124 (2012): 129–36.
- Li, X. and Gao P. « Isolation and Partial Characterization of Cellulose-Degrading Strain of *Streptomyces* sp. LX from Soil ». *Letters in Applied Microbiology*. 22, n° 3 (1996): 209–213.
- Lin Chi-Wen, Cheng Ya-Wen et Tsai Shen-Long. (2007). Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas*. 42(8): 1211-1217.
- Lin Q., Chen S., Hu M., Haq M., Yang L., et Li H. « Biodegradation of Cypermethrin by a Newly Isolated Actinomycetes HU-S-01 from Wastewater Sludge ». *International Journal of Environmental Science and Technology*. 8, n° 1 (2011): 45–56.
- Lin T.C., Young C. C., Ho M. J., Yeh M. S, Chou C. L., Wei Y. H., et Chang J. S. (2005). Characterization of Floating Activity of Indigenous Diesel-Assimilating Bacterial Isolates. *J. Biosci. Bioengin.* 99: 466–472.
- Lin, C., C. Yen, H.Lin and D. Tran. « Response Surface Optimization of Dissolved Oxygen and Nitrogen Sources for the Biodegradation of MTBE and BTEX ». *Biodegradation*. 21 (2010): 393–401.
- Linos, A., M.M. Berekaa, A. Steinbüchel, K.K. Kim, C. Sproer, et R.M. Kroppenstedt. « *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete ». *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 : 1133–1139.
- Liou, J.S.C., C.M. DeRito, et E.L. Madsen. « Field-Based and Laboratory Stable Isotope Probing Surveys of the Identities of Both Aerobic and Anaerobic Benzene-Metabolizing Microorganisms in Freshwater Sediment ». *Environ Microbiol* 10 (2008): 1964–1977.
- Littlejohns and Daugulis. « Response of a Solid–liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor to Transient BTEX Loadings. » *Chemosphere*. 9, n° 73 (2008): 1453–1460.
- Liu D.H.F. and Liptak B.G. Environmental Engineers' handbook, 2nd Ed. P. Lewis, Boca Ranton, USA. (1995). pp 629–636.
- Liu, Y., X. Quan, Y. Sun, J. Chen, et D. Xue J. S. Chung « Simultaneous Removal of Ethyl Acetate and Toluene in Streams Using Compost - Based Biofilters ». *J. of Hazardous Materials*. 95 (2002): 1–2.
- Locci R. and Sharples G.P. (1984). Morphology. In: the biology of actinomycetes. (Eds: Goodfellow M., Modarski M. and Williams S.T.). Ac. Press. London. pp 165-199.
- Losilla, B. Etude systématique de bactéries isolées à partir de sols d'origines diverses en vue de l'obtention et de l'identification de nouveaux antifongiques produits par les actinomycétales. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lion 1. France, 1988.
- Lovley, D., J. Coates, J.Woodward and E. Phillips. « Benzene Oxidation Coupled to Sulfate Reduction ». *Appl. Environ. Microbiol* 3 (1995): 953–958.
- Lu, S.J., H.Q. Wang, et Z.H. YAO. « Isolation and Characterization of Gasoline-Degrading Bacteria from Gas Station Leaking-Contaminated Soils ». *Environ Sci.* 18 (2006): 969–972.
- Lu, Si-jin et Y.A.O.Zhi-hua et Wang Hong-qi. « Isolation and Characterization of Gasoline-Degrading Bacteria from Gas Station Leaking-Contaminated Soils ». *Environmental Science* 18, n° 5 (2006): 969–972.
- Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J-E., et al. « Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques». *Chemosphere*. Vol. 73, 2008.
- Lyons, A.J., et T.G. Pridham. « *Streptomyces Torulosus* sp. n., an Unusual Knobby-Spored Taxon ». *Appl Microbiol* 22 (1971): 190–193.

M

- Ma, J.-P., Z. Wang, P. Lu, H. Wang, S. Waseem Ali, S.-P. Li and X. Huang. « Biodegradation of the Sulfonylurea Herbicide Chlorimuron-Ethyl by the strain *Pseudomonas* sp. ». *LW3. FEMS Microbiol. Lett.* 296 (2009): 203–209.
- Mackay, D.W.Y. and SHIU M.A. *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*. Vol. 1. Raton, Florida: Lewis Publishers, Boca, 1992.
- Macur E.R., J.T. Wheeler, M.D. Burr and W.P. Inskeep. (2007). Impact of Application on Soil Microbial Community Structure and on Populations Associated with 2,4-D Degradation. *Microbiological Research*. 162: 37–45.
- Maki, Miranda L., Michael Broere, et Kam Tin Leung. « And Wensheng Qin. Characterization of Some Efficient Cellulase-Producing Bacteria Isolated from Paper Mill Sludges and Organic Fertilizers ». *Int J Biochem Mol Biol.* 2 (2011): 146–154.
- Mallick K., Bharati K., Banerji A., Shakil N. A., et Sethunathan N. « Bacterial Degradation of Chlorpyrifos in Pure Cultures and in Soil ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62 (1999): 48–54.
- Manee, P., P. Prayad, S. Edward, A. Upatham, et T. Ladda. « Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic ». *Biodegradation* 9 (1998): 83–90.
- Margalith P.Z. *Pigment microbiology*. Ed. Shapman & Hall. London, (1992). pp 5-114.
- Margni M., Rossier D., Crettaz P. and Jolliet O. « Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems ». *Agriculture, Ecosystems & Environment*. n° 1 93(2002): 3–379.
- Mariat F. and Sebald M. Actinomycètes. *In: Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et Véron M. (Eds). 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949. (1990).
- Martin H., van A, Sytze K. and Dick B.J. *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London, 1998.
- Masiá, A., Campo, J., Vázquez-Roig, P., Blasco, C., and Picó, Y. « Screening of Currently Used Pesticides in Water, Sediments and Biota of the Guadalquivir River Basin (Spain) ». *J. Hazard. Mater.* 1 (2013): 95–104.
- Medina-Bellver, J., P. Marin, A. Delgado, A. Rodríguez-Sánchez, E. Reyes, J. Ramos and S. Marqués. « Evidence for in Situ Crude Oil Biodegradation after the Prestige Oil Spill ». *Environ. Microbiol.* 7(2005):773–779.
- Mehlman, M. « Dangerous and Cancer-Causing Properties of Products and Chemicals in the Oil Refining and Petrochemical Industry ». *Environ. Res* 59 (1992): 238–249.
- Meier-Kolthoff, J.P., M. Göker, C. Spröer, et H.-P. Klenk. « When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy ». *Arch Microbiol.* 195 (2013): 413–418.
- Mesbaiah, Fatma Zohra, Fatiha Mansour, Kamel Eddouaouda et Abdelmalek Badis. « Surfactant Effects on Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ». 57(2016):5995-6000.
- Mollier P. et Chabriat G. (2010). *Pour une agriculture compétitive plus économe en pesticides*. INRA magazine. 12-53 pp.
- Monard, C. *Biodégradation des herbicides en sols tempérés – Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol. Thèse de doctorat : Sciences de la Vie et de l'Environnement: Université de Rennes 1, 2008.*
- Moncheva, P., S. Tishkov, et N. Dimitrova. « Characteristics of Soil Actinomycetes From Antarctica ». 2002.
- Morlett-Chávez J.A., Ascacio-Martínez J.A, Rivas-Estilla A.M, Velázquez-Vadillo J.F, Haskins W, Barrera-Saldaña H.A, et Acuña-Askar K. « Kinetics of BTEX Biodegradation by a Microbial Consortium Acclimatized to Unleaded Gasoline and

- Bacterial Strains Isolated from It ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 64(2010) :581–587.
- Mougin, C., Chaplain, V., Gaillardon, P., Sohier, L., Mercier, R., Sigoillot, J-C., *et al.* « Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques : l'intérêt des champignons filamenteux ». *Courrier de l'Environnement de l'INRA*. 28 (1996). 49-56.
- Multigner, L. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, risques et santé*. n° 3. 4(2005) :197-94.
- Myadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J. et Hotta K. *Digital Atlas of Actinomycetes*. ([Http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas](http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas)). *The Society of Actinomycetes*. Tokyo, Japan, 2002.

N

- Nadjraoui, D. *Profil fourrager Algérie*, 2001. 30 P.
- Nagy I., Schoofs G., Compernelle F., Proost P., Vanderleyden J., et De mot R. « Degradation of the Thiocarbamate Herbicide EPTC (S-Ethyl Dipropylcarbamothioate) and Biosafening by *Rhodococcus* sp. Strain NI86/21 Involve an Inducible Cytochrome P-450 System and Aldehyde Dehydrogenase ». *Journal of Bacteriology*. n° 3, 177(1995): 676–687.
- Nand K and Rao D.V. « *Arthrobacter Mysorens* a New Species Excreting L-Glutamic ». 127(4): 324-31.
- Navarro, S., N. Vela, et G. Navarro. « Review. An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils ». *Spanish Journal of Agricultural Research*. n° 3, 5(2013): 357–375.
- Neff, J., K. Lee, et E.M. Deblois. « Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects ». In *Produced Water: Environmental Risks and Advances in Mitigation Technologies*, édité par K. Lee et J. Neff, 3–54. New York, NY: Springer Science, Business Media, LLC, 2011.
- Newman, L. and L. Wackett. « Purification and Characterization of Toluene 2-Monooxygenase from *Burkholderia Cepacia* G4 ». *Biochemistry* 34 (1995): 14066–14076.
- Nicholson C.A. and Fathepure B.Z. « Aerobic Biodegradation of Benzene and Toluene under Hypersaline Conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma ». *FEMS Microbiol Lett*. 245(2005) : 257–262
- Nodwell J.R. et Losick R. « Purification of an Extracellular Signalling Molecule Involved in Production of Aerial Mycelium by *Streptomyces Coelicolor* ». *J. Bacteriol*. 180, n° 5 (1998): 1334–1337.
- Nomura, N.S., et H.W. Hilton. « The Adsorption and Degradation of Glyphosate in Five Hawaiian Sugarcane Soils ». *Weed Sci*. n° 3, 23(1977): 229–234.
- Nooshin Khandan Dezfully and Janardhana Gottravalli Ramanayaka. « Isolation, Identification and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Streptomyces Flavogriseus*, Strain ACTK2 from Soil Sample of Kodagu, Karnataka State (India). Jundishapur ». *J Microbiol*. 8, n° 2 (2015): 15107.
- Novaka, J; Ruml, T; and Tykvva, R. Isolation of soil microbial strains for biodegradation of pesticides. Advanced Study Institute. Bioavail ability of organic xenobiotics in the environment. Practical con-sequences for bioremediation. Jesenik, Czech Republic. (1997):18-29.
- Ntzani, E., Chondrogiorgi M., Nritsos G., Evangelou E., et and Tzoulaki I. *Litterature Review on Epidemiological Studies Linking Exposure to Pesticides and Health Effects*. EFSA Support. Publ, 2013.

Nyysönen M., Kapanen A., Piskonen R., Lukkari T. and Itävaara M. Functional genes reveal the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following in situ biostimulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84(2009):169–182.

O

- O'Donnell G. Anthony. *Recognition of Novel Actinomycetes. Actinomycetes in Biotechnology*, 1988.
- Oestergaard, P.R., et C. Sjoeholm. «Use of acid-stable proteases in animal feed PCT ». *Int. Appl.* (2001): 49.
- Oh, Y., et R. Bartha. « Construction of a Bacterial Consortium for the Biofiltration of Benzene, Toluene and Xylene Emissions ». *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13 (1997): 627–632.
- Okami Y., Okasaki T., Kitahara T. et Umezawa H. « Studies on marine microorganisms ». *J. Antibiot.* 29 (1976): 15–20.
- Olsen, R., J.Kukor and B. Kaphammer. « A Novel Toluene-3-Monooxygenase Pathway Cloned from *Pseudomonas Pickettii* PKO1 ». *J Bacteriol.* 176 (1994): 3749–3756.
- Olson, E.H. *Actinomycetes Isolation Agar. In: Difco: Supplementary Literature, Difco Lab.* Detroit, MI, 1968.
- OMS, Organisation Mondiale de la santé. *L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique.* Genève, 1991.
- Omura S., (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Ed: Springer Verlag: New York. Inc. 281-303.
- Omura, S. *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms.* New York: Ed: Springer Verlag, 1992.
- Oskay M., Üsame Tamer A. et Azeri C. « Antibacterial Activity of Some Actinomycetes Isolated from Farming Soils of Turkey ». *Afr. J. Biotechnol.* n° 9, 3(2004): 441–446.
- Osman A.G., Kalinin A., Emtsev T. et Bikov K. (1999). Effect of new broad spectrum fungicide Amistar on soil microorganisms in field conditions, 1999.
- Osman G.A. (2006). Degradation of the fungicide azoxystrobin by soil microorganisms. *Journal of Agricultural Sciences* 14(1): 124–134.
- Otenio, M.H., M.T.L. da Silva, M.L.O. Marques, J.C. Roseiro et E.D. Bidoia. « Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852 ». *Braz. J. Microbiol.* 36 (2005): 258–261.

P

- Pamboukian, C.R.D., L.M. Guimarães, et M.C.R. Facciotti. « Applications of Image Analysis in the Characterization of *Streptomyces Olindensis* in Submerged Culture ». *Brazilian J. Microbiol.* 33 (2002): 17–21.
- Pelmont J.. *Biodégradations et métabolismes: les bactéries.* Sciences: Grenoble: Pp: 798, 2005.
- Peng, Xu, Wencheng Ma, Hongjun Han, et Shengyong Jia BaolinHou. « Characterization of Naphthalene Degradation by *Streptomyces* sp. QWE-5 Isolated from Active Sludge ». n°6, 70(2014): 1129–1134.
- Perfumo A., Smyth T.J.P., Marchant R., et Banat I.M. (2010). Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates ». Édité par Timmis Kenneth N. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* 47(7): 501-512.
- Perry J.J., et Staley J.T. et Lory S. *Microbiologie, cours et questions de révision.* Ed. Dunod. Paris, 2004.

- Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., et Huitron C. et Floress M.E. « *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., a Xylanolytic Microorganism Isolated from Soil ». *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003): 269–273.
- Phelps, C., Z. Zhang and L. Young. « Use of stable isotopes to identify benzoate as a metabolite of benzene degradation in a sulphidogenic consortium ». *Environ. Microbiol* 3 (2001): 600–603.
- Pimentel, D. « Amounts of Pesticides Reaching Target Pests: Environmental Impacts and Ethics ». *Journal of Agricultural and Environmental Ethics.* 8: (1995): 17–29.
- Pinedo, J., R. Ibanez, J.Lijzen and A. Irabien. « Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances ». *J. Environ. Manage.* 130 : (2013): 72–79.
- Pochon J., et Tardieux P. *Technique d'analyse en microbiologie du sol.* Saint-Mandé: Edition de la Tourtourelle, 1962.
- Porter J.N., Wilhe J.J.Tresner H.D. « Method for Preferential Isolation of Actinomycetes from Soils ». *Appl. Microbiol.* 8 (1960): 174–178.
- Prauser, H. *Nocardioform organisms: General characterisation and taxonomic relationships.* *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* Vol. 11, 1981.
- Pré P., Andrès Y., Gérente C., et Le Cloirec P. *Bioprocédés en traitement de l'air. Techniques de l'Ingénieur G I.* Vol. 780, 2004.
- Prenafeta-Boldú F.X., Vervoort J., J.T.C. Grotenhuis, et W.J. van Groenestijn (2002). Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2660–2665.
- Prescott H., Wiley J.M. Klein., Sherwood L. M., et Woolverton C. J. *Microbiologie.* 3rd Ed. De: Boeck, Bruxelles, 2010.
- Pridham T.G. and Gottlieb, D. « The Utilization of Carbon Compounds Bu Some Actinomycetales as an Acid for Determination ». *J. Bacteriol.* 56 (1948): 107–114.

R

- Radniecki, T.S., M.E. Dolan, et Semprini L. « Physiological and transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to toluene and benzene inhibition ». *Environ. Sci. Technol.* n° 42 (2008): 4093–4098.
- Rahul, A.K., C. Mathur, et Balomajumder. « Biological Treatment and Modeling Aspect of BTEX Abatement Process in a Biofilter ». *Bioresource Technol.* 142 (2013): 9–17.
- Reinhard, M., G. Hopkins, E.Steinle-Darling and C. LeBron. « *In Situ* Biotransformation of BTEX Compounds under Methanogenic Conditions. Ground Water Monitor ». *Rem.* 25 (2005): 50–59.
- Reponen, T.A., S.V. Gizenko, S.A. Grinshpun, K. Willeke, et E.C. Cole. « Characteristics of airborne actinomycete spores ». *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998): 3807-3812.
- Ridgway, H.F., J. Safarik, D. Phipps, P. Carl, et D. Clark. « Identification and Catabolic Activity of Well-Derived Gasoline-Degrading Bacteria from a Contaminated Aquifer ». *Appl Environ Microbiol.* n° 11, 56(1990): 3565–3575.
- Rifaat, H.M. « The Biodiversity of Actinomycetes in the River Nile Exhibiting Antifungal Activity ». *J. Mediterr. Ecol.* 4 (2003): 5–7.
- Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A.W., Hopwood D.A. et Van wezel G.P. « Feast or Famine: The Global Regulator DasR Links Nutrient Stress to Antibiotic Production by *Streptomyces* ». *EMBO Rep.* n° 7, 9(2008): 670–675.
- Rizk M., Abdel-Rahman T. et Metwally H. « Screening of Antagonistic Activity in Different *Streptomyces* Species against Some Pathogenic Microorganisms ». *J. Biol. Sci.* n° 8 7(2007): 1418–1423.

- Robledo-Ortíz, J.R., D.E. Ramírez-Arreola, A.A. Perez-Fonseca, C. Gomez, O. Gonzalez-Reynoso, Ramos-Quirarte et González-Núñez, R. « Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *Pseudomonas putida* F1 of postconsumer agave-fiber / polymer foamed composites ». *Int. Biodeterior. Biodegr.* 65 (2011): 539–46.
- Rodier J, B Legube, N Merlet, R Brunet. (2009). Dunod. L'analyse de l'eau-9^e éd.: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer.
- Roger P et Jacq V. « Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air ». Université de Provence AIX- Marseille. (2000) :1-90.
- Rong, X., et Y. Huang. « Taxonomic Evaluation of the *Streptomyces Griseus* Clade Using Multilocus Sequence Analysis and DNA-DNA Hybridization, with Proposal to Combine 29 Species and Three Subspecies as 11 Genomic Species ». *Int J Syst Evol Microbiol.* 60 (2010): 696–703.
- Ryan, M., J. Pembroke and C. Adley. « *Ralstonia Pickettii* in Environmental Biotechnology: Potential and Applications ». *J Appl Microbiol.* 103 (2007): 754–764.

S

- Sahlström, L., De Jong B. and Aspan, A. « *Salmonella* Isolated in Sewage Sludge Traced Back to Human Cases of Salmonellosis ». 43(2006): 46–52.
- Saini M.K., Phutela R.P., et Walia U.S. « Effect of straw management techniques and herbicides on soil microbes in wheat in rice-wheat system ». India: Abstract, 2013.
- Saitou N. and Nei M. « The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees ». *Molec Biol Evol.* 4(1987):406–425.
- Sander, A.B., H.A. Weelink-Miriam, Van Eekert Alfons et J.M. Stams. « Degradation of BTEX by Anaerobic Bacteria: Physiology and Application ». *Rev Environ Sci Biotechnol.* 9 (2010): 359–385.
- Sanger, F., S. Nicklen, et A.R. Coulson. « DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors ». In *Proc Natl Acad Sci USA*. n° 12, 74(1977) :5463-7.
- Sanglier J.J. et Dumenil D. « Physiologie de la production des antibiotiques. In : Biotechnologie des antibiotiques ». *Ed. Masson. Paris*, 1989, 195–217.
- Sasikala C., Jiwal S., Rout P., et Ramya M. (2012). Biodegradation of Chlorpyrifos by Bacterial Consortium Isolated from Agriculture Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(3):1301–1308.
- Schäfer, J., U. Jäckel, et P. Kämpfer. « FEMS Microbiol Lett. Development of a New PCR Primer System for Selective Amplification Of Actinobacteria ». *Actinobacteria.* 311, n° 2 (2010): 103–12.
- Schiavon M., Perrin-Ganier C., et Portal J.M. « La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : état et origine ». *Agronomie* 15 (1995): 157–170.
- Schiavon, M. « Studies of the Movement and the Formation of Bound Residues of Atrazine, of Its Chlorinated Derivatives, and of Hydroxyatrazine in Soil Using ¹⁴C Ring-Labelled Compounds under Outdoor Conditions ». *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 15(1988): 55–61.
- Schocher, R., B. Seyfried, F.Vazquez and J. Zeyer. « Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria ». *Arch. Microbiol.* 157 (1991): 7–12.
- Schraa, G., B.M. Bethe, A.R.W. van Neerven, W.J.J. van den Tweel, E. van der Wende, and A.J.B. Zehnder. « Degradation of 1,2-Dimethylbenzene by *Corynebacterium* strain C125 ». *Antonie Leeuwenhoek.* 53 (1987): 159–170.
- Schrempf, H. *The Family Streptomycetaceae. Part II: Molecular Biology. In The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria.* Édité par M. Dworkin et S. Falkow. 3rd edn. Vol. 3. New York: Springer, 2006.

- Schuppler M., Wagner M., Schan G. and Göbel U.B. « *In Situ* Identification of Nocardioform Actinomycetes in Activated Sludge Using Fluorescent rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes ». *Microbiology*. 144 (1998): 249–259.
- Schuppler M., Wasner M., Schön G., Göbel U.B. « *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA targeted oligonucleotide probes ». *Microbiology*. 144(1998): 249-259.
- Seiler, H., R. Braatz, et Ohmayer G. « Numerical Cluster Analysis of the Coryneform Bacteria from Activated Sludge ». *Zentbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, I Abt. Originalien*, 1980, 357–375.
- Senesi, N. « Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter: molecular and mechanistic aspects ». *NATO ASI Series*. 32 (1993): 47–74.
- Seviour E.M., Williams C.J., Seviour R.J., Soddell J.A. et Lindrea K.C. « A Survey of Filamentous Bacterial Populations from Foaming Activated Plants in Eastern States Of Australia ». *Water Res.* 24(1990): 493–498.
- Seviour J.R., Mino T. and Onuki M. « The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. Fems ». *Microbiol. Rev.* 27 (2003): 99–127.
- Shelton R.D., Khader S., Karns J. S., et Pogell B.M. « Metabolism of Twelve Herbicides by *Streptomyces* ». *Biodegradation*. 7(1996):129–136.
- Shen, Y. « *In Vitro* Cytotoxicity of BTEX Metabolites in Hela Cells ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34 (1998): 229–234.
- Sheneurt, L. *Transformation and Degradation of Pesticides in Soil. In : Chemistry of Plant Protection. Terrestrial Behavior of Pesticides*. Édité par W. Ebing, 1992.
- Shields, M., M. Reagin, R. Gerger, R. Campbell and C. Somerville. « TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4 ». *Appl Environ Microbiol.* 61 (1995): 1352–1356.
- Shim, H. et S.T. Yang. « Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor ». *J. Biotechnol.* 7(1999): 99–112.
- Shirling, E.B., et D. Gottlieb. « Methods for Characterization of *Streptomyces* Species ». *Int J Syst Bacteriol.* 16 (1966) : 313–340. <https://doi.org/doi: 10.1099/00207713-16-3-313>.
- Silini, S., H. Ali-Khodja, A. Boudemagh, A. Terrouche, et M. Bouziane. « Isolation and Preliminary Identification of Actinomycetes Isolated from a Wastewater Treatment Plant and Capable of Growing on Methyl Ethyl Ketone as a Sole Source of Carbon And ». *Energy* 57, n° 26 (2016): 12108–12117.
- Singh K.B., Walker A., Morgan J.A. W. et Wright D.J. « Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* Strain B-14 and Its Use in the Bioremediation of Contaminated Soils ». *Appl Environ Microbiol* 70 (2006): 4855–4863.
- Singh LS., Sharma H., et Talukdar N.C. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiology*. 14 (2014):278-290.
- Singh, R. et S. Mary Celin. « Biodegradation of BTEX (Benzene, Toluene, Ethyl Benzene and Xylene) Compounds by Bacterial Strain under Aerobic Conditions ». *J. Ecobiotechnol.* 2, n° 4 (2010): 27–32.
- Smets, B and P. Pritchard « Elucidating the Microbial Component of Natural Attenuation ». *Curr Opin Biotechnol* 14(2003): 283–288.
- Sondhia, S., U. Waseem, et R.K. Varma. « Fungal Degradation of an Acetolactate Synthase (ALS) Inhibitor Pyrazosulfuron-Ethyl in Soil ». *Chemosphere*, 2013.
- Sotsky, J., Greer C. and Atlas, R. « Frequency of Genes in Aromatic and Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation Pathways within Bacterial-Populations from Alaskan Sediments ». *Can J Microbiol.* 40 (1994): 981–985.

- Soulas, G. « La dégradation dans le sol aspects microbien et cinétiques ». *Science du sol* 2(1985): 43–57.
- Souza, A.P., F.A. Ferreira, A.A. Silva, A.A. Cardoso, et H.A. Ruiz. « Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr ». *Planta Daninha* 17, n° 3 (1999): 387–398.
- Stackebrandt, E. et B.M. Goebel. « Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology ». *Int J Syst Evol Microbiol* 44 (1994): 846–849.
- Staneck, J.L., et G.D. Roberts. « Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography ». n° 2, 28(1974):226-31.
- Stapleton, R.D., et G.S. Saylor. « Changes in subsurface catabolic gene frequencies during natural attenuation of petroleum hydrocarbons ». *Environ Sci Technol* 34 (2000): 1991-1999.
- Subhajib, R. « Production of Biosurfactant Using an Isolated Bacterial Strain of *Bacillus* sp. (M28) ». *J. Microbiol. Biotech. Res* 2 (2012): 402–415.
- Sublette, K., A. Peacock, D. White, G. Davis, D. Ogles, D. Cook, R. Kolhatkar, D. Beckmann and X. Yang. « Monitoring Subsurface Microbial Ecology in a Sulfate-Amended, Gasoline-Contaminated Aquifer. Ground Water Monitor ». *Rem* 26 (2006): 70–78.
- Surzhko, L.F., Finkelshtein ZI., B.P. Baskunov, M.I. Yankevich, L.A. Golovleva, et VI Yakovlev. « Utilization of Oil in Soil and Water by Microbial Cells ». 64(1995):330-334.
- Suzuki S.I. « Establishment and Use of Gellan Gun Media for Selective Isolation and Survey of Specific Rare Actinomycetes ». *Actinomy* 15, n° 2 (2001): 55–60.
- Syoko, K.N., S. Keiji, Yukie Y.I., T. Haruhisa, V. Kasthuri, Y. Satoshi, T. Hirki, et H. Shikeaki. « Construction of Bacterial Consortia That Degrade Arabian Light Crude Oil ». *J Ferment Bioengin.* 82 (1996): 570–574.

T

- Takizawa, M., Colwell, R.R., Hill R.T. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1993): 997-1002.
- Tamura, K., G. Stecher, et D. Peterson. « MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 ». *Mol Biol Evol* 30 (2013). [https://doi.org/2725–2729](https://doi.org/2725-2729). doi: doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Tan, H., H. Tang, C. Joannou, et N. Abdel-Wahab and J. Mason. « The *Pseudomonas putida* ML2 Plasmid-Encoded Genes for Benzene Dioxygenase Are Unusual in Codon Usage and Low in G+C Content ». *Gene.* 130 (1993): 33–39.
- Tanaka, Y. *Fermentation Processes in Screening for New Bioactive Substances. In: The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms.* Ed. Springer-Verlag. New York, 1992.
- Tatsinkou Fossi B., Tavea F et Ndjouenkeu R. (2005). Production and Partial Characterization of Thermostable Alpha Amylase from Ascomycete Yeast Strain Isolated from Starchy Soil. *Afr. J. Biotechnol.* 14–18.
- Taylor A W. et Spencer F. « Volatilization and vapor transport processes. In: Pesticides in the soil environment ». *Soil Science Society of America Book Series*, 1990, 213–269.
- Terkina I.A., Drukker V.V., Parfenova V.V. et Kostornova T.Y. « The Biodiversity of Actinomycetes in Lake Baikal ». *Microbiology* 71 (2002): 346–349.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K. et Bora T.C. (2007). Isolation and Screening of *Streptomyces* in Soil of Protected Forest Areas from the States of Assam and Tripura, India, for Antimicrobial Metabolites. *J. Myc. Med.* 17: 242–249.

Trejo-Estrada, Paszczynski, SR et Crawford A.D.L. « Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9 ». *J Ind Microbiol Biotechnol*. 21 (1998): 81–90. <https://doi.org/doi: 10.1038/sj.jim.2900549>.

U

U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2008. Toxic substances; toluene; response to the interagency testing committee

Ulrich, A., H. Beller and E. Edwards. « Metabolites Detected during Biodegradation of 13C6-Benzene in Nitrate Reducing and Methanogenic Enrichment Cultures ». *Environ. Sci. Technol* 39 (2005): 6681–6691.

United States Environmental Protection Agency, Pesticide Fact Sheet: Azoxystrobin, (1997). Available from: http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/az_oxystrobin.pdf.

V

Vallaey, T., L. Albino, G. Soulas, A.D.Wright and A.T. Weightman. « Isolation and characterisation of stable 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degrading bacterium, *Variovorax paradoxus*, using chemostat culture ». *Biotechnology letters* 20, n° 11 (1998): 1073–1076.

Van Der Werf H. and Zimmer C. « An Indicator of pesticide environmental impact based on a fuzzy expert system ». *Chemosphere*. 36, n° 10 (1998): 2225–2249.

Vandecasteele, J.P. Microbiologie pétrolière – concepts, implications environnementales, applications industrielles. Volume 1. Publications de l’institut français du pétrole, Paris, 2005. 412p.

Vandermesse, F. *Capacité d’une communauté microbienne mixte à dégrader la MEK en réacteur batch, en vue de l’optimisation d’un bioréacteur. Mémoire pour l’obtention du diplôme d’études en science naturelle appliquée. Option : Biotechnologie industrielle. Université catholique. de Louvain, 1996.*

Varma, R.J. et B.G. Gaikwad. « Rapid and High Biodegradation of Phenols Catalyzed by *Candida Tropicalis* NCIM 3556 Cells ». *Enzyme Microb Technol* 43 (2008): 431–435.

Veyssier, P. *Actinomycoses-Nocardioses. In : Encyclopédie médico-chirurgicale. Ed. Elsevier. Paris, 8123, 1979.*

W

Waksman S.A. *Distribution, Isolation and Methods of Study. In: The Actinomycetes- a Summary of Current Knowledge. The Ronald. New york: Press Company, 1967.*

Waksman S.A., et Henrici A.T. « The Nomenclature and Classification of the Actinomycete ». *J. Bacteriol* 46 (1943): 337–341.

Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. et Peakall Sibly, et D. B. *Principles of Ecotoxicology*. Raton, FL. 315p: Taylor & Francis Group, Boca, 2006.

Wang L., Qiao N., Sun F., et Shao Z. « Isolation, Gene Detection and Solvent Tolerance of Benzene, Toluene and Xylene Degrading Bacteria from Nearshore Surface Water and Pacific Ocean Sediment ». *Extremophile*. 12 (2008): 335–342.

Wang, L., N. Qiao, et F. Sun et Shao Z. « Isolation, Gene Detection and Solvent Tolerance of Benzene, Toluene and Xylene Degrading Bacteria from Nearshore Surface Water and Pacific Ocean Sediment ». *Extremophile*. 12(2008):335-342..

Wardle, D.A., et D. Parkinson. « Effects of Three Herbicides on Soil Microbial Biomass and Activity ». *Plant Soil*. 122 (1990): 21–28.

- Weast, R.C., et D.R. Lide. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, Boca. Raton, FL: CRC Press, Inc, 1989.
- Weber F.J., Hage K.C., et deBont J.A.M. (1995). Growth of the Fungus *Cladosporium Sphaerospermum* with Toluene as Sole Carbon and Energy Source. *Applied and Environmental Microbiology*.61: 3562–3566.
- Weber, W.J.J. et H.X. and Corseuil. « Inoculation of Contaminated Subsurface Soils with Enriched Indigenous Microbes to Enhance Bioremediation Rates ». *Water Res.* 28 (1994): 1407–1414.
- Weinberg, J. *Un guide pour les ONG sur les pesticides les plus dangereux et la SAICM. Global Outreach Campaign.* 62, 2006.
- Weiss, B., S.Almer and R.W. Almer. « Pesticides ». *Pediatrics* 113, n° 4 (2004): 1030–1036.
- Whited, G.and D.Gibson. « Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1 ». *J Bacteriol.* 173 (1991): 3017–3020.
- Widdel, F. et R. Rabus. « Anaerobic Biodegradation of Saturated and Aromatic Hydrocarbons ». *Curr Opin Biotechnol.* n° 3, 12 (2001): 259–76.
- Williams S.T, Goodfellow M. « Ecology of actinomycetes ». *Ann. Rev. Microbiol.* 37 (1983): 189–216.
- Williams S.T. et Davies F.L. « Use of Antibiotics for Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes in Soil ». *J. Gen. Microbiol* 38 (1965): 251–261.
- Williams S.T. Lanning S. and Wellington E.M.H. « Ecology of Actinomycetes ». In *The Biology of the Actinomycetes. Eds, édité par M. Goodfellow et M.Mordarski et S.T,* 481–528. Williams: Academic press, 1984.
- Williams S.T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D.I., Kuznetsov V.D., Le Monnier F.J., Long P.F., et al. « Detection and Identification of Novel Actinomycetes ». *Microbiol* 144 (1993): 653–656.
- Willoughby L.G., Susan M. Smith and Bradshaw R.M. « Actinomycete Virus in Fresh Water ». *Freshwater Biology* 2, n° 1 (1972): 19–26.
- Woo P.C.Y., Ngan A.H.Y., Lau S.K.P. et Yung K. « *Tsukamurella conjunctivis*: a novel clinical syndrome ». *J. Clin. Microbiol* 41, n° 7 (2003): 3368–3371.
- Worsey, M. and P.Williams. « Metabolism of Toluene and Xylenes by *Pseudomonas (Putida (Arvilla) Mt- 2*: Evidence for a New Function of the TOL Plasmid ». *J Bacteriol* 124 (1975): 7–13.
- WuHao, HuShiBin Q. « Isolation and Character of Cyhalothrin Degrading Strains ». *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology.* 5 (2009): 851–856.

X

- Xin, B., C. Wu, and C. Lin. « Bioaugmented Remediation of High Concentration BTEX-Contaminated Groundwater by Permeable Reactive Barrier with Immobilized Bead ». *J. Hazard. Mater.* 244–245(2013):765-772.
- Xiu, L., Zhenan H., Yanyan F., Sifeng Z. et Jun Y. « Isolation and Characteristics of Efficient Carbendazim Degradation Bacterium ». *Advances in Biomedical Engineering.* 1-2(2011): 344-388.
- Xiu-Li W., Yang K. and Wang Y.Z. « Properties of Starch Blends with Biodegradable Polymers ». *J. Macro Mol. Sci. Part C – Polymer Reviews.* n° 43, 3(2003): 385–409.
- Xu J.L., Gu X.Y, Shen B., Wang Z.C., Wang K., et Li S.P. « Isolation and Characterization of a Carbendazim-Degrading *Rhodococcus* sp. ». *Djl-6. Curr Microbiol.* 53 (2006): 72–76.

Y

- Yadav, J. and C. Reddy. « Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* ». *Appl. Environ. Microb.* 59 (1993): 756–762.

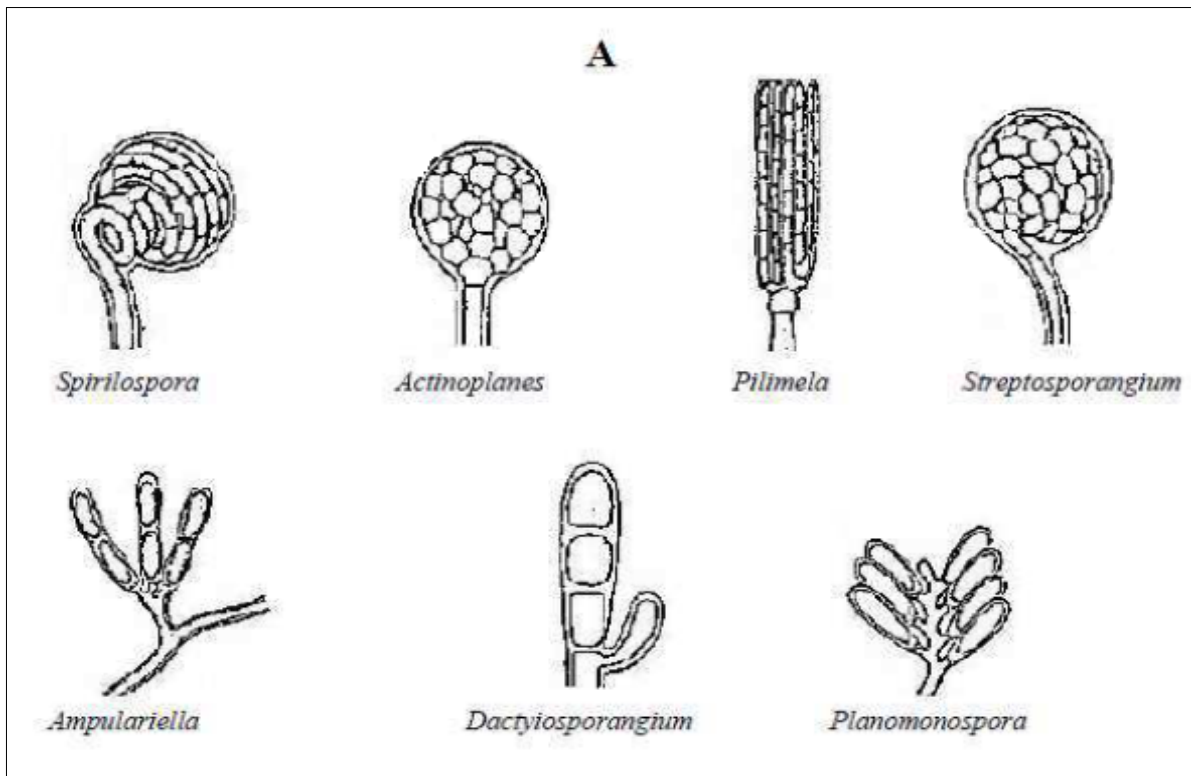
- Yang, X., D. Beckmann, S. Fiorenza and C. Niedermeier. « Field Study of Pulsed Air Sparging for Remediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil and Groundwater ». *Environ Sci Technol.* 39 (2005): 7279–7286.
- Yaron, B. « General principles of pesticide movement to groundwater ». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 26, n° 3–4 (1989): 275–297.
- Yen, K., M. Karl, L. Blatt, M. Simon, R. Winter, P. Fausset, H. Lu, et A. Harcourt and K. Chen. « Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase ». *J Bacteriol* 173 (1991): 5315–5327.
- Yoshida M., Matsubara K., Kudo T. and Horikoshi K. « *Actinopolyspora Mortivallis* sp. Nov., a Moderately Halophilic Actinomycete ». *Int. J. Syst. Bact.* (1991):15–20.
- You, Y., J. Shim, C.H. Cho, M.H. Ryu, P.J. Shea, S. Kamala-Kannan, J.C. Chae, et B.T. and Oh. « Biodegradation of BTEX Mixture by *Pseudomonas Putida* YNS1 Isolated from Oil-Contaminated Soil ». *J. Basic. Microb.* 53 (2013): 469–475.
- Yu, H., B.J. Kim, et B.E. Rittmann. « The Roles of Intermediates in Biodegradation of Benzene, Toluene, and p-Xylene by *Pseudomonas Putida* F1 ». *Biodegradation.* 12(2001):455-463.
- Yu, Y.L., X. Wang, Y.M. Luo, J.F. Yang, J.Q. Yu, et D.F. Fan. *Fungal Degradation of Metsulfuron-Methyl in Pure Cultures and Soil. Chemosphere.* Vol. 60(2005):460-466.

Z

- Zaitlin B., Watson S., Ridal J. Satchwill T. and Parkinson D. (2003). Actinomycetes in Lake Ontario: Habitats, Geosmin and MIB Production. *Res. J. Can.* 95(2): 113–118.
- Zanardini, E., M. Negri, G. Boschini, A. D'Agostina, A. Valle, A. Arnoldi, C. and Sorlini. *Biodegradation of Chlorsulfuron and Metsulfuron-Methyl by Aspergillus Niger. ScientificWorldJournal.* n° 2, 38(2002) :737-746.
- Zboniska E., Lejczak B., et Kafarski. (1994). « Organophosphonate Utilization by the Wild-Type Strain of *Pseudomonas Fluorescens* ». *Appl Environ Microbiol.* 58: 2993–29.
- Zhang G.S., Jia X.M., et Cheng T.F. « Isolation and Characterization of a New Carbendazim-Degrading *Ralstonia* sp. Strain world. *J Microbiol Biotechnol* 21 (2005): 265–269.
- Zhang, H., W. Mu, Z. Hou, X. Wu, W. Zhao, X. Zhang, H. Pan, and Zhang S. « Biodegradation of Nicosulfuron by the Bacterium *Serratia Marcescens* N80 ». *J. Environ. Sci. Health Part B.* 47(2012): 153–160.
- Zhang, L., C. Zhang, Z. Cheng, Y. Yao, and Chen J. « Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and o-Xylene by the Bacterium *Mycobacterium Cosmeticum* Byf-4 ». *Chemosphere.* 90 (2013): 1340–1347.
- Zheng L. C., Zhou Ji-Ti, Zhao Li Hong, Lu H., Qu B. C., et Wang Jianqi Zheng. « Isolation and Characterization of a Nitrobenzene Degrading *Streptomyces* Strain from Activated Sludge ». *Bull Environ Contam Toxicol* 78, n° 2 (2007) : 163–7.
- Zheng, Ling, Hai Jin Mou et Jing Li. « Determination and Microbial Degradation of Lambda-Cyhalothrin ». *Advanced Materials Research*, 343-344(2011): 430-437.
- Zhi, X.-Y. et W.-J. Li. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59 (2009): 589–608.
- Zilli M., Guarino C., Daffonchio D., Borin S. et Converti A. « Laboratory-Scale Experiments with a Powdered Compost Biofilter Treating Benzene-Polluted Air, Process ». *Biochemistry.* 40 (2005): 2035–43.
- Zilli, M.E. Palazzi, L. Sene, A. Converti et M.D. Borghi. « Toluene and styrene removal from air in biofilters. *Prosses Biochemistry* ». 2001 (4): 423-429.

ANNEXE 1

Les différentes structures de spores (A : Spores endogènes, B : spores exogènes) chez les actinomycètes (Larpent et Sanglier, 1989).



	B			
Monosporés				
	<i>Micromonospora</i>	<i>Thermomonospora</i>	<i>Saccharomonospora</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
Oligosporés				
	<i>Microbispora</i>	<i>Microtetraspora</i>	<i>Catellatospora</i>	
Polysporés				
	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptoverticillium</i>	<i>Streptoverticillium</i>	<i>Nocardioopsis</i>

ANNEXE 2**Milieux de culture****Milieu ISP2**

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
D-Glucose	4g
Eau distillée	1000 mL
Agar	20 g
+/- CaCO ₃	2 g

pH = 7,3**Milieu Olson**

Sodium caséinate.....	2 g
L-asparagine.....	0,1 g
Sodium propionate.....	4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Eau distillée.....	1000 mL
Agar.....	15 g

pH : 8,2**Milieu Amidon caséine**

Amidon soluble.....	10 g
Caséine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Eau distillée	1000 mL
Agar.....	20 g

pH : 7-7,5**Milieu minimum Vendermesse**

Na No ₃	13,76 g
KH ₂ PO ₄	1,78 g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O.....	4,66 g
Na ₂ SO ₄	9,88 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O.....	0,8 g
EDTA.....	10 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	5 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O.....	1,22 mg

Zn SO ₄ 1H ₂ O.....	0,25 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O.....	0,2 mg
CaCl ₂ 2 H ₂ O.....	1 mg

pH : 7,2**Milieu ISP 5**

Glycérol.....	10 g
L-Asparagine.....	1 g
Solution d'oligo-éléments.....	1 mL
Eau distillée.....	1000 mL
Agar.....	20 g

pH : 7,2**Milieu Bennett**

Glucose.....	10 g
Extrait de levure.....	1 g
NZ amine (caséine digest).....	2 g
Extrait de viande de bœuf.....	1 g
Eau distillée.....	1000 mL
Agar.....	20 g

pH : 7,3**Milieu ISP9**

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O.....	5,65 g
MgSO ₄ 2H ₂ O.....	1 g
Solution saline.....	1 mL
Eau distillée.....	1000 mL
Agar.....	20 g

pH : 6,8-7**Milieu Pectine Agar**

Pectine.....	5 g
Extrait de levure.....	5 g
Eau distillée.....	1000 mL
Agar.....	20 g

pH : 7

Milieu Sierra

Peptones.....10 g
Tween 80.....10 mL
NaCl.....5 g
CaCl₂-H₂O.....0,1 g
Eau distillée.....1000 mL
Agar.....18 g

pH : 7,4

Gélose nutritive

Peptone.....10 g
Extrait de levure.....5 g
NaCl.....5 g
Agar.....20 g
Eau distillée.....1000 mL

pH : 7,2

Milieu Difco Columbia blood agar

Pancreatic Digest of Casein.....10 g
Proteose peptone.....5 g
Yeast extract.....3.5 g
Beef heart.....3 g
Corn starch.....1 g
Sodium chloride.....5 g
Agar.....15 g

pH : 7.3 ± 0.2

ANNEXE 3**Préparation des solutions****TBE 10X (Tampon de migration)**

Dans 800 mL d'eau dissoudre : 108 g de Tris base + 27,5 g d'acide borique + 10 mL d'EDTA 0,5 M, compléter le volume à 1000 mL et ajuster le pH à 8.

(1X= 100 mL du 10 X + 900 mL de l'eau déminéralisée)

Solution Gram iodine

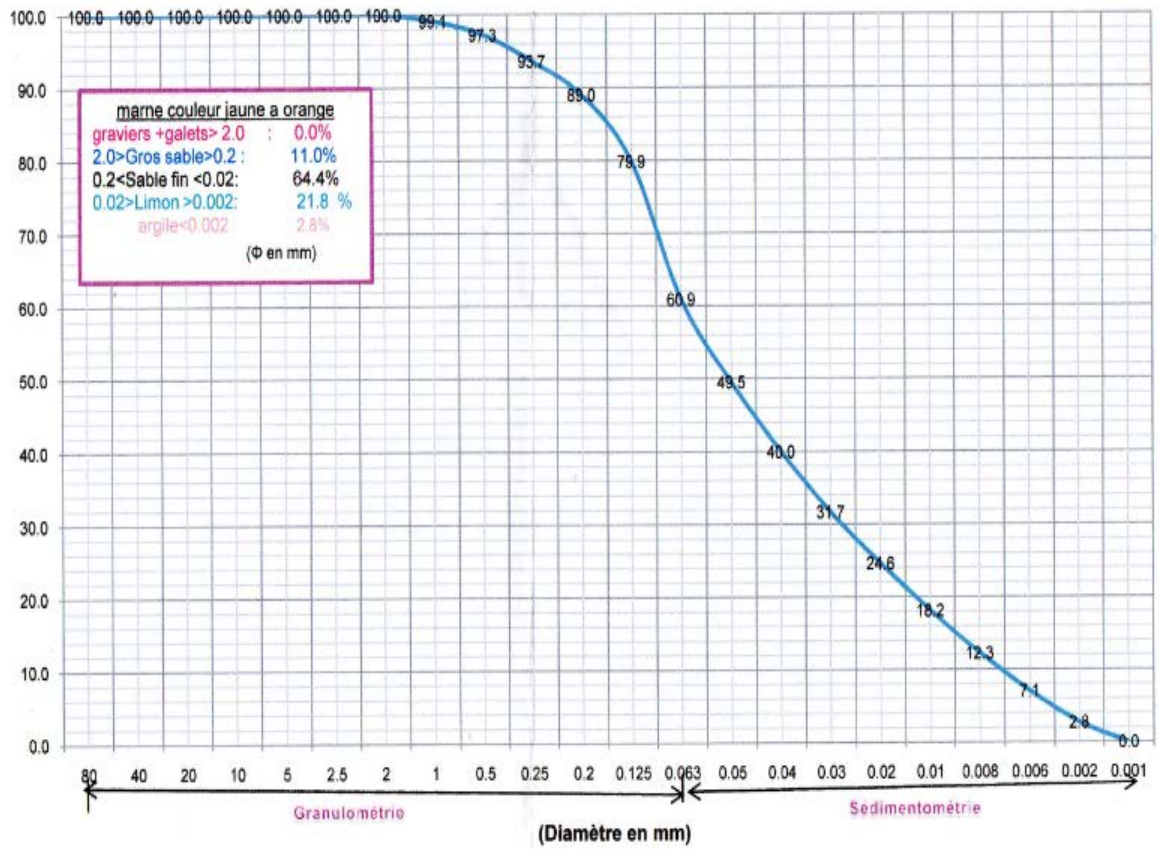
Iodine.....1 g
Potassium iodide.....2 g
Distilled water.....300 mL

Solution d'oligo-éléments

FeSO₄ 7H₂O.....0,1 g
MnCl₂ 4H₂O0,1 g
ZnSO₄ 7H₂O.....0,1 g
Eau distillée.....100 mL

Solution saline

CuSO₄ 5H₂O.....0,64 g
FeSO₄ 7H₂O.....0,11 g
MnCl₂ 4H₂O.....0,79 g
ZnSO₄ 7H₂O.....0,15 g
Eau distillée.....100 mL

ANNEXE 4**Analyse granulométrique (norme : A.S.T.M D422-63)**

ANNEXE 5**Table 12.** Résultats des tests de la biodégradation des herbicides.

	Roundup	Glyphosate	Zoom	Mamba	Traxos	Axial	Herbasate
SA1	+	-	+	+	+/-	+/-	+
SA3	+	+	+	+	+/-	+/-	+
SA4	+	-	+	+	+/-	+/-	+
SA5	+	+	+	+	+	+	+
SA6	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+
SA9	+	-	+	+	+	+/-	+
SA10	+	+	-	-	-	+/-	-
SA11	-	-	+	-	-	-	+
SA12	-	+	-	+	-	-	-
SA13	-	-	+	+	+	-	+
SA16	-	-	+	+	+	+/-	+/-
SA17	-	-	+	+	+	+/-	+
SA18	+	-	+/-	+	-	-	+
SA19	+	-	-	+	-	+/-	+/-
SA20	-	-	+/-	+	-	-	-
SA21	+	-	+	-	-	+/-	-
SA22	+/-	+	+/-	+	-	-	+/-
SA23	-	-	+/-	-	+	+/-	+
SA24	+	-	+	+	+	-	+
SA25	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+
SA26	-	-	+/-	+	+/-	+/-	+
SA27	-	-	+	+	+	+	+
SA28	+/-	-	+	-	+/-	+	+
SA30	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+
SA31	-	-	+/-	+/-	-	-	-
SA32	-	-	+	-	-	-	+
SA33	-	-	+	+	-	+	+
SA34	+	-	+/-	+	+	+/-	+/-
SA35	+	-	-	+	-	-	-
SA36	+/-	+	+	+	+	+	+
SA37	+	+/-	-	+/-	-	-	-
SA38	+/-	-	+	-	+/-	+/-	+
SA39	+/-	-	+/-	+	+/-	-	+/-
SA41	-	-	+/-	-	+	-	-
SA42	+	-	-	+	+	-	+
SA43	+	-	+	+/-	-	+/-	+
SA46	+	+	+/-	+	+	+/-	+
SA47	+/-	+	+	+	-	+/-	+
SA48	-	-	+/-	+	-	+/-	-
SA50	-	+	+/-	+	+/-	+	-
SA53	-	-	+	-	+/-	-	+/-
SA54	+	+	+	+	+	-	+
SA55	+/-	+/-	+	+	+	-	-
SA56	+	+	+	+	+	+	+

SA57	-	-	+/-	-	+	+	-
SA58	+	-	+	+/-	+	+	+
SA59	+	-	+	+	+	+/-	+
SA61	+	-	+	+	+	+	-
SA62	-	-	+	+	+	+/-	-
SA63	-	+	+	-	+/-	+	+
SA64	-	-	+	-	-	+/-	-
SA66	-	-	+/-	-	+	+	+
SA67	-	-	+	+/-	-	+/-	-
SA68	-	-	-	+/-	-	-	+/-
SA69	+	-	+	+	+	+	+
SA70		-	+/-	+	+	+	+
SA71	+/-	-	+/-	+	-	-	+
SA72	-	-	+	+	-	+/-	+/-
SA73	-	-	-	-	+	-	+/-
SA74	+	-	-	-	-	+	+/-
SA	+/-	-	+/-	+	-	+	+/-
SAA	-	-	+	+	+	+	+/-
SAB	+	+	+	-	+/-	+	+/-
SAC	+/-	-	+	-	-	-	+
SAE	+/-	-	+	-	+/-	+/-	+/-
SAE	-	-	+/-	+	+	+/-	+
SAF	+/-	+	-	+/-	+/-	-	-
SAG	+	-	+	+	+/-	-	+/-
SAH	+	+	+	-	+/-	-	+
SAI	+/-	-	+/-	+	+	+	+
SAJ	-	-	+	+	-	+	-
SAT	+/-	-	+	-	+	+	+
A	-	-	+	+	-	-	+
C	-	+	-	+/-	+/-	+	+
D	+	+	+	+/-	-	+	-
E	-	+/-	-	+	+	+	-
F	+	+	+	+	-	-	+
G	+	+	-	-	+	+	-
H	-	+/-	-	+	+/-	-	+
I	-	+	+	+	+	-	-
K	-	-	+	+	-	-	+
L	+	+/-	-	-	-	+/-	-
M	+	+/-	-	+	+/-	-	+
O	-	+	+	-	+/-	+	+
R	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-
S	+	+	+	+	-	+	-
U	+	+	+	-	-	-	-
V	+	+	+	+/-	+	-	+
X	+	+	-	-	+	-	+
T	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+

Table 13. Résultats des tests de la biodégradation des fongicides.

Isolats	Ortiva	Rodazime	Isolats	Ortiva	Rodazime
SA1	-	+	SA57	+	+/-
SA3	+	+/-	SA58	-	+
SA4	+/-	+/-	SA59	-	+/-
SA5	+	+	SA61	+	+/-
SA6	+/-	+/-	SA62	-	+/-
SA9	+	+	SA63	-	+
SA10	-	+	SA64	-	+
SA11	-	+	SA66	+/-	+
SA12	+/-	+/-	SA67	-	+
SA13	-	+	SA68	+	+/-
SA16	+	+	SA69	+	+/-
SA17	+	+	SA70	-	+
SA18	-	+	SA71	+/-	+
SA19	-	+/-	SA72	-	+/-
SA20	+/-	+	SA73	+/-	+
SA21	+	+/-	SA74	+/-	+
SA22	-	+/-	SA	-	+/-
SA23	+	+/-	SAA	+/-	+/-
SA24	+/-	+/-	SAB	-	+
SA25	+	+/-	SAC	+	+
SA26	+/-	+/-	SAE	+	+
SA27	+	+/-	SAE	+	+
SA28	-	+/-	SAF	+	+
SA30	+	+/-	SAG	+/-	+
SA31	+	+	SAH	+	+
SA32	+	+	SAI	+	+
SA33	-	-	SAJ	+/-	+
SA34	-	+/-	A	-	+
SA35	-	-	C	+/-	+/-
SA36	+/-	+/-	D	+	+
SA37	+/-	+/-	E	+/-	-
SA38	+	+/-	F	+	-
SA39	+	+/-	G	+	+
SA41	-	+	H	+	-
SA42	+	+	I	+	+
SA43	+	+	K	-	-
SA46	-	+/-	L	+	+
SA47	+	+	M	+/-	-
SA48	+/-	+/-	O	+/-	-
SA50	-	+/-	R	+/-	-
SA53	-	+/-	S	+	+/-
SA54	-	+/-	U	-	+
SA55	+	+	V	+	+
SA56	+	+	X	+	-
SAT	-	+	T	-	-

Table 14. Résultats des tests de la biodégradation des insecticides.

Isolats	Phoenix	Karaté	Cypermethrine	Dursban	Isolats	Phoenix	Karaté	Cypermethrine	Dursban
SA1	+/-	+	-	+/-	SA57	+	-	+	+/-
SA3	+	+	+/-	+	SA58	+	-	-	+
SA4	+	+	-	+/-	SA59	+/-	+/-	-	-
SA5	+	+	+	-	SA61	+	+	-	-
SA6	+	+/-	-	+	SA62	+	+/-	+/-	-
SA9	+	+	+/-	+/-	SA63	+	+	-	+
SA10	-	+	+	-	SA64	+/-	-	-	-
SA11	-	+/-	-	+/-	SA66	+	+	-	+/-
SA12	-	+	+	+	SA67	+/-	+	-	+
SA13	+	+	-	-	SA68	-	+	+/-	-
SA16	+	+	-	+/-	SA69	-	+	+	+
SA17	+	+	-	-	SA70	+	+	+/-	+
SA18	-	-	+/-	+	SA71	-	+/-	+/-	+
SA19	+/-	+	-	+/-	SA72	+/-	+/-	-	+/-
SA20	-	-	-	-	SA73	-	+	-	-
SA21	+/-	-	+/-	-	SA74	+	-	+	+/-
SA22	+	-	-	-	SA	-	-	-	+/-
SA23	+	+	-	+/-	SAA	-	+	-	+/-
SA24	+	+	-	-	SAB	-	+	+	+/-
SA25	-	-	-	-	SAC	-	+/-	-	+/-
SA26	+/-	+/-	-	-	SAE	+	+/-	+/-	+
SA27	+	+	-	+	SAE	+	+	-	+
SA28	-	+	+	+/-	SAF	-	-	+/-	+/-
SA30	+	+/-	-	+	SAG	-	+	+/-	-
SA31	-	-	+/-	+/-	SAH	-	+	-	-
SA32	+	-	-	+	SAI	+	-	+/-	+/-
SA33	+/-	+/-	-	+/-	SAJ	+/-	+	+	+/-
SA34	+	+/-	-	+/-	SAT	+/-	+/-	-	+
SA35	-	-	-	-	A	-	-	+	+/-
SA36	+	+/-	-	+/-	C	+	+/-	-	+
SA37	-	-	-	+/-	D	+	+	+/-	-
SA38	+	-	-	-	E	+	-	+	-
SA39	+	-	+/-	+/-	F	+/-	+/-	+	+
SA41	+/-	+/-	+	-	G	+/-	+	-	-
SA42	+/-	+/-	-	+	H	-	-	+/-	+
SA43	+	+	-	-	I	+	+	-	+
SA46	+	-	-	+	K	-	+	-	-
SA47	+	+	-	+/-	L	+/-	+/-	+	-
SA48	+/-	+	-	+	M	+	+/-	+	+
SA50	+	+	-	+	O	+/-	-	+/-	+
SA53	+/-	+	-	+/-	R	-	-	-	+
SA54	+	+	-	-	S	+	+	+	+/-
SA55	-	+/-	+	+	U	+/-	-	-	-
V	+	+	+/-	-	X	+	-	-	-
T	+/-	+	+/-	+/-					

+ : bonne croissance. - : absence de croissance. +/- : croissance faible.

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publications Scientifiques

A. HOCINAT et A. BOUDEMAGH (2016). Biodegradation of commercial Ortiva by actinomycetes isolated from the activated sludge. Desalination and water treatment. pp 1-7.

http://www.deswater.com/in_press/1022799.pdf

Proceeding et actes de séminaires

HOCINAT Amira, A. BOUDEMAGH et BENHASNA S. (2013). Etude de la biodégradation de l'herbicide Glyphosate commercial par des Actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées d'Ibn Ziad de la commune El Hamma wilaya de Constantine. Proceeding édité du 2^{ème} Colloque International sur la Gestion Intégrée des Ressources en Eau. Batna le 22 et 23 Octobre 2013.

<http://gire.univ-batna.dz/GIRE2013/Posters/ID%20494.pdf>

Articles en cours de publication

Amira HOCINAT, Allaoueddine BOUDEMAGH, Hocine ALI-KHODJA, Eric PEYRETAILLADE, Auriane BERNARD, Pierre PEYRET and Sylvain DENIS.

Biodegradation of BTEX compounds by *Streptomyces* species isolated from activated sludge and agricultural soil.

Amira HOCINAT, Allaoueddine BOUDEMAGH, Hocine ALI-KHODJA. Capability of *Nocardia nova* found in activated sludge to use synthetic BTEX as sole source of carbon and energy.

Communications internationales

HOCINAT Amira, A. BOUDEMAGH et BENHASNA S. (2013). Etude de la biodégradation de l'herbicide Glyphosate commercial par des Actinomycetes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées d'Ibn Ziad de la commune El Hamma wilaya de Constantine. 2ème Colloque International sur la Gestion Intégrée des Ressources en Eau. Batna le 22 et 23 Octobre 2013.

HOCINAT A, A. BOUDEMAGH et BENHASNA S. (2013). Etude de la biodégradation du fongicide ORTIVA commercial par des actinomycetes isolés à partir des sols semi-arides de l'est Algérien de la région de Ain M'Lila. 1^{er} Colloque International sur la Préservation de l'Environnement des Régions Semi-arides Tébessa le 20 et 21 Octobre 2013.

HOCINAT A. et A. BOUDEMAGH (2013). Biodégradation du fongicide ortiva commercial par des actinomycètes isolés à partir des boues activées. La 3^{ème} Conférence Internationale sur l'Eau « CI.Eau 2013 » Organisée par : Laboratoire de Recherches des Sciences de l'eau Ecole Nationale Polytechnique LRS-EAU/ENP Le 18-19-20 Novembre 2013, Hôtel Hilton à Alger.

HOCINAT A. BOUDEMAGH A. ALI-KHODJA H. (2014). Etude du rôle des actinomycètes provenant des boues activées et du sol dans la biodégradation des BTEX. Congrès International de Photocatalyse et Environnement (CIPE 2014), 7 et 8 Mai 2014 Université Constantine 1.

A. HOCINAT, BOUDEMAGH A. ALI-KHODJA H. (2015). Etude de la biodégradation des BTEX par des cultures pures de *Streptomyces* provenant des boues activées. Séminaire international des biotechnologies (SIBC). Constantine le 19, 20 et 21 Octobre 2015.

BOUDEMAGH A., BENSOUICI K., **HOCINAT A.**, BENHASNA S. (2015). Isolation and molecular identification of actinomycetes from wastewater treatment plant and capable of growing on Roundup herbicide as a sole source of carbon and energy. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Barcelone, Spain, 28-30 Octobre 2015.

BOUDEMAGH A., **HOCINAT A.**, ALI-KHODJA H., Aerobic biodegradation of BTEX compounds by actinobacteria isolated from activated sludge. Dubai, 20-21 December 2016.

BOUDEMAGH A., **HOCINAT A.**, ALI-KHODJA H., *Streptomyces griseorubens* is an actinobacteria that can degrade cypermethrin insecticide. 175th International Conference on Chemical and Biochemical Engineering (ICCBE) 23rd-24th December, 2017 at Istanbul, Turkey.

Communications nationales

BENHASNA S., BOUDEMAGH A. et **HOCINAT A.** (2014). Etude de la biodégradation du benzène par des actinomycètes isolés à partir des sites pétroliers contaminés de quelques régions désertiques du sud-est-Algérien. Conférence nationale sur la Pollution et Déchets Industriels (CNPDI). Skikda, 5- 6 juin 2014.

This article was downloaded by: [University of Exeter]

On: 18 March 2015, At: 13:38

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Desalination and Water Treatment

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/tdwt20>

Biodegradation of commercial Ortiva fungicide by isolated actinomycetes from the activated sludge

Amira Hocinat^{ab} & Allaoueddine Boudemagh^a

^a Laboratory of Applied Biology and Health, Faculty of Nature and Life, Department of Microbiology, University of Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria, Tel. +213 777 807 848, Tel. +213 771 206 765

^b Laboratory of Microbiological and Engineering Applications, Faculty of Nature and Life, Department of Microbiology, University of Constantine 1, Constantine 25000, Algeria

Published online: 16 Mar 2015.



[Click for updates](#)

To cite this article: Amira Hocinat & Allaoueddine Boudemagh (2015): Biodegradation of commercial Ortiva fungicide by isolated actinomycetes from the activated sludge, *Desalination and Water Treatment*, DOI: [10.1080/19443994.2015.1022799](https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1022799)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2015.1022799>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>



Biodegradation of commercial Ortiva fungicide by isolated actinomycetes from the activated sludge

Amira Hocinat^{a,b,*}, Allaoueddine Boudemagh^a

^aLaboratory of Applied Biology and Health, Faculty of Nature and Life, Department of Microbiology, University of Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria, Tel. +213 777 807 848; email: hocinatamira@hotmail.fr (A. Hocinat), Tel. +213 771 206 765; email: boudemaghallaoueddine@yahoo.fr (A. Boudemagh)

^bLaboratory of Microbiological and Engineering Applications, Faculty of Nature and Life, Department of Microbiology, University of Constantine 1, Constantine 25000, Algeria

Received 13 February 2014; Accepted 9 February 2015

ABSTRACT

Wastewater can be defined as water degraded mainly by human activities. This water must be treated before being reintroduced into the supply circuits. Wastewater from the agricultural sector can be difficult to process because of the presence of many persistent pesticides. The Ortiva fungicide has been used for several years worldwide since 1996. It is very toxic for aquatic organisms and can lead to long-term adverse effects in aquatic environments. Different biological treatment techniques are necessary to overcome the devastating effects of this pollutant. The micro-organisms present in the wastewater sludge are the major players in the suppression of these effects. In this study, we isolated nine actinomycetes strains which are able to degrade the fungicide Ortiva at a concentration of 500 mg/L and at a temperature of 30°C within 21 d of incubation when supplied as a sole carbon source. The molecular identification by 16S rRNA was possible for only seven actinomycetes under laboratory conditions. These isolates showed a homology to *Nocardia* sp. and *Streptomyces* sp. The biodegradation ability of these strains reveals its potential for further study as a biological agent for the remediation water contaminated with Ortiva.

Keywords: Actinomycetes; Biodegradation; Ortiva; Wastewater sludge; Azoxystrobin

1. Introduction

Pesticides, which are chemicals designed to kill or control pathogens or diseases, have become more widely used in recent years and have contributed to improved crop production and income by substantially reducing the risks of disastrous crop losses [1].

Since most arable crops such as cereals are more widely cultivated and more susceptible to fungal infections, the fungicides are usually used more than any other class of pesticides [2–4].

The commercial Ortiva is a phytosanitary product which belongs to a family of a new generation of active materials developed at the example of nature. It is effective against a large number of diseases, such as *Alternaria*, powdery mildew, disease of spots, and

*Corresponding author.

Presented at the 3rd Annual International Conference on Water (CI.EAU 2013), 18–20 November 2013, Algiers, Algeria

rust. This product is used as a fungicide with xylem systematic action. The Ortiva, which belongs to the family of strobilurins, has become one of the most widely used fungicides [5]. The azoxystrobin ($C_{22}H_{17}N_3O_5$), as one of the leading worldwide proprietary fungicides, is known to possess broad-spectrum systemic activity against the four major classes of pathogenic fungi [5]. It diffuses from the seed (zone of application) to the surrounding soil, then it is absorbed by the roots during germination to migrate once again to the air parts. The azoxystrobin is marketed under different trade names, such as Bankit, Heritage, Abound, Ortiva, and Dynasty, either as the sole fungicide-active ingredient or in combination with other active ingredients [6].

The azoxystrobin like other strobilurins, such as fluoxastrobin, kresoxim methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, and trifloxystrobin, possess a high antifungal activity but are relatively inert to mammals [7]. The strobilurins function inhibits mitochondrial respiration by binding to the cytochrome b complexes. This binding prevents electron transfer from cytochrome b to c and inhibits energy production via oxidative phosphorylations. The ATP inhibition may result in the death of the micro-organism [5–8].

The azoxystrobin was announced as being very promising molecule because of the extent of their action spectrum and the absence of phytotoxicity. However, the strobilurins cause resistance problems [8].

The azoxystrobin has been reported to have a half-life in soil of less than 14 d [9], but this contradicts with some recent findings which suggest that they persist in soils for up to six months with water solubility from 13 to 121 mg/L [10–12]. Whilst, ecotoxicological testing has established that the azoxystrobin is toxic to freshwater and marine invertebrates and also fish [9], some studies by [13–15] have shown many environmental and health problems because of the continuous and excessive strobilurins use. Other works have studied the azoxystrobin ecological effects on microcosms of brackish water and have found that the azoxystrobin is toxic to copepods of these waters in a much lower concentration of 3 g/L, than previously reported about the monospecific tests made with crustaceans of fresh water [16]. The azoxystrobin and its degradation product R234886 can infiltrate into the loamy soil for a long period of time after the application of pesticide and therefore constitute a potential threat to aquatic vulnerable and drinking water resources [17].

The biodegradation of pesticides is an area of increasing importance because of the enormous potential of micro-organisms to clean up the environment of these dangerous xenobiotics [18,19].

The micro-organisms of wastewater treatment plants are among the main actors of the removal of the harmful effects of these pollutants. The *Actinobacteria* are known by their capacities of biodegradation of most of the polymers. According to the reports of the EFSA [20]; EFSA [15]; and US EPA [9], no study concerning the biodegradation of the azoxystrobin by pure cultures is available. The literature reports some works about the effects and desperation of the azoxystrobin in microcosms of soil and water [21–23]. Consequently, the aim of this study is to isolate and characterize the actinomycetes present in the activated sludge from a wastewater treatment plant. The study also investigates the possibility of these bacteria to grow on a minimal medium supplemented with Ortiva as the sole source of carbon and energy. This work is of a certain importance and can offer micro-organisms capable of being used in systems of cleanup of the environment, such as the bioremediation of the aquatic environments contaminated by this kind of pesticide.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

The samples used in this study came from an activated sludge taken from the wastewater treatment station of Ibn Ziad, town of Constantine (Algeria). The samples were taken from the biological basin after an aeration phase. One hundred milliliters were recovered in a sterile flask of 250 mL of volume.

2.2. Isolation of actinomycetes

From the original solution of sludge, a series of decimal dilutions are made, going up to 10^{-5} . For each dilution, two repetitions were established. Two selective culture mediums of actinomycetes were used: starch-casein medium [24] and Olson medium [25]. The nystatin is added aseptically to both mediums as an antifungal agent at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and polymyxine at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as an antibacterial agent active against negative Gram bacteria. These antibiotics are sterilized by filtration through a Millipore filter of 0.22 μm of porosity. One Hundred micro liters of every dilution were inoculated on the surface of Petri dishes containing culture mediums of isolation. The prepared plates were incubated at a temperature of 28°C for 3 weeks. Daily observations were carried out to follow the growth of colonies and avoid contaminations. All colonies approaching their macroscopic appearance to actinomycetes were observed under microscope (5×40)

in the fresh state and after Gram staining. Typical colonies of actinomycetes are transplanted by the streaks method on the same isolation medium for purification.

The isolated and purified actinomycetes colonies are inoculated on Olson medium without antibiotics in inclined agar and incubated at 30°C for two weeks and then stored at 4°C. The subculturing is performed every two months. For longer storage, spore suspensions in 20% of glycerol were stored at -20°C.

2.3. Growth of actinomycetes on Ortiva

This step aims to find *Actinobacteria*, which have a capacity to use Ortiva as the sole source of carbon and energy. The minimal medium used in this study is completely exempt of carbon source. Its chemical composition is: Agar (18 g), KNO₃ (13.76 g), KH₂PO₄ (1.78 g), Na₂HPO₄·2H₂O (4.66 g), Na₂SO₄ (9.68 g), MgSO₄·7H₂O (0.8 g), EDTA (10 mg), FeSO₄·7H₂O (5 mg), MnCl₂·4H₂O (1.22 mg), ZnSO₄·7H₂O (0.25 mg), CuSO₄·5H₂O (0.2 mg), CaCl₂·2H₂O (1 mg), Na₂MoO₄·H₂O (0.2 mg), pH 7. After adjusting the pH to 7.2–7.4 with 8 M NaOH, the solution was autoclaved at 121°C for 15 min. The Ortiva fungicide was added after being filtered through a membrane of 0.22 μ of porosity at a concentration of 500 mg/L. The bacteria were inoculated by streaking on the surface of the solid medium and incubated for 21 d at a temperature of 30°C. Non-inoculated minimal plate agar with Ortiva and inoculated minimal plate agar without Ortiva were tested as a control test.

2.4. The actinomycetes identification

2.4.1. The morphological characterization

The morphological characteristics of the efficient isolates were examined according to the identification of actinomycetes [26,27]. The isolates were grown on glucose yeast extract malt agar medium to determine the cultural characteristics, such as shape, margin, elevation, surface appearance of the colonies. The morphological features of the cells and spores were also observed with a microscope according to the technique of slide culture. This consists of inserting delicately sterile lamella into ISP₂, ISP₃, ISP₄, or ISP₅ agar, such that it forms an angle of 45° with the surface of plate agar. The bacterial inoculum was then sowed on the lamella in contact with the medium. After 14 d of incubation at 30°C, the slide was carefully removed from agar, carrying with it fragments of substrate and aerial mycelium; it is then deposited on a blade and examined under an optical microscope (S×100) [27].

2.4.2. The molecular analysis

Seven isolates from the efficient actinomycetes were molecularly identified (D, F, G, L, S, V, and X). The genomic DNA was directly extracted from the strains using PCR colony protocol: for cell lysis, all individual colonies were diluted in 50 μL of MilliQ filtered water and heated at 98°C in an incubator (Peltier Thermal cycler) from 5 to 10 min. After sufficient mixing, only 1 μL was added to each PCR tube containing the PCR reaction. The 16S rDNA gene fragment was amplified from the genomic DNA bPCR using primers 27F_YM (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') and R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') [28]. Each 50 μL PCR microtube contains 1 μL extracted DNA; 0.5 μL of upstream primer (10 mmol); 0.5 μL of downstream primer (10 mmol); 5 μL of 5× Tampon; 0.5 μL Go Taq DNA Polymerase DNA (5 U/μL); 0.5 μL of dNTP (10 mM); and 17.3 μL of sterile MQ water. Negative control (24 μL mix + 1 μL of water) and positive control (24 μL mix + 1 μL of 16S DNA of *Pseudomonas aeruginosa* 1/1000^e) were included.

The DNA amplification was performed in a thermal cycler with the following conditions: denaturation for 5 min at 95°C, then 35 cycles of 30 s of denaturation at 95°C, 30 s of annealing at 52°C, 1 min and 30 s extension at 72°C, and finished with a final extension step of 7 min at 72°C. The purification of the PCR products was performed using the protocol of the kit MinElute PCR Purification Kit. The purified DNA was sequenced according to Sanger method. The nucleotide sequences determined in this study were compared with existing sequences in GenBank by performing a BLASTN to determine their phylogenetic affiliation. The results are expressed as percentage of similarity of the strain to be identified with the most closely related species.

3. Results and discussions

3.1. Isolation of actinomycetes

From the two selective mediums used, colonies of actinomycete isolates were recognized according to their characteristic macroscopic aspect (powdery colonies or hard colonies inlaid in agar plate), and microscopic aspect (filamentous colonies with Gram-positive staining) [29]. After the subculturing, 18 isolates of actinomycetes completely different were purified. These isolates are referred to by code names as follows: A, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, O, R, S, U, V, and X.

According to our results, 18 actinomycetes were isolated from activated sludge. The actinomycetes

obtained from both mediums vary in number, 15 actinomycetes are isolated from Olson medium and three from starch–casein agar. According to this, the Olson medium is the medium which allows the isolation of a larger number of this kind of bacteria from water sludge. According to the literature, mesophilic actinomycetes are present in sewage sludge. The genus *Nocardia* often exists; it is the most important genera in water sludge, it forms flocs that facilitate the sedimentation of particles presenting a particular importance [30,31]. The genus *Gordona* was also isolated in activated sludge [32]. The *Actinobacteria* are parts of accumulating bacteria of the polyphosphates [33].

3.2. Growth of actinomycetes on *Ortiva*

The growth capacity of actinomycete isolates was tested on a minimal medium with *Ortiva* added as the sole source of carbon and energy. The obtained results can be seen in Fig. 1. If the bacteria are unable to use this substrate, the growth is weak or absent. This explains the absence of biodegradation's enzymes. On the other hand, the bacteria which exhibit a good growth are able to produce enzymes that degrade this compound.

The use of fungicides in agriculture has two opposite consequences. The first one is to combat pathogens fungi to increase crop yields. The second is the nature of the fungicide, which, under certain conditions, can become pollutants themselves of air, water, food, and soil [34]. The fungal diversity of soil is also affected by some fungicides [23]. The azoxystrobin is known to be

photolabile via different pathways, such as photo isomerization, photo hydrolytic, and oxidative cleavages of the aromatic rings and double bonds [35]. The value of the Henry constant of this fungicide is low, and it is unlikely to volatilize, thus it accumulates in aquatic systems and deep groundwater [36]. It is toxic to freshwater and marine invertebrates and also fish [9]. Other studies have shown that the azoxystrobin may persist in water for longer periods of 3–6 months [11] or more than 2 years [10]. The azoxystrobin persistence is influenced by farm management practice with higher breakdown being observed in organically managed soils than conventionally managed soils [12]. It is also affected by the level of humic and fulvic acids in the environment with increasing levels of these compounds generally enhancing photodegradation [37].

Very few information or data exist in the literature on the azoxystrobin degradation in different aquatic systems. Some studies have shown that in water, only 2.5–4.2% of the azoxystrobin was mineralized to CO₂ within 130 d of incubation and the pH of water did not have much effect on the rate of mineralization [38]. In activated sludge, the complete degradation of azoxystrobin affected the microfauna and microflora of sludge and caused an increase of free bacteria and rotifers of Monogononta and Digononta classes. At the microfauna, it is very difficult to determine the influence of this pesticide [39]. However, the emergence and development of new micro-organisms, large holotriches (*Colpidium*, *Chilodonella*, *Holophrya*), was noted because of the appearance of free bacteria on which they feed [39].

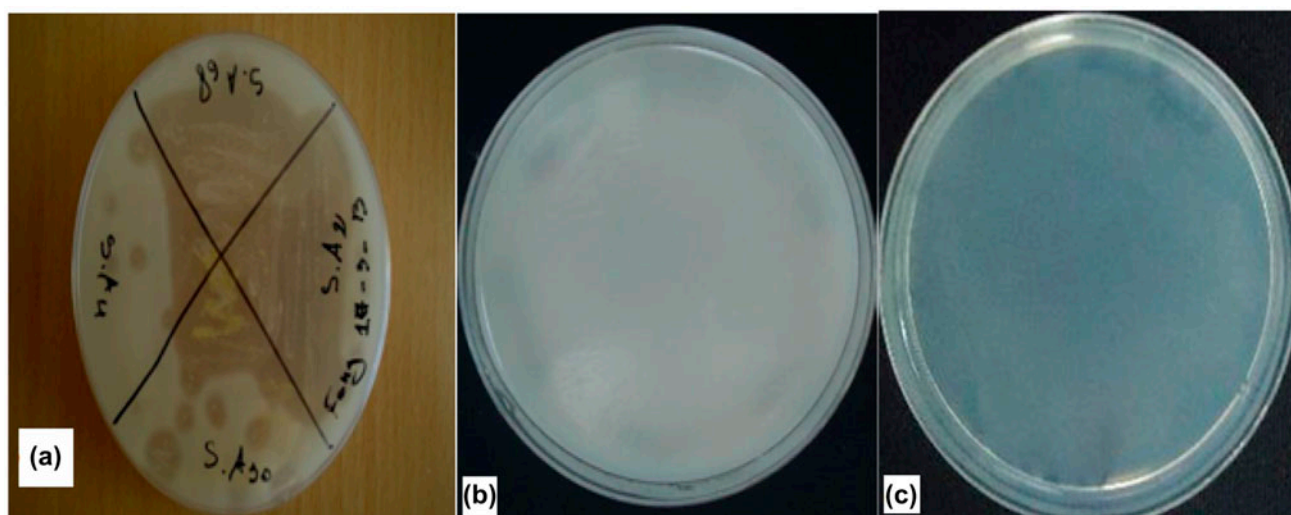


Fig. 1. Growth of the actinomycetes on *Ortiva*: (a) Good growth of the actinomycetes on *Ortiva*, (b) Non-inoculated minimal medium with *Ortiva*, and (c) Inoculated minimal medium without *Ortiva*.

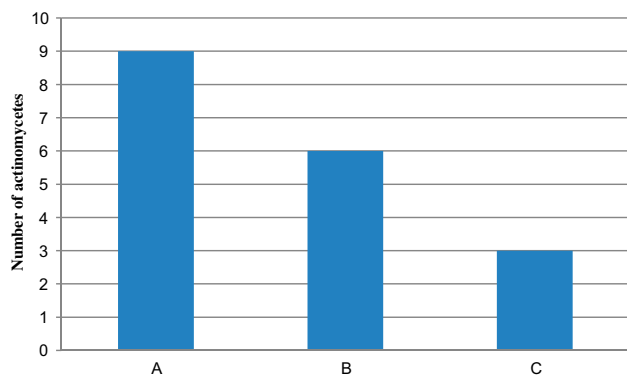


Fig. 2. The number of actinomycetes grown on minimal medium added by 500 mg/L of Ortiva taken as the sole source of carbon and energy: (A) Good growth, (B) Moderate growth, and (C) No growth.

The disappearance of the azoxystrobin applied to tomatoes in greenhouse showed that some residues of the azoxystrobin remained stable [21]. Myung et al. [40] have explored the plant metabolism of three strobilurin fungicides: azoxystrobin, kresoxim-methyl, and trifloxystrobin using wheat cell suspension cultures. The trifloxystrobin and kresoxim-methyl were completely metabolized within 24 h, whereas the metabolism of azoxystrobin was relatively slow with half-lives up to 48 h depending on specific experimental conditions.

The elimination of this molecule is a certain environmental urgency. Wastewater treatment plants are the important structures for treating polluted water before being reintroduced into the supply circuits.

The actinomycetes are among the largest groups with considerable activity in the degradation of natural and synthesis compounds, such as pesticides and other xenobiotics in the environment [41]. Therefore, they play a major role in the remediation of contaminated environments by these components. The actinomycetes belonging to the genera of *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Nocardioides*, and *Streptomyces* are capable of degrading pesticides [42].

In our investigation, 15 preselected actinomycetes were isolated from sludge, which were able to grow well using Ortiva as the sole source of carbon. Among them, nine strains (A, D, F, G, H, L, S, V, X) were the

most efficient in degrading Ortiva at the concentration of 500 mg/L at a temperature of 30°C (Fig. 2).

Growth studies showed that there is a significant degradation of fungicide Ortiva within 21 d period of incubation. This supports the claim that the half-life of the compound was less than 14 d [9].

The works that studied the biodegradation of the azoxystrobin by pure culture of actinomycetes remain largely unknown or poorly reported. A study conducted in Sudan (Khartoum) has reported the ability of the genera *Nocardia*, *Arthrobacter*, and *Mycobacterium* coming from soils to use the azoxystrobin as the sole source of carbon and nitrogen. Among these genres, *Nocardia* had the greatest ability to break the azoxystrobin and identified as *Nocardia brasiliensis* [22].

In a recent work, using sequential soil and liquid culture enrichments, Howell et al. [41] isolated two bacterial strains which were able to degrade the most widely used strobilurin, azoxystrobin when supplied as a sole carbon source. The identification of these bacteria by 16S rRNA showed that the strains showed a homology to *Cupriavidus* sp. and *Rhodanobacter* sp.

3.3. Identification of efficient actinomycetes

The isolates A, D, F, G, H, L, S, V, and X are Gram-positive aerobic bacteria. The color of aerial mycelium and substrate mycelium varies for the different strains. Table 1 represents the color of each isolate spores.

The microscopic observation of the selected isolates by slide culture technique showed filamentous aspects. They form highly branched mycelia that rarely break. At maturity, the aerial mycelium produces chains of variable length spores: straight chains, rectiflexibles chains, or spirals chains of spores. Also, they form partially fast-beaded branching filaments.

The molecular identification of the isolates was possible for only seven actinomycetes in the laboratory conditions. It reveals that the actinomycetes bacteria belong to the genera *Streptomyces* species for F, G, L, V, and X strains and to the *Nocardia* species for the isolates D and S. The taxonomic affiliation of strains is collected in Table 2.

These results are very promising; they show that the actinomycetes isolated from activated sludges can

Table 1
spores color of actinomycete isolates

Isolates	A	D	F	G	H	L	S	V	X
Color	White	Yellow	White	Black	Pink	Gray	Orange	White	Gray

Table 2

The molecular identification of the actinomycetes isolates and their percentage of similarity

Isolate	Affiliation	Percentage of similarity (%)	GenBank source
D	<i>Nocardia asteroides</i> strain Z12-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	KJ571110.1
F	<i>Streptomyces</i> sp. SAI-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	KM220609.1
G	<i>Streptomyces microflavus</i> strain 126,182 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	JN180196.1
L	<i>Streptomyces lavendulae</i> strain FSHJ9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	KC626003.1
S	<i>Nocardia nova</i> strain GTC 86116S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	AB292584.1
V	<i>Streptomyces flavogriseus</i> strain P.S.461 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	KF991651.1
X	<i>Streptomyces</i> sp. Sn-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	KJ742904.1

grow on Ortiva as the sole source of carbon. To our knowledge, these strains were the first-reported pure cultures of actinomycetes capable of degrading commercial Ortiva.

4. Conclusion

The wastewater treatment is one of the most complex problems for both developed and developing countries. In conclusion, it has been demonstrated that seven actinomycetes isolated from activated sludges of wastewater treatment plant degrade the Ortiva fungicide at a concentration of 500 mg/L within 21 d of incubation and at a temperature of 30°C under laboratory conditions. 16S rRNA reveals that the strains showed a homology to *Nocardia asteroides* strain Z12-8, *Streptomyces* sp. SAI-13, *Streptomyces* sp. Sn-23, *Streptomyces lavendulae* strain FSHJ9, *Nocardia nova* strain Z12-8, *Streptomyces flavogriseus* strain P.S.461, and *Streptomyces microflavus* strain 126182. Our strains can be used in systems of cleanup of the environment, such as the bioremediation of the aquatic environments contaminated by this kind of fungicide.

References

- [1] K.J. Brent, R.K. Atkins, Rational pesticide use, in: Proceedings of the Ninth Long Ashton Symposium, ninth ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1989, p. 9.
- [2] D.G. Garthwaite, M.R. Thomas, A. Dawson, H. Stoddard, Arable Crops in Great Britain, Pesticide Usage Survey Report 187, Defra, London, 2002, pp. 1–108.
- [3] D.G. Garthwaite, M.R. Thomas, A. Dawson, H. Stoddard, Arable Crops in Great Britain, Pesticide Usage Survey Report 202, Defra, London, 2004, p. 11.
- [4] Z. Dhlamini, C. Spillane, J.P. Moss, J. Ruane, N. Urquia, A. Sonnino, Status of Research and Application of Crop Biotechnologies in Developing Countries: Preliminary Assessment, FAO Report, Rome, 2005, p. 24.
- [5] D.W. Bartlett, J.M. Clough, A.R. Godwin, A.A. Hall, M. Hamer, B. Parr-Dobrzanski, The strobilurin fungicides, *Pest Manage. Sci.* 58 (2002) 647–662.
- [6] G.C. Schutte, R.I. Mansfield, H. Smith, K.V. Beeton, Application of azoxystrobin for control of benomyl-resistant *Guignardia citricarpa* on 'Valencia' oranges in South Africa, *Plant Dis.* 87 (2002) 784–788.
- [7] T. Anke, The antifungal strobilurins and their possible ecological role, *Can. J. Bot.* 73 (1995) 940–945.
- [8] P. Leroux, Fungicide resistance in plant pathogens: A phenomenon difficult to manage, *Phytoma* 566 (2003) 36–40.
- [9] United States Environmental Protection Agency, Pesticide Fact Sheet: Azoxystrobin, (1997). Available from: <http://www.epa.gov/oppr001/factsheets/azoxyst.pdf>, accessed 24 April 2006.
- [10] C.D.S. Tomlin (Ed.), The Pesticide Manual, Twelfth ed., British Crop Protection Council, Farnham, 2000.
- [11] G.D. Bending, S.D. Lincoln, R.N. Edmondson, Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties, *Environ. Pollut.* 139(2) (2006) 279–287.
- [12] G.D. Bending, M.S. Rodriguez-Cruz, D.S. Lincoln, Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories, *Chem.* 69(1) (2007) 82–88.
- [13] L. Maltby, T.C.M. Brock, P.J. van den Brink, Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime, *Environ. Sci. Technol.* 43(19) (2009) 7556–7563.
- [14] T. Warming, G. Mulderij, K. Christoffersen, Clonal variation in physiological responses of daphnia magna to the strobilurin fungicide azoxystrobin, *Environ. Toxicol. Chem.* 28(2) (2009) 374–380.
- [15] EFSA, Council directive 91/414/EEC, Azoxystrobin, Report and proposed decision of the United Kingdom made to the European Commission under commission regulation (2009) 737/2007. Available from: <http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision>.

- [16] K. Gustafsson, E. Blidberg, I. Elfgrén, A. Hellström, H. Kylin, E. Gorokhova, Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms, *Ecotoxicology* 19(2) (2010) 431–444.
- [17] L.F. Jørgensen, J. Kjær, P. Olsen, A.E. Rosenbom, Leaching of azoxystrobin and its degradation product R234886 from Danish agricultural field sites, *Chemosphere* 88(5) (2012) 554–562.
- [18] F. Pazos, A. Valencia, V. De Lorenzo, The organization of the microbial biodegradation network from a systems-biology perspective, *EMBO Rep.* 4(10) (2003) 994–999.
- [19] C.O. Nwuche, E.O. Ugoj, Effect of co-existing plant species on soil microbial activity under heavy metal stress, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 7(4) (2010) 697–704.
- [20] EFSA, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azoxystrobin, *EFSA J.* 8(4) (2010) 1542. Available from: <http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision>.
- [21] V.L. Garau, A. Angioni, A.A. Del Real, M. Russo, P. Cabras, Disappearance of azoxystrobin, pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil on tomatoes in a greenhouse, *J. Agric. Food. Chem.* 50(7) (2002) 1929–1932.
- [22] A.G. Osman, V.A. Kalinin, V.T. Emtsev, K.V. Bikov, Effect of new broad spectrum fungicide amistar on soil microorganism in field condition, *J. Sci. Technol.* 6(2) (2005) 207–213.
- [23] E.M. Adetutu, A.S. Ball, A.M. Osborn, Azoxystrobin and soil interactions: Degradation and impact on soil bacterial and fungal communities, *J. Appl. Microbiol.* 105(6) (2008) 1777–1790.
- [24] E. Kuster, S.T. Williams, Selection of media for isolation of *Streptomyces*, *Nature* 202 (1964) 928–929.
- [25] E.H. Olson, Actinomycetes isolation agar, in: *Difco: Supplementary Literature*, Difco Lab., Detroit, MI, 1968.
- [26] X.C. Yan, Classification and identification of Actinomycetes, Beijing Science Press, Beijing, 1992, pp. 265–1045.
- [27] E.B. Shirling, D. Gottlieb, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16(3) (1966) 313–340.
- [28] H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, E.M.H. Wellington, Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8) (1997) 3233–3241.
- [29] M. Goodfellow, J. Lacey, C. Todd, Numerical classification of thermophilic *Streptomyces*, *J. Gen. Microbiol.* 133(11) (1987) 3135–3149.
- [30] M. Schuppler, M. Wagner, G. Schön, U.B. Göbel, In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRW1 targeted oligonucleotide probes, *Microbiology* 144(1) (1998) 249–259.
- [31] M.P. Lechevalier, H.A. Lechevalier, *Nocardia amarae* sp. nov. an actinomycete common in foaming activated sludge, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24(2) (1974) 278–288.
- [32] P. Kämpfer, Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge, *FEMS Microbiol. Ecol.* 23(3) (1997) 169–181.
- [33] J.R. Seviour, T. Mino, M. Onuki, The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems, *FEMS Microbiol. Rev.* 27(1) (2003) 99–127.
- [34] R. Calvet, E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M.P. Charnay, Y. Coquet, Pesticides in Soil, Agronomic and Environmental Consequences, France Agricole, France, (2005), p. 637.
- [35] L.F. Hanne, L.L. Kirk, S.M. Appel, A.D. Narayan, K.K. Bains, Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol, *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10) (1993) 3505–3508.
- [36] A. De Schrijver, R. de Mot, Degradation of pesticides by actinomycetes, *Crit. Rev. Microbiol.* 25(2) (1999) 85–119.
- [37] K. Hustert, E.A. Feicht, A. Kettrup, Photodegradation of azoxystrobin and kresoxim methyl under simulated environmental conditions, *Fresen. Environ. Bull.* 11(7) (2002) 322–325.
- [38] N. Singh, S.B. Singh, I. Mukerjee, S. Gupta, T.V. Gajbhiye, P.K. Sharma, M. Goel, P. Dureja, Metabolism of ¹⁴C-azoxystrobin in water at different pH, *J. Environ. Sci. Health* 45(2) (2010) 123–127.
- [39] K. Esteve, Process of Aerobic Biological Treatment Plant Effluents in Viticulture, Doctorate thesis, Bordeaux 1 University, Graduate School of Life Science, France, 2007.
- [40] K. Myung, D.A. Williams, Q. Xiong, S. Thornburgh, Metabolism of strobilurins by wheat cell suspension cultures, *J. Agric. Food. Chem.* 61(1) (2012) 47–52.
- [41] C.C. Howell, K.T. Semple, G.D. Bending, Isolation and characterisation of azoxystrobin degrading bacteria from soil, *Chemosphere* 95 (2014) 370–378.
- [42] R. Balagurunathan, L. Xu, C. Jiang, Diversity of soil actinomycetes from South India and South China, *Actinomycetes* 4(3) (1996) 89–94.

Thème :

Biodégradation de quelques composés organiques volatils et de certains pesticides par des actinomycètes provenant d'un sol agricole et de boues activées

Résumé

À partir d'un échantillon de sol agricole de la région de Ain M'Lila et d'un échantillon de boues activées de la station d'épuration des eaux usées Ibn Ziad-Constantine, nous avons isolé des actinomycètes. 80 isolats actinobactéries ont été purifiés à partir du premier écosystème et 18 actinomycètes tous phénotypiquement différents ont été également isolés à partir des boues. Nous avons testé tous ces isolats pour leurs capacités à dégrader différents herbicides, insecticides et fongicides sous leurs formes commerciales. Les résultats ont montré que la majorité des isolats avaient la capacité d'utiliser pour leurs croissances ces pesticides comme seule source de carbone et d'énergie. Dans ce travail, nous avons également testé la capacité de ces isolats à dégrader les BTEX qui constituent une famille importante de composés organiques volatils les plus toxiques pour l'environnement. Les résultats des cinétiques de croissance et de dégradation ont montré que vingt actinobactéries étaient capables d'utiliser au moins un composé des BTEX comme unique source de carbone et d'énergie. Parmi eux, 4 isolats désignées sous le nom de code U, F, V et S, qui proviennent des boues activées et une bactérie dénommée SA13 récoltée du sol agricole, sont les plus performants. Ils sont capables de dégrader *in vitro* en conditions aérobies tous ces composés organiques volatils à des concentrations allant de 1400 à 1500 mg/L en 72 à 96 h d'incubation. Ces actinomycètes ont montré également d'autres aptitudes de biodégradation de plusieurs polymères naturelles comme la chitine, la cellulose et bien d'autres composés. L'identification des isolats actifs, par méthodes physiologiques, morphologiques et moléculaires basées sur le séquençage de l'ARNr 16S, nous ont permis d'assigner 21 bactéries au genre *Streptomyces* et 3 isolats au genre *Nocardia*. Plusieurs actinobactéries ont été identifiées au niveau de l'espèce. Ces résultats sont très prometteurs et montrent que les actinomycètes des boues activées et du sol agricole peuvent être d'excellents candidats pour la bioremédiation des écosystèmes terrestres et aquatiques pollués par les BTEX et les pesticides.

Mots clés : Actinobactéries, Biodégradation, BTEX, Pesticides, boues activées, sol agricole, ARNr 16S, *Streptomyces*, *Nocardia*.

Membres de jury :

Président :	Pr. HAMIDECHI M. A.	U. des frères Mentouri. Constantine1.
Directeur de thèse :	Pr. BOUDEMAGH A.	U. des frères Mentouri. Constantine1.
Co-encadreur :	Pr. ALI-KHODJA H.	U. des frères Mentouri. Constantine1.
Examineur :	Pr. KITOUNI M.	U. des frères Mentouri. Constantine1.
Examineur :	Dr. GRAMA B. S.	U. Larbi Ben M'hidi. OEB.

Année universitaire : 2017-2018