

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologies



*Mémoire*

*En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique*

*Option*

*Biotechnologie Microbienne*

*Thème*

**Effet de la bio augmentation des herbicides sur la  
production de phosphore assimilable  $P_2O_5$  et azote nitrique  
 $NO_3^-$  dans les sols de la plaine de Blida .**

*Présenté par M<sup>lle</sup> GUERFI Chaima*

*Devant le Jury :*

<i>Mme Benkorteby</i>	<i>MAA</i>	<i>UB-1</i>	<i>Présidente</i>
<i>H</i>			
<i>Mme Yala A</i>	<i>Dr</i>	<i>UB-1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme Cheloufi R</i>	<i>MCB</i>	<i>UB-1</i>	<i>Promotrice</i>

*2021 / 2022*

# REMERCIEMENT

---

Je remercie **Allah** le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience de mener au terme ce travail.

Mes sincères gratitude à ma promotrice Mme CHELOUFI pour leurs conseils, leur confiance en moi, leur soutien, leur patience et leur encouragement pour mener à bien ce travail.

On tient à remercier les membres du Jury : la présidente MmeBENKORTEBY et l'examinatrice Mme YALA d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à vous d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Mes vifs remerciements au chef de laboratoire PFE Mme Belarbi et au chef de laboratoire de chimie Mme Ouaili pour leurs soutiens.

Je tiens à exprimer tous mes gratitude et mes vifs remerciements au chef d'option Mr BENCHABEN pour la qualité de leur enseignement.

Je remercie infiniment l'ensemble des enseignants intervenant à ma formation.

Un grand merci également à tous les étudiants de notre promotion,

Merci pour les moments de joies et de stresse passé ensembles.

# DEDICACE

---

Avec gratitude, respect et amour que je dédie ce  
modeste travail,

A l'âme de ma mère que dieu vous garde dans son vaste paradis,

A ma grande mère «El Joher».

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et ma  
source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me  
voir réussir, que dieu te garde toujours à côté de moi, à toi mon père.

Je dédie mon travail à mon profond amour qui n'a cessé de me  
soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études,  
vous étiez toujours présente à mes côtés

Maman Nadia que j'adore.

A ma sœurs chérie, Aicha et mon frère Mohammed Amine pour leur encouragement  
sans limites.

A toute ma famille, Oncles, Tantes, Cousines et Cousins.

Des fois, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien que je le  
sens !

Que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

## **Résumé : Effet de bioaugmentation par les herbicides sur la production de phosphore assimilable $P_2O_5$ et azote nitrique $NO_3^-$ .**

---

Ce travail porte sur l'étude de l'effet de la bioaugmentation de l'herbicide 2.4-D sur l'évolution de l'azote nitrique et du phosphore assimilable dans le sol de périmètre irrigable de Mitidja. Pour cela, nous avons employé une actinomycète *Rhodococcus fascians*, elle a été isolée à partir des sols de Halouia et inoculée à ces mêmes sols par un processus de bioaugmentation.

Les résultats obtenus confirment l'effet nocif du 2.4-D vis-à-vis les microflores contrôlant la minéralisation de l'azote nitrique et du phosphore assimilable dans les sols de Halouia d'un côté, et d'autre côté, la bioaugmentation par une souche *Rhodococcus fascians* provoque significativement l'augmentation de libération de  $NO_3^-$  et de  $P_2O_5$  et contribue éventuellement à une meilleure dégradation de l'herbicide 2.4-D.

**Mots clés :** 2.4-D, *Rhodococcus fascians*, Bioaugmentation, Azote nitrique, Phosphore assimilable.

**Abstract : Bioaugmentation effect by herbicides on the production of  $P_2O_5$  available phosphorus and  $NO_3^-$  nitric nitrogen.**

---

This work focuses on the study of the effect of bioaugmentation of 2.4-D herbicide on the evolution of nitric nitrogen and assimilable phosphorus in Mitidja irrigable perimeter soil. For this, we used an actinomycete *Rhodococcus fascians* was isolated from Halouia soils and inoculated to these same soils by a bioaugmentation process

The results obtained confirm the harmful effect of 2.4-D vis-à-vis microflores controlling the mineralization of nitric nitrogen and assimilable phosphorus in Halouia soils on one side, and on the other hand, bioaugmentation by a *Rhodococcus fascians* strain significantly increases the release of  $NO_3^-$  and  $P_2O_5$  and possibly contributes to better degradation of the 2.4-D herbicide.

**Keywords:** 2.4-D, *Rhodococcus fascians*, Bioaugmentation, Nitric nitrogen, Assimilable phosphorus.

تلخيص : تأثير الفحص الأحيائي بمبيدات الأعشاب على إنتاج الفوسفور والنتروجين.

يركز هذا العمل على دراسة تأثير النقح البيولوجي عن طريق 2.4-D مبيدات الأعشاب على تطور النتروجين النيتريك والفوسفور القابل للاستيعاب في تربة محيط ميتيدجا القابلة للري. لهذا، استخدمنا أكتينومييسيت *Rhodococcus fascians*، وتم عزله عن تربة الحلوية وتلقيحه في نفس هذه التربة عن طريق عملية التقويم البيولوجي.

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها التأثير الضار 2.4D على البكتيريا التي تتحكم في تمعدن النتروجين والفوسفور القابل للاستيعاب في تربة الحلوية من جانب واحد، من ناحية أخرى، فإن الزيادة البيولوجية من قبل سلالة اللغافات الرودوكوس يزيد بشكل كبير من إطلاق  $\text{NO}_3^-$  و  $\text{P}_2\text{O}_5$  وربما يساهم في تحسين تدهور 2.4D. الكلمات المفتاحية :

2.4D, *Rhodococcus fascians*, زيادة البيولوجية, نتروجين, الفوسفور القابل للاستيعاب.

# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENT .....	
DEDICACE.....	
RESUME .....	
SOMMAIRE .....	7
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	11
Listes des abréviations.....	12
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
I,partie bibliographie.....	Erreur ! Signet non défini.
<b>1.Généralités sur le sol</b> .....	<b>4</b>
1.1. Définition de sol.....	4
1.2. Composition de sol .....	4
1.3. Types de sol .....	5
1.4. Fonctionnement du sol.....	5
<b>2.Azote et phosphore dans le sol</b> .....	Erreur ! Signet non défini.
2.1. Azote.....	6
2.1.1. Définition .....	6
2.1.2. Rôle de l'azote .....	6
2.1.3. Source de l'azote.....	7
2.1.4. Formes de l'azote dans le sol .....	7
2.1.5. Cycle de l'azote de sol.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2. Phosphore.....	9
2.2.1. Définition .....	9
2.2.2. Formes de phosphore .....	9
2.2.3. Cycle de phosphore .....	10
<b>3. Acide dichlorophenoxyacétique (2.4.D)</b> .....	Erreur ! Signet non défini.
3.1. Définition.....	13

3.2.	Effets de 2.4-D sur l'environnement .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.3.	Toxicité de 2.4-D .....	15
3.3.1.	Toxicité animale.....	16
3.3.1.1.	Toxicité aiguë.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.3.1.2.	Toxicité à long terme .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.3.2.	Toxicité chez l'homme .....	17
3.3.2.1.	Toxicité aiguë et subaiguë.....	17
3.3.2.2.	Toxicité à long terme .....	17
3.4.	Mécanisme d'action de 2.4-D.....	18
<b>4.</b>	<b>Aperçu générale sur la bio-augmentation des herbicides par <i>Rhodococcus fascians</i> dans les sols agricoles de Halouia.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4.1.	bioaugmentation .....	15
4.1.1.	Définition et Principe .....	15
4.1.2.	Effet de bio-augmentation des herbicides sur la production du phosphore $P_2O_5$ et d'azote $NO_3^-$ .....	15
4.2.	Actinomycètes : <i>Rhodococcus fascians</i> .....	16
4.2.1.	Généralité sur la bactérie.....	16
4.2.2.	Taxonomie .....	16
4.2.3.	Caractéristique morphologique de <i>Rhodococcus fascians</i> .....	16
4.2.4.	Caractéristiques biochimiques <i>Rhodococcus fascians</i> .....	17
4.2.5.	Caractéristiques génétiques <i>Rhodococcus fascians</i> .....	17
4.2.6.	<i>Rhodococcus</i> dans la biotechnologie .....	17
<b>II.</b>	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>19</b>
II . 1.	Matériels.....	20
II .1.1.	Sol .....	20
II .1.2.	Choix est caractérisation d' herbicides et leur dose :.....	20
II .1.3.	Préparation de l'isolat de <i>Rhodococcus fascians</i> .....	20
II .2.	Méthodes .....	21
II .2.1.	Les analyses physico-chimiques.....	21
II .3.	Montage expérimental .....	23
<b>III .</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.1.	Résultats des analyses de sol d'étude .....	<b>26</b>
III.1.2.	Interprétation physico-chimiques des sols des régions d'étude.....	33
III .2.	Effet de l'herbicide (2.4-D) sur l'évolution de l'azote nitrique ( $NO_3^-$ ) dans le sol ....	26

III .3. Effet d'une bioaugmentation de 2.4-D par <i>Rhodococcus fascians</i> sur l'évolution de l'azote nitrique (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) dans le sol .....	28
III .4. Effet de l'herbicide 2.4.D sur l'évolution du phosphore assimilable (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) dans le sol	30
III .5. Effet d'une bioaugmentation de 2.4.D par <i>Rhodococcus fascians</i> sur la disponibilité du phosphore assimilable dans le sol .....	31
<b>Conclusion .....</b>	<b>33</b>
Références .....	Erreur ! Signet non défini.
Annexe	
Tableau 2 : Analyse de la variance (Effet d'une bioaugmentation de 2.4-D par <i>Rhodococcus fascians</i> sur l'évolution de l'azote nitrique (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	44

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> Cycle de l'azote du sol (Nicolardot et al., 1997).....	8
<b>Figure 3</b> Cycle de phosphore (Shrivastava et al ., 2018). .....	11
<b>Figure 4</b> : Effet de 2.4-D sur l'évolution de l'azote nitrique (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) dans le sol de Halouia. ....	26
<b>Figure 5</b> Effet de bioaugmentation de 2.4-D par Rhodococcus fascians sur l'évolution de l'azote nitrique (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) dans le sol de Halouia. ....	28
<b>Figure 6</b> Effet d'herbicide 2.4-D sur la quantité de phosphore assimilable(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) dans le sol de Halouia. ....	30
<b>Figure 8</b> Effet de bioaugmentation de 2.4.D par Rhodococcus fascians sur l'évolution de phosphore assimilable(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) dans le sol de Halouia.....	31
L.....	31

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau -1</b> Classification des herbicides selon la famille chimique et le mode d'action (D'après Calvet et al., 2005). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau - 2</b> Caractéristiques macroscopiques (Mohanty., 1951 et Tilford., 1936). ...	17
<b>Tableau -3</b> caractéristiques microscopiques (Holt et al ., 1994).....	17
<b>Tableau -4</b> caractéristiques physico-chimiques de sol de Halouia	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau -5</b> Analyse de la variance .....	44
<b>Tableau- 6</b> Analyse de la variance .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau -7</b> Analyse de la variance .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Tableau- 8</b> Analyse de la variance .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

# Listes des abréviations

---

**2.4-D** Acide 2.4 dichlorophénoxyacétique

---

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** Nitrate

---

**R-NH<sub>3</sub>** Azote organique

---

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** Ammonium

---

**NH<sub>4</sub>** Ammoniac

---

**N<sub>2</sub>O** Azote gazeux

---

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** Nitrite

---

**P** Phosphore

---

**PO** Phosphore organique

---

**PI** Phosphore inorganique

---

**P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>** Phosphore assimilable

---

**H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>** Ion dihydrogénophosphate

---

**S** sol témoin

---

**SH** sol-herbicide

---

**SR** sol-*Rhodococcus fascians*

---

**SHR** Sol-Herbicide -*Rhodococcus fascians*

---

**SV** Source de variation

---

**DDL** Degré de liberté

---

**SCE** Somme carré d'écart

---

**CM** Carré moyen

---

**F<sub>cal</sub>** Facteur calculé

---

(\*) Significatif

---

(\*\*) Hautement significatif

---

(\*\*\*) Très hautement significatif

# **Introduction**

# Introduction

La pollution des sols est un problème mondial majeur qui tire ses origines de sources anthropiques. L'augmentation de la demande alimentaire nécessite l'utilisation de substances chimiques, les pesticides, qui sont jusqu'à présent le moyen de protection prépondérant contre les ravageurs des cultures. Au fil du temps, l'utilisation massive des pesticides a conduit à leur dissémination et persistance dans tous les milieux de l'environnement y compris le sol (**Carvalho, 2017**).

Parmi les différents pesticides pouvant se retrouver dans les sols suite à diverses activités humaines, figurent les herbicides. Les herbicides sont des produits phytosanitaires utilisés pour éliminer les plantes indésirables ou les mauvaises herbes. Ils sont largement utilisés dans l'agriculture moderne et constituant un moyen efficace et économique pour améliorer la quantité et la qualité des rendements (**Bose et al., 2014**). Toutefois, une application excessive des herbicides développe une résistance chez les mauvaises herbes, ainsi, lorsqu'ils sont utilisés en grande quantité, ils peuvent entraîner une pollution de l'eau et du sol, des dommages à la microflore et à la microfaune des sols, comme ils peuvent entraver également l'adsorption d'importants nutriments minéraux par les plantes (**Van der Werf., 1996**) reflétant ainsi le danger de ces produits phytosanitaires pour l'environnement (**Abong'o et al., 2014**).

En effet, les travaux de **Marsh et al., (1977)** et **Mazzatura et al., (2001)** ont démontré que les herbicides sulfonyles induisaient un effet toxique sur les bactéries nitrifiantes. De plus, l'effet négatif des herbicides sur la microflore des sols telluriques a été aussi observé dans différents travaux (**Cheloufi, 2012 ; Zouaoui et al., 2013**). Ainsi, les travaux de **Cheloufi et al., (2016)** montrent que les deux herbicides (Glyphosate et 2,4-D) semblent exercer des effets toxiques sur la microflore minéralisante du phosphore organique des sols.

Parmi les différentes techniques de bioremédiation et dépollution des sols, la bioaugmentation est une alternative intéressante aux autres procédés. Les techniques de remédiation des sols reposent sur les processus physico-chimiques, thermiques ou biologiques. La solution la plus efficace est l'utilisation des microorganismes tels que

les bactéries. En effet, 90% des bactéries présentes dans la nature sont utiles pour la biodépollution. La voie biologique est en plein essor et suscite de très nombreux travaux dans le monde (**Duchaufour, 2001, Lavelle *et al.*, 2005 ; Monard., 2008 ; Cheloufi., 2016 ; Cheloufi., 2017**).

Parmi les souches bactériennes employées dans le but de biodégradation des herbicides figure la bactérie *Rhodococcus sp.* Les espèces de *Rhodococcus* sont omniprésentes dans des environnements vierges et contaminés, survivent dans des conditions environnementales difficiles, rivalisent avec succès dans des populations bactériennes complexes et pourraient donc être utilisées efficacement dans des applications de bioremédiation (**Kuyukina, et Ivshina., 2019**). Dans les travaux de **Nagy *et al.*, (1995a ; 1995b)**, il a été démontré que la souche *Rhodococcus sp.* strain NI86/21 dégrade à la fois l'atrazine et le S-Ethyl Dipropylcarbamothioate (EPTC), deux herbicides de synthèse, et que la N-déalkylation de l'atrazine a été réalisée par une monooxygénase à cytochrome P-450 de type II.

C'est dans ce contexte que s'insère notre travail dont l'objectif principal est de développer une technique de bioaugmentation en introduisant une bactérie (*Rhodococcus fascians*) capable de dégrader un herbicide nommé 2.4-D ; dans le but de connaître si la dégradation de l'herbicide affecte ou non l'évolution de  $\text{NO}_3^-$  et de  $\text{P}_2\text{O}_5$  dans le sol et lorsqu'il on ajoute la bactérie, est ce que, peut- elle contribuer à une meilleure décomposition de cet herbicide ?

Ce manuscrit traite deux aspects suivants :

- 1- Effet de l'herbicide (2.4.D) sur l'évolution de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) et du phosphore assimilable ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) dans le sol.
- 2- Effet d'une bioaugmentation de 2.4.D par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) et de phosphore assimilable( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) dans le sol.

# **Partie bibliographie**

# 1. Généralités sur le sol

## 1.1 Définition de sol

Le sol se forme d'une modification naturelle des roches sous l'effet de l'eau, l'air et les organismes biologiques (**Boulaine., 1983**). Les pédologues considèrent le sol comme une partie de la lithosphère, biosphère, hydrosphère et atmosphère (**Brunet et Voltz., 2013**).

Selon **Duchaufour (2001)**, le sol est un milieu vivant dans lequel se développent une multitude d'organismes variés appartenant à tous les règnes du vivant (animal, végétal, champignons, bactéries....) ; cette biodiversité des sols est essentielle pour leur fertilité.

## 1.2. Composition de sol

Le sol est un milieu minéral poreux, composé de trois compartiments physiques :

### ❖ **Compartiment solide**

Ce compartiment est formé de deux types de composants ; des composants minéraux et des composants organiques. La phase solide du sol est caractérisée par sa richesse en micro-agrégats, cette dernière est constituée d'un ensemble de petits compartiments ou colloïdes (**Baize et Jabiol., 1995 ; Gobat et al., 1998**).

### ❖ **Compartiment liquide**

La phase liquide du sol (encore appelée solution du sol), est principalement constituée par l'eau, dans laquelle sont présents les ions minéraux et des molécules organiques (baize et jabiol. 1995). Cette phase permet le transport des pesticides à travers les pores de sol (Rao et al., 1974).

### ❖ **Compartiment gazeux**

La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol (**Soltner., 1986**). Cette phase renferme plusieurs gaz dont : oxygène, azote, dioxyde de carbone... (**Morel., 1996**).

### **1.3.Types de sol**

On peut classer les sols en quatre grands types:

- Sol sableux
- Sol limoneux
- Sol argileux
- Sol humifère (**Duchaufour., 2001**).

### **1.4. Fonctionnement du sol**

Les microorganismes telluriques sont indispensables à la dégradation biologique et la minéralisation des matières organiques et la production des nutriments pour les plantes. Ils sont de plus des agents majeurs de la production, mais aussi de l'élimination, des gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O). Ce sont les acteurs de la production des formes assimilables de l'azote, du phosphore, du soufre, du fer... et de la libération d'éléments nutritifs majeurs (K, Ca, Mg) et en traces (Cu, Zn, Co, Mn, etc.) qu'utilisent les plantes et les organismes du sol (**Berthelin., 1988 ; Uroz et al., 2015**).

Les microorganismes telluriques forment des associations (bénéfiques, antagonistes ou parasitaires) avec les plantes et la faune du sol : associations rhizosphériques symbiotiques (e.g., mycorhizes, nodules avec bactéries fixatrices d'azote) ou non symbiotiques (fixation d'azote) améliorant la nutrition et la croissance végétale ; associations synergiques avec divers animaux du sol : lombrics, termites, collemboles favorisant la minéralisation et l'humification des matières organiques et la structure du sol (**Lavelle et Spain., 2001**) ; associations pour la stimulation ou l'inhibition de la croissance, de la dynamique et de l'installation de communautés végétales. Ils sont des acteurs de la qualité des eaux, « épurateurs et agents de remédiation » de sols et sites pollués, de déchets. Certains de ces processus, comme la nitrification, sont connus depuis le début de la microbiologie des sols (**Davet., 1966 ; Dommergues et Mangenot., 1970 ; Alexander., 1971**).

## 2. Azote et phosphore dans le sol

### 2.1. Azote

#### 2.1.1. Définition

L'azote est un élément nutritif essentiel à la croissance des plantes par conséquent, il améliore la qualité et les rendements agricoles (**Metahri., 2012**). La croissance des plantes est limitée par la disponibilité de l'azote, donc c'est un élément limitant (**Barroin., 2003**). Il est présent dans le sol en petite quantité et il est considéré l'un des éléments chimiques les plus chers utilisé dans la production végétale (**Danso et Eskew., 1985**).

#### 2.1.2. Rôle de l'azote

L'azote joue un rôle essentielle dans la nutrition des plantes qui il est donc nécessaire à tous les stades : jeune, croissance, reproduction et mise en réserve (soltner ,2007).

L'azote est un constituant essentiel du cytoplasme car il favorise :

- La synthèse des glucides grâce à l'augmentation du nombre de chloroplastes.
- La constitution des réserves azotées dans les graines.
- La multiplication cellulaire donc la croissance des tissus.
- La multiplication des chloroplastes, puisque la chlorophylle est une substance azotée d'où la couleur vert foncée des plantes après d'un apport d'azote. C'est un facteur de rendement, et parfois de qualité , puisque il augmente la teneur en proteines de céréales et puis il est un des constituants de la chlorophylle qui commande l'opération fondamentale de la photosynthèse.

### 2.1.3. Source de l'azote

Selon **Nicolardot *et al* (1997)**, l'azote est un élément qui a une origine endogène (résidus de culture, exsudat racinaires) et exogène (amendement organique d'origine animale, végétal, urbaine...),

Dans le sol, la plus grande partie de l'azote (outre celle provenant de l'engrais) est présente dans la matière organique. Cette matière organique, pour la plus grande part, est non vivante, biologiquement stable et de faible dégradabilité (humus). L'autre partie de la matière organique du sol est constitué par la microfaune et la microflore (bactérie, champignons, actinomycètes...). Cette biomasse microbienne peut être considérée comme le moteur des transformations de l'azote du sol ; elle intervient comme un agent de dégradation.

### 2.1.4. Formes de l'azote dans le sol

Les différentes formes de l'azote correspondent aussi à différents états d'oxydation :

Azote organique  $\text{RNH}_3$  , l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et l'azote gazeux ( $\text{N}_2\text{O}$  ou  $\text{N}_2$ )(**Paul et Clark., 1998**).

### 2.1.5. Cycle de l'azote de sol

Le cycle de l'azote dans le système sol-plante-atmosphère est constitué par un grand nombre de transformations physico-chimiques et biologiques. La plupart de ces dernières sont sous le contrôle de microflore plus ou moins spécifiques (fixation, minéralisation, organisation, dénitrification), les formes minérales pouvant être considérées comme la plaque tournante d'une grande partie de ces processus (**Barroin *et al*, 1997 in Lemaire et Nicolardot, 1997**)

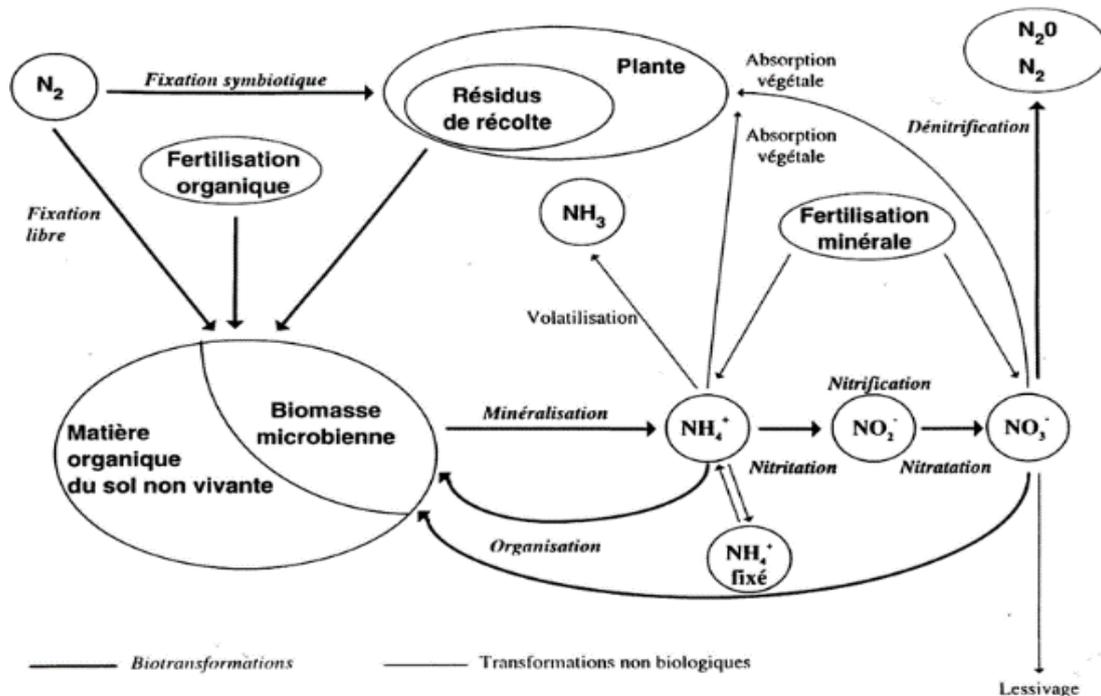


Figure 1 Cycle de l'azote du sol (Nicolardot *et al.*, 1997).

### 2.1.5.1. Fixation biologique

La fixation biologique est le passage de l'azote gazeux ( $N_2$ ) en azote organique sous l'action des microorganismes du sol (Stevenson., 1982). La fixation est symbiotique lorsqu'elle est réalisée par des bactéries, comme le *Rhizobium*. Elle est non-symbiotique lorsqu'elle est réalisée par des bactéries aérobies tel que *Azotobacter* et anaérobie stricte comme *Clostridium* (Herridge *et al.*, 2008).

Les conditions optimales pour une bonne fixation de l'azote comprennent un rapport carbone/azote élevé, une humidité adéquate et un pH neutre (Stevenson., 1982).

### 2.1.5.2. Ammonification

L'ammonification est la seconde étape de la minéralisation. Cette étape fait référence à toute réaction chimique dans laquelle les groupes  $NH_2$  sont convertis en ammoniac ou sa forme ionique, l'ammonium ( $NH_4^+$ ), en tant que produit final. Les bactéries et les micro-organismes apparentés tirent une énergie métaboliquement utile de l'oxydation de l'azote organique en ammonium. L'ammonium est alors disponible pour être assimilé et incorporé dans des acides aminés ou utilisé à d'autres fins métaboliques (Strock., 2008).

### 2.1.5.3. Nitrification

La nitrification est le processus par le quel les ions ammonium,  $\text{NH}_4^+$  sont oxydés en nitrites,  $\text{NO}_2^-$  et ensuite en nitrates,  $\text{NO}_3^-$ . Le processus est principalement réalisé par des bactéries aérobies du genre *Nitrosomonas* ou *Nitrobacter* (Paul et Clark., 1998). Ces microorganismes fonctionnent de façon optimale lorsque la température se situe entre 30 et 36°C (Gouin., 1974), lorsque la teneur en eau permet une aération suffisante et lorsque le pH est entre 6.8 et 8 (Paul et Clark., 1998).

### 2.1.5.4. Dénitrification

La dénitrification est la voie principale par laquelle l'azote passe du sol à l'atmosphère. La dénitrification biologique est la réduction des nitrates,  $\text{NO}_3^-$ , par des bactéries anaérobies principalement du genre *Pseudomonas*, qui utilisent les nitrates comme accepteurs d'électrons (Paul et Clark., 1998). Les conditions optimales pour la dénitrification sont : une température comprise entre 27 et 30°C (Gouin., 1974), un pH entre 6 et 8, une teneur en eau élevée limitant la diffusion d'oxygène, une concentration élevée en nitrate et la présence en quantité suffisante d'un composé donneur d'électron comme le carbone organique (Stevenson., 1982).

## 2.2. Phosphore

### 2.2.1. Définition

Le phosphore (P) est un élément minéral essentiel qui se trouve dans les roches, le sol, les plantes, les cadavres des animaux. Il est essentiel au métabolisme énergétique de toutes les formes de vie. De plus, il est important pour la croissance des plantes (Liu et Chen., 2008). Après l'azote, le phosphore est le deuxième nutriment le plus limitant. Il peut réduire la croissance et le développement des plantes et potentiellement limiter le rendement des cultures (Prasad et Chakraborty., 2019).

### 2.2.2. Formes de phosphore

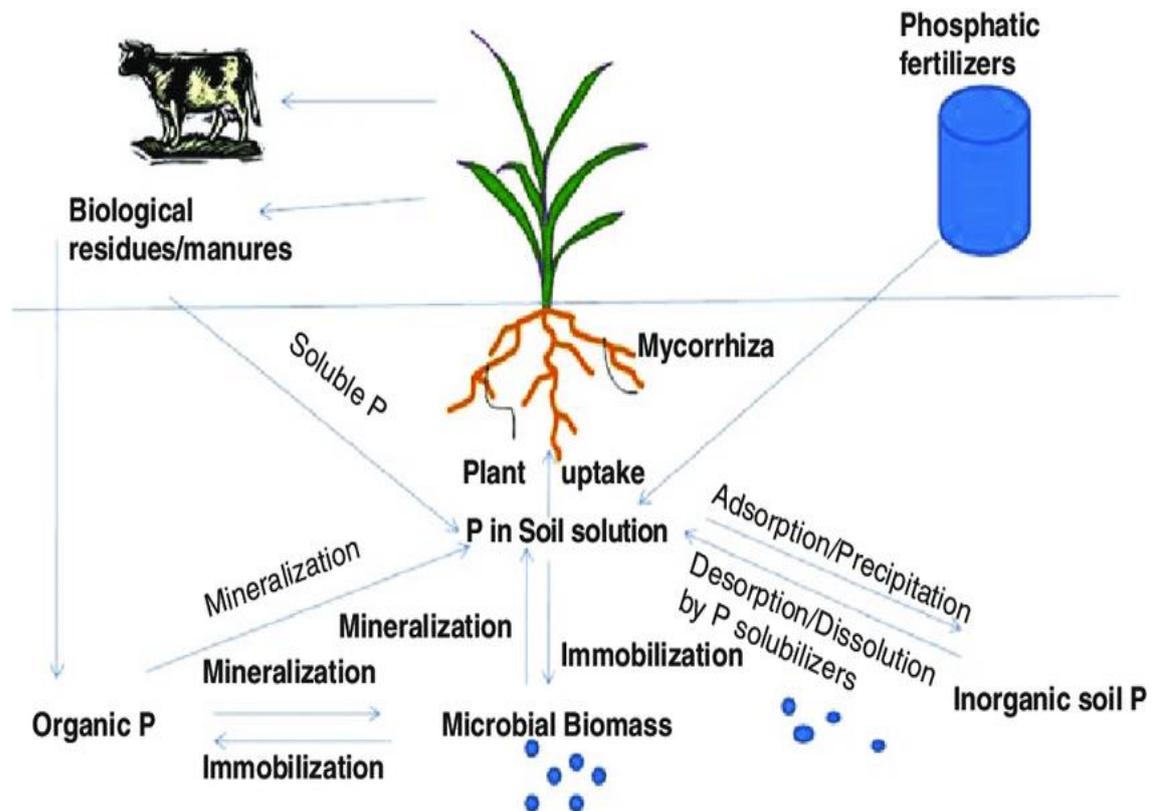
Dans le sol, le phosphore existe sous deux formes :

- **Phosphore organique(PO)** : il se trouve dans la matière organique et l'humus, il est susceptible de devenir assimilable grâce à l'action des micro-organismes et à la minéralisation de l'humus (**Scheiner., 2005**).
- **Phosphore inorganique(PI)** : il est principalement sous forme de phosphate, il pourrait être divisé en PI dans les minéraux, PI adsorbé et PI soluble (**Demers., 2008**).

### **2.2.3. Cycle de phosphore**

Le cycle naturel du P commence par la désintégration (physique, chimique et microbienne) des roches primaires d'apatite P. Dans ce cycle, les microbes jouent un rôle clé (oxydation et réduction des composés du phosphore) de sorte que nous pouvons les appeler "précurseur du cycle P". Après altération, le phosphore vient dans la solution du sol et s'incorpore dans le système sous différentes formes secondaires Pi et Po, dont la disponibilité est limitée (**Walker et Syers., 1976**).

Selon **Prasad et Chakraborty (2019)**, le phosphore circule entre plusieurs bassins du sol via des processus tels que la minéralisation, l'immobilisation, l'adsorption, la précipitation, la désorption, l'altération, et dissolution. La Figure 2 représente le cycle de P, et les paragraphes suivants résument les principaux processus impliqués.



**Figure 2** Cycle de phosphore (Shrivastava et al ., 2018).

### 2.2.3.1. Minéralisation

La minéralisation est un processus par lequel le phosphore organique du sol est converti en phosphore inorganique à l'aide de microbes du sol. Le processus de minéralisation de P est biologique et influencé par l'humidité du sol, la température, le pH, le rapport carbone et phosphore organique des résidus de culture ainsi que la population microbienne (Shrivastava *et al.* , 2018).

### 2.2.3.2. Adsorption-désorption

L'adsorption est un processus dans lequel le phosphore est présent dans la solution du sol fixé à la surface des particules du sol. La nature de ce processus est rapide et réversible. Le phosphore adsorbé peut être libéré dans la solution du sol via un processus de désorption et sera disponible pour l'absorption par les plantes.

Elle peut être s'expliquer par le transfert des ions phosphatés de la phase solide vers la solution du sol et vice-versa.

**2.2.3.3. Adsorption :** c'est le déplacement des ions phosphatés ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) de la solution du sol suite à des réactions chimiques. A court terme, les principaux facteurs responsables de l'absorption et de la fixation des ions phosphatés sont les oxydes d'aluminium et de fer libres ainsi que le calcium et le magnésium sous forme échangeables ou sous forme de carbonates (**Gagnon et Beaulieu, 2002**).

**2.2.3.4. Désorption :** c'est la libération du phosphore de la phase solide à la phase liquide. Ce phénomène a lieu suite à la diminution de la concentration en phosphore dans le sol par les prélèvements des plantes. Seulement une faible quantité des ions adsorbés peuvent être résorbés facilement (**Pierzynski *et al.*, 1990c**).

#### **2.2.3.5. Altération, précipitation et dissolution**

Le sol contient des minéraux riches en phosphore qui sont classés en minéraux primaires et secondaires. Ces derniers se décomposent au fil du temps (un processus appelé altération) et libèrent du phosphore dans la solution du sol pour l'absorption par les plantes.

La précipitation est un processus par lequel des ions métalliques réagissent avec les ions phosphates présents dans la solution du sol pour former leurs minéraux. La précipitation est un processus lent et implique une transformation permanente en phosphates métalliques qui peuvent libérer du phosphore dans la solution du sol lors de la dissolution. Cette dernière est une forme d'altération lorsque les minéraux phosphatés se dissolvent et libèrent du phosphate dans la solution du sol (**Shrivastava *et al.*, 2018**).

### **3. Acide Dichlorophenoxyacétique (2.4.D)**

#### **3.1. Définition**

Le 2,4-D ou 2,4-dichlorophénoxyacétique est un herbicide sélectif utilisé contre les dicotylédones. Sa sélectivité envers les dicotylédones l'inscrit dans le contingent des herbicides les plus employés pour lutter contre les adventices des cultures céréalières et des plantes vivaces de la famille des monocotylédones. Il est même utilisé en hygiène public pour l'entretien des pelouses. Il fait partie des auxines de synthèse et est classé dans les groupes 4 et O, respectivement par le Weed Science Society of America (WSSA) et le Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) (**Retzinger et MallorySmith, 2003**). Il provoque chez les dicotylédones, la stimulation des hormones naturelles, ce qui provoque la croissance cellulaire anormale suivie de la mort de la plante (**Grossmann, 2000; Song, 2014**).

#### **3.2. Effets de 2.4-D sur l'environnement**

Dégradation modérée dans le sol : Demi-vie de 10 jours. En quelques semaines biodégradation oxydative par la flore microbienne du sol, avec formation entre autres, de 2,4-Dichlorophénol. Dans l'Eau aérée, la demi-vie du 2,4-D est d'environ 15 jours. Toxicité modérée pour les Daphnies. Phytotoxicité importante, liée à la perturbation du métabolisme de nombreux Végétaux (**Chinalia R. S., 2007**).

#### **3.3. Toxicité de 2.4-D**

##### **3.3.1. Toxicité animale**

###### **3.3.1.1. Toxicité aigüe :**

- Irritation de tout le tractus respiratoire : bouche, trachée et bronches, entraînant éternuement, toux ;
- Irritation du tube digestif : nausées, vomissements... Irritation de la peau et des yeux ;
- Atteintes neuromusculaires : fatigue, crampes, convulsions (**Garabrant P., 2001**).

###### **3.3.1.2. Toxicité à long terme :**

- Irritation cutanée persistante : Eczéma, chloracné...
- Conjonctivite ;
- Atteintes hépatique et surtout rénale (**Garabrant P., 2001**).

### **3.3.2. Toxicité chez l'Homme**

#### **3.3.2.1. Toxicité aigüe et subaigüe :**

En générale la toxicité modérée, quel que soit la voie d'administration. Selon l'Union européenne, le 2,4-D serait faiblement irritant pour la peau et non sensibilisant. Par contre il est un irritant sévère pour les yeux. Il peut entraîner une diminution de l'appétit avec perte de poids par voie orale. Atteinte du foie, des reins et des glandes endocrines (thyroïde, surrénales, testicules...) (Onil ;saint-laurent.,2006).

#### **3.3.2.2. Toxicité à long terme :**

Selon OniS. L (2006), les travailleurs, exposés entre 5 et 10 ans, à des concentrations au-dessus de 6 mg/m<sup>3</sup>, fatigue généralisée, toux, vertiges, atteintes hépatiques et rénales. Selon le CIRC (1987), preuve limitée de cancérogénicité (lymphome nonhodgkinien). Le 2,4-D est un perturbateur endocrinien, agissant sur les glandes sexuelles (aménorrhée, avortement...) et sur la thyroïde. Pour les femmes enceintes et les jeunes enfants sont des populations à risque. Suite à la présence d'impuretés (dioxines), possibilités d'effets tératogènes.

### **3.4. Mécanisme d'action de 2,4-D**

Selon Bukowska(2005), les plantes, le 2,4-D agirait comme herbicide, mimant l'action hormonale de l'Auxine (Acide indole acétique), en activant la 1-Aminocyclopropane-1-carboxylicacid-Synthase (ACC Synthase) qui produit de l'Éthylène (une phytohormone) et secondairement de l'Anion cyanure (CN<sup>-</sup>), qui bloquerait la respiration cellulaire. Au niveau des cellules animales, par exemple sur les hépatocytes, il interviendrait principalement sur les mitochondries, en augmentant la formation des dérivés activés du Dioxygène (O<sup>2-</sup> . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO. ...), responsable de la peroxydation membranaire et de la déplétion du Glutathion, d'où l'augmentation de l'apoptose, entraînant la mort cellulaire.

## **4. Aperçu générale sur la bioaugmentation des herbicides par *Rhodococcus fascians* dans les sols agricoles.**

### **4.1. bioaugmentation**

#### **4.1.1. Définition et Principe**

Selon **Roudier(2005)** la bioaugmentation est un procédé pouvant s'appliquer à la fois *in situ* ou *ex situ*. Il consiste à ajouter des microorganismes dans la zone polluée afin d'augmenter la biodégradation des contaminants. Les micro-organismes ajoutés peuvent être étrangers au sol ou indigènes, cultivés *ex situ* puis réinjectés. Le procédé de bioaugmentation est envisagé lorsque la biostimulation de la flore indigène ne parvient pas à augmenter les vitesses de biodégradation.

#### **4.1.2. Effet de bio-augmentation des herbicides sur la production du phosphore $P_2O_5$ et d'azote $NO_3^-$**

Il existe des impacts négatifs de l'utilisation des herbicides, se manifestant par des changements dans les communautés microbiennes du sol , les cycles biogéochimiques , des altérations de la nutrition des plantes ,de la fertilité des sols et une contamination environnementale persistante (Pileggi et al., 2020).

De nombreux micro-organismes utilisent des herbicides comme seules sources de nutriments pour leur croissance et leur survie dans l'environnement. Le processus de sélection naturelle améliore l'aptitude des micro-organismes hébergeant des gènes de dégradation des herbicides. Cela a conduit à certains aspects positifs des effets des herbicides sur la diversité microbienne (**Weissenbach., 2019**).

L'application des herbicides à base de thiocarbamate , dinitroaniline et chloroacétamide ont augmenté la biomasse microbienne , probablement due à une dégradation directe ou via des processus Co-métaboliques. Cela a augmenté la disponibilité de l'azote et du phosphore dans le sol et a entraîné une minéralisation plus élevée de ces herbicides (**Barman et Das, 2015**).

La dépollution des sols agricoles par le 2,4-D ont été testées à l'aide de techniques de bio-augmentation qui n'ont pas montré une bonne efficacité en raison du faible taux de survie des souches dégradantes, car les conditions de laboratoire ne peuvent pas reproduire les conditions stressantes du milieu naturel . Une alternative serait introduit des plasmides

contenant des gènes de dégradation du 2,4-D dans des bactéries indigènes, qui sont bien adaptées à l'environnement (**Kumar et al., 2016**).

## **4.2. Actinomycetes : Rhodococcus fascians**

### **4.2.1. Généralité sur la bactérie**

*Rhodococcus fascians* est une bactérie phytopathogène à Gram positives, organismes aérobie chemoorganotrophiques avec un métabolisme oxydatif, capable d'utiliser un large gamme de composés organiques comme source d'énergie (source carbone) (**Goodfellow et al ., 1998 ; Jones et Goodfellow 2010**). Cette bactérie est placée actuellement dans les producteurs d'acides mycoliques (**Zhi et al ., 2009**).

Cette bactérie infecte les plantes dicotylédones et monocotylédones, produisant des denses de pousses feuilles déformées proche au niveau du sol qui stimule la croissance anormale des tissus végétaux et perturbe les niveaux normaux d'hormones végétales en particulier les auxines et les cytokinines (**Putnam et Miller ., 2007**).

### **4.2.2. Taxonomie**

- ✓ **Domaine:** Bacteria
- ✓ **Embranchement :** Actinobacteria [phylum]
- ✓ **Classe:** Actinobacteria
- ✓ **Sous classe:** Actinobacteridae
- ✓ **Ordre:** Actinomycetales
- ✓ **Sous ordre:** Corynebacterineae
- ✓ **Famille:** Nocardiaceae
- ✓ **Genre:** Rhodococcus
- ✓ **Espèce:** *Rhodococcus fascians* (**Tilford., 1936 ; Goodfellow., 1984**).

## **4.3. Caractéristique morphologique**

### **4.3.1..caractéristiques macroscopiques de *Rhodococcus fascians*.**

Tableau 1-**Caractéristiques macroscopiques *Rhodococcus fascians*.**

(Mohanty., 1951 et Tilford., 1936).

Forme	taille	Élévation	Aspect	Contour	consistance	opacité	Pigmentation
Colonies rondes	3-4mm	convexe	Lisse et rugueuse	filamenteux	muqueuse	translucide	Rouge et orange lors de l'addition de peptone.

#### 4.3.2. Caractéristiques microscopiques *Rhodococcus fascians*.

Tableau 2- **caractéristiques microscopiques *Rhodococcus fascians*.**

(Holt et al., 1994).

Gram	spore	mobilité
positive	Non sporulant	immobile

#### 4.4. Caractéristiques biochimiques

Ils ont des parois cellulaires de chémotype IV, ce qui signifie que l'acide diamino dans le peptidoglycane est l'acide méso-diaminopimélique et que les principaux sucres sont l'arabinose et du galactose (Goodfellow., 1989).

#### 4.5. Caractéristiques génétiques

La plupart des génomes de *Rhodococcus* vont de 4 à 9 Mb et ont une teneur élevée en GC (van der Geize&Dijkhuizen., 2004).

*Rhodococcus fascians* est le seul phytopathogène qui contient un plasmide de virulence linéaire, Dans la souche D188 la mieux étudiée, il est nommé plasmide pFiD188 (Stes et al., 2013).

#### 4.6. *Rhodococcus* dans la biotechnologie

Le genre *Rhodococcus* ont un grand nombre d'enzymes qui leur permettent d'effectuer plusieurs biocatalyses et les réactions de dégradation ayant une pertinences industrielle (Bell et al., 1998), Larkin , Kulakov et Allen 2006). les *Rhodococcus* ont révélé être capables de dégrader une large gamme de composés naturels et des xénobiotiques hydrophobes. La résistance cellulaire démontrée et la dégradation de tous ces composés sont liées au génome de cellules (Larkin, Kulakov et Allen(2005). la

mobilisation des grandes plasmides linéaires et la présence de plusieurs homologues d'enzymes dans les voies cataboliques (**Van der et Dijkhuizen (2004) (Iarkin , Kulakov et Allen 2006).**

# **Matériels et Méthodes**

## **II.1. Matériels**

### **II.1.1. Sol**

#### **1.2. But, choix et situation des sols**

Afin d'étudier l'effet de la bioaugmentation d'un herbicide sur l'évolution de l'azote nitrique et phosphore assimilable dans les sols agricoles du périmètre irrigable de Mitidja, Nous avons choisis un sol de texture vertisol. Il est situé dans la région de Halouia occupé en alternance par des cultures légumineuses et les agrumes.

#### **1.3. Prélèvement et traitement des échantillons**

Les prélèvements des terres ont été effectués de la couche arable (30 cm) au mois de mars 2022, destinés aux analyses physico-chimiques d'une part et d'autre part à l'étude expérimentale. Nous avons prélevé environ 4 kilogrammes de sol à l'aide d'une tarière, séché à température ambiante, broyé et tamisés à 2 mm. Une partie des sols destinés à l'expérimentation et l'autre partie (1kg) destiné aux analyses physico-chimiques qui sont mentionnées dans le tableau (tab1)

#### **1.4. Choix est caractérisation d'herbicides et leur dose**

Le choix de désherbant couramment utilisé en Algérie. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (également noté 2,4-D) : est un désherbant d'organochlorés chimique de formule de base  $C_8H_6Cl_2O_3$ . Cristal incolore ou poudre blanche sans odeur. Sélectif contre les mauvaises herbes mais inactif sur pelouse et céréales, leur dose est 2,4  $\mu g \cdot 300g$  de sol.

#### **1.5. Préparation de l'isolat de *Rhodococcus fasciens***

C'est une souche bactérienne indigène de sol de Gram positif. Leur dose est de  $10^9$  UFC. Il est utilisé pour bioaugmenter la microflore indigène du sol. L'inoculum est constitué de suspension liquide riche par une biomasse bactérienne préparée à partir de la souche ayant le temps de génération le plus court (25 min). Une relation relative entre la multiplication bactérienne et l'évolution de  $NO_3^-$  ou  $P_2O_5$ .

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Les analyses physico-chimiques**

#### **2.1.1. La granulométrie**

La texture du sol a été déterminée selon la méthode employant la pipette Robinson. En effet, après attaque, dans une éprouvette, de 20 g de sol tamisé à 2 mm par l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 110 v et dispersion des particules par l'hexametaphosphore de Na, il est ensuite procédé au prélèvement après agitation à la pipette de Robinson de 10 ml de la suspension après environ 8 heures de décantation. Le pourcentage d'argile est calculé après séchage à l'étuve à 105 °C et pesée de la charge solide contenue dans les 10 ml prélevés à la pipette Robinson. Pour la détermination des différentes classes texturales, le diagramme utilisé est le triangle de textures GEPPA (**Baize D., 1995**).

#### **2.1.2. La capacité de rétention en eau**

La méthode consiste à saturer le sol avec de l'eau et laisser ressuyer pendant 48 h. On effectue une pesée à l'état humide puis l'échantillon est mis à l'étuve à 105°C pour une dessiccation. La différence de poids correspond à l'eau de la capacité de rétention.

#### **2.1.3. Potentiel d'hydrogène (PH)**

La mesure du pH a été réalisée par la méthode électrométrique à l'aide d'un pH mètre avec un rapport sol/eau 1/2,5.

#### **2.1.4. Conductivité électrique (CE)**

La conductivité électrique exprimée en (dS/m) a été mesurée à l'aide d'un conductimètre et selon un rapport (sol/eau = 1/5) (**Aubert, 1978**).

#### **2.1.5. Calcaire total**

Le calcaire total est dosé par la méthode gazométrique en utilisant le calcimètre de Bernard; la méthode consiste à décomposer les carbonates du sol par l'acide de HCL (6N) et à mesurer le volume de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) dégagé.

#### **2.1.6. Carbone organique**

Le carbone organique est dosé par la méthode ANNE où il est oxydé par du bichromate de potassium K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> à 8% en milieu sulfurique à chaud. L'excès de bichromates de potassium est titré par une solution de sel de Mohr.

La matière organique est obtenue par la formule suivante : **MO % = C % x 1,72.**

### **2.1.7. Azote total (méthode de Kjeldhal)**

Cette méthode consiste en une minéralisation de la matière organique à chaud par de l'acide sulfurique concentré  $H_2SO_4$  en présence de catalyseurs  $CuSO_4$  et  $K_2SO_4$ . L'azote ammoniacal ( $NH_4^+$ ) produit est piégé, après une distillation dans la première solution d'acide borique 4 %. Nous dosons l'azote total après une titration avec de l'acide sulfurique  $H_2SO_4$ .

### **2.1.8. Dosage de l'azote minéral (l'azote ammoniacal, l'azote nitrique)**

Le dosage de l'azote minéral s'effectue selon la méthode de **Drouineau et Gouny in Bonneau et Souchier, (1979)**. Cette technique de dosage consiste à extraire l'ammonium et les nitrates par une solution saline de ( $CaCl_2$ , 1N). Après extraction des sels ammoniacaux et des nitrates sur la même prise d'essai, il sera procédé à la distillation, par l'ajout d'une solution de soude NaOH. Dans un premier temps de l'ammonium sera piégé dans de l'acide borique 1% puis dosé par titration à l'aide de l'acide sulfurique à N/10 et en présence d'un indicateur de pH. Le même procédé sera utilisé pour le dosage de l'azote nitrique mais après sa transformation à l'état gazeux (azote ammoniacal) par l'adjonction de l'alliage de Dewarda.

### **2.1.9. La capacité d'échange cationique (CEC)**

La CEC a été déterminée par la méthode de Metson. Cela consiste à saturer le sol à l'aide d'acétate d'ammonium 1N à pH 7. Celui-ci déplace les bases et l'acidité échangeable du complexe adsorbant (Les bases échangeables Ca, Mg sont dosées par spectrophotométrie, K et Na sont dosées par photomètre à flamme, dans la 1ere solution d'acétate d'ammonium récoltée). Concernant la détermination de la capacité d'échanges cationiques, l'ammonium fixé sera déplacé à son tour par une solution de KCl (M) puis distillé et dosé par une solution de  $H_2SO_4$ .

### **2.1.10. Phosphore assimilable 'méthode Olsen'**

Selon **Olsen(1954)** l'extraction est réalisée dans une solution de bicarbonate de sodium. Le dosage est basé sur la formation et la réduction d'un complexe formé par l'acide phosphorique et l'acide molybdique. Le complexe phospho-molybdique, sous l'effet de la chaleur et en présence d'acide ascorbique développe une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de la solution en orthophosphates.

### II.3. Montage expérimental

La bioaugmentation de 2,4-D par *Rhodococcus fascians* et leurs effets sur la biodisponibilité du phosphore assimilable ( $P_{2O_5}$ ) et des nitrates ( $NO_3^-$ ). Leur principe consiste à ajouter des micro-organismes dans le sol mélangé avec l'herbicide, afin d'augmenter le taux de biodégradation de ce xénobiotique.

La technique d'incubation des flacons suivra la minéralisation de l'azote organique et le phosphore par l'incubation d'un mélange sol- herbicide- bactérie, dans un étuve à l'obscurité.

Le dispositif expérimental que nous avons mis en place est un dispositif en Split-plot en blocs à trois répétitions. Le dispositif expérimental comporte 4 traitements et 3 répétitions. Nous avons comparé les traitements inoculés (SR, SHR) à ceux non inoculés (S, SH). La cinétique de minéralisation (l'azote et le phosphore assimilable) est suivie pendant la période d'expérimentation avec les pas de temps suivants : 0, 3, 7, 9, 11, 21, 28 et 39 jours. Chaque traitement a subi deux dosages ( $P_{2O_5}$ ,  $NO_3^-$ )

Cette étude a été effectuée en conditions contrôlées à la température de 30°C dans l'étuve à l'obscurité. Le volume d'eau ajouté a été calculé pour obtenir 70 % de la capacité de rétention en tenant compte de l'apport de la solution d'herbicide et la quantité de l'inoculum. Ce taux d'humidité permet une activité optimale des microorganismes et facilite la diffusion des substrats au sein de l'échantillon. Pour l'inoculation nous avons adopté la méthode d'Holben, soit l'introduction de  $10^9$  UFC dans le sol qui contient déjà une population microbienne (Holben *et al.*, 1994).

# **Résultats et discussion**

### III.1. Résultats des analyses de sol d'étude

**Tableau 3** caractéristiques physico-chimiques de sol de Halouia

Caractéristiques physico-chimiques	Unité de mesure	Sol de Halouia	
<b>Granulométrie</b>	%	<b>Sable</b>	30
		<b>Limon</b>	33
		<b>Argile</b>	37
<b>Classes texturale</b>	Triangle de texture GEPPA	Argile limoneuses	
<b>PH</b>	-	7.79	
<b>Conductivité électrique CE</b>	μS/CM	105	
<b>Capacité de rétention en eau CR</b>	%	34.52	
<b>Calcaire total</b>	%	T	
<b>K</b>	PPM	150.31	
<b>Na</b>	Meq /100g	0.42	
<b>Mg</b>	Meq/100g	1.79	
<b>Ca</b>	Meq/100g	18.19	
<b>CEC</b>	Meq/100g	85	
<b>P (OLSEN)</b>	Ppm	6.30	
<b>Nt</b>	%	0.19	
<b>C</b>	%	2.11	
<b>C / N</b>	-	11.105	

#### III.1.1. Interprétation physico-chimiques des sols des régions d'étude

Le tableau1 représente les résultats d'analyse de sol qui montre que le sol est une texture très argileuse (vertisol) de sol de Halouia, un pH légèrement alcalin(7,79), une conductivité électrique(CE) très élevé (105). Un taux de calcaire nul, la capacité de rétention est de (34,52%) et la capacité d'échange cationique est 85 méq/100g de sol.

Le carbone organique est de 2,11% et également donne le taux de la matière organique est de 3,62 (moyen), La teneur on *N* est atteint 0.19% qui donne un rapport C/N 11,105, ce rapport est un indicateur qui exprime le bon fonctionnement du sol. On conclure que le sol est favorable pour l'agriculture (**Ragaswami et Bagyaraj 2005**).

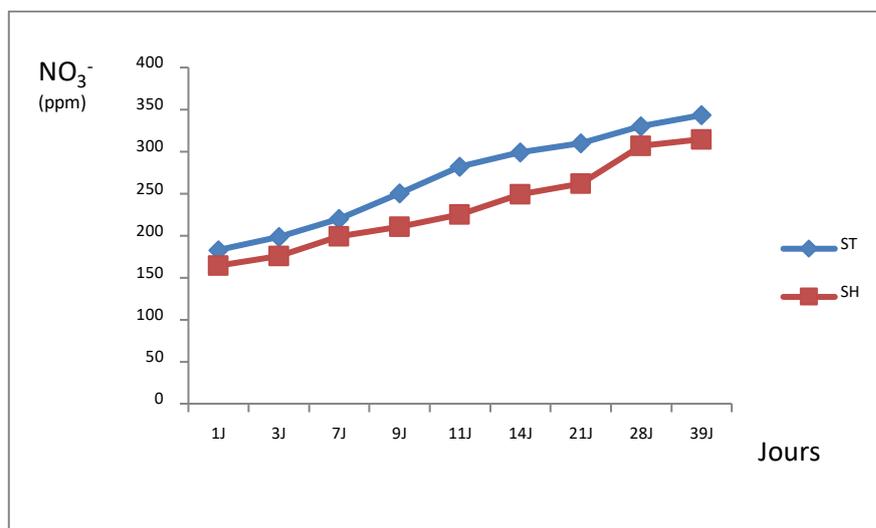
### III.2. Analyse des résultats :

Les traitements statistiques des analyses de variance à deux facteurs (herbicide-bactérie) à été effectués avec le logiciel Minitab.13D.

Les graphes ont été réalisés par le logiciel excel 2010.

#### III.2.1. Effet de l'herbicide (2.4-D) sur l'évolution de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) dans le sol

La **Figure (3)** représente l'évolution de l'azote nitrique dans le sol de Halouia sous l'effet de l'herbicide 2.4-D.



**Figure 3 :** Effet de 2.4-D sur l'évolution de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) dans le sol de Halouia.

ST : sol témoin                      SH : sol-hericide

Les deux courbes expriment la variation de la quantité de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) (ppm) en fonction du temps (jours).

Après 39 jours d'incubation, on observe :

- Dans la courbe SH (sol traité par 2.4-D) : la quantité de ( $\text{NO}_3^-$ ) augmente progressivement jusqu'à devenir 300 ppm.

- Dans la courbe ST (sol sans 2,4-D) : la quantité de  $(\text{NO}_3^-)$  aussi augmente progressivement jusqu'à ce qu'elle arrive à une valeur de 350 ppm.

Cela signifie que, l'addition de l'herbicide au sol influence négativement sur l'évolution de  $(\text{NO}_3^-)$ , on constate que, la quantité de l'azote nitrique dans le sol traité par l'herbicide est diminuée par rapport à la quantité de  $(\text{NO}_3^-)$  dans le sol sans herbicide. Cette diminution de la quantité de l'azote nitrique pourrait être due à la perturbation et au dysfonctionnement des activités enzymatiques des souches microbiennes nitrifiantes du sol sous l'action de l'herbicide (Soulas., 1999).

Nos résultats confirment l'effet inhibiteur des herbicides sur la nitrification et sont en concordance avec ceux de Cheloufi et al., (2017b) et Cheloufi., (2012). De plus, Cheloufi et al., (2013b) ont noté une inhibition par certains herbicides tels que le Topic et ZOOM vis-à-vis l'ammonification et la nitrification. Aussi, Cheloufi., 2019, confirme l'action inhibitrice des herbicides sur les souches microbiennes et leurs activités. En effet, les résultats de Cheloufi., (2019) montrent que cinq souches bactériennes, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysylae*, *Enterobacter cloacae* et *Azotobacter* sont affectées fortement par l'effet de 2,4-D et Glyphosate dans les sols sableux. Les quatre souches bactériennes (*Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysylae* et *Azotobacter*) ont été très sensibles à l'effet des deux herbicides (2,4-D et Glyphosate). En outre, la souche *Rhizobium* a été stimulée par le 2,4-D, mais réprimée par le Glyphosate.

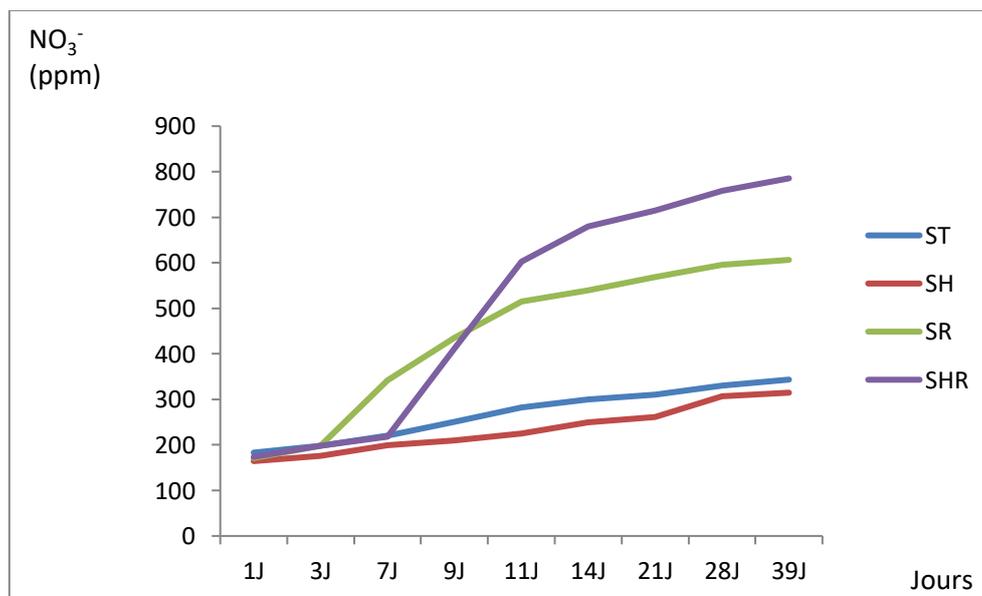
L'analyse de l'évolution de la quantité de  $(\text{NO}_3^-)$  en fonction du temps (jours) révèle que la quantité de l'azote nitrique évolue lentement et progressivement entre le 1<sup>er</sup> jour et le 11<sup>eme</sup> jour ; cela indique que les microorganismes de sol ne sont pas encore adaptés à la dégradation de cet herbicide. Entre le 11<sup>eme</sup> jour et le 21<sup>eme</sup> jour la quantité de  $\text{NO}_3^-$  évolue rapidement par rapport aux premiers jours ; cela indique que les microorganismes commencent à s'adapter à la dégradation de 2,4-D. Dans ce sens, Barruiso et houot ., (1996), ont révélé que les microorganismes s'adaptent à la présence de l'atrazine, un herbicide appartenant à la famille chimique des triazines, dont l'effet s'est traduit par une minéralisation plus ou moins rapide de l'herbicide. Ensuite, 21 à 39 jours, il est noté que la quantité de  $\text{NO}_3^-$  évolue plus rapidement que les jours précédents; donc on déduit que l'usage des herbicides à long terme peut entraîner une adaptation des bactéries de sol à sa dégradation (Monard., 2008).

Ces résultats concordent avec ceux de **Martin *et al.*, (1991)** et **Naik *et al.*, (2007)** qui démontrèrent que les herbicides affectent les aspects microbiologiques du sol, la pollution de l'environnement et peuvent comporter un risque pour la santé, en entraînant des altérations de l'équilibre écologique de la microflore du sol. En outre, **Aleem *et al.*, (2003)** confirment que les herbicides provoquent des changements permanents dans la microflore du sol. De plus, les travaux de **Reinhardt *et al.*, (2008)** et ceux de **Sachin., (2009)** montrent que les herbicides nuisent à la fertilité du sol, inhibent l'activité de l'azote, suppriment les bactéries nitrifiantes et celles l'ammonificatrices et altèrent l'équilibre azoté du sol.

Il est noté de ce fait une différence hautement significative (Annexe) au plan de l'intensité (quantité et vitesse) du processus de nitrification dans le système sol et le système sol-herbicide ; autrement dit, cet herbicide exerce un effet d'inhibition très intense sur cette activité microbienne dans le sol.

### III.2.2. Effet d'une bioaugmentation de 2.4-D par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de l'azote nitrique (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dans le sol.

La Figure (4) représente l'effet de bioaugmentation par *Rhodococcus fascians* de 2.4-D sur l'évolution de l'azote nitrique dans le sol de Halouia.



**Figure 4 :** Effet de bioaugmentation de 2.4-D par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de l'azote nitrique (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dans le sol de Halouia.

ST : Sol témoin    SH :sol-herbicide    SR : sol-*Rhodococcus fascians*    SHR : sol-herbicide-*Rhodococcus fascians*

L'analyse des résultats consignés dans la figure (4) révèle un effet positif d'une bioaugmentation par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) dans le sol de Halouia. Les teneurs en  $\text{NO}_3^-$  sont relativement plus élevées dans les deux systèmes inoculés « SHR » et « SR ». Ainsi, nous notons les quantités de 785.33 ppm et de 606.33 ppm dans ces deux systèmes. Cependant, nous enregistrons des valeurs réduites dans les deux systèmes témoins « S » et « SH » non inoculés: 343.33 ppm et 314.66 ppm de  $\text{NO}_3^-$  respectivement.

De ce fait, la bioaugmentation des systèmes Sol-herbicide par la souche de *Rhodococcus fascians* accroît la densité bactérienne et permet aux microorganismes de dégrader le 2,4-D, dont l'effet est toxique vis-à-vis des microflore et de minéraliser l'azote organique. Cet effet positif de la bioaugmentation des sols traités par les herbicides a été noté par **Cheloufi et al., (2017)** et **Cheloufi et al., (2016)**. Cette bioaugmentation a un effet positif sur la quantité de  $\text{NO}_3^-$  libéré. Plusieurs souches bactériennes capables d'utiliser le 2,4-D comme seule source de carbone et d'énergie ont été décrites (**Marron et al., 2006 ; Baelum et al., 2010 ; Sandoval-Carrasco et al., 2013**).

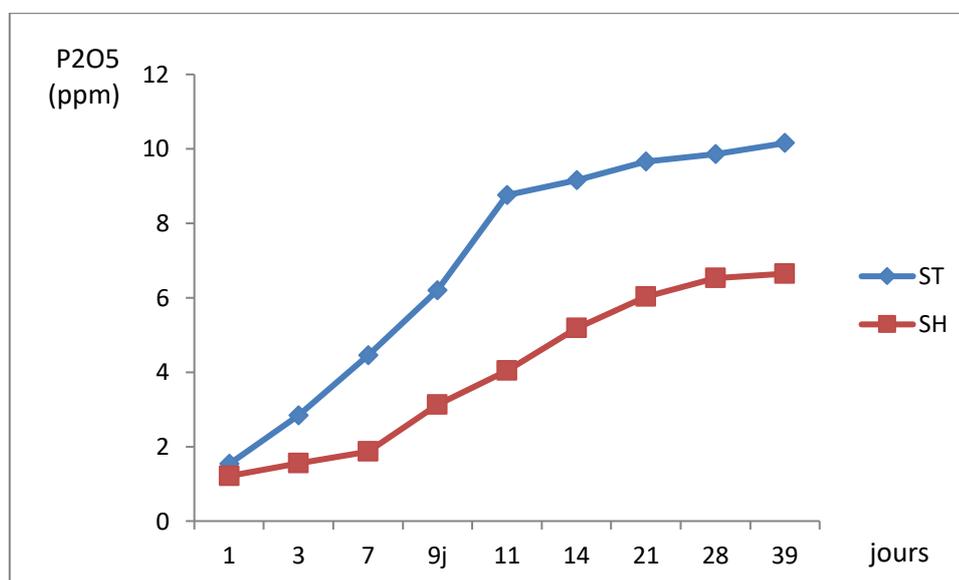
Ces résultats concordent avec ceux de **Belkouri et al., (2009)** qui démontrèrent que le Granstar<sup>®</sup> stimule la croissance de certains actinomycètes notamment *Saccharomonospora* et *Microbiospora* qui assurent avec d'autres microorganismes la fourniture de l'azote minéral dans les sols. L'étude de **Cheloufi., 2019** révèle que le Glyphosate et 2,4-D entraînent une stimulation de la croissance et de la survie de quatre genres d'actinomycètes dans le sol (S1), ce sont *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura* et *Microbiospora*. Alors que le genre *Rhodococcus* stimule le 2,4-D, toutefois, devient sensible au Glyphosate. Cet herbicide (2,4-D) est plus ou moins métabolisé par les actinomycètes et représente souvent une source de carbone et d'énergie pour besoin nutritionnel (**Cheloufi et al., 2016**).

La sélection de souche est fondée sur le principe que certains micro-organismes sont mieux adaptés à certaines activités cataboliques et certains environnements que d'autres (**Fantroussi et Agathos., 2005 ; Charissou et Lejeune., 2009**).

Les résultats des analyses de la variance (Annexe) montrent que la bioaugmentation des sols traités par les herbicides entraîne une amélioration hautement significativement de la production de  $\text{NO}_3^-$  dans le sol de Halouia traité par le 2,4-D.

### III.2.3. Effet de l'herbicide 2.4-D sur l'évolution du phosphore assimilable ( $P_2O_5$ ) dans le sol

Nos résultats révèlent que le 2.4-D induit, sur une période de 39 jours d'incubation, la production dans le sol de 6.64 ppm de phosphore assimilable. Cependant, la quantité de cet élément atteint 10.64 ppm dans le système témoin S (Figure 5).



**Figure 5 :** Effet d'herbicide 2.4-D sur la quantité de phosphore assimilable( $P_2O_5$ ) dans le sol de Halouia.

ST : sol témoin    SH : sol-herbicide

Ces résultats concordent avec les travaux de **Cheloufi., (2017)**. Il y a, de ce fait, un effet négatif de ces produits ayant réduit l'activité des microorganismes mobilisant cet élément majeur, soit en réduisant la densité et la typologie des germes telluriques (**Rengel et Wheal., 1997**), soit encore en inactivant les cellules microbiennes et en perturbant leur métabolisme (**Sannino et Gianfreda., 2001**).

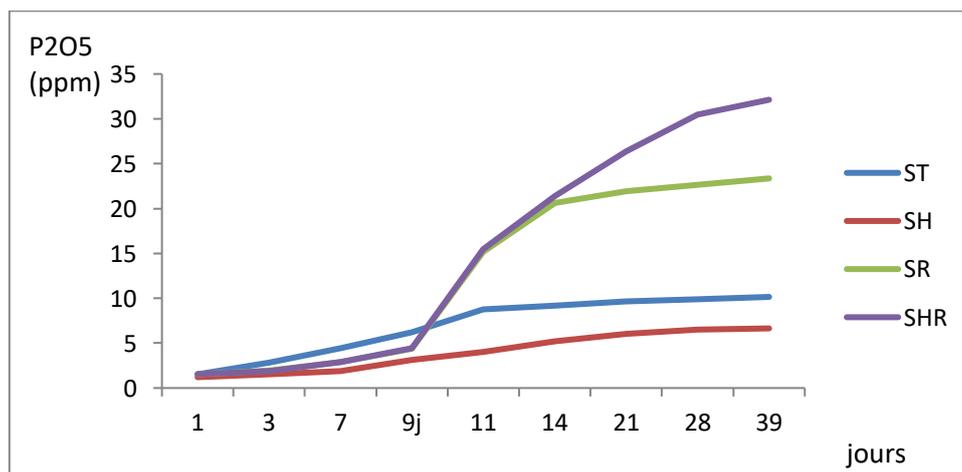
Au plan de la cinétique de mobilisation du phosphore dans le système sol-2.4-D, l'examen de courbe (Figure05), fait ressortir l'existence de trois phases. Les activités microbiennes se caractérisent par une période de latence probable plus au moins la première semaine, durant laquelle il y a production de 1.87 ppm dans le système « SH ». La période allant de 7 à 28 jours se caractérise par la disponibilité du phosphore ou les quantités atteignent 6.52 ppm. Au-delà du 18<sup>ème</sup> jour, nous notons une diminution des quantités de  $P_2O_5$  jusqu'au le dernier jour (39<sup>ème</sup> jour).

Dans le système témoin, il y aurait deux phases principales : une phase 0 – 11 jours et une phase 11–39 jours. La première se caractérise par une augmentation de l'intensité de la mobilisation du phosphore. Cependant, la deuxième phase est une phase de réduction de l'activité microbienne.

De leur côté, **Cheloufi *et al.*, (2017 b)** montrent indéniablement un effet inhibiteur qui est lié au type de sols et à la nature chimique de Glyphosate et 2.4-D ; ces deux herbicides provoquent une diminution de la biodégradation des macromolécules (Po) et cela entraîne une augmentation du taux d'inhibition surtout dans le traitement sol sableux - 2.4-D.

Il est noté de ce fait une différence significative (Annexe) au plan de l'intensité (quantité et vitesse) du processus de la mobilisation du phosphore dans le système sol et le système sol herbicide ; autrement dit, cet herbicide exerce un effet d'inhibition très intense sur cette activité microbienne dans le sol.

### III.2.4. Effet d'une bioaugmentation de 2.4.D par *Rhodococcus fascians* sur la disponibilité du phosphore assimilable dans le sol



**Figure 6 :** Effet de bioaugmentation de 2.4.D par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de phosphore assimilable(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) dans le sol de Halouia

ST : Sol témoin    SH :sol-herbicide    SR : sol-*Rhodococcus fascians*    SHR : sol-herbicide-*Rhodococcus fascians*

L'examen des résultats (Figure6), obtenus sur une période de 39 jours d'incubation, révèle que l'inoculation des systèmes sol-herbicide par une souche de *Rhodococcus fascians*(10<sup>9</sup> bactéries/kg) provoque une augmentation de la libération du phosphore

assimilable. En effet, nous avons noté les quantités de 32.12 ppm et 23.36 ppm dans les échantillons SHR et SR comparativement aux deux témoins SH et S, nous enregistrons 6.64 ppm et 10.15 ppm respectivement.

Il en résulte une meilleure mobilisation microbienne du phosphore et éventuellement une dégradation des molécules des herbicides par les souches de *Rhodococcus*. Cette meilleure mobilisation du phosphore, à cause d'une part, de la stimulation de 2.4-D l'actinomycète *Rhodococcus fascians* (Cheloufi., 2019) et d'autre part, que cet substrat toxique peut être dans certaines conditions, utilisé comme une source de C, N et P pour les microflores du sol (Van Eerd *et al.*, 2003)

Au plan de la cinétique de mobilisation du phosphore assimilable (Figure6), nous distinguons trois phases ; la première s'étale une semaine (0- 7 jours) et se caractérise par une solubilisation très lente. Nous enregistrons les quantités de 4.46 ppm et de 6.19 ppm dans les systèmes SHR et SR contre 3.12 ppm et de 6.02 ppm dans les systèmes témoins, SH et S.

Par la suite, nous observons une période d'activité biologique intense qui s'étale jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour et qui se caractérise par la production de 30.45 ppm et 22.64 ppm respectivement dans les systèmes SHR et SH. Enfin, une phase plus ou moins diminuée, c'est une période qui s'étale entre 28 – 39 j, nous y observons un phénomène de régression c'est-à-dire une baisse des quantités de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dans les traitements SR et SHR. Cette diminution peut être aussi due aux réactions d'immobilisation.

Les résultats des analyses de la variance (Annexe), montrent que la bio-augmentation des sols traités par le 2.4-D améliore significativement la production et l'évolution de phosphore assimilable dans le sol de Halouia .

# Conclusion

L'effet nocif des herbicides dans les sols est devenu une menace sérieuse pour l'environnement. Pour cela, à mieux décrire l'effet des pollutions de sol par l'herbicide d'une côté, et d'autre côté les essais de bioremédiation et leur effet sur la production des éléments majeurs.

A cet effet, nous avons choisis une technique de bioaugmentation basé à inoculé le sol par un microorganisme, puis l'incubé les traitements dans des boites en condition de laboratoire contrôlé (30°C et 2/3 CR) en vue d'étudier la décomposition de 2.4-D par une actinomycète appelé *Rhodococcus fascians* et leur effet sur la libération de l'azote et de phosphore (N et P).

Il ressort de cette étude les points suivants ;

- une influence hautement significative négative de l'herbicide 2.4-D sur la production de l'azote nitrique  $\text{NO}_3^-$  dans le sol. Ainsi, Il est noté de ce fait, une différence au plan de l'intensité (quantité et vitesse) du processus de nitrification dans le système sol et le système sol-herbicide.
- la bioaugmentation de 2.4-D par la souche de *Rhodococcus fascians* accroît la densité bactérienne et permet aux microorganismes de dégrader le 2.4-D, donc, elle influence positivement l'évolution de  $\text{NO}_3^-$  dans le sol de Halouia.
- un effet significatif négatif de 2.4-D sur l'évolution et la production de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .
- la bioaugmentation à base de *Rhodococcus fascians* provoque une augmentation de la libération du phosphore assimilable. Il en résulte une meilleure mobilisation microbienne du phosphore et éventuellement une dégradation d'herbicide par cette souche dans le sol de Halouia.

Les résultats obtenus dans notre étude sont probants et méritent d'être plus approfondies. De là, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les principales sont les suivantes :

- ✓ Elargir l'étude à d'autres souches microbiennes cibles ;
- ✓ Réaliser des études sur le terrain (*in situ*) sous conditions naturelles.
- ✓ Tester d'autres types de sols et appliquer d'autres herbicides pour évaluer leur dégradation par les souches bactériennes testées.

- ✓ Réaliser des études approfondies sur les interactions entre la souche apportée et les microorganismes indigènes et mettre en évidence une éventuelle synergie ou antagonisme.
- ✓ Evaluer les mécanismes possibles de la biodégradation des pesticides par les différentes souches.

# Références

---

- Abong'o, D., Wandiga, S., Jumba, I., Madadi, V., & Kylin, H. (2014).** Impacts des pesticides sur la santé humaine et l'environnement dans le bassin versant de la rivière Nyando, Kenya. *Int J Hum Arts Med Sci* 2(3):1-14.
- Agoussar, A. (2017).** Effet des pesticides sur la diversité bactérienne des champs agricoles et la capacité des bactéries à les dégrader.
- Aleem, A., Isar, J., & Malik, A. (2003).** Impact of long-term application of industrial Wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizobacter soil *Bioresour Technol.* 86(1):7-13.
- Alexander, M. (1977).** *Introduction to Soil Microbiology, Second Edition.*
- Aubert, G. (1978).** Méthodes d'analyses des sols. 2ème Edition, Centre régional de Documentation Pédagogique, CRDP Marseille, 191 p.
- Baize, D. (1995).** *Guide pour la description des sols-paris, INRA, coll.*
- Barman, A et Das, C. (2015).** Residual effect of pre-emergence herbicides on microbial activities in relation to mineralization of C,N and P in the Gangetic alluvial soil of west Bengal. India.
- Barroin, G. (2003).** *phosphore, azote et prolifération des végétaux aquatiques.*
- Barruiso, E., Calvet, R., & Schiavon M, S. (1996).** Les pesticides et les polluants organiques des sols, transformation et dissipation : le sol, un patrimoine menacé ? Paris, 24 Octobre (numéro spécial) pp279 – 296.
- Bassil, K., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D., kaur, J., & Kerr, K. (2007).** Cancer santé 585 effets des pesticides: revue systématique. *Boite Fam . Médecin*, V.
- Bell, K., Philp, & christofi, N. (1998).** A review of the genus *Rhodococcus* . *J .Appl Microbiol.*
- Berthelin, J. (1988).** Microbial weathering processes in natural environments. 33-59.
- Bonneau et Souchier, B. (1979).** constituant et propriétés du sol , Tome2.
- Bose, A., & Mozumdar, S. (2014).** Utilisation mondiale de pesticides. dans : livraison ciblée de pesticides à l'aide de nanoparticules polymères biodégradables.

- Bose, A., Kumar, A., & Mozumdar, s. (2014).** *Trends and Limitations in Chemical-Based Pest Management. In: Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. SpringerBriefs in Molecular Science.* (N. D. Springer, Éd.)
- Bose, A., Kumar, R., & Mozumdar, A. (2014).** Utilisation mondiale de pesticides. Dans : livraison ciblée de pesticides à l'aide de nanoparticules polymères biodégradables.
- Bouilly, K., Bonnard, M., Cagnaire, B., Renault, T., & Lapègue, S. (2007).** Impact du diuron sur l'aneuploidie et les paramètres hématologiques chez l'huitre creuse du pacifique *Crassostrea gigas*. *Cambre . Environ contam Toxicol.*
- Boulaine, j. (1983).** v.v.dokouchaev et les débuts de la pédologie. 285-306.
- Bouron H. (1990).** le désherbage des céréales à la sortie de l'hiver. Dossier Spécial.ITCF.
- Brunet yves et voltz, M. (2013).** les sols: éléments d'un cycle dynamique. CNRS Editions.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M., & Coquet, Y. (2005).** *les pesticides dans le sol-conséquences agronomiques et environnementales.* editions France agricole. paris.
- Carvalho, F. .. (2017).** Pesticides , environment , and food safety. Food and energy security.
- Charissou, A. I. (2009).** Etat de l'art sur les potentialités des techniques de bioaugmentation dans le traitement des déchets , sédiments et sols pollués .
- Cheloufi, R. (2012).** Influence de deux herbicides sur la minéralisation du sols(W El tarf) Thèse de magister, université El tarf).100.
- Cheloufi, R., & Zouaoui, H. e. (2013).** impact of herbicides upon dynamic of nitrogen in soils Albanian *j.agric,sci.p:375-381.*
- Cheloufi, R., Alayat, H., & Messaadia, H. (2017c).** Effet d'un apport de deux types de fumiers de bétail sur la biodégradation de deux herbicides(Glyphosate et 2.4-D) dans les sols agricoles de périmètre irrigable de bounamoussa,extrême Nord EST Algérien *Afrique Science.13(5);161-173 .*
- Cheloufi, R., Messaadia, H., & Alayat, H. (2016).** The Bio-augmentation of Glyphosate and 2.4-D By *Pseudomonas Aeruginosa* In Two Soil Types of The Bounamoussa Irrigable Perimeter (Algerian Exterme Northeast): Effects on Bioavailability of Assimilable Phosphorus( $P_2O_5$ ) and nitrates  $NO_3^-$ .

- Cheloufi, R., Messaadia, H., & Alayat, H. (2017a).** Biodegradation of Herbicides by *Pseudomonas aeruginosa* in two Soils Types of the Bou Namoussa irrigable perimeter (Algerian Extreme Northeast): Effects on mineral nutrition (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and NO<sub>3</sub>).
- Cheloufi, R., Messaadia, H., et Alayat, H. (2017b).** Effet du glyphosate et 2.4-D sur la production du CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans les sols du périmètre irrigable de Bounamoussa. *Revue des BioRessources*. 7(1);92-106.97.
- Chinalia F, R.-S. M. ( 2007 ).** *2,4-D Toxicity: Cause, Effect and Control Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology 1(2), 24-33.* Global Science Books.
- Danso, S. e. (1985).** comment renforcer la fixation biologique de l'azote. *FAO/AIEA Bulletin, 26(2), 29-32.*
- Davet, p. (1996).** *Vie microbienne du sol et production végétale* . Editions Quae.
- Demers, I. (2008).** formes et disponibilité du phosphore de composts utilisés comme amendements de sol agricoles.
- Dommergues, y. e. (1970).** *ecologie microbienne du sol* .
- Duchaufour, P. (2001).** Introduction à la science du sol : Sol,Végétation et environnement.6ème édition MASSON.
- Dumont, K. e. (2001).** In field wheat nitrogen assessment using hyperspectral imaging techniques. *Agro Montpellier. Montpellier, France.(June2001), 905-910.*
- Fantroussi, S., & Agathos, S. (2005).** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? current opinion in microbiology. 268-75
- Gagnon, E. e. (2002).** Utilisation du phosphore dans les engrais de démarrage.
- Garabrant D.H, P. M. (2001 ).** *Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Epidemiology and Toxicology.* *Critical Reviews in Toxicology, 32(4):233–257.*
- Gauvrit, C. (1996).** Efficacité et sélectivité des herbicides . 1-168.
- Gobat, J.-M. ,. (2010).** *le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols.* PPUR Presses polytechniques. 817 pages.
- Goodfellow, & al. (1998).** In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, 2nd Edn.*
- Goodfellow, M. (1989).** gENUS rhodococcus Zopf 1891,28 al in williams ST? Sharpe ,M.E, Holt JG. *Bergey's Manual of Systématique Bactériologie, vol4.* Williams and wilkins, baltimore. 1-28p.

- Goodfellow. (1984).** la relation entre la virulence et la production de cytokinine par *Rhodococcus Fascians*. Plant Pathology 45(2):323 - 331.
- Gouin, D. (1974).** Influence de l'inondation d'un sol sur les bactéries actives dans le cycle de l'azote. mémoire de maîtrise. Université du Québec, INRS-Eau. Ste-Foy, Canada. 163 P.
- Gupta, P. (2004).** Pesticide exposure\_Indian scene. *Toxicology*. 83-90.
- Guzzella, L., Pozzoni, F., et Giuliano, G. (2006).** Contamination par les herbicides des eaux souterraines superficielles dans le nord de l'Italie. Pollution de l'environnement.
- Hamadache, A. (1995).** Les mauvaises herbes des grandes cultures (Biologie, Ecologie, moyen de lutte) ITGC, 40p.
- Hanke, W., & Jurewicz, J. (2004).** Le risque de troubles indésirables de la reproduction et du développement dus à l'exposition professionnelle aux pesticides: un aperçu des preuves épidémiologiques actuelles. *Int.J.Occup.Méd Environ .Santé*, V.
- Hernández, A., Parron, T., & Alarcon, R. (2011).** Pesticides et asthme. *Courant Avis.Allergie clin.Immunol*;V.11.
- HM, V. d. (1996).** évaluation de l'impact des pesticides sur l'environnement. écosystème agricole *Environ* 60(2-3):81-96.
- Holben, J. C. (2010).** Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. *Systematic and Applied Microbiology*. Volume 33, Issue 2 Pages 67-70.
- Holben, W., Tiedje, J., et Joka. (1994).** Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. . 1106-1115p
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (1994).** *Bergey's manual of determinative Bacteriology*. 9th ed Baltimore, MD, USA: Williams; Wilkins.
- Jones, A., & Goodfellow, M. (2010).** Genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) .1-28.
- Kadra, N. (1977).** Désherbage des céréales. IDGC, Créaliculture, 2, 2 . 2, 36p.

- Kumar, A. .. (2016).** Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. 194-208.
- Kuyukina, M. S., et Ivshina, I. B. (2019).** Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus*. In *biology of Rhodococcus*. pp.231-270.
- Larkin, M., & Kulakov, L. C. (2006).** Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology and genetic adaptation *Adv Appl Microbiol.*
- Larkin, M., Kulakov, L., & Allen, C. (2005).**
- Lavelle, P. a. (2005).** *Soil Ecology, Chapter 3: Soil Organisms*, Springer: New Delhi, India.
- Lavelle, P. e. (2001).** *Soil Ecology*. Springer; 2005e édition. 654 p
- Liu Y, C. J. (2008).** Phosphorus cycle, in S.E.Jorgensen and B. Fath (ed), *Encyclopedia of ecology*. Academic press, Oxford, pp. 2715 - 2724.
- Machane, Y. (2008).** Efficacité des herbicides les plus utilisés dans la culture de blé dur, de la région de Sétif. 106 pages.
- Marron, E., Ruiz-ordaz, N., Rubio-Granados, C., Juarez-Ramirez, C., & Galindez-Mayer, C. (2006).** 2,4-D degrading bacterial consortium isolation, Kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochemistry*, Pages 1521-1528.
- Marsh, J. D. (1977).** The effect of herbicides on respiration and transformation of nitrogen in two soils I. Metribuzin and glyphosate. Pages 77-82.
- Martin, A. N. (1991).** étude Pédologique du Comté de Chambly (Québec),” Agriculture Canada, Sainte-Foy, Contribution No. 89-26 p
- Mazzatura, A., Scranò, L., Scopa, A., & Chovelon, J. (2001).** Effet des sulfonilurées de première et de deuxième génération sur les propriétés biochimiques et microbiologiques d'un sol.
- Metahri, M. S. (2012).** Elimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées par des procédés mixtes: cas de la STEP est de la ville de Tizi Ouzou. université Mouloud Mammeri. 1-172p.

**Mohanty, U. (1951).** *Corynebacterium fascians* (Tiflord) Dowson; its morphology, physiology, nutrition and taxonomic position. *Transaction of the British mycological society* 34:23–34.

**Monard, C., Binet, F., et Vandenkoornhuyse, P. (2008a).** Short-term response of soil bacteria to carbon enrichment in different soil microsites. *Appl Environ Microbiol.*;74:5589–5592.

**Morel, R. (1996).** *Les sols cultivés*. Technique and documentation-Lavoisier.

**Moura, M., Franco, D., & Matallo, M. (2008).** Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. *Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária*.

**Nagy, I., F, et Compernelle, K. a. (1995).** A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC(S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Applied and environmental microbiology*.

**Naik, A., Eranna, N., & suresh, C. (2007).** influence of azotobacter chroococcum strain on growth and biomass of *Adiantum vasica* nees. 613-615p.

**Nezzal, M. (1973).** Méthodes générales d'application des substances herbicides en céréaliculture. Séminaire National sur le désherbage des céréales d'hiver. *Mara*.14-21p.

**Nicolardot, B., Mary, B., Houot, S., & Recous, S. (1997).** La dynamique de l'azote dans les sols cultivés. 209p.

**Olsen. (1954).** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. p. 18-19.

**Onil, S., & Saint-Laurent, L. (2006).** *Profil toxicologique du 2,4-D et risques à la santé associés à l'utilisation de l'herbicide en milieu urbain. Institut national de santé publique du Québec.*

**Paul, E. A., et Clarck, F. E. (1998).** Soil microbiology and biochemistry. 563-566 p.

**Pierzynski, G. T. (1990c).** Phosphorus chemistry and mineralogy in excessively fertilized soils : Descriptions of phosphorus-rich particles. *Soil Sci.Soc.* 1576-1583.

**Pileggi, M., Pileggi, a., Michael, a., & Sadowsky, J. b. (2020).** Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities.

**Poupée, R., & Peto, R. (1981).** les causes du cancer: estimations quantitatives des risques évitables de cancer aux Etats-Unis aujourd'hui *Journal National cancer Institute*, V.1191-308.

- Prasad, R., & Chakraborty, d. (2019).** Phosphorus Basic : Understanding phosphorus Forms and Their Cycling in the soil- Alabama Cooperative Extension System. 1-4.
- Putnam, M. M. (2007).** Rhodococcus fascians in herbaceous perennials. Plant.1-13.
- Ragaswami, G., et Bagyaraj, D. (1993).** Agricultural microbiology , 2nd edn, prentice-hall of india private limited, new delhi , india.
- Rao, P. S., Green, R. E., Balasubramanian, V., & Kanehiro, Y. (1974).** Field Study of Solute Movement in a Highly Aggregated Oxisol with Intermittent Flooding: II. Picloram. 197-202.
- Rengel, Z. (1997).** Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. plant and soil.255–260p.
- Retzinger E.J., M.-S. C. ((1997)).** *Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies.* Weed Technology, 11: 384– 393.
- Roman, E., Beckie, H., Vargas, L., Hall, L., & Rizzardi, M. T. (2007).** Comofuncionam os herbicidas da biologia à aplicação. Passo Fundo. Brésil.
- Roudier, P. (2005).** Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués.
- Sandoval-Carrasco, C., et Ahuatzzi-chacon, D. (2013).** biodégradation of a mixture of the herbicides ametryn and 2.4-D in a compartmentalized biofilm reactor.
- Sannino, F., & Gianfreda, L. (2001).** Pesticide influence on soil enzymatic activities. Chemosphere 45, 417–425.
- Scheiner, & David, J. (2005).** *Spéciation du carbone , de l'azote et du phosphore de différentes boues de stations d'épuration au cours de leurs incubations contrôlées dans deux sol.*
- Shrivastava, M., Srivastava, P., et D'Souza, S. (2018).** *Phosphate-Solubilizing Microbes, Diversity and Phosphates solubilization Mechanism.*
- Soltner, D. (1986).** Les bases de la production végétale.Tome1: Le sol et son amélioration. collection science et techniques agricoles.472 p.
- Soltner, D. (1986).** *Les bases de la production végtale* (éd. 14ème édition).
- Soulas, G. (1999).** Techniques d'évaluation de l'écotoxicité des substances xénobiotiques vis-à-vis de la microflore des sols. INRA-CMSE, Microbiologie des sols. 65 p.

- Stes, E. F. (2013).** La galle feuillue syndrome induit par *Rhodococcus fascians*. *lettres de microbiologie FEMS*, 342, 187-194.
- Stevenson, F. (1982).** *Organique Forms of soil nitrogen*.
- Strock, J. (2008).** *Encyclopedia of Ecology*.
- Tilford, P. (1936).** Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp. *Agricultural research*.
- Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P., & Turpault, M.-P. (2011).** Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in microbiology* . 820-831p.
- Van der Geize, R., & Dijkhuizen, L. (2004).** Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological application .
- Van der Geize, R., & Dijkhuizen, L. (2004).** Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *curr opin microbiol*.
- Van der Werf, H. (1996).** évaluation de l'impact des pesticides sur l'environnement. *écosystème agricole Environ* 60(2-3):81-96.
- Van Eerd, L., Hoagland, R., & Hall, R. Z. (2003).** Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci*. 51:472-495.
- Vance, C. p. (2001).** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology*.
- walker, T. e. (1976).** The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma*. 1-19.
- Weissenbach, J. (2019).** Exploring biochemical diversity in bacteria.
- Winogradsky, S. (1890).** Recherche sur les organismes de la nitrification . *Ann.Inst.Pasteur*.
- Ying, G.-G., et Williams, B. (2000).** étude en laboratoire sur l'interaction entre les herbicides et les sédiments dans les systèmes aquatiques. *Pollution de l'environnement*. 283-289p.
- Zeliger, H. (2011).** *Toxicologie humaine des mélanges chimiques. Dans : Conséquences toxiques au delà de l'impact d'un produit à un composant et des expositions environnementales* (éd. 2e édition ). Oxford. 1-185p.
- Zhi, X. L. (2009).** 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.

## Annexe

**Tableau 01** : Analyse de la variance (Effet de 2.4-D sur la nitrification)

SV	DDL	SCE	CM	Fcal
Facteur	1	23450	23450	
Résiduelle	16	54670	3416.8	6.86**
<b>Totaux</b>	17	78120		

Tableau 2 : Analyse de la variance (Effet d'une bioaugmentation de 2.4-D par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de l'azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ))

SV	DDL	SCE	CM	Fcal
Facteur	2	5870	2935	
Résiduelle	16	6790	424.37	6.91**
<b>Totaux</b>	26	12660		

Tableau 3 : Analyse de la variance (Effet de 2.4-D sur l'évolution de phosphore)

SV	DDL	SCE	CM	Fcal
Facteur	2	6590	3295	
Résiduelle	16	24300	1518.75	2.16*
<b>Totaux</b>	26	30890		

Tableau 4 : Analyse de variance ((Effet d'une bioaugmentation de 2.4-D par *Rhodococcus fascians* sur l'évolution de Phosphore assimilable  $P_2O_5$ ).

SV	DDL	SCE	CM	Fcal
Facteur	2	4350	2175	
Résiduelle	16	8965	550.31	3.95*
<b>Totaux</b>	26	13315		