

N° d'ordre.....

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU



UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE /
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE

CENTRE DE RECHERCHES
EN SCIENCES BIOLOGIQUES ALIMENTAIRES
ET NUTRITIONNELLES (CRSBAN)

THESE

DE DOCTORAT DE SPECIALITE SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES OPTION : BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE (MICROBIOLOGIE)

Présentée par **Paul Windinpsidi SAVADOGO**

Sur le thème :

**ETUDE DE LA BIODEGRADATION ANAEROBIE DES PESTICIDES
UTILISES EN AGRICULTURE AU BURKINA FASO :
CAS PARTICULIERS DU DECIS, DE L'ULTRACIDE ET DU SUMITHION**

Soutenue le 17 Décembre 2001 devant la commission d'examen :

Président : M. Mawuena Y. D. GUMEDZOE, Professeur, Université de Lomé, TOGO

Membres : M. Alfred S. TRAORE, Professeur, Université de Ouagadougou, (BF)
M. Aboubakar S. OUATTARA, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou, (BF)
M. Michel P. SEDOGO, Directeur de Recherches, C.N.R.S.T, (BF)
M. Marc LABAT, Chargé de Recherches, IRD, Marseille, FRANCE

DEDICACE

A la mémoire de mon père Joanny et de mon frère François Marie Borgia qui nous ont quitté très tôt.

A

Mon épouse Berthe et à ma fille Kévine j'offre le fruit de mon travail en témoignage de mon affection.

A

Ma mère, mes frères, mes sœurs ainsi qu'à tous mes amis.

A

Tous ceux qui ont un objectif noble dans la vie pour les inciter à persévérer.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé au Centre de Recherches en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) du département de Biochimie-Microbiologie de l'Université de Ouagadougou.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon Directeur de thèse et Directeur du CRSBAN, le Professeur **Alfred S. TRAORE**, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire pendant tout mon troisième cycle. J'ai bénéficié de son encadrement scientifique et de son soutien moral et matériel. C'est lui qui m'a inculqué l'esprit et la rigueur scientifique. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Monsieur **Mawuena Y. D. GUMEDZOE**, Professeur, Docteur-ingénieur agronome à Université de Lomé au Togo, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que Président du Jury.

C'est un grand honneur que me fait Monsieur **Michel P. SEDOGO**, Directeur de Recherches, Délégué Général du CNRST, de juger mon travail. Qu'il me permette de lui adresser mes sincères remerciements.

Monsieur **Marc LABAT**, Chargé de Recherches au Laboratoire de Microbiologie de l'IRD de Marseille après avoir beaucoup contribué à la réalisation de ce travail me fait l'honneur de siéger dans ce Jury. Je lui exprime ma gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à mon Maître de thèse, Monsieur **Aboubakar S. OUATTARA**, Maître de Conférences à l'Unité de Formation et de Recherche –Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), pour son inestimable contribution à ma formation et à la réalisation de ce travail. Je n'oublie pas également son soutien moral lors de mes expériences douloureuses.

- A Monsieur **Cheick A. T. OUATTARA**, Maître Assistant à l'UFR-SVT, pour sa contribution à ma formation et sa disponibilité renouvelée.

- A Monsieur **Philippe A. NIKIEMA** Maître Assistant à l'UFR-SVT, pour la riche bibliographie qu'il m'a offert Pour son soutien matériel je lui dis merci.

- A Monsieur **Nicolas BARRO** Maître Assistant à l'UFR-SVT, pour ses encouragements et ses conseils judicieux.

- A Monsieur **Dayéri DIANOU** pour la riche bibliographie qu'il m'a offert et pour ses conseils.

- A Monsieur **Ezokasi C. ASSIH**, et à toute l'équipe du **Laboratoire IRD de Microbiologie** à Marseille en France, pour avoir réalisé gratuitement des analyses entrant dans le cadre de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

- A Madame **Odile G. NACOULMA**, Maître de Conférences à l'UFR-SVT, Monsieur **Augustin BERE**, Maître de Conférences à l'UFR-SVT, Madame **Bonafos KOUDA**, Maître de Conférences de chimie à l'UFR-SEA, Monsieur **Gnissa KONATE**, Directeur de Recherches à l'INERA, Madame **Nadine OUATTARA** au CNRFP, pour leur disponibilité, leurs conseils et leurs encouragements qui ont efficacement contribué à la réalisation de ce présent travail.

- A mes camarades **Mamoudou H. DICKO** et **Marcel D. BENGALY** ainsi qu'à tous les étudiants de 3^{ème} cycle de Biochimie et Microbiologie pour leur soutien moral et matériel tout au long de mon séjour au laboratoire.

- A toute la grande famille du CRSBAN, secrétaire, techniciens et chauffeurs pour leur patience leur compréhension et leurs contributions diverses à la réalisation de ce travail.

J'exprime enfin ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail.

RESUME

La biodégradation de six pesticides parmi les plus utilisés en agriculture au Burkina Faso a été réalisée en conditions anaérobies. La biométhanisation a permis de montrer que le Décis, l'Ultracide et le Sumithion sont les plus récalcitrants. Ces trois pesticides ont été retenus pour une étude visant l'optimisation de leur biodégradation. Une période d'acclimatation de deux ans a permis d'obtenir des inocula constitués de consortia de microorganismes performants, capables de réaliser la dégradation de ces trois pesticides à des concentrations de 20, 50 et 100mg/l. Après deux ans d'acclimatation les taux d'épuration ont montré une amélioration des rendements d'épuration de 21,6% pour le Decis, 13,6% pour l'Ultracide et de 15% pour le Sumithion. Ces résultats prouvent que l'acclimatation des inocula augmentait leur capacité biodégradante. La cinétique de dégradation a montré que la biodégradation anaérobie de 20 mg/l de Decis est réalisée en 10 jours. Lorsque la concentration en Decis atteint 50mg/l cette biodégradation nécessite 30 jours. La biodégradation de 100 mg/l de Decis est réalisée en 50 jours. La biodégradation de 20 mg/l, 50 mg/l et 100mg/l de Sumithion est réalisée respectivement en 15 jours, 25 jours et 45 jours. Enfin la biodégradation de 20 mg/l, et 50 mg/l d'Ultracide nécessite respectivement 30 et 55 jours d'incubations. A partir de 100 mg/l la biodégradation anaérobie de l'Ultracide requière plus de 60 jours d'incubation. L'Ultracide s'est avéré particulièrement récalcitrant à la biodégradation anaérobie. Notre étude a montré que la biodégradation du Decis et du Sumithion est totale et que les produits de dégradation sont des gaz tels que le CO₂, le N₂, le CH₄ et le H₂S. Des bactéries dénitrifiantes, des bactéries sulfatoréductrices et des bactéries méthanogènes pourraient être impliquées dans cette biodégradation.

L'isolement et la caractérisation partielle d'une souche bactérienne capable de dégrader le Decis nommée DX et d'une souche capable de dégrader le Sumithion et nommée SY a été réalisée. La souche SY a été identifiée comme appartenant au genre *Bacillus*, tandis que la souche DX qui est un cocci immobile, sporulés et Gram négatif, est en cours d'identification.

Mots clés : Biodégradation anaérobie, Pesticides, Decis, Sumithion, Ultracide, Acclimatation, Burkina Faso

ABSTRACT

Biodegradation of six pesticides among the most used in agriculture in Burkina Faso was tested in anaerobic conditions. Decis, Ultracide and Sumithion were the most recalcitrant as revealed by biomethanization. Therefore, they were retained for their biodegradation optimization study. A two years acclimatation period permit to obtain inocula made up of consortia of powerful microorganisms, able to carry out the degradation of these three pesticides to concentrations of 20, 50 and 100 mg/l. After two years of acclimatation, epuration rates were improved by 21.6% for Decis, 13.6% for Ultracide and 15% for Sumithion. Acclimatation of inocula increased their pesticides biodegradation ability. The kinetics of degradation showed that the anaerobic biodegradation of 20 mg/l of Decis is achieved in 10 days. When the concentration of Decis reached 50 mg/l this biodegradation required 30 days. The biodegradation of 100 mg/l of Decis is performed within 50 days. The biodegradation of 20 mg/l, 50 mg/l and 100 mg/l of Sumithion is carried out respectively in 15 days, 25 days and 45 days. Biodegradation of 20 mg/l, and 50 mg/l of Ultracide requires respectively 30 and 55 days. From 100 mg/l the biodegradation of Ultracide required more than 60 days. Ultracide was particularly recalcitrant to anaerobic biodegradation. Biodegradation of Decis and Sumithion was total and that the breakdown products are gases such as CO₂, N₂, CH₄ and H₂S. Denitrifying bacteria, sulfate reducing bacteria and methanogenic bacteria were presumed to be involved in anaerobic biodegradation of these pesticides. Isolation and partial characterization of a strain able to catabolise Decis named DX and of a strain able to degrade Sumithion and named SY were realized. Strain SY was identified as a member of the genus *Bacillus*. Strain DX is a non motile, spore forming coccus and Gram negative and its identification is in progress.

Key-words: Anaerobic biodegradation, Pesticides, Decis, Ultracide, Sumithion, Acclimatation, Burkina Faso

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1-1-Généralités sur les pesticides.....	6
1-1-1-Introduction.....	6
1-1-2-Les différents groupes de pesticides.....	6
1-1-2-1-Les organochlorés.....	6
1-1-2-2-Les organophosphorés.....	7
1-1-2-3-Les organosulfurés.....	8
1-1-2-4-Les carbamates.....	9
1-1-2-5-Les formamides.....	9
1-1-2-6-Les dinitrophénols.....	9
1-1-2-7-Les organotins.....	10
1-1-2-8-Les pyréthrénoïdes.....	11
1-1-2-9-Les autres pesticides.....	11
1-2-Les effets néfastes de l'utilisation des pesticides.....	13
1-3-La dégradation abiotique des pesticides.....	17
1-4-La dégradation des pesticides par les microorganismes anaérobies....	18
1-4-1-Le concept de biodégradabilité et ses aspects généraux.....	18
1-4-2-Voies de la biodégradation anaérobie des pesticides.....	21
1-4-3-Utilisation des microorganismes dans la biodépollution de l'environnement contaminé par les pesticides.....	23
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	26
2-1-Les méthodes microbiologiques.....	27
2-1-1-La préparation des milieux de culture.....	27
2-1-2-L'inoculation et l'incubation.....	27
2-1-3-Les solutions utilisées pour les milieux de culture.....	28
2-1-4-Les différents milieux de culture utilisés.....	30
2-1-5-L'isolement des souches.....	31
2-1-6-Test de pureté.....	32
2-1-7-Conservation des souches DX et SY.....	33
2-1-8-Etude de la morphologie des souches.....	33
2-1-9-Conditions de croissance et propriétés métaboliques.....	33
2-1-10-La numération des bactéries par le Nombre le plus probable (NPP).....	35
2-2-Les méthodes analytiques.....	35
2-2-1-La préparation des échantillons.....	35
2-2-2-Suivi de la croissance bactérienne par dosage des protéines.....	36
2-2-3-Dosage du titre alcalimétrie complet (TAC).....	36
2-2-4-Dosage des acides gras volatils (AGV) totaux.....	36
2-2-5-Dosage des sulfures totaux.....	37

2-2-6-Analyse des produits gazeux (CH ₄ , CO ₂ , N ₂).....	37
2-2-7-Le rendement d'épuration : le taux d'abaissement de la Demande Chimique en Oxygène (DCO).....	38
2-2-8-Analyse HPLC des résidus du Decis et du Sumithion.....	38
2-2-9-Analyse HPLC des aromatiques.....	39
2-2-10-Analyse HPLC des AGV (acides gras volatils) différentiels.....	39
2-2-11-Etude de la biodégradation du Decis et du Sumithion dans le sol.....	40
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	41
3-1-Etude de la biodégradabilité des pesticides.....	42
3-1-1-Choix des pesticides à utiliser comme substrat.....	42
3-1-2-Choix du site de prélèvement de l'inoculum.....	42
3-2-Etude des paramètres physico-chimiques en vue de l'optimisation de la biodégradation de Decis, de l'Ultracide et du Sumithion.....	47
3-2-1-Conditions de culture pendant l'acclimatation.....	47
3-2-2-Evolution des acides gras volatils totaux (AGV) et du titre alcalimétrie complet (TAC).....	48
3-2-3-Evolution de la Demande Chimique en Oxygène au cours de l'acclimatation.....	49
3-2-4-Suivi de la production de sulfures dissous (HS ⁻ , S ²⁻) dans les conditions méthanogéniques.....	51
3-2-5-Besoin en facteurs de croissance des bactéries intervenant dans la biodégradation des pesticides.....	52
3-3-Cinétique de la biodégradation du Decis, de l'Ultracide et du Sumithion.....	54
3-3-1-Dégradation du Decis par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation.....	54
3-3-2-Dégradation du Sumithion par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation.....	58
3-3-3-Dégradation de l'Ultracide par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation.....	60
3-3-4-Recherche des métabolites produits au cours de la biodégradation anaérobie du Decis et du Sumithion.....	63
3-3-4-1-Les métabolites aromatiques de la dégradation anaérobie du Decis.....	63
3-3-4-2-Les métabolites aromatiques de la dégradation anaérobie du Sumithion.....	65
3-3-5-Recherche des acides gras volatils produits lors de la dégradation du Decis et du Sumithion par les consortia acclimatés.....	67
3-4-Isolement et caractérisation partielle des microorganismes intervenant dans la biodégradation anaérobie des pesticides.....	69
3-4-1-Groupe de microorganismes intervenant dans la biodégradation anaérobie du Sumithion, de l'Ultracide et du Decis.....	69
3-4-2-Evolution de la population microbienne des consortia dégradant le Decis, l'Ultracide et le Sumithion.....	73
3-4-3-Caractérisation partielle d'une souche isolée du milieu à Decis et d'une souche isolée du milieu à Sumithion.....	75
	78

3-5-Etude de la biodégradation du Decis et du Sumithion par les souches DX et SY	
3-5-1-Dégradation du Decis par la souche DX.....	78
3-5-2-Dégradation du Sumithion par la souche SY.....	80
3-5-3-Dégradation du Decis par la souche DX en présence de 20mM de glucose.....	
3-5-4-Dégradation du Sumithion par la souche SY en présence de 20mM de glucose.....	82
3-5-5-Etude de la biodégradation du Decis et du Sumithion dans le sol par les souches DX et SY.....	84
CONCLUSION GENERALE	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93
ANNEXES	101

Listes des abréviations

1C4NB : 1-chloro-4-nitrobenzène

2,4-D : Acide 2,4-dinitrophénol

AchE : acétylcholinestérase

AFNOR : Association française de Normalisation

AGV : Acides Gras volatils

ChE : Cholinestérase

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DDD : Dichloro-diphényl-dichloroéthane

DDT : Dichloro-diphényl-trichloroéthane

DPVC : Direction des Protections des Végétaux et du Conditionnement

EIER : Ecole Inter-Etats d'Ingénieurs de l'Équipement Rural

HCH : Hexachlorocyclohexane

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

OP : Organophosphorés

PCP : Pentachlorophénol

pp'-DDE : dichlorodiphényl dichloroéthylène

SOFITEX : Société des Fibres et Textiles

TAC : Titre Alcalimétrique Complet

INTRODUCTION GENERALE

On appelle pesticide, toute substance naturelle ou synthétique utilisée pour prévenir, détruire, repousser ou inhiber les pestes, ou utilisé comme régulateur de plant, défoliant ou dessiccatif (Middlekanf, 1986). Ces substances ont été utilisées pour obtenir un supplément alimentaire ainsi que pour protéger les Hommes contre certaines maladies (Jenning, 1991)0. Il y a plusieurs classes de pesticides et les plus populaires sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrénoïdes (Menzer, 1991). Les organochlorés ont été retirés des pratiques agricoles du fait de leur toxicité vis-à-vis des mammifères et de leur persistance dans l'environnement. C'est ainsi que les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrénoïdes ont remplacé ces composés toxiques dans les applications en agriculture (Menzer, 1991).

Les paysans du Burkina Faso à l'instar de ceux des autres pays en voie de développement utilisent de plus en plus les pesticides, afin de lutter contre les nuisibles des végétaux et accroître les rendements agricoles.

Cependant l'usage de ces pesticides présente plusieurs inconvénients pour l'Homme, les animaux, les plantes et les microorganismes dont l'action est recherchée (Jenning, 1991). Plusieurs auteurs ont démontré que les pesticides peuvent être toxiques aussi bien pour les animaux, les Hommes, les plantes que pour les microorganismes utiles à l'Homme (Renner et Hopfer, 1987; Huynt, 1990; Ramade, 1992). Certains herbicides notamment les dérivés de l'acide phénoxyacétique inhibent la photosynthèse bloquant la croissance des plantes. Les pesticides sont souvent toxiques pour le phytoplancton (Ramade, 1992). Plusieurs cas d'intoxication des microorganismes du sol due à l'application des pesticides ont été relevés (Ginette, 1977; Lieberman et Alexander, 1981; Bean et Southall, 1983; Renner et Hopfer, 1987; Huynt, 1990 ; Reyes et Lettinga, 1991; Ramade, 1992).

Une pollution particulièrement dangereuse peut survenir par infiltration dans le sol de pesticides peu volatils et plus denses que l'eau, susceptibles de

former des zones d'accumulation d'où ils peuvent contaminer pendant de longues durées la nappe phréatique et les eaux de boisson.

Heureusement les communautés microbiennes réagissent aux stress et aux produits toxiques en changeant leurs activités métaboliques, ce qui se traduit par la sélection de souches tolérant et/ou biodégradant les polluants introduits dans l'environnement (Alice *et al.*, 1984 ; Barkay et Pritchard, 1988 ; Bechard *et al.* , 1990; Ala-AI, 1991; Ala-AI,1992a, Ala-AI, 1992b; Yu-Yunlong *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 1998). Ainsi, la détoxification des écosystèmes contaminés par les polluants chimiques tels que les pesticides, peut se faire de manière abiotique (transformation photochimique, volatilisation, complexation...) ou par biodégradation.

Dans la recherche des moyens pour l'élimination des résidus de pesticides, l'utilisation des microorganismes constitue un moyen sûr, peu coûteux et même quelquefois unique (Ala-AI, 1992b; Heider et Fucks, 1997; Stamper et Tuovinen, 1998). En effet, l'équipement enzymatique des microorganismes leur permet de métaboliser les substrats y compris les composés xénobiotique. La dégradation des xénobiotiques peut conduire à leur minéralisation complète. Les travaux de plusieurs chercheurs ont clairement démontré l'importance des microorganismes dans la transformation des composés dans l'environnement anaérobie (Kilbane, 1983; Sleat et Robinson, 1984 ; Macarie *et al.*, 1992; Ouattara, 1994; Toé, 1994; Cernakova, 1995; Chamkha, 1997; Razo *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 1998; Boopathy *et al.*, 1998). Plusieurs travaux tendent à démontrer que dans certaines conditions, les microorganismes anaérobies offrent plusieurs avantages à la biodégradation des xénobiotiques (James et Lettinga, 1990).

L'acclimatation de certaines souches bactériennes leur permet d'acquérir des propriétés nouvelles rendant possible la dégradation des molécules qui leur étaient résistantes au départ. L'isolement des bactéries aptes à la dégradation rapide des pesticides peut contribuer à résoudre le problème de la pollution de l'environnement par les pesticides. En effet les souches performantes peuvent être utilisées dans les champs préalablement

traités par les pesticides afin d'en éliminer les résidus. Les mêmes souches peuvent être utilisées dans des fermenteurs afin de résoudre certains problèmes tels que la décontamination et la récupération des fûts ayant contenus des pesticides.

Ce présent travail a pour but la recherche de microorganismes performants capables de dégrader en anaérobiose les pesticides utilisés en agriculture au Burkina Faso.

Au cours de notre étude l'accent a été mis sur l'acclimatation de consortia en présence des pesticides les plus utilisés par les agriculteurs burkinabé et qui sont difficilement dégradables dans les conditions anoxiques. Dans un premier temps des études de biodégradabilité ont permis de déterminer parmi les pesticides les plus utilisés au Burkina Faso, ceux qui sont les plus difficilement biodégradables dans les conditions anoxiques. Afin d'optimiser leur biodégradation, les paramètres physico-chimiques pouvant influencer la biodégradation de ces pesticides ont été suivis.

Une étude dans le sol avec deux souches isolées des milieux contenant du Decis ou du Sumithion a permis de tester l'efficacité de ces souches à biodégrader ces deux pesticides dans un sol anoxique.

CHAPITRE 1 :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1-1-GENERALITES SUR LES PESTICIDES

1-1-1-INTRODUCTION

Parmi le grand nombre d'espèces d'insectes plus de 10000 sont des ravageurs des produits agricoles. Il en résulte des dommages au niveau des récoltes dans les champs et lors du stockage post-récolte. Pour remédier à cette situation l'Homme utilise des produits chimiques connus sous le nom de pesticides (Thomson, 1994).

Les tous premiers pesticides étaient constitués d'extraits végétaux (poivre, tabac), d'eau savonneuse, de vinaigre, d'essence de térébenthine, d'eau saumâtre, etc... Au début de la deuxième guerre mondiale (1940), la sélection d'insecticides était limitée à des composés arsenicaux, des huiles d'essence et de composés comme la nicotine, la pyrèthrine, le sulfure, les gaz de cyanite d'hydrogène, la roténone et les cryolites. La deuxième guerre mondiale a ouvert l'ère chimique avec l'introduction d'un nouveau concept, celui de la fabrication de composés synthétiques pour le contrôle des insectes. Le tout premier pesticide de synthèse produit en grande quantité fut le DDT (dichlorodiphényltrichloroethane) (Tomlin, 1994).

1-1-2-LES DIFFERENTS GROUPES DE PESTICIDES

1-1-2-1-Les organochlorés : Les organochlorés sont des pesticides qui contiennent des atomes de carbone, d'hydrogène et de chlore. Historiquement ce sont les pesticides les plus importants. Les plus connus et les plus anciens sont le DDT (diclorodiphényltrichloro-ethane) (figure 1a), le DDD (diclorodiphényldichloro-ethane) (figure 1b), le dicofol, l'éthylan, le chlorobenzélate et le methoxychlore (Thomson, 1994). Le DDT a été probablement le produit chimique le plus connu du 20^{ème} siècle (Tomlin. 1994) Il y a également l'hexachlorocyclohexane (HCH) (figure 1c). Son isomère gamma possède le plus grand effet insecticide. Il est connu sous le nom commercial de lindane (Thomson, 1994).

fenthion (figure 2b) et le Famphur. Il y a également les OPs hétérocycliques tels que le diazinon (figure 2c), l'azinphos-méthyle, l'azinphos-éthyle, le chlorpyrifos, le métidathion (Thomson, 1994).

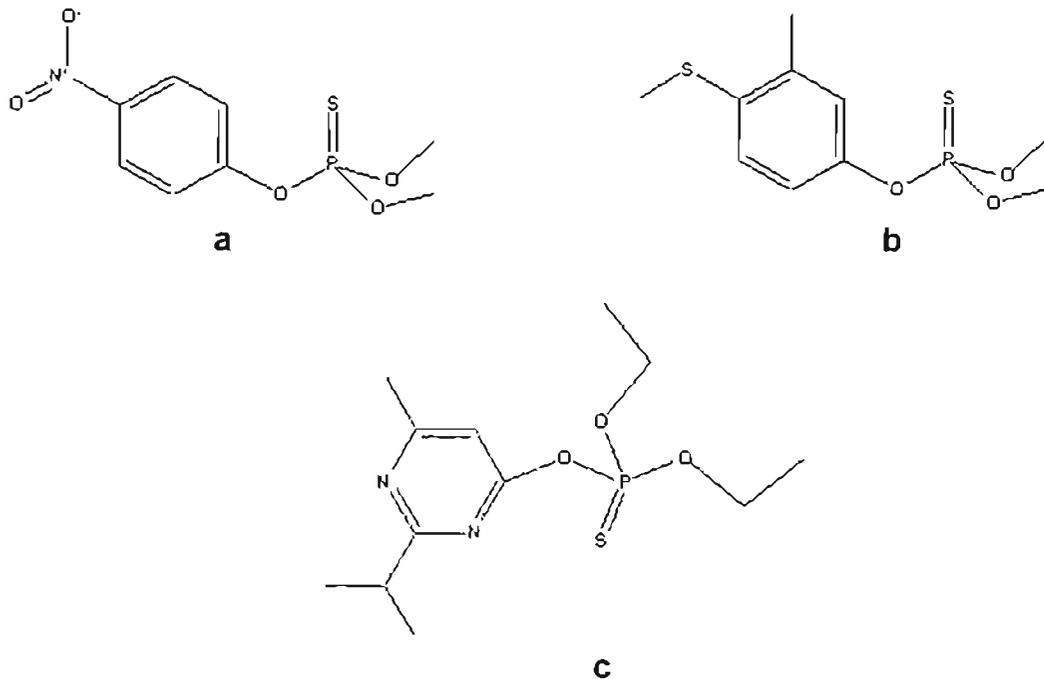


Figure 2: Structures des pesticides organophosphorés: le méthyleparathion (a), le fenthion (b) et le diazinon (c).

1-1-2-3-Les organosulfurés

C'est un groupe contenant quelques pesticides tels que le tétradifon, le propangite et l'ovex (figure 3). Ils renferment une molécule de soufre dans leur structure.

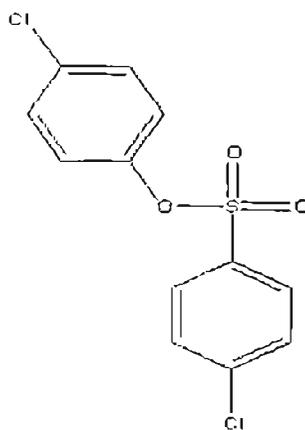


Figure 3: Structure d'un pesticide organosulfuré: L'ovex

fenthion (figure 2b) et le Famphur. Il y a également les OPs hétérocycliques tels que le diazinon (figure 2c), l'azinphos-méthyle, l'azinphos-éthyle, le chlorpyrifos, le métidathion (Thomson, 1994).

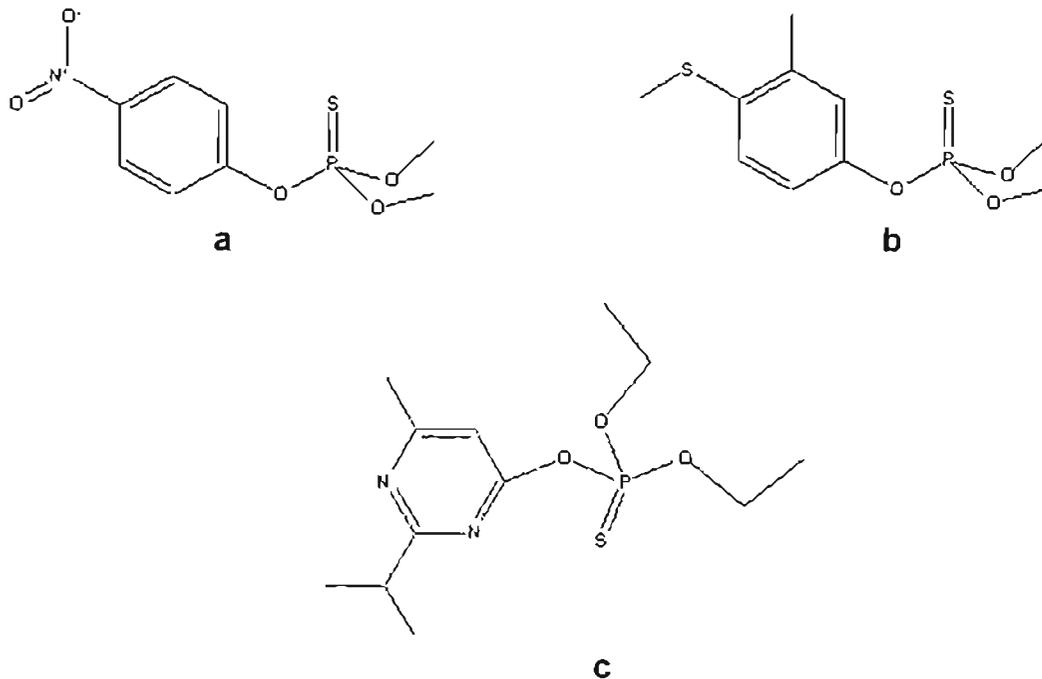


Figure 2: Structures des pesticides organophosphorés: le méthyleparathion (a), le fenthion (b) et le diazinon (c).

1-1-2-3-Les organosulfurés

C'est un groupe contenant quelques pesticides tels que le tétradifon, le propangite et l'ovex (figure 3). Ils renferment une molécule de soufre dans leur structure.

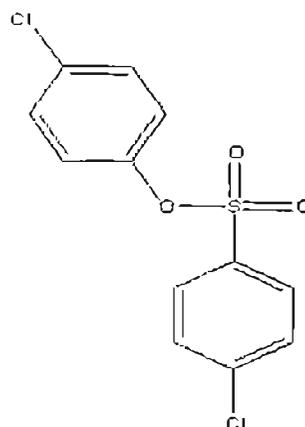


Figure 3: Structure d'un pesticide organosulfuré: L'ovex

1-1-2-4-Les carbamates

Les carbamates sont dérivés de l'acide carbamique (Figure 4) tout comme les organophosphorés sont issus de l'acide phosphorique. Leur mode d'action est semblable à celui des OPs et se traduit par l'inhibition de la ChE qui est une enzyme vitale.

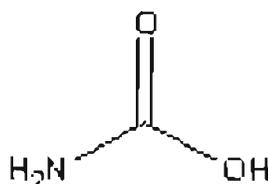


Figure 4 : Structure de l'acide carbamique

1-1-2-5-Les formamides

C'est un petit groupe de pesticides couramment utilisés dans la lutte contre les insectes résistants aux traitements aux carbamates et aux organophosphorés. Leur action réside en l'inhibition de l'enzyme monoamine oxydase, responsable de la dégradation des neurotransmetteurs (Tomlin, 1994). On peut citer des exemples comme la norepinéphrine et la sérotonine (figure 5). Les troubles liés à ces pesticides sont dus à l'accumulation de ces composés qui sont connus comme étant des amines.

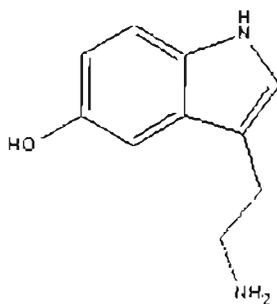


Figure 5: Structure d'un pesticide formamide: la sérotonine

1-1-2-6-Les dinitrophénols

Les molécules dinitrophénoliques constituent un large spectre de pesticides dont le mode d'action est une inhibition de la phosphorylation oxydative qui aboutit à la formation de l'adénosine triphosphate (ATP) (Tomlin,

1994; Ware, 1994). Un exemple en est l'acide 2,4-dinitrophéno (2,4-D) (figure 6).

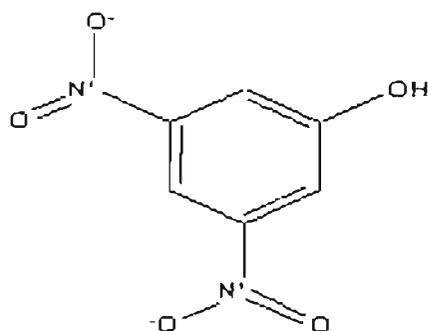


Figure 6: Structure de l'acide 2,4-dinitrophéno

1-1-2-7-Les organotins

C'est un groupe d'acaricides doublé de fonctions fongicides. Comme exemple on peut citer le plictran (figure 7a) et le vendex (figure 7b). Leur mode d'action est l'inhibition de la phosphorylation oxydative et de la

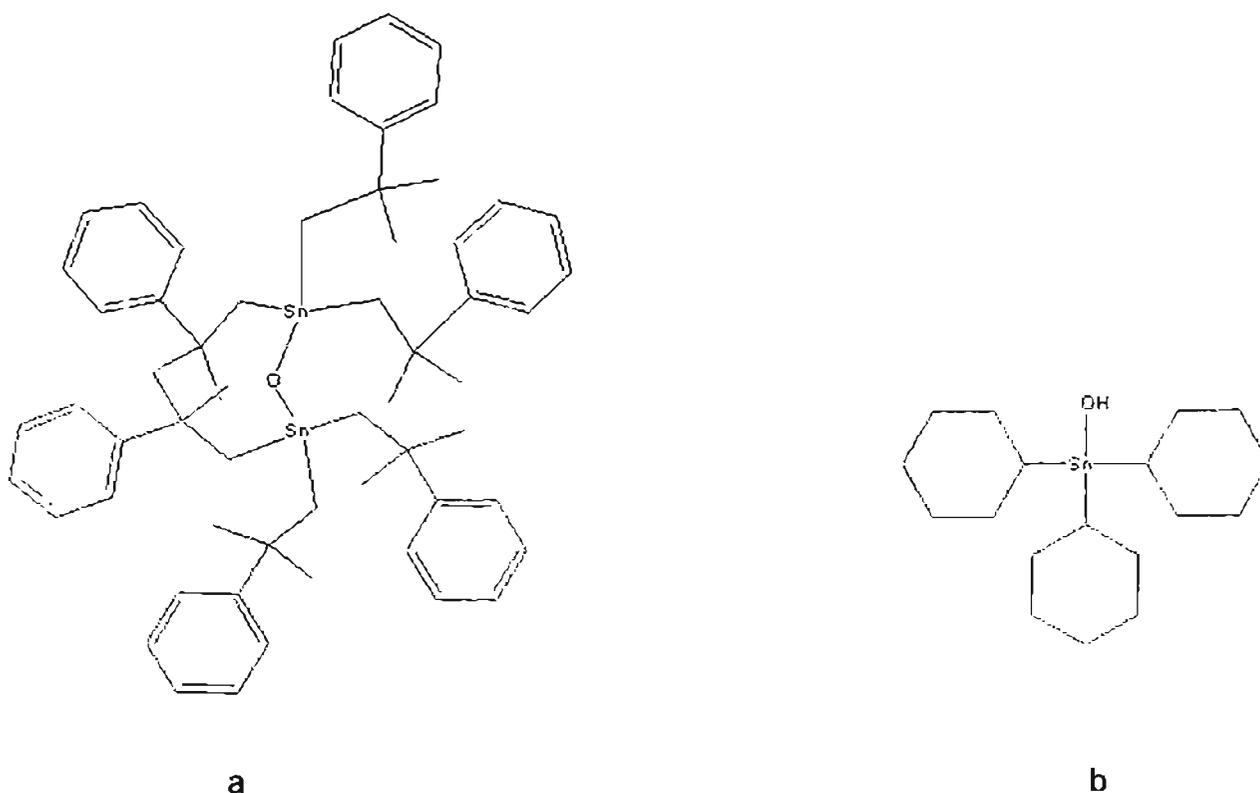


Figure 7: Structure de pesticides organotin: le vendex (a) et le plictran (b)

phosphorylation au niveau des chloroplastes (Thomson, 1994; Johnson et Ware, 1998). Cette dernière propriété fait qu'ils peuvent être utilisés comme algicide.

1-1-2-8-Les pyréthrénoïdes

Les pyréthrénoïdes sont des insecticides de synthèse dérivés du pyrèthre (molécule naturelle). Le pyrèthre est instable à la lumière solaire tandis que les pyréthrénoïdes sont assez stables à la lumière solaire et sont efficaces contre un large spectre d'insectes (Tomlin, 1994).

Les pyréthrénoïdes sont classés en générations (Ware, 1994). La 1^{ère} génération est apparue en 1949. Un exemple type en est l'allethrine (figure 8a). La 2^{ème} génération est apparue vers 1967. On peut citer parmi eux la tétraméthrine (figure 8b) et la resmethrine (figure 8c). La 3^{ème} génération est apparue vers 1972-1973. Un exemple type est la fenvalérate (figure 8d) qui est une molécule très active sur les insectes. Elle est également photostable. La 4^{ème} génération de pyréthrénoïdes apparue après les années 1975 est constituée de pesticides tels que le bifenthrin, la lambda-cyhalothrine, la cyperméthrine (figure 8e), la cyfluthrine, la deltaméthrine, l'esfenvalérate, la fenpropathrine et la fluvalinate. Tous ces derniers sont photostables et peu volatils.

Le mode d'action des pyréthrénoïdes ressemble à celui du DDT, mais ils sont en plus des poisons de la cellule nerveuse.

1-1-2-9-Les autres pesticides

Les insecticides d'origine végétale : ce sont des insecticides naturels qui intéressent beaucoup de personnes actuellement. Cela à cause de leur toxicité moindre sur les vertébrés et leur plus grande biodégradabilité (Johnson et Ware, 1998).

Les synergisants ou activateurs : ils ne sont pas considérés comme des pesticides en tant que tel, mais ajoutés aux pesticides cela permet d'accroître l'activité de ces derniers sur les insectes (Johnson et Ware, 1998).

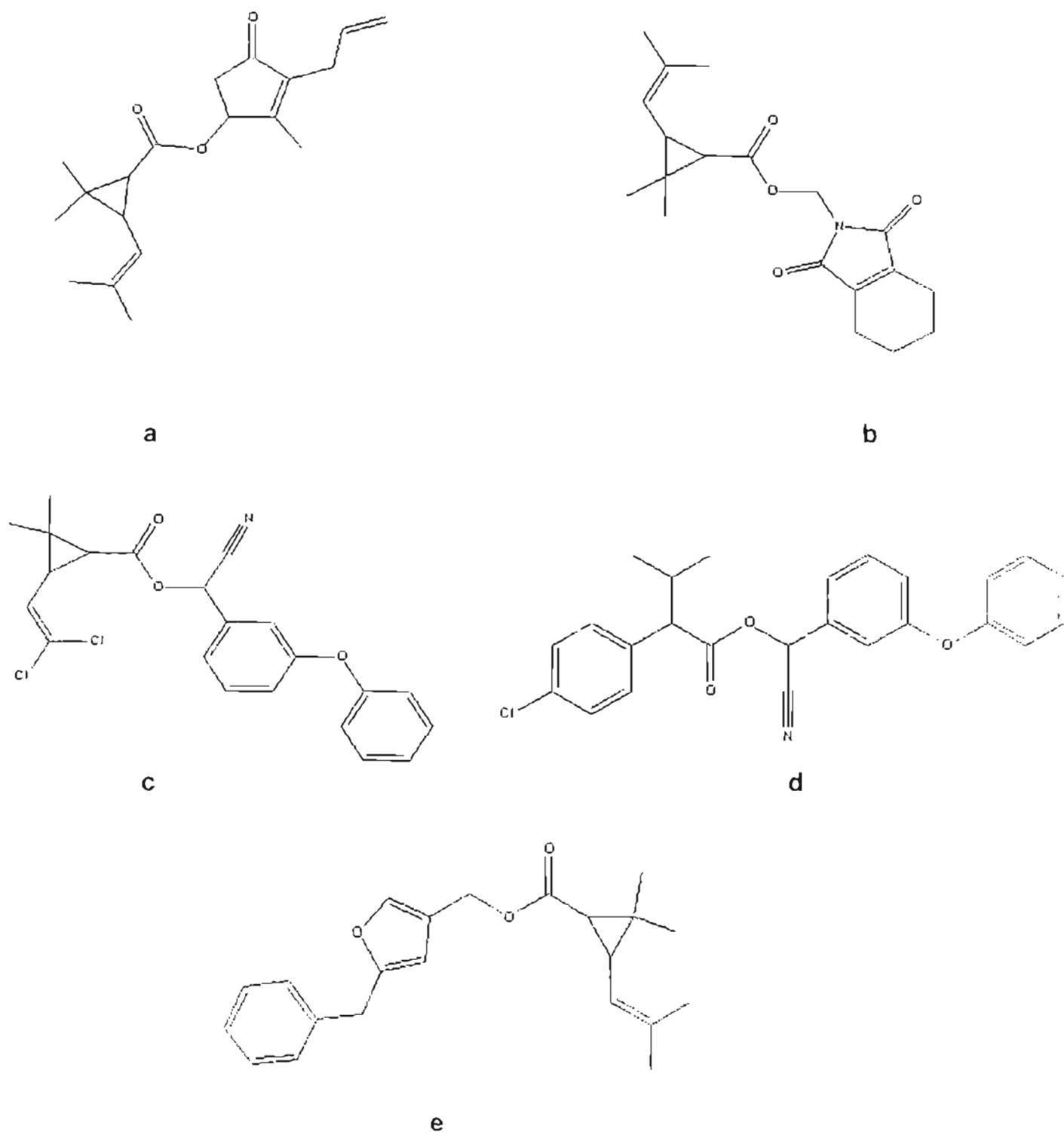


Figure 8: Structures de pesticides pyréthrénoïdes: l'alléthrine (a), le tétraméthrine (b), la resméthrine (c), la fenvalérate (d) et la cyperméthrine (e)

Les antibiotiques. Un exemple type est l'ivermectine (figure 9). Ce sont des bactéricides ayant des propriétés insecticides, acaricides ou antihelminthiques. Ce sont surtout des produits de fermentation des microorganismes tel que *Streptomyces avermitilis* (Thomson, 1994).

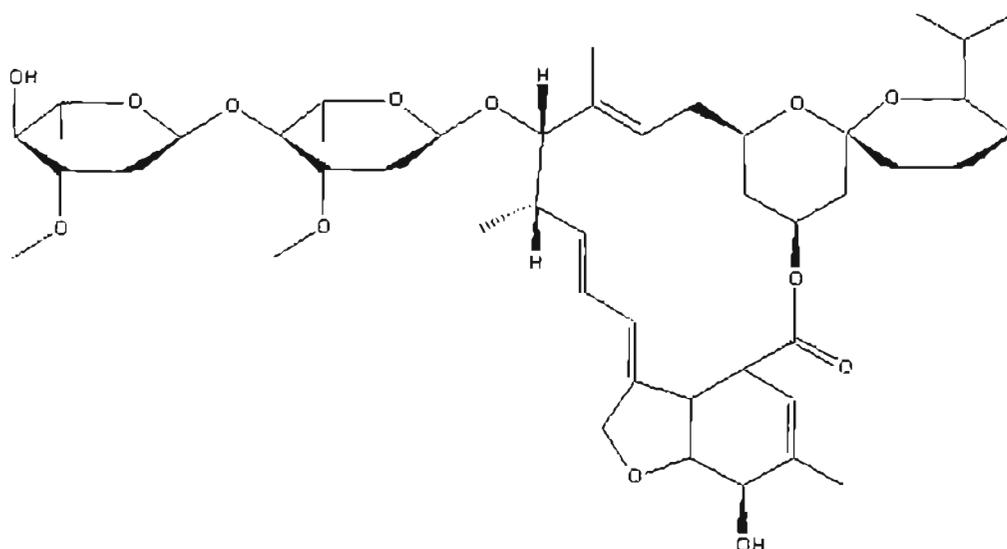


Figure 9: Structure d'un pesticide antibiotique: l'ivermectine

Les fumigants : ce sont des agents gazeux à 5°C et utilisés pour tuer les insectes, leurs œufs, les nématodes dans les maisons, les graines, le sol et les produits de conservation.

Les répélants des insectes : ils sont constitués de fumées et autres gaz ayant une action répulsive.

Les insecticides inorganiques qui ne contiennent pas d'atome de carbone.

Les composés mucilagineux utilisés comme pesticides (Tomlin, 1994).

1-2-LES EFFETS NEFASTES DE L'UTILISATION DES PESTICIDES

Les cas d'intoxication par les pesticides ont été plusieurs fois rapportés dans la littérature (Morison *et al.*, 1966; Alexander et Lustigman, 1966; Nath *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 1996).

La deltaméthrine est utilisée en agriculture contre un large spectre d'insectes nuisibles. Elle est préférentiellement utilisée à cause de sa faible toxicité à l'égard des animaux et sa non-persistance dans l'environnement. Mais les données actuelles sur la génotoxicité et l'effet cancérigène de la Deltaméthrine sont très controversées. En effet la toxicité du produit dépendrait du système de test utilisé. Les résultats de certains tests montrent que le DNA est endommagé par la Deltaméthrine (Villarini *et al.*, 1998). Il a été montré que la δ -bioallethrine cause une inhibition de la prolifération des lymphocytes après 72 heures de culture à une concentration de 6.5 μ M. (Diel *et al.*, 1998). Une étude récente consistant à examiner et caractériser le fait que l'apoptose testiculaire puisse être due ou induite par l'exposition des mâles de rats à la deltaméthrine a montré qu'il y avait un arrêt de la spermatogenèse chez les animaux traités avec 1mg/kg/j de deltaméthrine pendant 21 jours (El Gahary *et al.*, 1999). Cette étude permet de suspecter le rôle de la deltaméthrine dans la stérilité (Diel *et al.*, 1998). Il a été montré que l'application de 100 ppm de l'herbicide bentazon inhibait l'activité des bactéries anaérobies fixatrices d'azote. La méthanogénèse est également inhibée par 1000 ppm de bentazon. Dans les conditions du laboratoire et en présence d'un consortium de bactéries aérobies et anaérobies, aucune biodégradation du bentazon n'était observée après 2 semaines en condition aussi bien aérobie qu'anaérobie (Allievi *et al.*, 1996).

Le thiobencarb après déhalogénéation a été indiqué comme causant le nanisme au niveau des champs de riz. sa biodégradation anaérobie est lente. Ce qui cause des problèmes au niveau des champs de riz.

Le carbofuran, insecticide systémique est rapidement absorbé par les plantes et transmis au niveau des parties aériennes (feuilles) où il s'attaque de manière irréversible à la plante ainsi qu'à tout animal ou toute personne qui en consomme. (Mabury *et al.*, 1996).

Il a été montré qu'une algue (*Nannochloris oculata*) est très sensible à l'insecticide fénitrothion. Une concentration en pesticide de plus de 10mg/l

réduit significativement la densité de ces algues après 72 heures d'exposition (Ferrando *et al.*, 1996).

Le taux de pesticides organochlorés a été déterminé dans des échantillons de viande des abattoirs municipaux de Veracruz. Dans tous les échantillons ont été détectés de la beta-HCH (hexachlorocyclohexane) et du pp'-DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène). Le taux de pp'-DDE était surtout élevé dans les poumons des animaux avec un maximum de 2,713 mg/kg (Waliszewski *et al.*, 1996). Des résidus de pesticides organochlorés ainsi que des résidus de polychlorure de biphényle ont été détectés dans plusieurs échantillons de lait humain collectés dans un hôpital en Croatie (Frkovic *et al.*, 1996).

Une étude visant à déterminer le taux de pesticides organochlorés chez les oiseaux migrateurs (passerines) dont la population était en déclin a permis de détecter entre 0,385 et 27,4 ng/g de pesticides dans 19 sur 21 oiseaux testés. Il a été également trouvé chez la plupart d'entre eux des concentrations élevées de pp'-DDE et de dieldrine. On suspecte l'effet de ces pesticides sur la fécondité des passerines (Harper *et al.*, 1996).

La toxicité des pesticides organophosphorés (Ops) vis à vis des insectes et des mammifères est toujours attribuée à une inactivation de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui catalyse l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine (ACh). L'interaction des OPs avec les AChE aboutit à une réaction de transphosphorylation. Le groupe hydroxyle terminal d'un résidu de sérine dans le site actif de l'enzyme est phosphorylé par le pesticide organophosphoré (Fukuto, 1987). La réaction de transphosphorylation de l'AChE est en fait une substitution nucléophile de cinétique de second ordre (S_N2) dans lequel le groupe OH du pesticide est substitué par l'enzyme (figure 10).

Les symptômes de la toxicité aiguë par les Ops chez les animaux et les Hommes sont typiques d'une hyperactivité cholinestérasique qui se traduit par la salivation, le larmolement, la défécation et les urines involontaires, ainsi que des convulsions puis la mort par asphyxie.

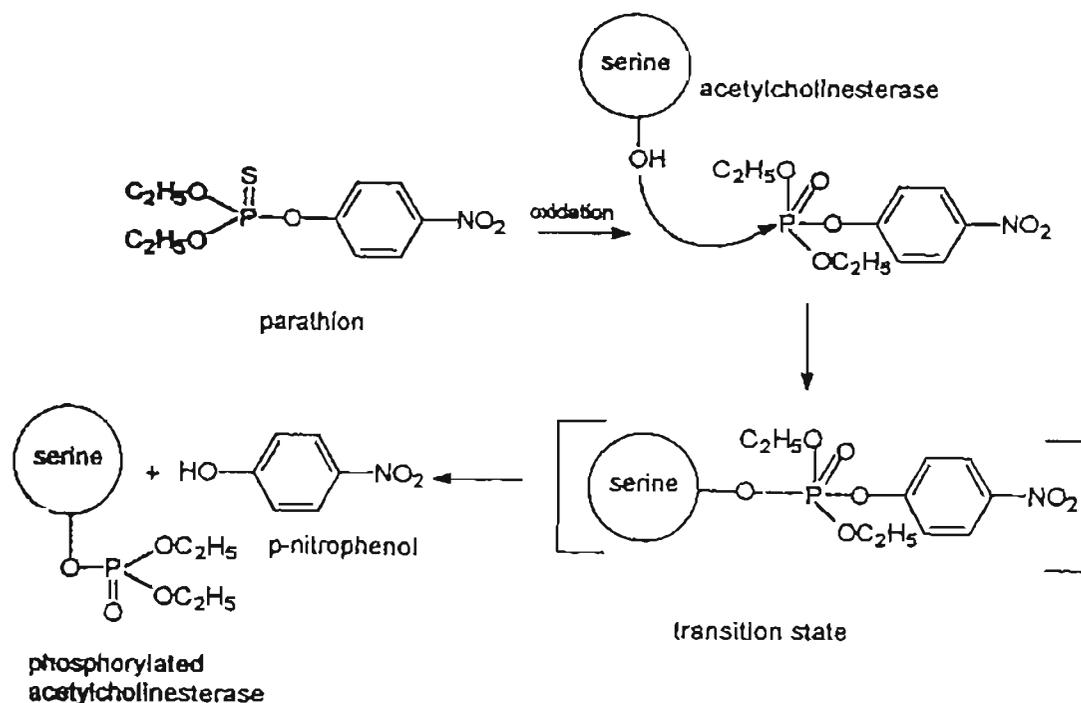


Figure 10: Phosphorylation de l'acetylcholinestérase par le parathion à travers la réaction de mécanisme S_n2

Des études ont montré que les métabolites primaires des OPs sont plus actifs dans l'inhibition que leurs parents correspondants (Fukuto, 1987). C'est le cas du paraoxon, qui inhibe l'AChE mieux que le parathion. Ainsi le paraoxon apparaît plus toxique pour les mammifères que le parathion. Aussi bien les carbamates que les OPs (les plus utilisés des pesticides) expriment leur toxicité par l'inhibition de l'acetylcholinestérase (Fukuto, 1987).

Bien que les OPs soient toxiques, leur utilisation en agriculture ainsi que pour le contrôle des insectes s'attaquant aux animaux est encouragée dans la mesure où elle a apporté une augmentation de la production alimentaire.

A l'instar de plusieurs pyréthrénoïdes, la deltaméthrine a une grande toxicité envers les poissons. La deltaméthrine a également un impact sur les insectes aquatiques herbivores. Ce qui se traduit par une augmentation de la population algale pouvant entraîner une asphyxie des retenues d'eau. Les poissons sont capables d'accumuler de grandes concentrations de deltaméthrine. La faune aquatique particulièrement les crustacés, peut être

affectée par la deltaméthrine. La deltaméthrine est très toxique pour les abeilles (Kenneth, 1990).

Ainsi, l'utilisation des pesticides apparaît comme un mal nécessaire. Il est alors important de rechercher les voies et moyens d'éliminer les résidus de pesticides après leur application.

1-3-LA DEGRADATION ABIOTIQUE DES PESTICIDES

La dégradation des pesticides peut se faire de manière abiotique ou par les êtres vivants tels que les mammifères, les insectes, les plantes et les microorganismes.

La dégradation abiotique des pesticides est un phénomène bien connu. Elle est souvent liée à l'action de la lumière notamment les rayons ultra-violet (U.V) du soleil, à la température, au pH, à l'humidité du sol et de l'air, à la volatilité du pesticide, à certains ions et la structure du sol (Coulibaly et Smith, 1990).

Il a été montré que dans un cours d'eau contaminé par le pentachlorophénol (PCP), la photolyse est le premier mécanisme de dégradation. Ainsi, selon les conditions d'ensoleillement, 5 à 28% de la concentration initiale en PCP sont réduits par photolyse avant que la microflore aquatique ne prenne la relève. (Pignatello *et al*, 1983). Miller et Herbert en 1987 ont étudié l'influence directe ou indirecte de la photolyse dans l'environnement. Il ressort de cette étude que l'hydrolyse, l'oxydation et la réduction sont des réactions impliquées dans la photodégradation des pesticides. La lumière du soleil a été ciblée comme étant la source majeure de dégradation des pesticides organochlorés et pyréthrénoïdes dans l'environnement (Eto, 1974).

Certains pesticides tels que le dichlorobenzyl ainsi que les thiocarbamates et les nitroanilines ont une demi-vie relativement courte dans le sol du fait de leur volatilité (Kenneth. 1990). La température et l'humidité sont des facteurs environnementaux importants qui influencent la dégradation des pesticides dans le sol (Coulibaly et Smith, 1990). L'étude de la

décomposition du [^{14}C]isofenphos, un insecticide à large spectre à différents pHs, température et humidité a montré que la dégradation des pesticides était plus grande à 35°C par rapport à 25 et 15°C. Mais certains organophosphates comme le fénitrothion ont une grande stabilité thermique et ne s'évaporent pas.

La dégradation des pesticides se fait souvent par des réactions d'oxydation et d'hydrolyse. Ces types de réactions sont fortement influencés par le pH. Ainsi on démontre qu'une solution basique d'hydroxyde de potassium hydrolyse le ronnel, le crufonate, le fénitrothion, le parathion et le méthyle-parathion. Une étude avec le tétrachlorovinphos a montré une hydrolyse de plus en plus accrue lorsqu'on passe de pH 5,75 à pH 9. Les vitesses d'hydrolyses les plus élevées ont été observées en milieu alcalin. Une étude a montré que la demi-vie du chlorpyriphos à pH 7 était de 72 jours pendant qu'elle n'était que de 16 jours à pH 9. (Racke, 1992)

Les pesticides organophosphorés (les plus utilisés dans l'agriculture) subissent une dégradation induite par la lumière du soleil, les rayons UV ou par des réactions avec les minéraux du sol. En effet la dégradation hydrolytique des pesticides dans l'environnement peut être catalysée par des ions métalliques. Les ions impliqués dans l'hydrolyse des pesticides organophosphorés sont : le Pb^{2+} , le Zn^{2+} , le Co^{2+} , le Ni^{2+} , le Ag^+ et le Cu^{2+} . (Mendez *et al.*, 1986 ; Eto, 1974). Les ions Cu^{2+} forment un complexe avec l'atome de soufre ($\text{P}=\text{S}-\text{Cu}^{2+}$) ce qui augmente la charge positive du phosphore. Ce dernier devient alors susceptible à une attaque nucléophile par un ion hydroxyle, facilitant ainsi l'hydrolyse du composé organophosphoré.

1-4-LA BIODEGRADATION DES PESTICIDES PAR LES MICROORGANISMES ANAEROBIES

1-4-1-LE CONCEPT DE BIODEGRADABILITE ET SES ASPECTS GENERAUX

On désigne sous le terme biodégradation, la transformation biologique de substances sous une autre forme (Berry, 1987). La biodégradabilité est dite

totale lorsque les molécules organiques sont totalement minéralisées sous la forme d'espèces dont la nature et la proportion dépendent du métabolisme suivi. En effet dans le cas d'une biodégradation anaérobie totale les produits finaux du métabolisme sont le CO_2 , le CH_4 , le NH_4 , le S^- et le H_2O tandis que la biodégradation aérobie donne le CO_2 , et le H_2O , mais avec du NO_3 et du SO_4^- . Une biodégradation incomplète peut avoir un impact négatif sur la microflore elle-même et sur l'environnement général. Par exemple une substance sans danger peut être convertie en une substance toxique.

Dans l'optique d'un traitement d'épuration ou d'une valorisation énergétique, on pourra évaluer la biodégradabilité soit par l'observation d'une minéralisation complète, soit par l'apparition de métabolites réputés biodégradables ou non toxiques. Les résultats obtenus lors d'un essai de biodégradation sont liés aux conditions dans lesquelles l'essai a été mené.

Pour la compréhension du phénomène de biodégradabilité nous pouvons retenir les principaux points suivants :

- Le métabolisme des microorganismes aérobies comme anaérobies procède par un mécanisme respiratoire libérant de l'énergie par des réactions d'oxydation et/ou de transfert d'électrons.
- Le processus peut présenter des étapes limitantes constituées par la transformation de structures chimiques très stables. C'est le cas des composés xénobiotiques (dont les pesticides) et des molécules aromatiques (Jim et Van Veld, 1983).
- la substance à dégrader doit être en contact avec un microorganisme génétiquement apte à cette dégradation et les conditions du milieu doivent être favorables à l'induction des enzymes nécessaires à l'exercice de leur activité (Jim et Van Veld, 1983).
- Les enzymes existantes peuvent dégrader les molécules nouvelles dès lors que leurs groupes fonctionnels n'altèrent pas la structure électronique du site actif de l'enzyme. Dans le cas contraire le métabolisme d'une substance xénobiotique peut nécessiter la présence d'une substance inductrice.

-
- La biodégradation d'une substance peut nécessiter la présence d'une autre qui contrairement à la première permet la croissance des microorganismes. Ce phénomène est connu sous le nom de "cométabolisme". (Jim et Van Veld, 1983).
 - La biodégradation peut se poursuivre jusqu'à la formation de structures biogéniques qui rentrent dans le métabolisme cellulaire normal des microorganismes.
 - La régulation de la biodégradation peut s'opérer par les produits de la dégradation ou par le substrat lui-même. (Jim et Van Veld, 1983).
 - La structure de la communauté microbienne et les interactions entre espèces jouent un rôle très important. C'est ainsi que les populations mixtes ont une capacité dégradante beaucoup plus importante que les cultures pures, notamment lorsque les substances xénobiotiques sont impliquées.
 - L'évolution de la structure de la communauté en présence d'un substrat nouveau donne lieu au phénomène d'adaptation ou acclimatation (Jim et Van Veld, 1983).
 - L'adaptation peut procéder soit par sélection des espèces résistantes par mutation soit par transfert des gènes. C'est le cas du transfert des plasmides qui confèrent à la cellule hôte des avantages vitaux vis-à-vis des conditions du milieu.
 - L'acclimatation d'une culture à une substance peut permettre la dégradation de molécules de structures voisines par celle-ci. C'est le "phénomène d'acclimatation croisé".
 - L'analyse fine des phénomènes impliqués dans la biodégradation conduit au choix de cultures mixtes les plus diversifiées possibles. (Jim et Van Veld, 1983).

1-4-2-VOIES DE LA BIODEGRADATION ANAEROBIE DES PESTICIDES

La dégradation par les microorganismes est le phénomène le plus important dans l'élimination des pesticides du sol. La dégradation par oxydation ou par hydrolyse des pesticides organophosphorés du sol est souvent due à l'action des microorganismes (Alasdair *et al.*, 1978). Une bactérie isolée des effluents industriels et classée dans le genre *Pseudomonas* a été capable de dégrader le malathion. Plusieurs microorganismes du sol possèdent les enzymes catalysant l'activation et l'élimination des pesticides. Les réactions enzymatiques conduisant à la dégradation des pesticides organophosphorés sont divisées en deux phases (phase 1 et phase 2). Les enzymes impliquées dans la phase 1 sont responsables de l'oxydation, de la réduction et de l'hydrolyse des composés chimiques avec catalyse de la majorité des biotransformations des pesticides (Murphy, 1987) (Figure 11). Les enzymes impliquées dans la phase 2 conduisent les réactions de conjugaison. La fonction des enzymes oxydatives est de convertir les molécules chimiques en leurs dérivés solubles et d'ajouter ou d'exposer les groupes fonctionnels (OH, SH, NH₂, COO). Les groupes fonctionnels peuvent être ajoutés par deux systèmes oxydatifs. Ce sont le cytochrome P450 et la fonction amine mixte oxydase. Le cytochrome P450 est le terminal du système cytochrome P450-dépendant-monoxygénase. Les enzymes de la phase 1 et 2 sont considérées comme des enzymes de détoxification (Murphy, 1987).

Les enzymes impliquées dans la phase 2 sont des glucuronosyltransférases, des sulfotransférases, des N-acyl transférases et des glutathione S-transférases (Sipes et Gandolfi, 1991).

La déhalogénéation réductive est le mécanisme le plus important de la transformation des polluants halogénés par les microorganismes anaérobies (Joseph *et al.*, 1983; Paige *et al.*, 1997). De nos jours peu de microorganismes pouvant effectuer une déhalogénéation réductive des composés chlorés aromatiques et aliphatiques ont été isolés. *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, une souche de bactérie sulfato-réductrice, anaérobie stricte Gram négative est

capable de méta-déhalogéner une grande variété de substances de types halobenzoates et chlorophénols (Beudet *et al.*, 1998). La dégradation anaérobie du pentachlorophénol (PCP) dans un sol contaminé par des

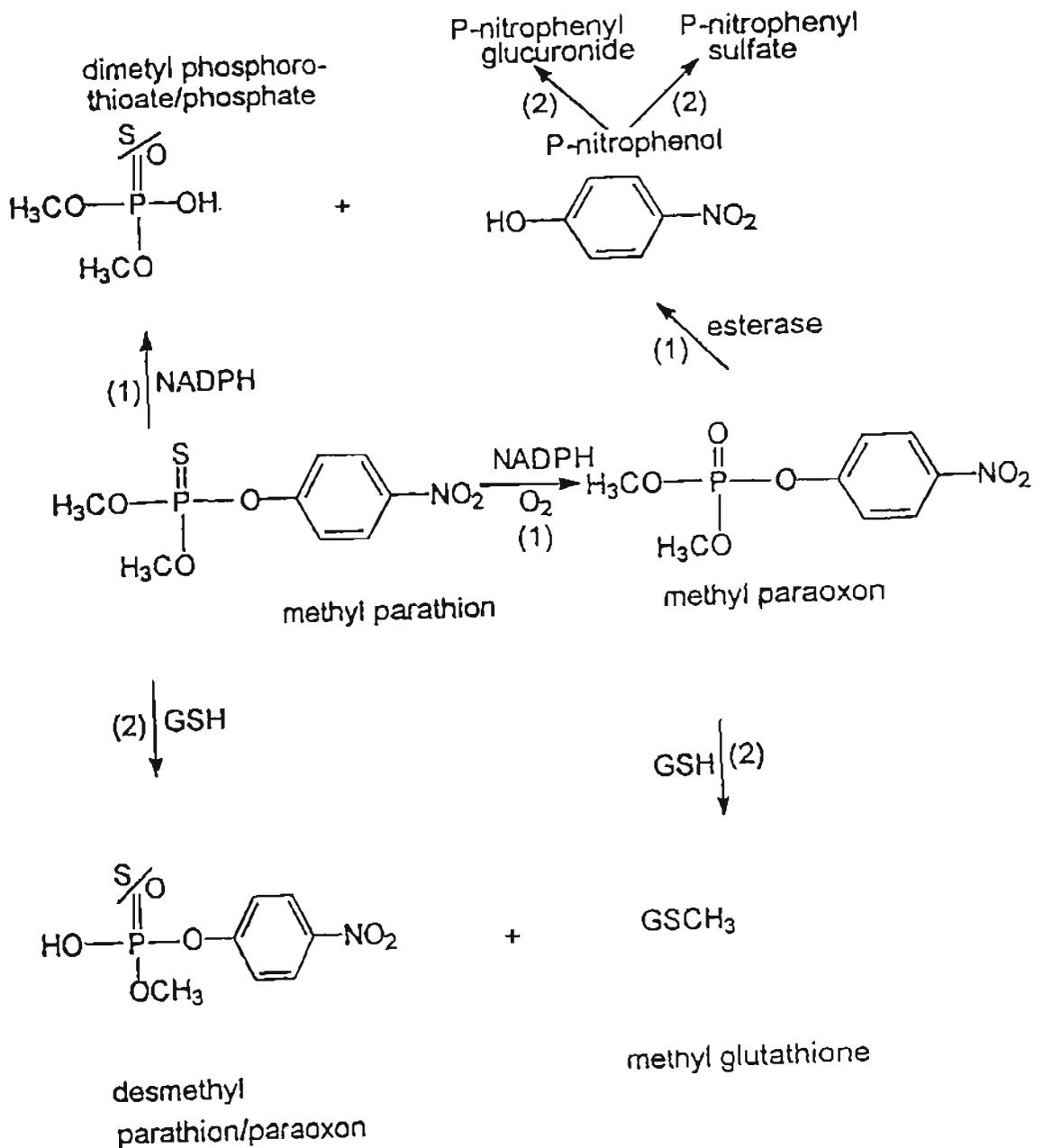


Figure 11 : Biotransformation du méthyle-parathion par des réactions métaboliques de phase 1 et de phase 2 (Murphy, 1987).

industriels a été effective grâce à un consortium de bactéries en condition méthanogénique. Les résultats ont prouvé que *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 pouvait être utilisée efficacement pour la déchloration du PCP en 3-chlorophénol dans les sols contaminés. Ces mêmes études ont montré que les substituants fluorés ont moins tendance à la déhalogénéation réductrice que les substituants brome ou chlore.

L'acclimatation des bactéries joue un grand rôle dans la biodégradation des pesticides. En effet il a été montré que le tétrachlorocatéchol était complètement déchloré en Catéchol seulement lorsque les bactéries utilisées étaient préalablement acclimatées.

Une souche bactérienne isolée du sol et identifiée comme étant *Arthrobacter sp* a montré une grande habilité à dégrader l'isoxathion (pesticide organophosphorés) dans le sol. Mais la bactérie était incapable d'utiliser l'isoxathion comme seule source de carbone et de phosphore. Les produits de dégradation étaient surtout des produits d'hydrolyse (3-hydroxy-5-phénylisoxazole et l'acide diéthylthiophosphorique) suggérant que cette souche hydrolyse la liaison ester de l'isoxathion. La souche d'*Arthrobacter sp* était également capable d'hydrolyser le diazinon, le parathion, le fénitrothion, l'isofenphos, le chlorpyrifos, et l'ethoprophos, mais la vitesse de dégradation dépendait du substrat pesticide utilisé (Wahid *et al.*, 1980; Shalini *et al.*, 1996; Ohshiro *et al.*, 1996).

1-4-3-UTILISATION DES MICROORGANISMES DANS LA BIODEPOLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT CONTAMINE PAR LES PESTICIDES

Un système anaérobie de traitement utilisant des granules a été développé pour la biodégradation du pentachlorophénol (PCP). Ce système a été capable de minéraliser complètement le ^{14}C -PCP en $^{14}\text{CH}_4$ et $^{14}\text{CO}_2$ (Beaudet *et al.*, 1997).

Il a été prouvé que l'élimination des ions chlorures du PCP était effectuée par des cellules bactériennes vivantes fixées sur des granules en condition anaérobie. Il n'y avait aucune élimination des ions chlorures en condition aérobie ou avec des granules stériles. Au cours de cette minéralisation le PCP était dégradé selon les étapes suivantes : PCP → 2,4,6-trichlorophénol → 2,4-dichlorophénol → 4-chlorophénol ou 2-chlorophénol → phénol → CO₂ + CH₄ (Kennes *et al.*, 1996).

Une souche bactérienne nommée DCA-2 et dégradant le pentachlorophénol en 3,4,5-trichlorophénol, a été immobilisée sur des granules d'un réacteur Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB). La performance du réacteur était de 120 μmol.l.jour⁻¹ et par conséquent comparable au plus performant réacteur UASB décrit ainsi qu'aux réacteurs aérobies. Ces résultats ont des implications pour l'éco-ingénierie des granules par le traitement anaérobie des eaux contaminées. (Christianen et Ahring, 1996). Une nouvelle souche bactérienne nommée LW1 de la famille des *Comamonadaceae* utilise le 1-Chloro-4-nitrobenzène (1C4NB) comme source de carbone d'azote et d'énergie. En condition anaérobie la souche LW1 transforme le 1C4NB en 2-amino-5-chlorophénol. En présence d'oxygène et en absence de NAD, une importante transformation du 2-amino-5-chlorophénol en acide 5-chloropicolinique et un autre produit absorbant à 306 nm a été constaté. (Khatsiela *et al.*, 1999). Les résultats d'études ont montré que des consortia de bactéries étaient capables de minéraliser de fortes concentrations de coumaphos (1500 mg/l) dans des sols boueux (Mulbry *et al.*, 1996). La biodégradation pouvait ramener la concentration du coumaphos à moins de 1 mg/l en 7 à 10 jours à 28°C. Il a également été montré que ces mêmes microorganismes étaient capables de coloniser des morceaux de graviers et être utilisés dans des filtres pour métaboliser le coumaphos jusqu'à moins de 0,1 mg/l en 7 à 10 jours à 28°C. Ce système simple offre un moyen potentiel à faible coût à la détoxification des eaux usées contenant le coumaphos et la biorémediation des sols contaminés par ce pesticide (Mabury *et al.*, 1996).

Face au problème de contamination des eaux et des sols par les résidus de pesticides nous apportons notre contribution en optimisant l'activité des bactéries capables de dégrader totalement les pesticides les plus utilisés en agriculture. Les souches performantes pourront être utilisées dans des fermenteurs destinés à l'épuration des eaux polluées par les pesticides notamment les eaux issues du nettoyage des fûts ayant contenus des pesticides. Ces souches pourront être aussi utilisées dans les champs après l'application des pesticides afin d'y éliminer les résidus.

CHAPITRE 2
MATERIELS ET METHODES

2-1-LES METHODES MICROBIOLOGIQUES

2-1-1-LA PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

2-1-1-1-Les milieux liquides

Les milieux de culture anoxiques ont été préparés selon les techniques décrites par Hungate (1969) et modifiées par Miller et Wolin (1974). Les milieux sont dégazés en les portant à ébullition, refroidis sous flux d'azote exempt d'oxygène, répartis dans les flacons de culture, des tubes de Hungate ou des tubes à haute pression, puis stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 45 minutes.

2-1-1-2-Les milieux solides

Pour la culture et l'isolement des bactéries en milieu solide la technique du roll-tube développée par Hungate (1969) a été utilisée. Cette méthode consiste à faire bouillir sous flux d'azote un milieu de culture anoxique contenant 1,5% d'agar, puis à le répartir à chaud dans des tubes de Hungate à raison de 4,5 ml par tube. Ces tubes sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 45 minutes. Avant inoculation, ils sont chauffés pour faire fondre l'agar, puis maintenus à 48°C. Ils sont alors inoculés à raison de 0,5 ml de culture par tube, puis placés horizontalement sur un tour afin de répartir d'une manière homogène le milieu gélosé sur toute la longueur du tube, en le refroidissant avec de la glace.

2-1-2-L'INOCULATION ET L'INCUBATION

Dans des tubes de Hungate contenant le milieu de base pour les bactéries, sont ajoutés anaérobiquement et stérilement selon la nature de l'enrichissement, le pesticide, un accepteur d'électrons et un réducteur de potentiel. L'addition d'une source énergétique complémentaire est réalisée de la même manière. Les tubes sont ensuite inoculés et mis en culture à 37°C.

2-1-3-LES SOLUTIONS UTILISEES POUR LES MILIEUX DE CULTURE

2-1-3-1-La solution d'oligo-éléments de Balch *et al.* (1979)

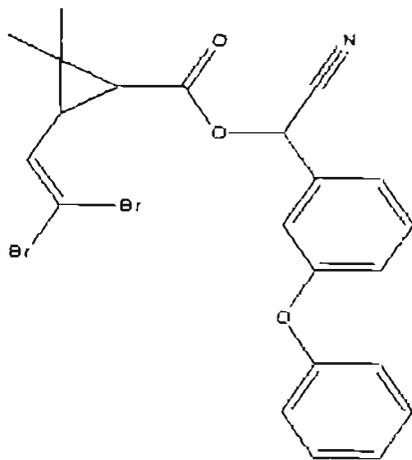
La composition de cette solution est la suivante : acide nitroacétique, 1,5 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,0g ; NaCl, 1,0g ; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,5g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1g ; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1g ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1g ; $ZnCl_2$, 0,1g ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,01g ; $AlK(SO_4)_2$, 0,01g ; H_3BO_3 , 0,01g ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,01g ; H_2O , qsp 1000ml. La solution est conservée à 4°C et utilisée à raison de 1ml/l de milieu de culture.

2-1-3-2-La solution d'oligo-élément de Widdel (1983)

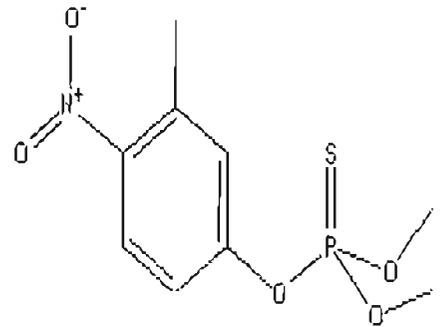
La composition de cette solution est la suivante : $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 1,5g, HCl (25%), 10,0ml ; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,19g ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,1g ; $ZnCl_2$, 0,07g ; H_3BO_3 , 0,006g ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,036g ; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 24 mg ; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 2mg ; H_2O distillée, qsp 1000ml. La solution est conservée à 4°C et utilisée à raison de 1ml/l de milieu.

2-1-3-3-Les solutions mères de substrat

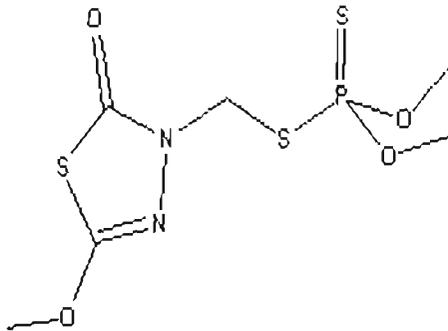
Decis 1g/l ; Sumithion 1g/l ; Ultracide 1g/l ; Sevimol 1g/l ; Malathion 1g/l ; Pyridaphenthion 1g/l ; glucose, 1M ; acétate, 0,5M ; pyruvate, 0,5M, D-fructose, 0,5M, L-arabinose, 0,5M ; maltose 0,5M ; mannitol, 0,5M. Les solutions sont stérilisées par filtration et conservées en flacons pénicilline à température ambiante (environ 23 °C) à l'abri de la lumière.



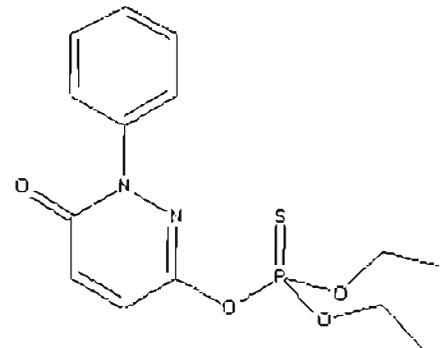
deltaméthrine (Decis)*



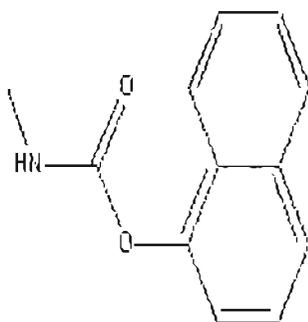
fénitrothion (Sumithion)*



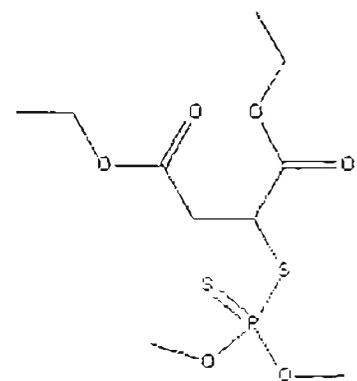
métidathion (Ultracide)*



pyridaphenthion (Pyridaphenthion)*



sévimol (Carbaryl)*



malathion (Malathion)*

Figure 12: Formules développées des pesticides utilisés comme substrat (Thomson, 1986)

*Matière active (nom commercial)

2-1-4-LES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE UTILISES

2-1-4-1-Milieu de base (MB) (Traoré, 1978)

Il est dépourvu de source de carbone et d'accepteur d'électron et est constitué d'un mélange de 3 solutions stériles (A, B et C) préparées anaérobiquement.

- la solution minérale (A) contient : K_2HPO_4 , 0,35 ; KH_2PO_4 , 0,25g, NaCl, 0,5g ; NH_4Cl , 2g ; Extrait de levure, 0,1g ; Oligo-éléments de Balch *et al.*, 1 ml ; Résazurine (0,1%), 1ml ; Eau distillée et désaérée, qsp 1000 ml.

Le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$ à l'aide d'un pH mètre (Fischer Accumet Model 230).

La solution réductrice (B) est une solution à 2,5 g/l de $Na_2S \cdot 9H_2O$ dans de l'eau distillée et désaérée.

La solution tampon (C) est une solution à 4 g/l de $NaHCO_3$ dans de l'eau distillée et désaérée.

Le milieu complet est obtenu par ajout de 2%(V/V) de B et 2%(V/V) de C au moment de l'inoculation.

2-1-4-2-Milieu pour bactéries sulfato-réductrices

Le milieu pour bactéries sulfato-réductrices est celui de Traoré et Jacq, 1991 modifié. La composition de la solution A est la suivante : K_2HPO_4 , 0,35g ; KH_2PO_4 , 0,25g ; Na_2SO_4 , 6,84g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,00g ; NaCl, 0,50g ; NH_4Cl , 2,00 ; Extrait de levure, 0,10g ; solution d'oligo-élément de Widdel, 1ml ; solution de résazurine (0,1%), 1ml ; eau distillée désaérée, qsp 100ml.

Le milieu complet est obtenu par ajout de la solution B et C comme décrit au paragraphe 2-1-4-1.

2-1-4-3-Milieu pour bactéries méthanogènes (Traoré, 1978)

La solution A du milieu pour bactéries méthanogène a la composition suivante : KH_2PO_4 , 0,35g ; KH_2PO_4 , 0, 25g ; NaCl, 0,50g ; Casitone ; 0.10g ; Extrait de levure, 0,1g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,50g ; solution d'oligo-élément de

Balch et al.(1979), 1ml ; solution de résazurine (0,1%), 1ml ; eau distillée désaérée, qsp 100ml.

Le milieu complet est obtenu par ajout de la solution B et C comme décrit au paragraphe 2-1-4-1.

2-1-4-4-Milieu pour bactéries dénitrifiantes

Il est préparé de la même manière que le milieu pour les bactéries méthanogènes , toutefois il est ajouté du NaNO_3 à concentration finale de 20 mM dans la solution A.

2-1-5-L'ISOLEMENT DES SOUCHES

L'enrichissement a été réalisé dans des flacons de 100 ml contenant 60 ml de milieu de culture anoxique constitué des solutions A, B et C en présence de 20 mg/l de pesticide.

2-1-5-1-Obtention de l'inoculum

L'inoculum à acclimater a été obtenu à partir d'échantillons de boue prélevés dans la station d'épuration de l'abattoir frigorifique de Ouagadougou. Cette station est en fait une lagune anaérobie fonctionnant en condition méthanogénique depuis plusieurs années. Cet inoculum a été conservé au réfrigérateur à +4°C.

Deux souches bactériennes anaérobies, nommées DX et SY ont été isolées à partir des inocula acclimatés pendant 2 ans en présence de 20mg/l de Decis et de Sumithion respectivement.

2-1-5-2-Enrichissement et isolement des souches de bactéries anaérobies

Les souches DX et SY ont été isolées grâce à la technique des roll-tubes (cf paragraphe 2-1-1-2) à partir d'une colonie isolée prélevée sur l'un des roll-tubes précédents et mis en suspension dans 5 ml de milieu MB. Cette suspension a servi à inoculer par dilution en cascade, une nouvelle série de

roll-tubes incubée à 37°C pendant 48 heures. Ensuite, une colonie isolée a été prélevée sur l'un des roll-tubes et l'opération précédente a été répétée. Après trois passages sur roll tube, une colonie isolée a été prélevée et resuspendue dans 5 ml de milieu MB en présence du pesticide (Decis ou Sumithion). Cette nouvelle suspension bactérienne a servi à inoculer par dilutions en cascade une série de tubes de Hungate, contenant 10 ml de milieu MB avec 10 mg/ de pesticide. Après 48 heures d'incubation à 37°C, le dernier tube de la série dans laquelle se manifestait une croissance a été sélectionné. Ce tube a été considéré comme contenant la souche pure.

2-1-6-TEST DE PURETE

Ces tests ont consisté à cultiver les souches isolées en condition aérobies et anaérobies sur des milieux très riches pouvant permettre la croissance de la plupart des microorganismes.

2-1-6-1-Recherche de contaminants aérobies

Le milieu de culture utilisé à la composition suivante : nutrient broth-Difco, 2g ; glucose, 10g ; peptone, 4g ; agar, 16g ; eau distillée, qsp 1000 ml
Le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$. Le milieu est ensuite autoclavé à 110 °C pendant 30 minutes et réparti dans des boîtes de Pétri.
L'ensemencement des boîtes est effectué par étalement d'un inoculum de la souche à tester. Le prélèvement est réalisé en phase exponentielle de croissance. Des boîtes non ensemencées ont servi de témoins pour ce test.

2-1-6-2-Recherche de contaminants anaérobies

Le milieu de culture contient : peptone, 4g ; glucose, 10g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g ; $Fe(SO_4)_2(NH_4)_2$, 0,5g ; Na_2SO_4 , 2g ; agar, 16g ; eau distillée désaérée, qsp 1000 ml. Il est préparé et réparti anaérobiquement.

Le pH est ajusté à $7,3 \pm 0,2$. Le milieu est autoclavé à 110°C pendant 30 mn. Les cultures sont réalisées dans des tubes de Hungate en « gélose profonde » selon la technique de Pfennig *et al.*, 1981.

2-1-7-CONSERVATION DES SOUCHES DX ET SY

Les souches DX et SY ont été transférées tous les mois environ dans le milieu liquide MB contenant 20mg/l de pesticide correspondant. Les flacons contenant les cultures ont été conservés à la température ambiante du laboratoire (environ 23°C).

2-1-8-ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES SOUCHES

Les caractéristiques morphologiques (la coloration de Gram, la mobilité, la présence et la position des spores, la présence des flagelles, etc..) sont directement observées au microscope optique (CARL ZEISS, West Germany) en contraste de phase. Les photographies des souches ont été réalisées à partir de cellules bactériennes immobilisées.

2-1-9-CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIETES METABOLIQUES

2-1-9-1-Température de croissance

Les intervalles de température permettant la croissance des souches DX et SY ont été déterminés en mesurant la vitesse maximale de croissance des souches, incubées à différentes températures dans des bains-marie thermostatés. On entend par vitesse maximale de croissance (μ_{\max} exprimée en h⁻¹) la vitesse mesurée pendant la phase exponentielle de croissance. Cette vitesse correspond à la pente de la droite : $\text{Log}(\text{DO}) = \mu_{\max} \times (\text{temps})$. Pour cette étude, les cultures ont été réalisées dans des tubes de Hungate contenant le milieu MB avec 20 mg/l de pyruvate ou de glucose respectivement pour le DX et le SY. La croissance a été suivie en mesurant directement la densité optique (DO) des tubes à une longueur d'onde de 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (MILTONROY Spectronic 601). Pour chaque température nous avons inoculé un tube à 10%(V/V) avec une culture récente de la souche. Durant la phase exponentielle de croissance, le tube est utilisé pour inoculer trois nouveaux tubes à partir desquels la cinétique de la

croissance a été suivie. Pour chaque température, la moyenne des trois μ_{\max} été calculée.

2-1-9-2-pH de croissance

L'intervalle de pH permettant la croissance des souches a été déterminé en mesurant la vitesse maximale de croissance de la souche cultivée à différents pH. Cette étude a été effectuée en tubes de Hungate contenant le milieu MB avec 20 mg/l de pyruvate ou de glucose respectivement pour les souches DX et SY. La croissance a été suivie en mesurant directement la densité optique (DO) des tubes à 580 nm. Le reste de l'étude a été mené comme déjà décrit au paragraphe 2-1-9-1.

2-1-9-3-Test de sporulation

Trois tubes de Hungate contenant la culture de la souche pure en croissance exponentielle, sont placés dans un bain-marie thermostaté à 90°C pendant 10 minutes. Après refroidissement à la température ambiante (23°C environ) pendant 10 minutes, les tubes sont placés à l'étuve à 37°C. Si on n'observe aucune croissance après 72 heures. La souche est non sporulante.

L'observation des spores s'effectue après 24 heures d'incubation. Cette observation se fait à l'état frais et après coloration des spores.

2-1-9-4-La réduction des nitrates, des sulfates, des sulfites, du soufre élémentaire et des thiosulfates

La réduction des nitrates, des sulfates, des sulfites, du soufre élémentaire et des thiosulfates a été étudiée en utilisant le milieu MB avec 20mM de NaNO_3 , de Na_2SO_4 , de Na_2SO_3 , de sulfites et de soufre respectivement. La réduction des composés soufrés a été contrôlée par dosage des sulfures totaux (cf. paragraphe 2-2-6).

Pour tous ces tests, les cultures ont été réalisées en tubes de Hungate inoculés à 10%(V/V) à partir d'une culture récente de la souche DX ou SY

dans un milieu MB avec 20mg/l de pesticide correspondant. Les expériences sont conduites à 37°C en triple culture.

2-1-9-5-Besoins en facteurs de croissance

Pour l'étude des besoins en facteur de croissances, il a été utilisé les facteurs de croissances suivants: extrait de levures (Sigma), Casitone (Difco), Biopeptone (Difco), Casaminoacides (Difco). La mesure de l'absorbance à 580 nm a permis de déceler le facteur permettant une meilleure croissance.

2-1-10-LA NUMERATION DES BACTERIES PAR LE NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP)

D'une culture en phase exponentielle de croissance il a été prélevé 1 ml de milieu. Une dilution en cascade de 10^{-1} à 10^{-10} a été réalisée dans des tubes de Hungate contenant 9 ml d'une solution physiologique (NaCl 9g/l) stérile et préparée dans les conditions anaérobies. Ensuite 3 tubes contenant 9 ml de milieu de culture approprié ont étéensemencés avec un aliquote de 1 ml de chaque concentration. Le tout a été incubé à 37°C pendant une semaine. Le relevé des tubes positifs a permis d'estimer via la table de McCrady (1915) le Nombre le Plus Probable (NPP) de bactéries présentes dans l'échantillon de départ.

2-2-LES METHODES ANALYTIQUES

2-2-1-LA PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons biologiques sont centrifugés 15 minutes à 10000g afin d'éliminer les cellules et les débris, puis dilués convenablement pour être compatibles avec les gammes étalons utilisées. Les échantillons à analyser ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'au moment de l'emploi. Les échantillons aromatiques à analyser sont laissés le minimum de temps possible en contact avec l'air afin de minimiser leur oxydation chimique ou

biologique. Les échantillons sont enveloppés de papier aluminium afin d'éviter toute exposition à la lumière.

2-2-2-SUIVI DE LA CROISSANCE BACTERIENNE PAR DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951).

Cette méthode repose sur la formation d'un complexe protéine-cuivre (réaction de biuret) et sur la réduction du phosphomolybdate-phosphotungstate (réactif de Folin-Ciocalteu phénol) par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. Ce procédé est applicable quand la quantité de protéine à déterminer est comprise entre 20 et 200 µg. La concentration en protéine était déterminée par rapport à une courbe étalon établie avec la sérumalbumine bovine ($Y = 0,018X + 0.029$; $R = 0,996$).

2-2-3-DOSAGE DU TITRE ALCALIMETRIQUE COMPLET (TAC)

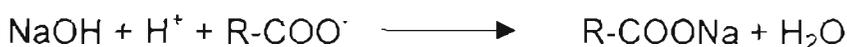
La méthode de dosage du TAC permet de doser simultanément les carbonates et les bicarbonates (CO_3^{2-} et HCO_3^-). Le pH du milieu est lié à la teneur en AGV et à l'alcalinité du milieu. Au-dessous de pH 4 l'ensemble des carbonates et bicarbonates est transformé en acide carbonique et en gaz carbonique. Le TAC est dosé par mesure du volume nécessaire pour ramener le pH à 4 (Traoré, 1992).

Après filtration, le pH de la solution à analyser était mesuré. Le volume en millilitre d'acide sulfurique 0,1N nécessaire (V_1) pour ramener le pH à 4 permet de déterminer la valeur du TAC selon la relation suivante :

$$\text{TAC}(\text{mg/l}) = V_1 \times 0,2 \times 1000$$

2-2-4-DOSAGE DES ACIDES GRAS VOLATILS (AGV) TOTAUX

La soude réagit avec les acides gras volatils suivant la réaction



A pH 7 tous les AGV sont transformés en sel de sodium.

L'échantillon à analyser est bouilli pendant 3 mn après avoir ramené le pH à 3,5. Ceci permet d'éliminer le CO₂ libre contenu dans l'échantillon. La solution est ensuite refroidie à la température ambiante, puis le pH est ramené à 4. Le volume de soude 0,1 N nécessaire pour atteindre pH 7 (V₂) permet de déterminer la concentration d'AGV par la relation : (Traore, 1992).

$$\text{AGV totaux(mg/l)} = V_2 \times 0,04 \times 1000$$

2-2-5-DOSAGE DES SULFURES TOTAUX

Les sulfures totaux ont été dosés selon la méthode de Cord-Ruwish (1985).

On injecte rapidement 0,1 ml de la phase liquide dans 4 ml de réactif [HCl 50mM-CuSO₄ 5mM]. Après cette acidification, l'intensité de la coloration brune due au sulfure de cuivre formé, est mesurée à 480 nm au spectrophotomètre. La concentration en sulfures est proportionnelle à la DO mesurée dans une gamme comprise entre 2 et 20 mM. Une courbe étalon ($Y = 0,0084X + 0.0065$; $R=0.997$) permet de déterminer cette concentration.

2-2-6-ANALYSE DES PRODUITS GAZEUX (CH₄, CO₂, N₂)

Les produits gazeux ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse à catharomètre (CPG). L'appareil utilisé est un chromatographe Girdel série 30, Type 30-C-TP N°900 équipé d'un enregistreur Servotrace Type PL N°9349 et doté d'une colonne Altech CAT N°8700. L'analyse des gaz est effectuée par injection manuelle de 0,5 ml de gaz prélevé au niveau de la phase gazeuse des digesteurs. Les aires des pics détectés permettent de calculer la concentration de chaque gaz dans le mélange par comparaison avec les concentrations calculées à partir des pics du gaz étalon correspondant.

Les échantillons sont analysés dans les conditions suivantes: gaz vecteur (argon à 1 bar), températures d'injection et de détection (100°C), température du four (60°C), courant du filament (50 mA), vitesse de déroulement du papier (5 mm/mn).

2-2-7-LE RENDEMENT D'EPURATION : LE TAUX D'ABAISSMENT DE LA DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE (DCO)

Les rendements d'épuration ont été exprimés par les taux d'abaissement de la DCO suivant la norme AFNOR NFT 90-101 (Afnor, 1985). Ce dosage est basé sur la réduction du bichromate de potassium en excès lors de la dégradation de la matière organique en milieu acide à chaud et en présence de catalyseur. La quantité de bichromate de potassium non réduite est mesurée par dosage avec du sulfate de fer et d'ammonium [$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4,6\text{H}_2\text{O}$] ou sel de Mohr. En comparant les résultats avec celui d'un témoin blanc, on déduit la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation de la matière organique.

La DCO exprimée en mg/l d'oxygène est obtenue par la formule suivante.

$$\text{DCO (mg/l)} = 8000 \times (V_0 - V_1) \times N/V$$

Pour laquelle on a:

N: titre de la solution de sel de Mohr

V: volume en ml de la prise d'essai

V_0 : volume en ml de sel de Mohr utilisé pour le blanc

V_1 : volume en ml de sel de Mohr utilisé pour l'échantillon

2-2-8-ANALYSE HPLC DES RESIDUS DU DECIS ET DU SUMITHION*

L'appareil utilisé dans cette étude est un chromatographe HPLC avec une colonne apolaire C18 Symmetry Waters, couplée à un détecteur UV (Jasco, UV-975, Japon) et à un intégrateur (Hewlett-Packard)

Les conditions opératoires sont les suivantes :

Eluant: acétonitrile 60% soit 600 ml d'acétonitrile + 400 ml d'eau distillée filtrée sur membrane millipore (0,22 μm), volume d'injection de l'échantillon: 20 μl ., débit de la pompe (Jasco, PU-980, Japon): 0,9 $\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1}$, température de la colonne: température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), longueur d'onde de détection: 240 nm.

L'échantillon est dilué dans l'éluant de manière à obtenir une concentration compatible avec la gamme d'étalonnage utilisée.

* Avec la collaboration du Laboratoire de Microbiologie IRD de Marseille

2-2-9-ANALYSE HPLC DES AROMATIQUES*

L'appareil utilisé est un chromatographe (Hewlett Packard) modèle 1100 équipé d'une colonne C18 SYMMETRY (Waters Chromatography) couplé à un ordinateur (Hewlett-Packard) équipé d'un logiciel Chemstation

Les conditions opératoires :

Traitement des échantillons : Un ml de milieu de culture à analyser est prélevé dans un tube Ependorf. Puis on y ajoute 100 µl d'acide acétique pur. Le tout est centrifugé à 13000g pendant 15 min (Centrifugeuse de paillasse Biofuge 13, Heræus) puis filtré à travers un filtre millipore (0.22 µm). Le volume d'injection est de 25 µl. La longueur d'onde de détection est fixée à 240 nm.

Le débit de la pompe binaire est de 0.75 ml.min⁻¹. La température du four est fixée à 35°C. La phase mobile est constituée d'un mélange graduel de deux solvants A et B. les modalités de ce mélange sont contenues dans un programme informatique, spécialement conçu pour l'analyse des composés aromatiques. La composition pour 1 litre de solvant A est de 800 ml H₂O filtrée sur membrane millipore (0.45 µm), 200 ml d'acétonitrile pur, 500 µl d'acide acétique pur. Le solvant B contient de l'acétonitrile pur pour HPLC.

2-2-10-ANALYSE HPLC DES AGV (ACIDES GRAS VOLATILS) DIFFERENTIELS*

L'appareil utilisé est un chromatographe HPLC muni d'une pompe Spectra série P 100 (Thermo Separation Products ; Californie, USA)

Le volume d'injection est de 20 µl. La colonne utilisée est une colonne ORH 801 (Interaction Chemicals, Inc., Mountain View, Ca. USA). Le détecteur est un réfractomètre différentiel RID 6A (Shimadzu CO., Kyoto, Japon). Le chromatographe est couplé à un intégrateur : Chromatopac C-R6A (Shimadzu CO., Kyoto, Japon).

Les conditions opératoires sont les suivantes:

Eluant : solution H₂SO₄ 0.005 N filtrée (0.22 µm, Millipore) puis dégazée sous vide. Le débit de l'éluant est fixé à 0.6 ml.min⁻¹. La température de la colonne

*Avec la collaboration du Laboratoire de Microbiologie IRD de Marseille

est de 35°C. Avant injection, l'échantillon à analyser est centrifugé à 13000g pendant 15 min puis dilué après filtration en utilisant le solvant approprié.

2-2-11-ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU DECIS ET DU SUMITHION DANS LE SOL

2-2-11-1-Traitement du sol :

Le sol prélevé dans la cour de l'université de Ouagadougou, provenait d'un endroit qui n'a subi aucun traitement par des pesticides antérieurement. Le sol séché à l'air libre, tamisé à travers un tamis (0,5 mm) a été pré-réduit avant l'application du pesticide. Trois kilogrammes (3kg) de sol tamisé ont été introduits dans un pot en plastique de 5 litres et inondé avec 1,5 l d'eau distillée stérile de sorte à avoir une colonne d'eau d'environ 25 mm. Le sol ainsi inondé fut incubé à température ambiante ($25\pm 2^\circ\text{C}$) pendant 60 jours pour permettre sa réduction. La réduction du sol a été confirmée par mesure du potentiel redox. Pour faire la part de la dégradation chimique et de la dégradation biologique, le sol réduit fut stérilisé par autoclavage 3 fois à 121°C pendant 1 heure.

2-2-11-2-Extraction et analyse du Decis et du Sumithion

L'extraction du Sumithion fut effectuée en agitant trois fois de suite 10 g de sol dans 40 ml de chloroforme-diéthyl éther pendant 45 mn. L'extraction du Decis a été effectuée en agitant 10g de sol dans 30 ml de benzène pendant 45 mn une première fois, puis deux fois de suite avec 30 ml d'acétone pendant 30 mn. Après une centrifugation à 10000g pendant 15 mn suivie d'une filtration sur filtre millipore (0,22 μm), les résidus de Decis et de Sumithion sont alors analysés par HPLC selon le protocole détaillé au paragraphe 2-2-8.

CHAPITRE 3
RESULTATS ET DISCUSSIONS

3-1-ETUDE DE LA BIODEGRADABILITE DES PESTICIDES

3-1-1- CHOIX DES PESTICIDES A UTILISER COMME SUBSTRAT

Le recensement des informations au Ministère de l'Agriculture, à la Société de Fibres et Textile (SOFITEX), et à la Direction des Protections des Végétaux et du Conditionnement (DPVC) en 1994 ont permis de retenir six (6) pesticides parmi les plus utilisés en agriculture au Burkina Faso (Savadogo, 1996). Il s'agissait du Decis (deltaméthrine), du Malathion (malathion), du Pyridaphenthion (pyridaphenthion), du Sevimol (carbaryl) du Sumithion (fénitrothion) et de l'Ultracide (métidathion).

3-1-2- CHOIX DU SITE DE PRELEVEMENT DE L'INOCULUM

L'efficacité de l'inoculum à dégrader le pesticide a été estimée en suivant la production de méthane (CH_4) en présence de chacun des six pesticides inoculés avec chaque type d'inoculum (Savadogo, 1996; Shelton et Tiedje, 1984). Des inocula provenant de six sites ont été testés. Il s'agissait des inocula provenant de la station d'épuration de l'EIER, des effluents de TAN-ALIZ, de la station d'épuration de l'abattoir frigorifique de Ouagadougou, du barrage N°1 de Ouagadougou et de 2 puits perdus de Zogona (quartier où se situe l'université de Ouagadougou). Les échantillons d'inocula prélevés dans ces sites ont été enrichis dans les conditions méthanogéniques en présence de chaque pesticide à la concentration initiale de 20 mg/l et incubés à 37°C pendant 60 jours.

Après 60 jours d'incubation les inocula provenant du barrage et de la station d'épuration de l'EIER n'ont donné lieu à aucune production de méthane. En revanche une activité notable a été enregistrée avec les autres inocula.

Aucune production de méthane n'a été enregistrée au niveau des témoins stériles contenant 20 mg/l de chaque pesticide.

Tableau la : Suivi de la production de méthane avec l'inoculum provenant de l'abattoir frigorifique de Ouagadougou

^a Méthane produit dans la phase gazeuse ($\mu\text{mole}/0,5 \text{ ml}$) après :

Pesticides	0 jour	5 jours	10 jours	15 jours	20 jours	25 jours	30 jours	35 jours	40 jours	45 jours	50 jours	55 jours	60 jours
Néant ^b	0,0	0,0	1,0	2,1	3,2	5,6	6,2	6,4	6,3	6,2	6,2	6,2	6,2
Decis	0,0	4,4	7,0	16,0	22,0	26,0	30,0	32,0	31,0	31,0	30,8	30,6	30,5
Malathion	0,0	6,6	13,1	17,1	24,8	30,4	35,4	44,6	44,5	44,4	44,0	44,0	43,8
Pyrida- phenthion	0,0	9,5	14,4	19,6	31,0	39,0	42,1	46,0	47,0	47,2	47,0	47,0	47,0
Sevimol	0,0	12,4	32,2	38,0	42,0	46,0	45,8	45,7	45,5	45,2	45,0	45,0	45,0
Sumithion	0,0	5,4	6,8	14,4	15,6	15,8	16,2	18,1	18,0	17,8	17,5	17,5	17,5
Ultracide	0,0	3,0	4,0	6,4	7,0	8,2	9,0	9,4	9,3	9,3	9,2	9,2	9,2

^a Les expériences ont été conduites dans des flacons de 50 ml contenant 27 ml de milieu de culture inoculé avec 3 ml de l'inoculum fraîchement prélevé et incubé à 37°C à l'obscurité.

Chaque expérience est réalisée en trois (3) exemplaires. Deux (2) prélèvements de 0,5 ml de la phase gazeuse de chaque exemplaire sont analysés par CPG. Ainsi, chaque valeur du tableau est une moyenne de six mesures.

^b Témoin inoculé ne contenant aucun pesticide. Les seules sources de carbone sont l'extrait de levure (0,1g/l), la casitone (0,1g/l) et les substrats apportés par l'inoculum.

L'inoculum provenant de l'abattoir frigorifique de Ouagadougou (tableau ia), s'est montré plus performant dans la production de méthane en présence des pesticides testés. Cela indique que ces pesticides peuvent servir de source de carbone et d'énergie pour les microorganismes contenus dans l'inoculum de l'abattoir comme précédemment décrit dans la littérature (Bechard *et al.*, 1996). Nous concluons donc que le Decis, le Malathion, le Pyridaphenthion, le Sevimol, le Sumithion et l'Ultracide sont dégradés par l'inoculum de l'abattoir. Par contre la capacité de minéralisation de l'inoculum varie d'un pesticide à l'autre. En effet après 60 jours d'incubation la quantité de méthane produite est de 47,0 μmole avec le Pyridaphenthion, 45,0 μmole avec le Sevimol, 43,8 μmole avec le Malathion, 30,5 μmole avec le Decis tandis qu'elle n'est que de 9,2 μmole avec l'Ultracide.

Tableau Id : Suivi de la production de méthane avec l'inoculum ZOGONA2

^aMéthane produit dans la phase gazeuse ($\mu\text{mole}/0,5 \text{ ml}$) après :

Pesticides	0 jour	5 jours	10 jours	15 jours	20 jours	25 jours	30 jours	35 jours	40 jours	45 jours	50 jours	55 jours	60 jours
Néant ^b	0,0	0,0	0,2	0,7	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Decis	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Malathion	0,0	0,0	0,2	0,8	1,2	2,3	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Pyrida- phenthion	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Sevimol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
Sumithion	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Ultracide	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Selon le seul critère de production de méthane par l'inoculum de l'abattoir, nous pouvons classer les six pesticides selon une biodégradabilité décroissante. Dans nos conditions, le Pyridaphenthion serait le plus facilement biodégradable suivi du Malathion, du Sevimol, du Decis, du Sumithion et de l'Ultracide. Ce dernier semble être le plus récalcitrant à la biométhanisation, car c'est en sa présence qu'on note les plus faibles productions de méthane quel que soit l'inoculum. Nous avons constaté que la production de méthane est faible pendant les 10 premiers jours puis qu'elle s'accroît rapidement entre le 10^{ème} et le 35^{ème} jour pour finalement baisser et s'annuler après 45-50 jours d'incubation (tableau Id). sauf dans le cas du Malathion et du Sevimol avec l'inoculum ZOGONA2 où elle continue d'augmenter après 60 jours (résultat non disponible).

Nous constatons également que la production de méthane varie d'un inoculum à l'autre. En effet, tandis que la production de méthane est nulle avec les inocula de l'EIER et du barrage n°1 de Ouagadougou, elle est faible avec les inocula de TAN-ALIZ et de ZOGONA2 (tableau Ib et Id) et ne commence qu'après 10 à 15 jours d'incubation. Celle enregistrée avec ZOGONA1 (tableau Ic) est plus importante par rapport à ZOGONA2 et TAN-ALIZ, mais reste inférieur à la production de méthane avec l'inoculum de l'abattoir.

La différence de production de méthane traduit la spécialisation de chaque inoculum à dégrader les pesticides testés. Cette observation peut s'expliquer par le fait que ces inocula renfermeraient des substances toxiques pour ce groupe de microorganismes. Cela peut provenir aussi du fait que certains inocula renferment une faible population de bactéries méthanogènes. C'est le cas où l'inoculum contient des substances toxiques pour ce groupe de microorganismes.

La toxicité des pesticides joue également un rôle capital en ce qui concerne l'inhibition de la méthanogénèse (Donlon *et al.*, 1995).

La présence d'autres microorganismes capables d'amorcer la dégradation des pesticides devrait se traduire par une forte production de méthane étant donné que les méthanogènes sont au bout de la chaîne trophique dans les consortia de microorganismes et que leur activité est d'autant plus forte que la dégradation des molécules de départ est importante comme l'a démontré Bechard *et al.* (1996). Ainsi la diversité de la population microbienne joue un rôle important dans la biodégradation des molécules xénobiotiques telles que les pesticides de synthèse.

La variation de la production de méthane pourrait également être expliquée par le fait que certains inocula étaient très riches en substances nutritives (Abattoir, ZOGONA1 et ZOGONA2) ce qui est favorable au cométabolisme c'est à dire à la biodégradation simultanée d'autres substrats carbonés. Cela à été probablement le cas de l'inoculum de l'abattoir.

Au vu de sa performance, l'inoculum provenant de l'abattoir a été retenu pour la suite de l'étude qui visait l'optimisation de la biodégradation des trois pesticides les plus récalcitrants c'est à dire le Decis, le Sumithion et l'Ultracide.

3-2-ETUDE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES EN VUE DE L'OPTIMISATION DE LA BIODEGRADATION DU DECIS, DE L'ULTRACIDE ET DU SUMITHION

3-2-1- CONDITIONS DE CULTURE PENDANT L'ACCLIMATATION

Pendant l'acclimatation il a été utilisé un milieu de culture favorisant la croissance de la plupart des groupes de bactéries anaérobies. L'acclimatation a consisté à effectuer des transferts successifs des souches dans un milieu neuf contenant le même pesticide comme seule source de carbone. La périodicité du transfert avait été fixée à 30 jours. Pendant la période d'acclimatation qui a duré 2 ans, la température d'incubation a été fixée à 37°C. La température de 37°C a été choisie parce qu'elle est favorable à la croissance de nombreux microorganismes anaérobies dont les bactéries méthanogènes. Le pH initial des milieux de culture a été fixé à 7,2 pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment. L'évolution du pH des milieux a été suivie pendant toute la période d'incubation. Les résultats obtenus au cours des quatre (4) premiers mois d'acclimatation (tableau II) ont montré que le pH baisse légèrement entre le 1^{er} et 5^{ème} jour d'incubation en présence du Decis, de l'Ultracide ou du Sumithion. Une augmentation régulière du pH est ensuite apparue dans les milieux contenant le Decis ou l'Ultracide. Cette augmentation est importante au cours du premier mois d'acclimatation des souches. Le pH atteint 7,65 avec le Decis et 7,55 avec l'Ultracide au moment du transfert. L'augmentation du pH serait due à la libération de produits alcalins (ammoniacque, radicaux phosphorés) dans le milieu de culture. En effet le Decis comme l'Ultracide renferme des atomes d'azote. On note la présence de l'atome de phosphore au niveau de l'Ultracide.

Avec le Sumithion on note une diminution du pH entre le 10^{ème} et le 20^{ème} jour. Ce qui peut correspondre à une accumulation d'acides gras volatils (AGV) (acétate, propionate, butyrate, ...) provenant de la dégradation de ce

pesticide. Après le 20^{ème} jour le pH augmente pour atteindre 7,2 le 30^{ème} jour d'incubation (tableau II).

Tableau II: Evolution du pH dans les flacons au cours des quatre (4) premiers mois d'acclimatation.

		Temps d'incubation en jours						
		0	5	10	15	20	25	30
PH* du milieu contenant le Decis (20 mg/l)	1 ^{er} mois	7,25	7,10	7,26	7,53	7,60	7,65	7,65
	2 ^{ème} mois	7,28	7,19	7,20	7,45	7,54	7,58	7,63
	3 ^{ème} mois	7,22	7,15	7,22	7,38	7,45	7,48	7,55
	4 ^{ème} mois	7,23	7,17	7,18	7,20	7,28	7,32	7,48
PH* du milieu contenant l'Ultracide (20 mg/l)	1 ^{er} mois	7,22	7,24	7,20	7,22	7,25	7,30	7,55
	2 ^{ème} mois	7,18	7,23	7,22	7,27	7,25	7,30	7,30
	3 ^{ème} mois	7,22	7,24	7,23	7,26	7,24	7,32	7,30
	4 ^{ème} mois	7,19	7,25	7,24	7,28	7,30	7,35	7,40
PH* du milieu contenant le Sumithion (20 mg/l)	1 ^{er} mois	7,26	7,10	7,05	6,60	6,70	7,10	7,20
	2 ^{ème} mois	7,22	7,12	6,80	6,90	7,02	7,12	7,15
	3 ^{ème} mois	7,24	7,20	7,02	7,01	6,89	7,18	7,25
	4 ^{ème} mois	7,25	7,15	7,05	6,95	7,10	7,20	7,22

* Les expériences ont été conduites dans des flacons de 500 ml contenant 390 ml de milieu de culture inoculé avec 40 ml d'inoculum et incubé à 37°C à l'obscurité. L'inoculum est obtenu par transfert successif après 30 jours d'incubation. Les valeurs indiquées sont des moyennes obtenues à partir de trois mesures avec des écartypes variant entre 0,005 et 0,02

Dans tous les cas les pH se situent entre 6,5 et 7,7 ce qui est favorable à une bonne activité de la plupart des bactéries anaérobies. Aucune mesure particulière n'a été prise pour ajuster le pH au cours de l'acclimatation des inocula.

3-2-2- EVOLUTION DES ACIDES GRAS VOLATILS TOTAUX (AGV) ET DU TITRE ALCALIMETRIE COMPLET (TAC)

Le dosage des AGV totaux a été effectué tout au long de l'acclimatation de l'inoculum en vue d'évaluer leur effet inhibiteur sur la méthanogénèse en cas de leur forte accumulation. Dans tous les milieux (Decis, Ultracide, Sumithion) il y a une augmentation de la concentration en AGV pendant les 5 premiers jours d'incubation. Toutefois le taux des AGV baisse après 10 jours. Dans tous les cas ces taux sont compris dans la gamme favorable à une

bonne activité microbienne c'est-à-dire entre 200 et 700 mg/l (Lagrange, 1980 ; Traore, 1992) (tableau III). Par contre les valeurs des titres alcalimétries complets (TAC) relevés sont en deçà de la limite favorable. En effet pour obtenir une bonne biométhanisation il faut que le TAC soit compris entre 2000 et 5000 mg/l (Lagrange, 1980) alors que nous avons obtenu des valeurs de TAC situées entre 700 et 920 mg/l pour le Decis, 600 et 980 mg/l pour l'Ultracide, 600 et 920 mg/l pour le Sumithion (tableau III).

Tableau III: Evolution des AGV et du TAC au cours du 3^{ème} mois d'acclimatation

		Temps d'incubation en jours						
		0	5	10	15	20	25	30
Decis	AGV* (mg/l)	280±10	380±5	300±14	320±12	270±15	280±10	260±8
	TAC* (mg/l)	800±15	700±12	900±11	920±13	920±14	900±11	920±12
Ultracide	AGV* (mg/l)	320±12	380±13	360±13	340±8	320±13	300±12	280±14
	TAC* (mg/l)	700±14	600±14	700±15	800±12	900±7	950±13	980±10
Sumithion	AGV* (mg/l)	280±10	360±16	300±12	280±9	240±8	260±15	240±15
	TAC* (mg/l)	800±15	600±13	800±10	820±10	840±14	900±10	920±14

* Moyenne de 3 mesures ± écartype moyen

3-2-3- EVOLUTION DE LA DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE (DCO) AU COURS DE L'ACCLIMATATION

Le dosage de la DCO a été effectué en fonction de temps d'acclimatation. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV.

Les taux d'épuration par rapport à la DCO exprimé par le pourcentage d'abaissement de la DCO donnent avec les inocula ayant subi 2 ans d'acclimatation 63% pour le Decis, 60% pour l'Ultracide et 56% pour le Sumithion (tableau IV). D'autre part nous constatons que les rendements d'épuration c'est à dire l'augmentation des taux d'épuration lorsqu'on compare

un inoculum non acclimaté d'avec les inocula acclimaté sont respectivement de 21% pour le Decis, de 14% pour l'Ultracide et de 15% pour le Sumithion. Nous constatons ainsi que l'acclimatation augmente la performance des microorganismes de nos inocula pour la biodégradation des pesticides.

Des résultats similaires ont été obtenus par Ouattara (1994) et Ossombo *et al.* (1985).

L'augmentation de la performance des microorganismes au cours de l'acclimatation peut s'expliquer par une induction d'enzymes spécifiques à ces pesticides; ou une mutation génétique conduisant à de nouvelles capacités physiologiques ou encore par une sélection de bactéries spécifiques, tolérant et/ou dégradant ces pesticides (Barkay et Pritchard, 1988). Ce type de sélection a lieu dans la nature et constitue un moyen de lutte des communautés microbiennes face à la pollution de leur environnement (Barkay et Pritchard, 1988). En effet l'épandage de produits polluants très toxiques, par exemple les phénols polychlorés conduit souvent à la sélection d'organismes qui sont capables de leur résister en les transformant rapidement sous une forme moins nocive (Ala Al-Aoukaty, 1992, Barkay et Pritchard, 1988; Santos *et al.*, 1998). C'est ainsi qu'il a été relevé que la biodégradation de cinq produits chimiques (aniline, anthracène, chlornitrophène, fénitrothion et des alkyl benzènes sulphonates) par des bactéries aquatiques était localisée aux zones contaminées suggérant que la biodégradabilité de certaines substances chimiques résulte de l'accumulation des communautés microbiennes sélectionnées par les contaminant (Spain et Van Veld, 1983; Nishihara *et al.*, 1997).

Tableau IV : Taux d'abaissement moyen de la DCO après 1 mois d'incubation avec l'inoculum non acclimaté et avec les inocula ayant subi 3 mois, 1 an et 2 ans d'acclimatation

	Avant acclimatation			Après 3 mois d'acclimatation			Après 1 an d'acclimatation			Après 2 ans d'acclimatation		
	DCO _i	DCO _f	ΔDCO	DCO _i	DCO	ΔDCO	DCO _i	DCO _f	ΔDCO	DCO _i	DCO _f	ΔDCO
Decis (20 mg/l)	15400	9000	42	11400	4800	58	11800	4800	59	11400	4200	63
Ultracide (20 mg/l)	15700	8400	46	11400	6000	47	11600	5000	57	11533	4600	60
Sumithion (20 mg/l)	16000	9500	41	11500	5400	53	12000	5400	55	10667	4733	56

Les valeurs sont des moyennes de trois mesures avec des écartypes variant entre 0,70 et 0,85.

DCO_i : DCO initiale

DCO_f : DCO finale

ΔDCO exprime le taux d'épuration des milieux de culture. Il est obtenu à partir de la formule :

$$\Delta\text{DCO} = \frac{\text{DCO}_i - \text{DCO}_f}{\text{DCO}_i} \times 100$$

Pour avoir une bonne méthanogénèse la valeur de la DCO favorable est de 10000 mg/l. Cette valeur doit être toujours supérieure à 3000 mg/l (Lagrange, 1980). Nous constatons que les valeurs de DCO initiale étaient toujours supérieures à 3000 mg/l. Ainsi, les valeurs obtenues étaient favorables à une bonne activité bactérienne et même à une bonne méthanogénèse.

3-2-4-SUIVI DE LA PRODUCTION DE SULFURES DISSOUS (HS⁻, S²⁻, HS⁻) DANS DES CONDITIONS METHANOGENIQUES

Dans des conditions méthanogéniques (pas d'ajout d'accepteur exogène d'électrons) la production de sulfures est très faible et n'atteint en aucun cas 100 mg/l qui est la valeur à ne pas dépasser pour une bonne méthanogénèse (Soren et Ahring, 1992). Les résultats obtenus avec l'inoculum ayant subi 2 ans d'acclimatation (tableau V) montraient des taux de sulfures situés entre 35 et 60 mg/l.

Tableau V : Production de sulfures avec le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation

	*Sulfures (mg/l) produits dans le milieu						
	0 jours	5 jours	10 jours	15 jours	20 jours	25 jours	30 jours
Decis	35±3	40±3	50±3	55±4	50±3	50±3	45±2
Ultracide	35±2	38±2	45±4	50±3	55±4	50±2	45±4
Sumithion	40±4	47±4	50±3	55±2	60±4	58±3	50±2

*moyenne de 3 mesures ± écartype

Le rapport de sulfures solubles sur la DCO (sulfures/DCO) est un facteur très important pour la digestion anaérobie surtout lorsque des bactéries méthanigènes interviennent dans cette digestion. En effet, lorsque ce rapport est situé entre 0,03 et 0,08 on a une inhibition des activités des bactéries méthanigènes et par suite de la biodégradation (Soren et Ahring, 1992). Dans notre cas, après 2 ans d'acclimatation le rapport Sulfures/DCO est de 0,003 pour le Decis et l'Ultracide et 0,004 pour le Sumithion. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles inhibitrices et montrent que la biodégradation anaérobie du Decis et du Sumithion n'est pas inhibée par la production de sulfures dans les milieux de culture.

3-2-5-BESOIN EN FACTEUR DE CROISSANCE DES BACTERIES INTERVENANT DANS LA BIODEGRADATION DES PESTICIDES

Il a été montré que pour réaliser la biodégradation des xénobiotiques certaines bactéries exigent la présence de facteur de croissance. C'est ainsi que nous avons testé quatre facteurs de croissance couramment utilisés dans l'étude de la biodégradation anaérobie. Il s'agit de l'extrait de levure (Sigma), la casitone (Difco), la biopeptone (Difco) et les casaminoacides (Difco).

L'analyse des résultats obtenus montre que parmi les produits testés l'extrait de levure s'est révélé être le meilleur pour la culture des bactéries intervenant dans la biodégradation, du Decis, du Sumithion et de l'Ultracide

(figure 13). Une étude précédente avait montré que la croissance des bactéries intervenant dans la biodégradation de ces pesticides est meilleure en présence d'extrait de levure et de casitone (Savadogo, 1996). Ces résultats sont similaires à ceux de Moore *et al*, 1983, qui ont montré que la thiamine était le facteur de croissance essentiel dans l'extrait de levure pour la croissance de deux souches bactériennes en présence d'un herbicide (le Glyphosate). En fait l'extrait de levure est reconnu pour être particulièrement riche en vitamines.

La concentration de l'extrait de levure et de la casitone à utiliser a été fixée à 0,1g/l afin de favoriser l'acclimatation des inocula pour la biodégradation des pesticides. En effet lorsque la concentration du facteur de croissance est élevée, les souches des inocula ont tendance à utiliser ces facteur au détriment des pesticides (substrats difficilement dégradables).

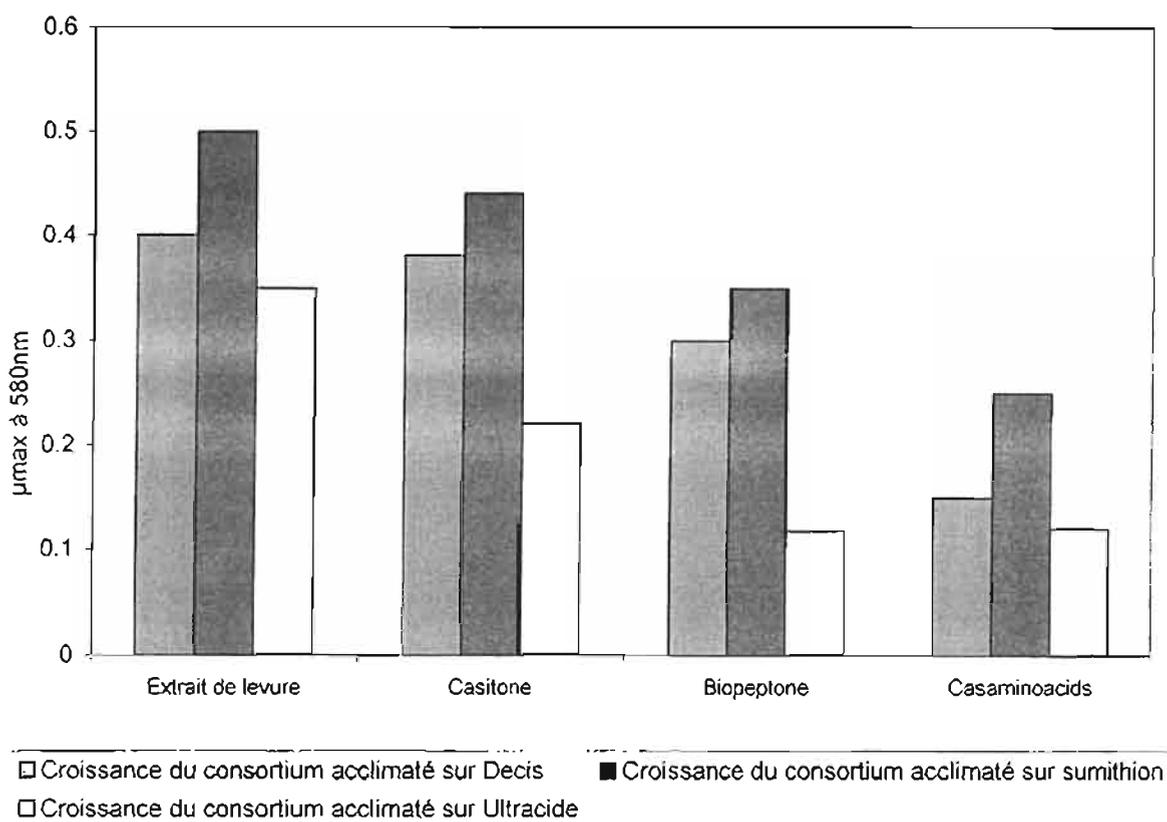


Figure 13: Effet de différents facteurs de croissance sur les inocula acclimatés

3-3-CINÉTIQUE DE LA BIODEGRADATION DU DECIS, DE L'ULTRACIDE ET DU SUMITHION

La cinétique de la biodégradation des pesticides a été suivie par HPLC pendant 60 jours.

3-3-1-DEGRADATION DU DECIS PAR LE CONSORTIUM AYANT SUBI 2 ANS D'ACCLIMATATION

La dégradation du Decis à 20 mg/l est rapide et ne présente pratiquement pas de phase de latence. Après 5 jours d'incubation la concentration du Decis est de 14 mg/l. Cette concentration atteint 6,8 mg/l après 10 jours d'incubation soit une vitesse maximale de dégradation de $(20 - 6.8)/15 = 0,9 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Après 20 jours la concentration en Decis est inférieure à la limite détectable ($1 \mu\text{g/l}$). Ainsi la vitesse moyenne de dégradation du Décis en présence de l'inoculum acclimaté est de $20/20 = 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$.

Au niveau des tubes témoins c'est-à-dire ne contenant aucun microorganisme la concentration en Decis passe de 20 mg/l à 19,2 mg/l en 20 jours, ce qui montre que la biodégradation anaérobie est responsable de la dégradation de 96% du Decis (figure 14a).

Lorsque la concentration initiale en Decis est portée à 50 mg/l, on n'observe pas de phase de latence et la concentration diminue à 17,5 mg/l en 10 jours d'incubation soit une vitesse maximale de dégradation de $3,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Au bout de 20 jours la concentration n'est plus que de 5 mg/l soit une dégradation de 90% du Decis initial. Au bout de 30 jours d'incubation la totalité du Decis est dégradé. Ce qui correspond à une vitesse moyenne de dégradation de $1,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Pendant ce même temps la concentration de Decis reste à 47,6 mg/l dans les tubes témoins montrant une biodégradation anaérobie du Decis de 95,2% (figure 14b).

Avec 100 mg/l de Decis initial, la phase de latence est de 4 jours, suivie d'une accélération de la dégradation entre le 5^{ème} et le 30^{ème} jour avec une vitesse maximale de $4 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ située entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour. En effet, après 5 jours la biodégradation du Decis n'est que de 4%. Ce taux atteint 9% au bout de 10 jours d'incubation et 42,3% au bout de 20 jours. A partir du 20^{ème} jour la biodégradation s'accélère pour atteindre un taux de 79,3% le 30^{ème} jour. La quantité totale (100 mg/l) n'est dégradée qu'après 50 jours d'incubation soit une vitesse moyenne de dégradation du Decis de $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. La dégradation abiotique observée après ces 50 jours d'incubation n'est que de 4% (figure 14c).

Ainsi, ces résultats ont montré qu'une biodégradation anaérobie du Decis est réalisable avec un consortium acclimaté sur Decis. Cette biodégradation est possible pour une teneur initiale en decis de 20, 50 et 100 mg/l. Des résultats similaires ont été rapportés par Ouattara, 1994 puis Chamkha, 1997 lors de l'étude de la biodégradation de structures tanniques.

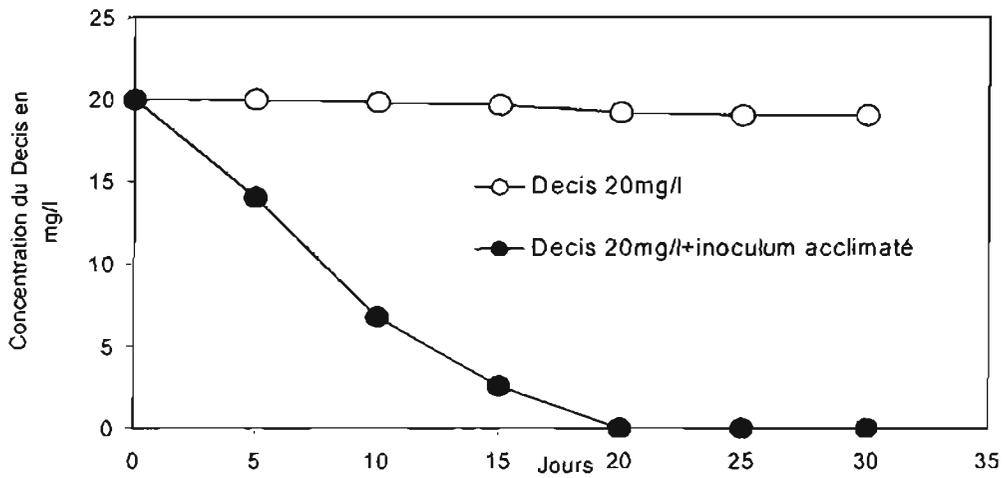
Nos résultats montrent que la vitesse moyenne de dégradation du Decis augmente lorsqu'on fait passer la concentration de 20 mg/l à 50 mg/l puis à 100 mg/l. La faible dégradation abiotique montre que le Decis est relativement

stable dans les conditions de réalisation de cette étude. En effet, la dégradation abiotique de ce pesticide varie entre 2 et 5%. Ceci s'explique par le fait que le Decis (pyréthrénoïde de synthèse) est une molécule stable en absence de lumière. La dégradation abiotique du Decis dans les champs est surtout réalisée par les rayons U.V de la lumière solaire. Dans notre cas les pesticides sont incubés à l'obscurité et à température constante.

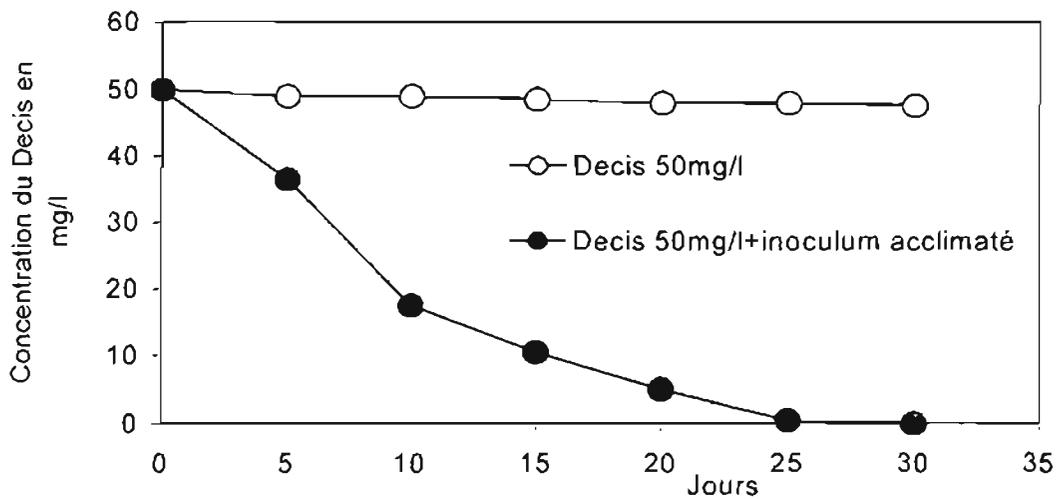
Si nous tenons compte du fait que dans les champs les concentrations de Decis appliquées sont nettement inférieures à celles que nous avons pratiquées, cela montre que l'inoculum acclimaté est très performant pour la biodégradation anaérobie de ce pesticide.

L'inoculum acclimaté peut être utilisé dans des fermenteurs fonctionnant en conditions anaérobies et destinés à l'élimination du Decis recueilli lors du nettoyage des fûts ayant contenus ce pesticide. Ce qui évitera de répandre les résidus de ce pesticide sur le sol et par conséquent de contaminer les eaux de surface et de la nappe phréatique.

a



b



c

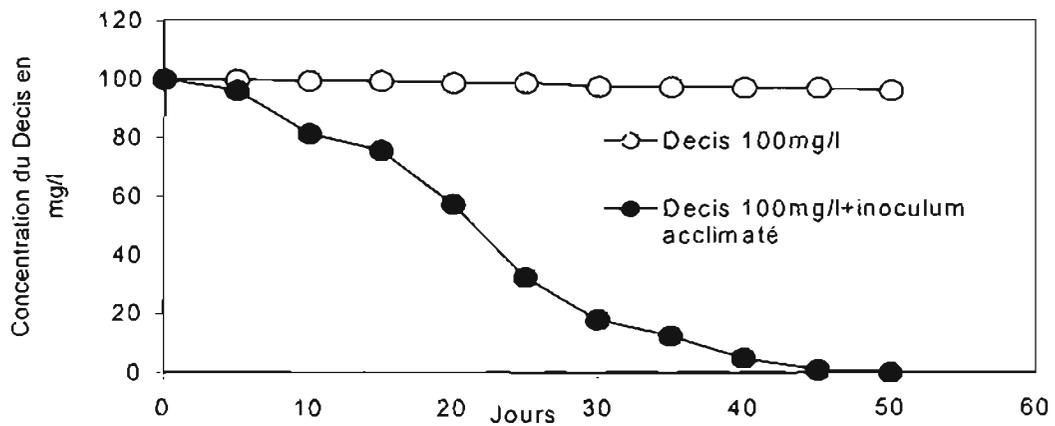


Figure 14: Biodégradation du Decis aux concentrations initiales de 20 mg/l (a), 50 mg/l (b) et 100 mg/l (c) par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation

3-3-2-DEGRADATION DU SUMITHION PAR LE CONSORTIUM AYANT SUBI 2 ANS D'ACCLIMATATION

La dégradation du Sumithion à une concentration de 20 mg/l est très rapide et se réalise en 15 jours avec une vitesse de $1,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. On n'observe pas de phase de latence. Au bout de 5 jours d'incubation 32% du Sumithion est dégradé et 76% au 10^{ème} puis 100% au 15^{ème} jour. Aucune dégradation abiotique du Sumithion n'est notée après 15 jours d'incubation (figure 15a). Cela montre la forte activité dégradatrice des bactéries du consortium obtenu par acclimatation sur le Sumithion.

Avec une concentration initiale portée à 50 mg/l la biodégradation du Sumithion est réalisée en 25 jours avec une vitesse moyenne de $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Ainsi, 69% du Sumithion est dégradé en 5 jours, 72% en 10 jours. Entre le 10^{ème} et le 20^{ème} jour la dégradation du Sumithion est très rapide avec une vitesse maximale de $2,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. En effet, la concentration du Sumithion passe de 28,5 mg/l à 2 mg/l. La dégradation abiotique est négligeable (figure 15b).

Avec 100 mg/l initial la dégradation du Sumithion devient lente. 45 jours sont nécessaires pour biodégrader la totalité du Sumithion. Ce qui correspond à une vitesse moyenne de dégradation de $2,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. La biodégradation abiotique observée est de l'ordre de 4,7% après les 45 jours d'incubation (figure 15c).

Ces résultats montrent que le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation sur Sumithion a été efficace pour les 3 concentrations traitées (20, 50 et 100 mg/l). Une étude similaire réalisée par Alonso *et al.* (1997) a montré que deux souches bactériennes (*Flavobacterium sp souche ATCC27551* et *Arthrobacter aureescens souche TW17*) étaient capable de dégrader le fénitrothion (principe actif du Sumithion) et le produit de son hydrolyse c'est à dire le 3-méthyl-4-nitrophénol dans des échantillons d'eau en condition de laboratoire. (Alonso *et al.*, 1997). Ainsi, l'inoculum acclimaté sur le Sumithion peut être utilisé pour la biodépollution des eaux contaminées par ce pesticide.

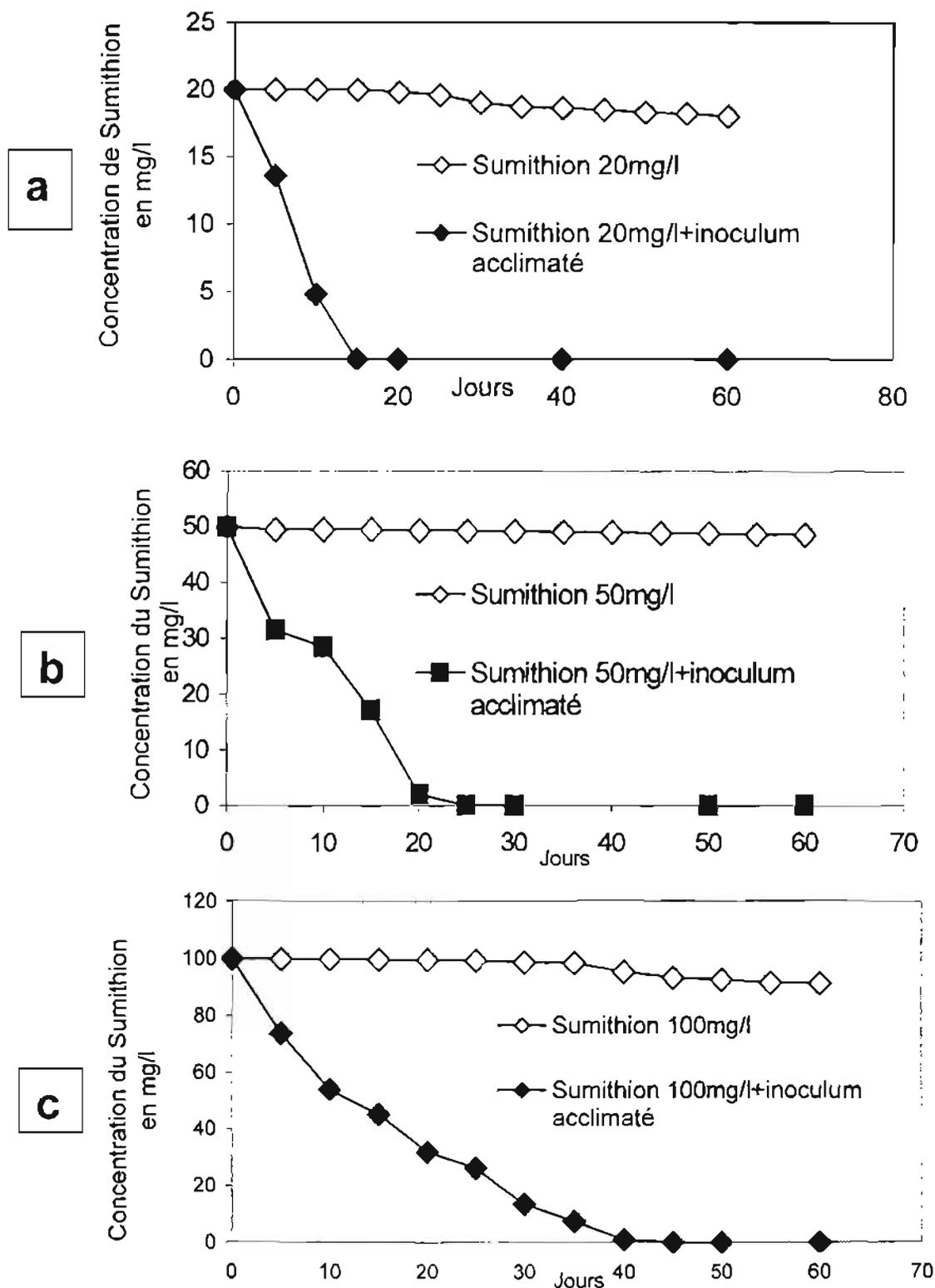


Figure 15: Biodégradation du Sumithion aux concentrations initiales de 20 mg/l (a), 50 mg/l (b) et 100 mg/l (c) par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation

3-3-3-DEGRADATION DE L'ULTRACIDE PAR LE CONSORTIUM AYANT SUBI 2 ANS D'ACCLIMATATION.

La dégradation de 20 mg/l d'Ultracide commence après une phase de latence de 2 jours. Cette dégradation évolue lentement pendant les 10 premiers jours d'incubation. Au 5^{ème} jour d'incubation le taux de dégradation de l'Ultracide est de 7% puis passe à 9% au 10^{ème} jour. La dégradation devient plus rapide après le 10^{ème} jour d'incubation. Ainsi le taux de biodégradation le 20^{ème} jour est de 66%. Ce qui correspond à une vitesse maximale de $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. La dégradation de 20 mg/l d'Ultracide est totalement réalisée après 30 jours d'incubation soit une vitesse moyenne de dégradation de $0,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ (figure 16a).

Avec 50 mg/l d'Ultracide on note une phase de latence de 2 jours. La biodégradation est lente jusqu'au 10^{ème} jour puis s'accélère jusqu'à la dégradation totale du pesticide. Toutefois l'Ultracide n'est totalement dégradé qu'après 55 jours d'incubation (figure 16b). Ce qui correspond à une vitesse moyenne de dégradation de $0,9 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$.

Avec 100 mg/l d'Ultracide on note 3 jours de phase de latence, puis la dégradation évolue de manière lente jusqu'au 15^{ème} jour. On note une accélération de la biodégradation entre le 5^{ème} et le 30^{ème} jour correspondant à une vitesse maximale de dégradation de $2,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Après 60 jours d'incubation il reste dans les milieux 7,4 mg/l d'Ultracide soit une biodégradation de 90,4%. Ainsi la vitesse moyenne de la biodégradation anaérobie de l'Ultracide est de $1,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. On enregistre après 60 jours seulement 2,2% de dégradation abiotique de l'Ultracide (figure 16c). Ce qui indique une grande stabilité de ce pesticide dans nos conditions.

Nos résultats montrent que la biodégradation anaérobie de l'Ultracide est possible à 20, 50 et 100 mg/l mais que aux concentrations de 50 et 100 mg/l elle nécessite une phase de latence pouvant atteindre 5 jours. Toutefois la vitesse de biodégradation de l'Ultracide est plus rapide aux fortes concentrations. Comparée au Decis et au Sumithion la biodégradation de

l'Ultracide est lente. Ce qui confirme les résultats obtenus lors de l'étude de la biodégradabilité de ces pesticides.

Après cette étude nous avons jugé nécessaire d'approfondir nos connaissances sur la biodégradation anaérobie du Decis et du Sumithion. Nous avons entamé pour cela la recherche des produits de leur dégradation afin de mieux élucider les mécanismes biochimiques de leur biotransformation.

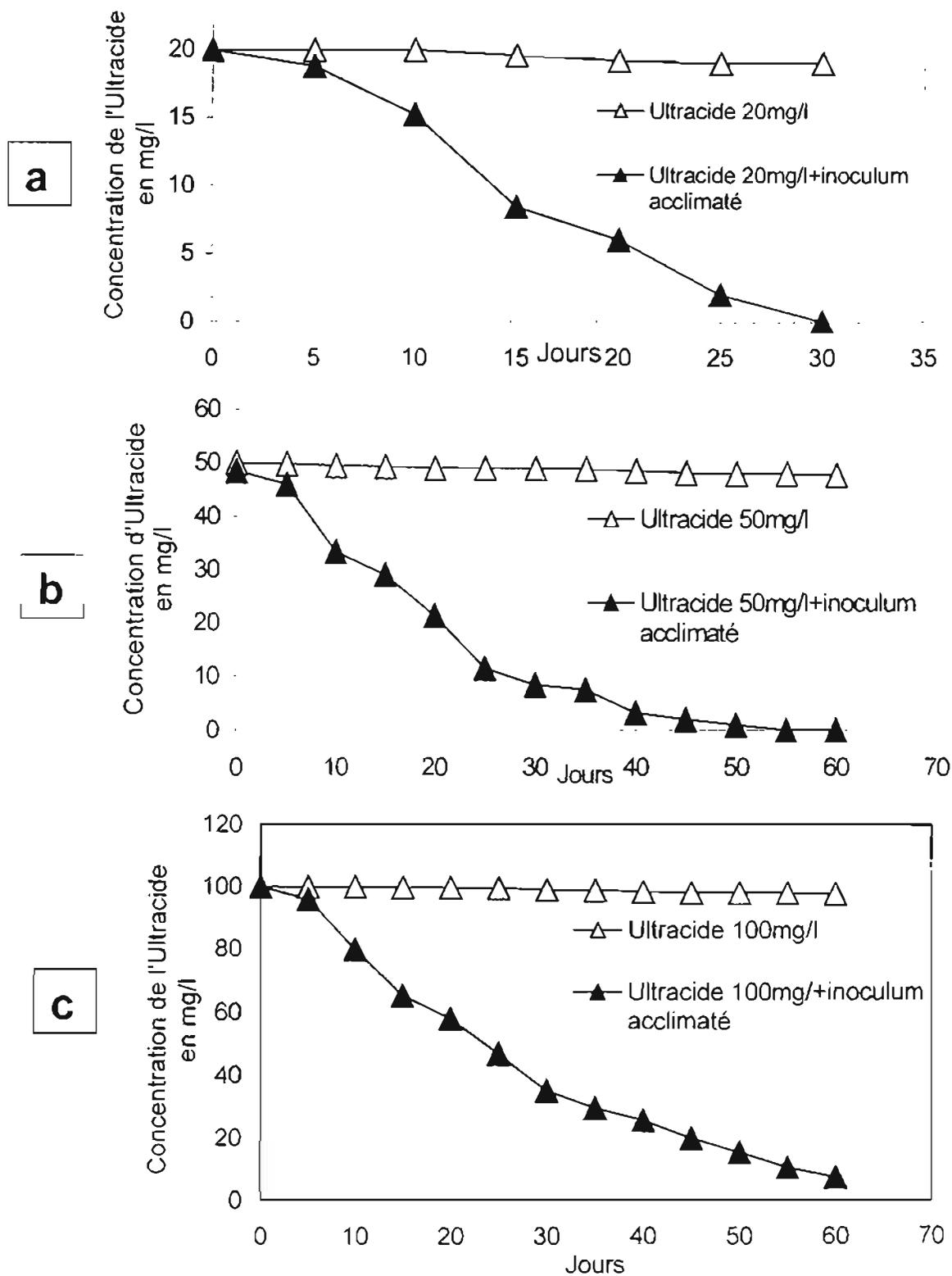


Figure 16: Biodégradations de l'Ultracide aux concentrations initiales de 20 mg/l (a), 50 mg/l (b) et 100 mg/l (c) par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation.

3-3-4-RECHERCHE DES METABOLITES PRODUITS AU COURS DE LA BIODEGRADATION ANAEROBIE DU DECIS ET DU SUMITHION.

3-3-4-1-LES METABOLITES AROMATIQUES DE LA DEGRADATION ANAEROBIE DU DECIS

La recherche de ou des métabolites aromatiques de la dégradation du Decis a donné les résultats suivants :

Après 10 jours de dégradation il apparaît de nombreux pics indiquant la biodégradation du Decis en au moins 13 molécules absorbant à 240 nm. Dans nos conditions, les temps de rétention des pics majeurs (en minutes) étaient : 3,145 ; 4,119 ; 9,657 ; 12,90 ; 14,979 ; 15,929 ; 20,650 ; 21,190 ; 22,183 (Figure 17). L'apparition de ces nombreux nouveaux pics indique une activité dégradatrice du Decis. Tous ces pics disparaissent après 30 jours d'incubation ce qui indique que ces molécules sont des métabolites intermédiaires pour la biodégradation anaérobie du Decis par le consortium microbien présent.

La recherche des métabolites aromatiques est très important dans la mesure où le Decis et le Sumithion (figure 12 page 29) étant des molécules aromatiques, la détection de produits de dégradation aromatiques signifierait que le ou les pesticides ne subissent pas une dégradation totale. Par conséquent leurs produits de dégradation seraient susceptibles de contaminer l'environnement. (Bechard *et al.*, 1996).

3-3-4-2- METABOLITES AROMATIQUES DE LA DEGRADATION ANAEROBIES DU SUMITHION

Après 10 jours d'incubation on obtient une dégradation du Sumithion se traduisant par l'apparition de 8 pics dont un pic majeur à 16,39. Ces pics disparaissent totalement après 30 jours d'incubation ce qui indique que ces molécules sont des intermédiaires et non des produits finaux de la biodégradation du sumithion (Figure 18). Une étude similaire réalisée par Alonso *et al.*, 1997 a montré qu'un intermédiaire de la biodégradation anaérobie du fénitrothion par une souche *Flavobacterium sp ATCC 27551* est le 3-méthyl-4-nitrophénol (Alonso *et al.*, 1997). Dans la mise en œuvre de la biodégradation totale du fénitrothion ces auteurs ont dû utiliser une seconde souche bactérienne (*Arthrobacter aurescens souche TW17*) afin de dégrader totalement le 3-méthyl-4-nitrophénol. Ce qui montre l'importance de l'utilisation d'un consortium de microorganismes dans la mise en œuvre de la biodégradation anaérobie des substances xénobiotiques.

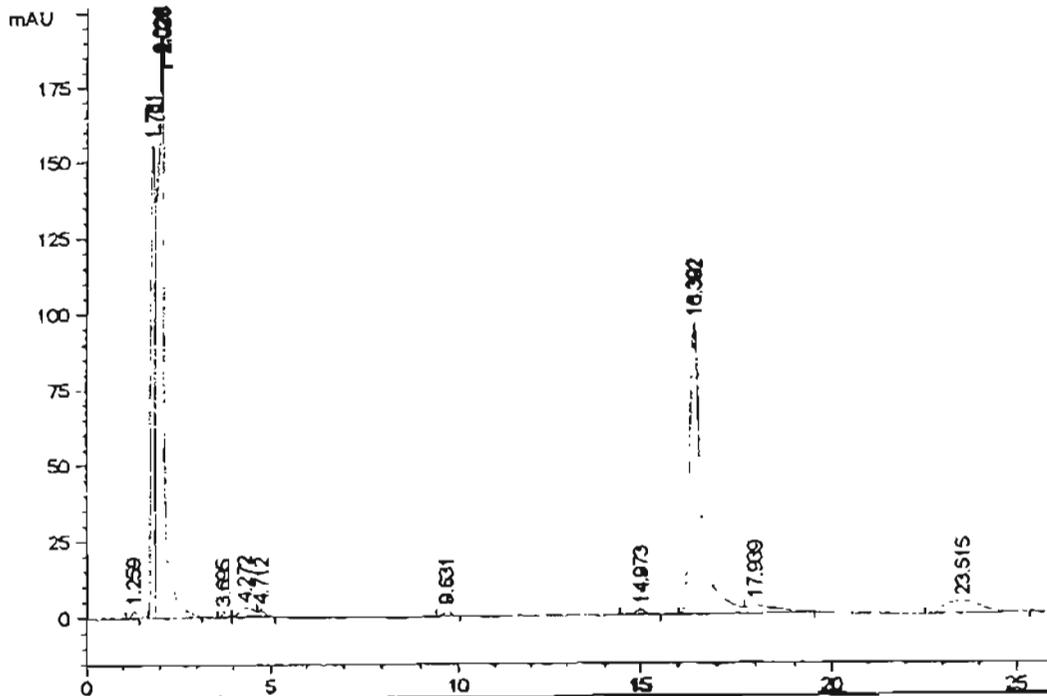
Injection Date : 10/3/99 4:38:24 AM
Sample Name : Sumithion
Operator : Paul

Seq. Line : 9
Vial : 9
Inj : 1
Inj Volume : 25 µl

Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DEF_LC.S
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ESSAI5.M
Last changed : 8/26/99 8:34:42 PM by francois

VWD1 A, Wavelength=240 nm (03-09-99\009-1001 D)

a



VWD1 A, Wavelength=240 nm (03-09-99\010-1001 D)

b

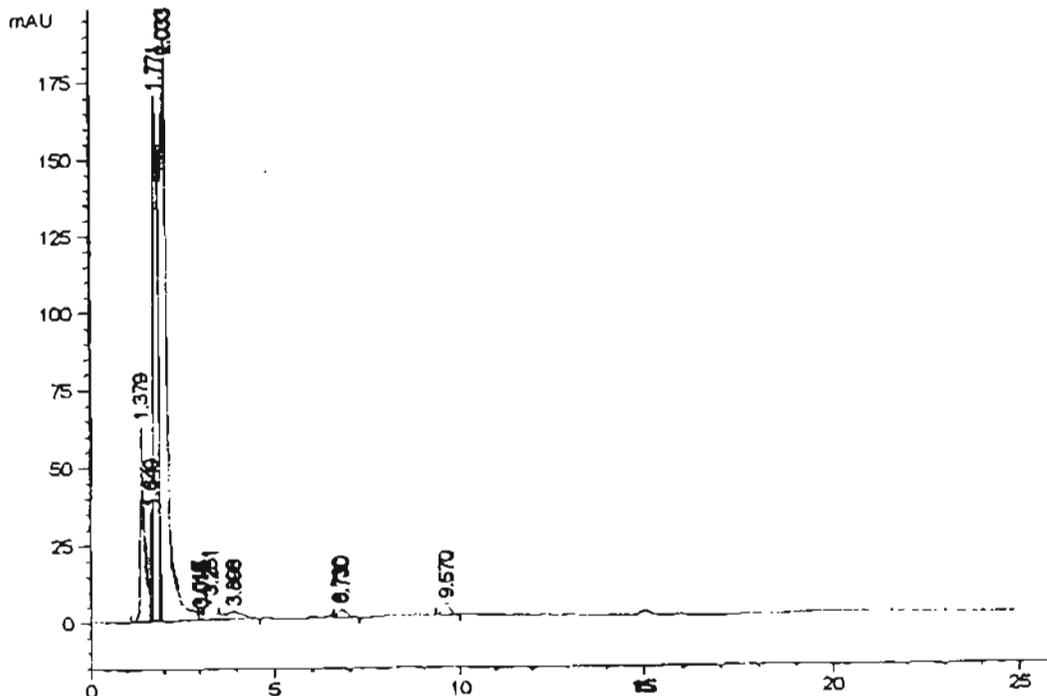


Figure 18: Chromatogramme des composés aromatiques d'échantillons de Sumithion après 10 jours (a) puis 30 jours (b) d'incubation en présence du consortium ayant subi 2 ans d'acclimation

3-3-5-RECHERCHE DES ACIDES GRAS VOLATILS PRODUITS LORS DE LA DEGRADATION DU DECIS ET DU SUMITHION PAR LES CONSORTIA ACCLIMATES

L'utilisation de la colonne réfractomètre différentiel RID pour l'identification du ou des éventuels AGV produits a montré qu'aucun AGV n'est détecté après 30 jours d'incubation aussi bien dans le milieu à Decis que dans celui à Sumithion. Par contre cette colonne a permis de confirmer la biodégradation anaérobie du Decis et du Sumithion. Ainsi on note la dégradation de plus de 86,4% du Decis après 30 jours d'incubation (Figure 19).

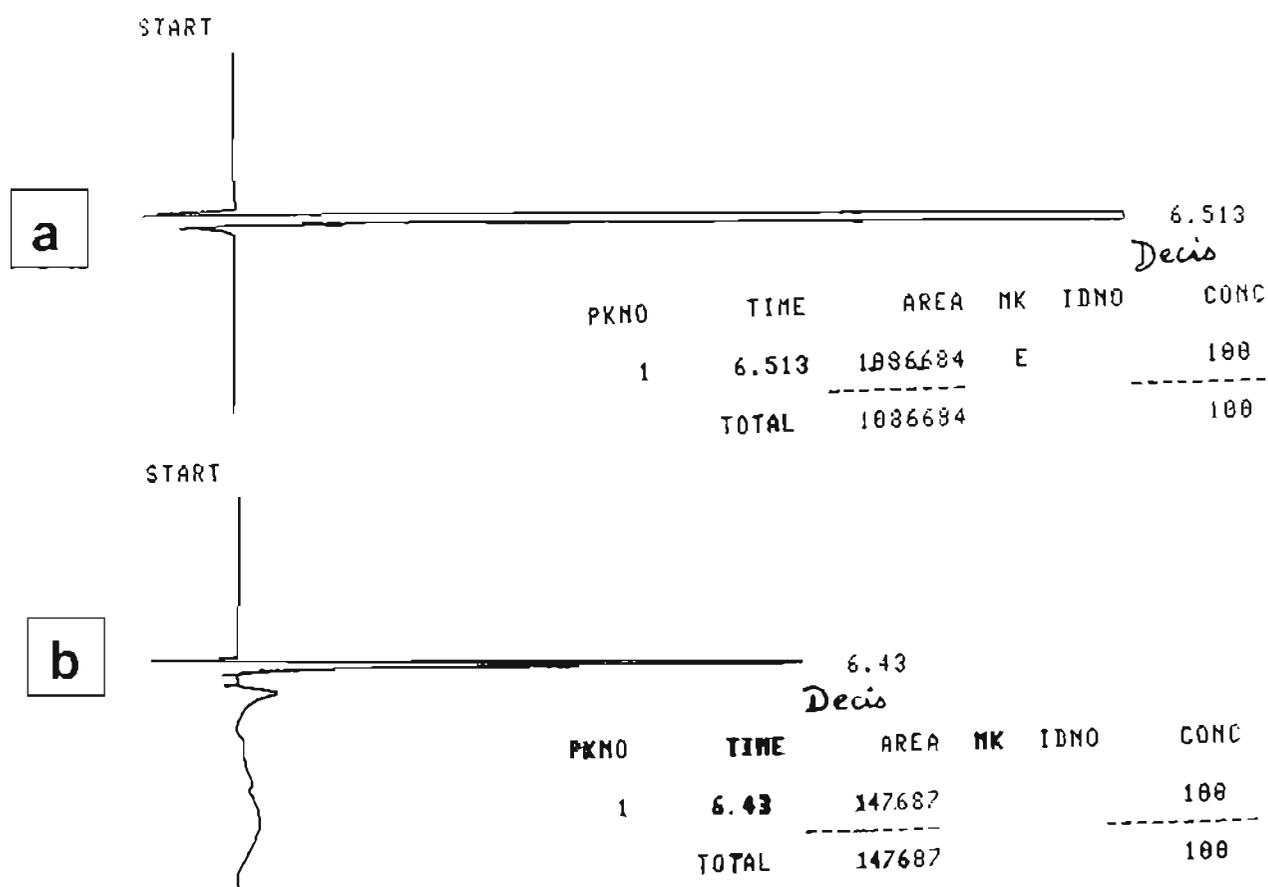


Figure 19: Chromatogramme mettant en évidence la biodégradation du Decis par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation dans 20 mg/l de Decis.

a: Témoin non inoculé, après 30 jours d'incubation

b: Echantillon inoculé, après 30 jours d'incubation

De même la biodégradation du Sumithion est mise en évidence par la disparition quasi totale du pic du Sumithion après 30 jours d'incubation. (Pic à 7,5). Son produit de métabolisme (pic à 6,42) est également dégradé à 87,4% après 30 jours d'incubation. On remarque l'apparition d'un nouveau pic à 8,44. Ce qui pourrait correspondre à une autre molécule intermédiaire supposée aromatique de la biodégradation du Sumithion.

La recherche des métabolites produits lors de la biodégradation du Decis et du Sumithion a montré que ces deux pesticides sont totalement dégradés (figure 19 et 20). La chromatographie en phase gazeuse (CPG) a montré que les produits finaux de la dégradation du Decis et du Sumithion sont des gaz. Le CO₂, le CH₄ et le N₂ ont été détectés

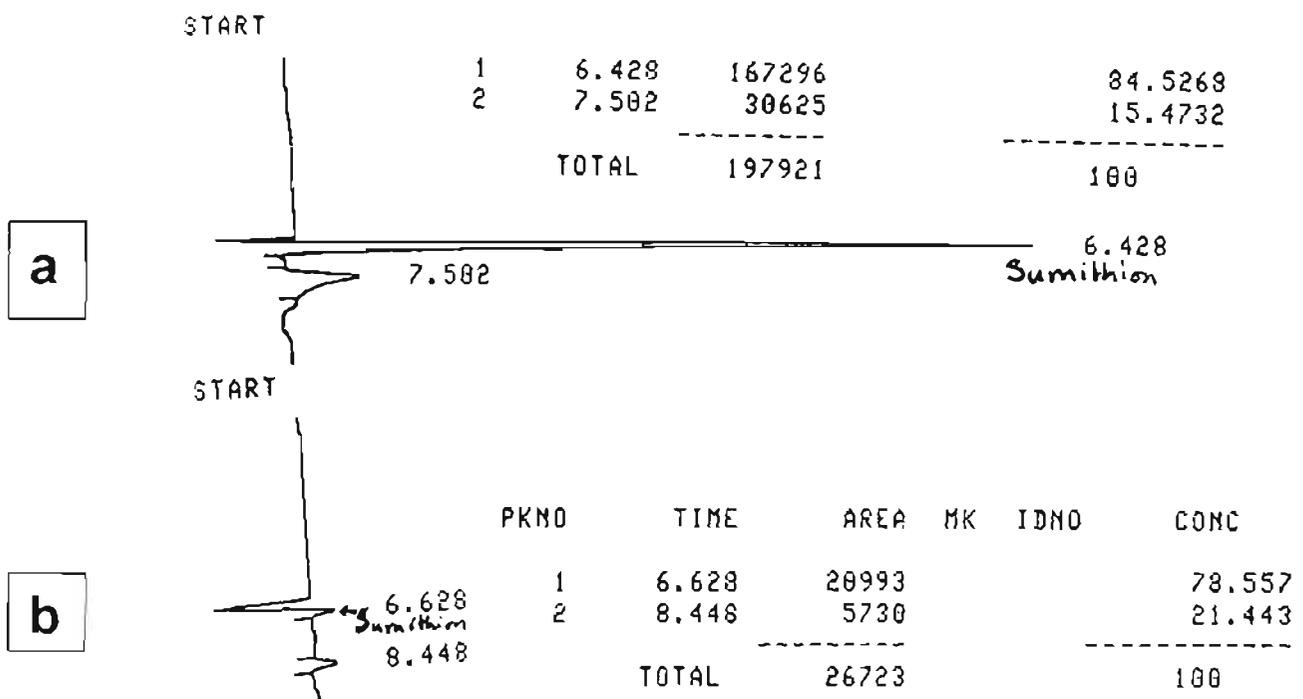


Figure 20: Chromatogramme mettant en évidence la biodégradation du Sumithion par le consortium ayant subi 2 ans d'acclimatation dans 20 mg/l de Sumithion.

a: Témoin non inoculé, après 30 jours d'incubation

b: Echantillon inoculé, après 30 jours d'incubation

Il ressort de ces résultats que l'utilisation des inocula ci-dessus pour la biorémediation anaérobie des milieux contaminés par le Decis et le Sumithion pourrait offrir des avantages évidents dans la mesure où il n'y a pas d'accumulation des produits de dégradation susceptibles de contaminer l'environnement.

3-4-ISOLEMENT ET CARACTERISATION PARTIELLE DES MICROORGANISMES INTERVENANT DANS LA BIODEGRADATION ANAEROBIE DES PESTICIDES

3-4-1- GROUPES DE MICROORGANISMES INTERVENANT DANS LA BIODEGRADATION ANAEROBIE DU SUMITHION, DE L'ULTRACIDE ET DU DECIS

La recherche des groupes bactériens intervenant dans la biodégradation des pesticides a permis d'obtenir les résultats suivants.

Avec les consortia acclimatés, une production importante d'azote a été observée dans les milieux contenant les pesticides en présence du nitrate (figure 21). La production d'azote est très faible les 5 premiers jours, puis elle augmente de manière importante jusqu'au 25^{ème} jour. Cela se traduit par l'existence d'une phase de latence relativement courte pour tous les composés

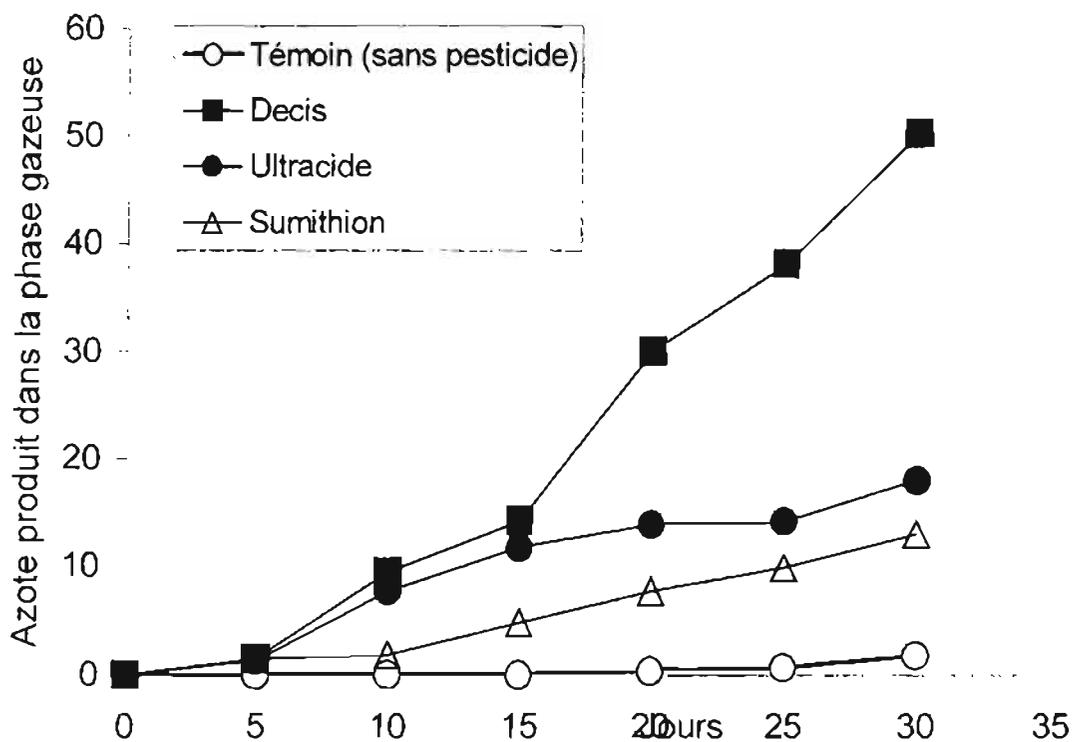


Figure 21: Production d'azote en présence des pesticides à la concentration initiale de 20 mg/l et du consortium lorsque le nitrate est utilisé comme accepteur d'électrons

testés. Selon nos résultats, en présence de nitrates le Decis est le plus facilement biodégradable, suivi par l'Ultracide et le Sumithion (savadogo *et al.*, 1999). Le catabolisme des pesticides en présence de nitrate est couramment observé chez certaines bactéries du sol tel que les *Pseudomonas* et les *Bacillus*. (Edward *et al.*, 1983; Donlon *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 1987; Crawford *et al.*, 1998). Les bactéries dénitrifiantes interviennent activement dans la nature et leur action peut être bénéfique lorsque l'environnement est pollué par des déchets azotés (Edward et McCarthy, 1983; Drzyzga *et al.*, 1999). C'est ainsi qu'un isolat nommé M91-3 a été capable de biodégrader l'atrazine en anaérobiose avec production d'azote. L'organisme utilisait l'atrazine comme seule source de carbone et d'azote. Le clivage du noyau a même été mis en évidence par la production de $^{14}\text{CO}_2$ (Crawford *et al.*, 1998). Ainsi l'utilisation de

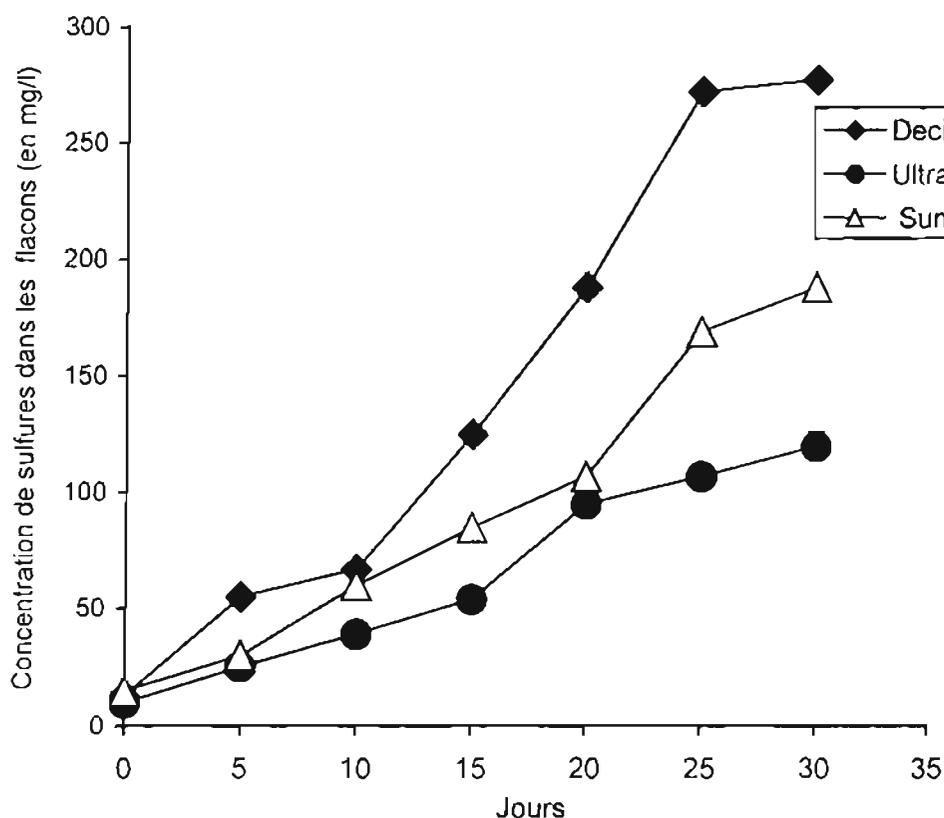


Figure 22: Production de sulfures en présence des pesticides à la concentration initiale de 20 mg/l et du consortium lorsque le sulfate est utilisé comme accepteur d'électron

l'inoculum acclimaté peut avoir des applications dans la biorémédiation anaérobie de pesticides tels que le Decis, le Sumithion et l'Ultracide des milieux aqueux. Le nitrate et certains composés explosifs pourraient également être éliminés par l'inoculum. En effet des études montrent que les composés explosifs sont dégradés rapidement par les bactéries dénitrifiantes qui peuvent même les utiliser comme source d'azote pour leur croissance, (Boopathy *et al.*, 1998).

En présence de sulfate dans le milieu de culture, une production importante de sulfures a été observée avec les consortia acclimatés. Cette production de sulfures débute après une phase de latence de 2 jours (figure 22). Elle est très forte entre le 10^{ème} et le 25^{ème} jour. Après le 25^{ème} jour on note

une décroissance de la production de sulfures. Les phases de latence observées sont plus courtes que celles notées en conditions dénitrifiantes. Plusieurs bactéries sulfato-réductrices du sol sont connues comme manifestant une activité de biodégradation des pesticides. Le métabolisme de plusieurs composés explosifs et de pesticides par un consortium de bactéries sulfatoréductrices *Desulfovibrio spp* a été étudié.

Nos résultats montrent que les pesticides testés peuvent être métabolisés en conditions sulfato-réductrices. Dans ces conditions, le Decis serait le plus facilement catabolisable, suivi du Sumithion et de l'Ultracide. Les bactéries acclimatées peuvent être utilisées dans des sols contaminés par les composés soufrés. Cela est important lorsqu'on utilise des pesticides contenant l'atome de soufre. En effet, Il est montré que les bactéries sulfato-réductrices peuvent oxyder des composés cycliques ou réaliser la déshalogénéation de certains pesticides (Berry *et al*, 1987).

En absence de tout donneur exogène d'électrons et en présence de 20 mg/l de pesticide, une importante production de méthane a été observée (Figure 23). Les temps de latence varient de 3 à 4 jours. L'activité méthanogénique augmente au cours du temps. On note cependant un ralentissement de la production de méthane après le 20^{ème} jour pour le Sumithion et l'Ultracide. Une étude similaire réalisée par Bechard *et al.* en 1990 a montré la dégradation totale du phénol par un consortium en condition méthanogénique.

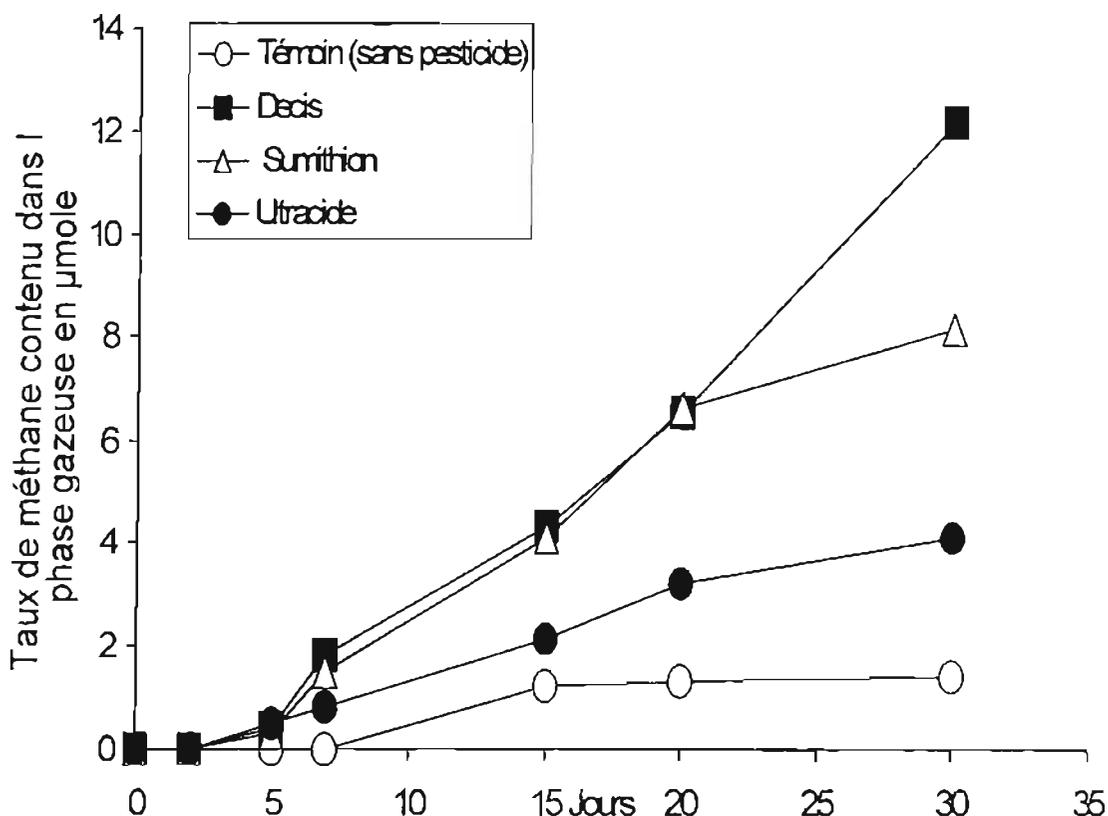


Figure 23: Production de méthane(CH₄) en présence des pesticides à la concentration de 20 mg/l et du consortium acclimaté en absence d'accepteur d'électrons

Nos résultats montrent qu'en l'absence de tout donneur exogène d'électrons le Decis et le Sumithion sont dégradés avec production de méthane (Savadogo *et al.*, 1999) Ce qui est intéressant dans la mesure où le méthane est une source importante d'énergie.

3-4-2-EVOLUTION DE LA POPULATION MICROBIENNE DES CONSORTIA DEGRADANT LE DECIS, L'ULTRACIDE ET LE SUMITHION

Le suivi des différentes forme bactériennes au cours de l'acclimatation a montré que dans le milieu contenant le Decis il y a disparition des bâtonnets courts et une forte diminution des formes en bâtonnets moyens et longs. Une prolifération des coques et des bâtonnets fins incurvés a été constaté (tableau VII).

Dans le milieu contenant l'Ultracide on note la disparition des formes en bâtonnets longs, et une diminution des bâtonnets moyens et des coques. On constate une persistance des bâtonnets courts ainsi que des bâtonnets fins incurvés. On constate que dans le milieu à Ultracide, il y a une flore pauvre et peu active, témoignant de l'état de stress de ces microorganismes dans ce milieu.

Tableau VII: La diversité microbienne à 3 mois, 1 an et 2 ans d'acclimatation.

	Formes observées dans le milieu de culture à :		
	3 mois	1 an	2 ans
Milieu au Decis	Coque : ++ Bâtonnets courts : +++ Bâtonnets moyens : +++ Bâtonnets longs : ++ Bâtonnets incurvés : +++	Coque :+++ Bâtonnets moyens : + Bâtonnets longs : + Bâtonnets incurvés :+++	Coque : +++ Bâtonnets moyens : + Bâtonnets longs : + Bâtonnets incurvés :+++
Milieu à l'Ultracide	Coque:+ Bâtonnets courts:++ Bâtonnets moyens:++ Bâtonnets longs:++ Bâtonnets incurvés:++	Coque : + Bâtonnets courts : + Bâtonnets moyens : + Bâtonnets incurvés : +	Coque : + Bâtonnets courts : + Bâtonnets moyens : + Bâtonnets incurvés : +
Milieu au Sumithion	Coque : ++ Bâtonnets courts : +++ Bâtonnets moyens : ++ Bâtonnets longs : + Bâtonnets incurvés :+++	Coque : ++ Bâtonnets moyens : + Bâtonnets longs : +++ Bâtonnets incurvés :+++	Coque : ++ Bâtonnets longs : ++ Bâtonnets incurvés :+++

+ :peu nombreux

++ : nombreux

+++ : très nombreux

Dans le milieu contenant le Sumithion, on note la disparition des bâtonnets courts et des bâtonnets moyens, pendant que les bâtonnets longs, les bâtonnets incurvés et les coques poursuivent leur croissance.

L'élimination de certaines formes est due au fait qu'elles ne peuvent pas supporter les conditions de culture, notamment la présence du pesticide.

Au cours de l'acclimatation, les formes résistantes et/ou douées d'activité de biodégradation prolifèrent tandis que les formes sensibles disparaissent. Ainsi les formes en coque et les longs bâtonnets semblent être actives dans la biodégradation du Decis et du Sumithion, tandis que les bâtonnets incurvés se retrouvent dans tous les milieux. Cela montre la grande capacité d'adaptation de ces derniers.

3-4-3-CARACTERISATION PARTIELLE D'UNE SOUCHE ISOLEE DU MILIEU A DECIS ET D'UNE SOUCHE ISOLEE DU MILIEU A SUMITHION.

Après 2 ans d'acclimatation nous avons constaté que les inocula acclimatés sur Decis et sur Sumithion offraient une rapide biodégradation des

pesticides (cf paragraphe 3-3). C'est alors que nous avons entrepris d'isoler le ou les microorganismes capables de biodégrader le pesticide en culture pure. Les tentatives d'isolement de bactéries biodégradant l'Ultracide n'ont pas été couronnées de succès. Ce qui laisse penser que ce pesticide est dégradé grâce à l'action synergique de plusieurs souches agissant dans un système d'association du type syntrophique. Ou que les souches impliquées dans sa dégradation ne peuvent pas former de colonie en roll-tube. Ou encore que le substrat ne fournit pas suffisamment d'énergie pour permettre la formation de colonies.

Au niveau de l'inoculum à Decis nous avons isolé une souche notée DX ("D" indiquant la première lettre du mot Decis et X un inconnu).

Au niveau de l'inoculum à Sumithion, nous avons isolé une souche notée SY ("S" indiquant la première lettre du mot Sumithion et Y un inconnu)

La détermination de quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques a donné les résultats contenus dans le tableau VIII.

Notre objectif premier dans l'étude des caractéristiques morphologiques et physiologiques des souches SY et DX est la détermination des conditions optimales pour la culture massive de ces souches. Néanmoins nous pouvons rapprocher ces souches à des genres connus.

La souche SY bâtonnet anaérobie facultative avec une coloration de Gram négative peut s'agir d'un genre de la famille des *Enterobacteriaceae* ou d'un genre de la famille des *Bacillaceae*. La formation de la spore en position terminale indique que la souche SY n'appartient pas au groupe des entérobactéries. En effet ces dernières ne sont pas sporulées. La formation d'endospores rapproche la souche SY du genres *Bacillus* et *Clostridium* de la famille des *Bacillaceae*. Le fait que la souche SY soit catalase positive la rapproche encore plus du genre *Bacillus*, car la plupart des bactéries du genre *Clostridium* sont catalase négative. Le fait que la souche SY soit anaérobie facultative la rapproche beaucoup plus du genre *Bacillus*.

La souches DX est une cellule sphérique anaérobie facultative de coloration de Gram négative. Elle est immobile et capable de sporuler. Elle ne réduit ni

Tableau VIII: Caractéristiques morphologiques et physiologiques des Souches SY et DX

	Caractéristiques de SY	Caractéristiques de DX
Forme	Long bâtonnet droit	Coque
Mobilité	Mouvements lents à rapide serpentiformes	Immobile
Gram	Négative	Négative
Spores	Spore terminale	Sporulé
Flagellation	Péritriche	Néant
Catalase	Positive	Positive
Oxydase	Négative	Positive
Substrats testés utilisés	Glucose, fructose, arabinose, maltose, mannitol, amidon soluble, pyruvate, acétate	Glucose, fructose, arabinose, maltose, mannitol, pyruvate, acétate
Substrats testés non utilisés	Néant	Amidon soluble
Accepteurs d'électrons (facultatif)	NaNO ₃	NaNO ₃
Gamme de température permettant la croissance	15 à 45°C	20 à 45°C
Température optimale de croissance	37°C	37°C
Gamme de pH permettant la croissance	5 à 9	6 à 9
PH optimum de croissance	7	7,5

Pour l'ensemble de ces études les cultures ont été réalisées en anaérobiose dans des tubes Hungate. Le milieu utilisé est le milieu de base (MB). Du glucose à 20 mM a été utilisé comme substrat pour l'étude de la physiologie de la souche SY et de la souche DX.

le sulfate, ni le sulfite ni le thiosulfate et fermente les carbohydrates. Elle est capable de croître sur boîte de Pétri incubées en anaérobiose (atmosphère saturée de CO₂). Elle forme alors des petites colonies translucides. La souche DX ne peut pas être affiliée aux familles suivantes : *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae* et *Peptococcaceae*. Car ces familles contiennent des cocci

Gram positive. L'ensemble de ces constats permet de suggérer que DX appartiendrait à la famille des *Veillonellaceae* contenant les genres *Veillonella*, *Acidaminococcus* et *Megasphaera*. Les genres *Veillonella* et *Acidaminococcus* ne peuvent pas être retenus car les bactéries de ces genres n'utilisent pas les carbohydrates comme c'est le cas de la souche DX. Seul le genre *Megasphaera* a des caractéristiques similaires à celles de DX à l'exception du fait que le genre *Megasphaera* est non sporulant et ne réduit pas le nitrate. Ainsi la souche DX mérite une étude approfondie afin d'élucider sa taxonomie.

Notre étude a montré que les souches SY et DX peuvent être facilement cultivées sur un milieu contenant du glucose à 37°C à pH 7 (SY) et pH 7,5 (DX) en vue d'obtenir une grande quantité d'inoculum. Ces inocula pourraient être utilisés dans la biodépollution d'eaux ou de champs contaminés par le Sumithion et/ou le Decis. La large gamme de pH permettant la croissance de SY est un atout favorable à l'utilisation de cette souche. La capacité à sporuler des souches SY et DX contribue à faciliter leur conservation et leur utilisation.

3-5-ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU DECIS ET DU SUMITHION PAR LES SOUCHES DX ET SY

Cette étude a été réalisée avec une souche isolée du milieu à Decis (DX) et une souche isolée du milieu à Sumithion (SY). La croissance des souches a été estimée par le dosage des protéines totales des milieux de culture. A cet effet un volume nécessaire d'inoculum est injecté de sorte à avoir une concentration initiale en protéine de 50 µg/ml.

3-5-1-Dégradation du Decis par la souche DX

La dégradation de 20 mg/l de Decis par la souche DX commence immédiatement après l'inoculation (figure 24). La dégradation est lente les 10 premiers

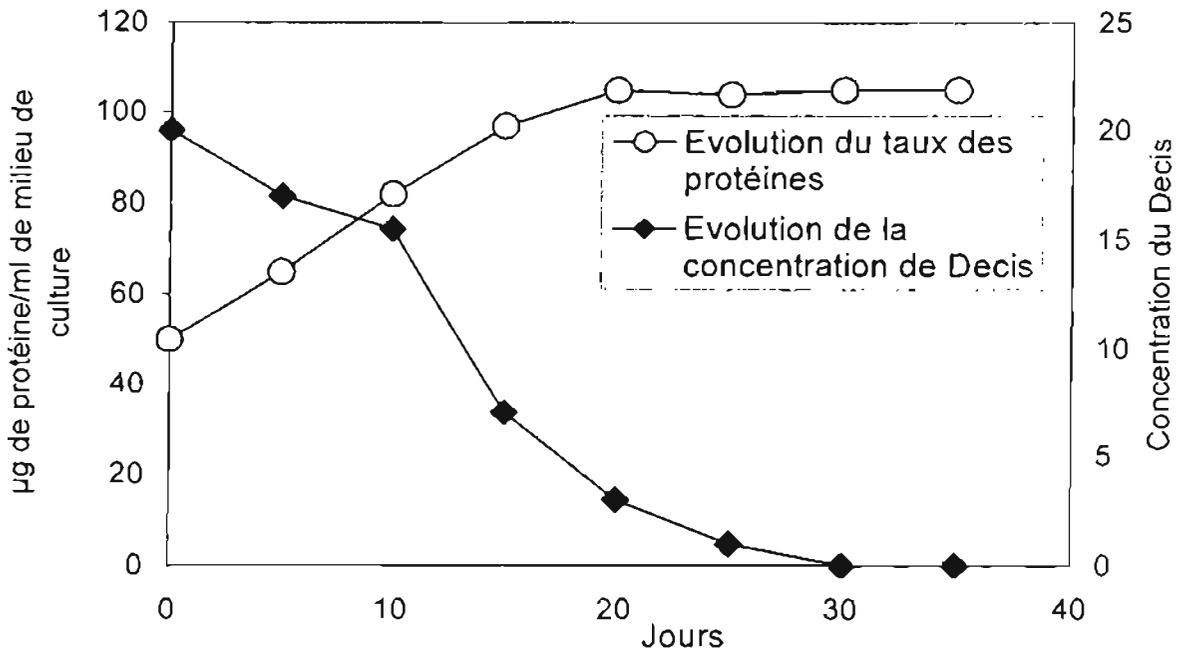


Figure 24: Dégradation du Decis et croissance de la souche DX lorsque le Decis est le seul substrat carboné

jours. Ce qui correspond à la période d'adaptation de l'inoculum. Elle s'accélère entre le 10^{ème} et le 20^{ème} jours. En effet la concentration du Decis passe de 15,5 mg/l le 10^{ème} jour à 03 mg/l le 20^{ème} jour. Ce qui correspond à une vitesse maximale de dégradation du Decis de 1,3 mg l⁻¹ j⁻¹. La biodégradation est totale au bout de 30 jours soit une vitesse moyenne de dégradation de 0,7 mg l⁻¹ j⁻¹. Ainsi la vitesse moyenne de dégradation du Decis par la souche DX est inférieure à celle enregistrée avec l'inoculum acclimaté (1 mg l⁻¹ j⁻¹).

La croissance du DX commence pratiquement sans phase de latence et évolue de manière exponentielle jusqu'au 20^{ème} jour où on atteint la phase stationnaire.

3-5-2-Dégradation du Sumithion par la souche SY

La dégradation du Sumithion est rapide et on ne note pas de phase de latence (figure 25). Entre le 1^{er} et le 10^{ème} jour d'incubation la concentration de Sumithion passe de 20 à 03 mg/l soit une vitesse maximale de dégradation de $1,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Après 20 jours d'incubation la dégradation du Sumithion est totale. La vitesse moyenne de dégradation du Decis est de $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Cette vitesse est inférieure à celle enregistrée avec l'inoculum acclimaté ($1,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$).

La croissance de la souche SY commence sans phase de latence. Cette croissance est rapide entre le 1^{er} et le 10^{ème} jour d'incubation. La croissance est ralentie entre le 10^{ème} et le 25^{ème} jour où elle prend fin.

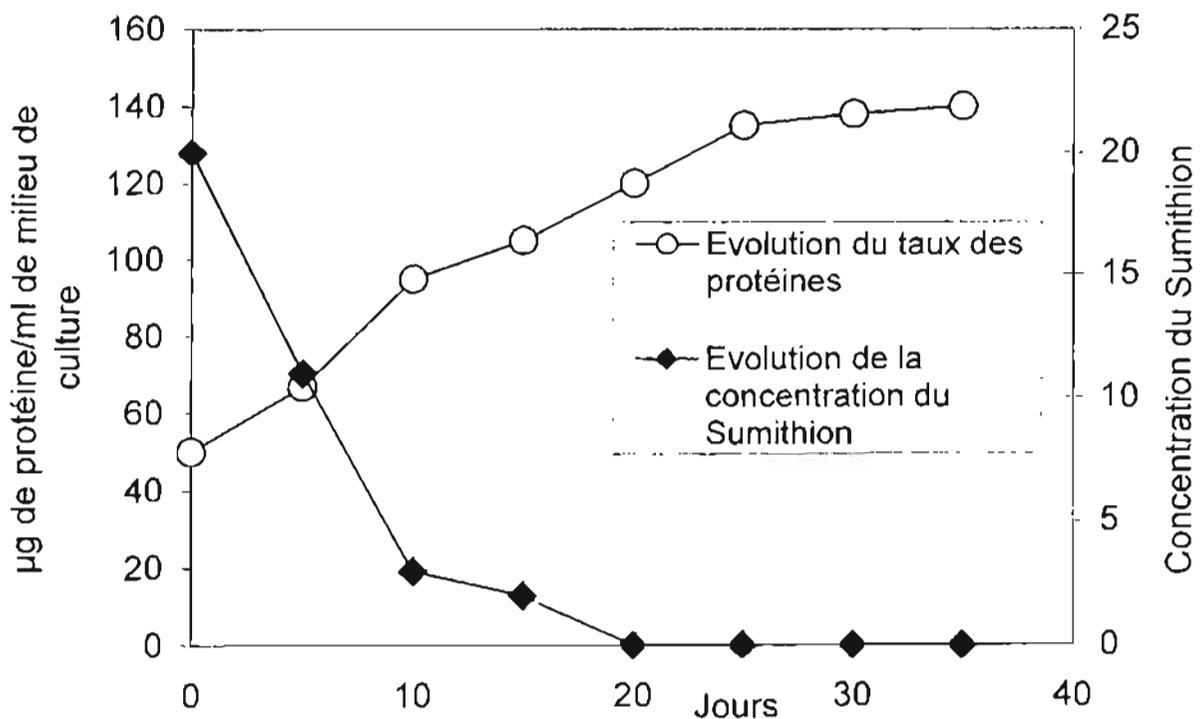


Figure 25: Dégradation du Sumithion et croissance de la souche SY lorsque le Sumithion est le seul substrat carboné

3-5-3-Dégradation du Decis par la souche DX en présence de 20mM de glucose.

Nous constatons que la croissance de la souche DX commence pratiquement sans phase de latence (figure 26). La croissance de DX en présence de glucose est plus rapide comparativement à la croissance de DX en son absence (cf paragraphe 3.3.8.1). Mais en présence de glucose la croissance s'arrête après 20 jours lorsque la totalité du glucose a été utilisée. La dégradation du Decis commence après le 5^{ème} jour et se poursuit jusqu'au 35^{ème} jour où la totalité des 20 mg/l de Decis est dégradée. La vitesse moyenne de dégradation du Decis est de $0,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Ainsi nous constatons que l'ajout du glucose ne change pas la vitesse moyenne de dégradation du Decis par la souche DX en présence de glucose. La dégradation du Decis par DX ne nécessite pas de glucose. Nous constatons également que la

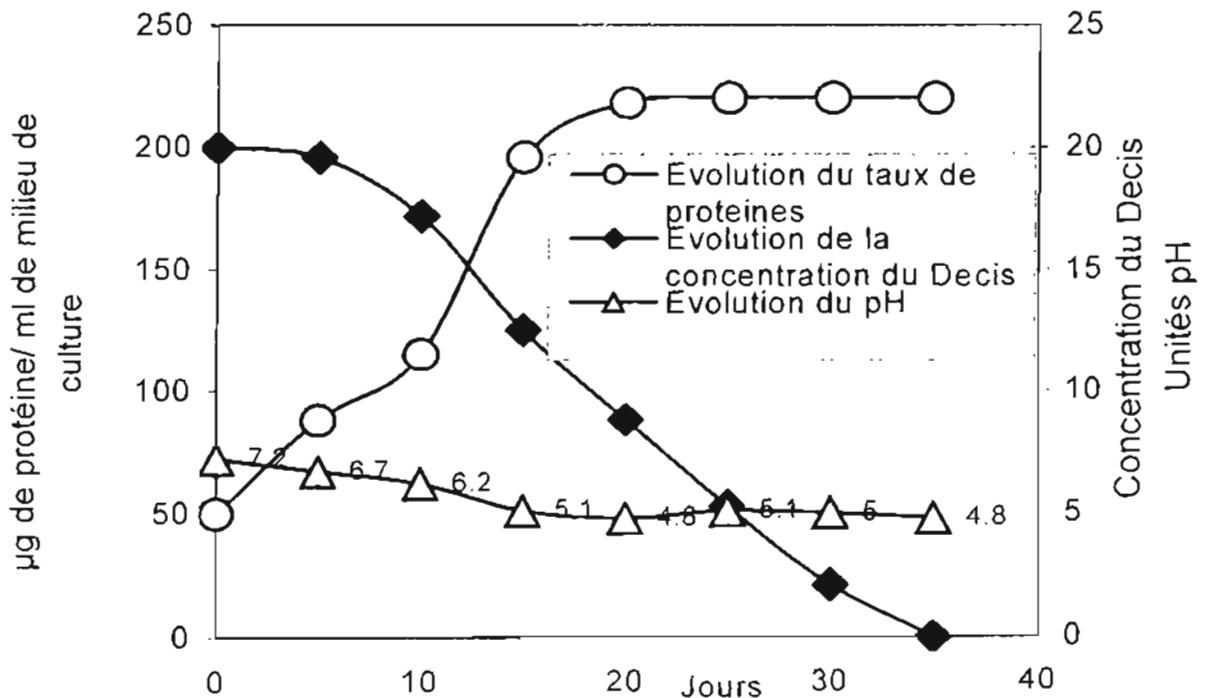


Figure 26: Suivi de la dégradation du Decis (20 mg/l) et de la croissance de la souche DX en présence de 20 mM de glucose

dégradation du Decis en présence du glucose est accompagnée d'une forte diminution du pH. En effet le pH passe de 7,2 le premier jour à 4,8 le 20^{ème} jour d'incubation. A partir du 20^{ème} jour le pH se stabilise jusqu'à la dégradation totale du Decis (35^{ème} jour). D'autre part on constate que pendant que la croissance s'arrête au 20^{ème} jour, la dégradation se poursuit jusqu'au 35^{ème} jour. On peut alors supposer qu'avant le 20^{ème} jour la souche DX utilise le glucose tout en dégradant le Decis. Ensuite la baisse du pH due à la production d'acides organiques entraîne une acidification du milieu et l'inhibition de la croissance de la souche DX. Des résultats similaires ont été rapportés par Combet Blanc (1995) qui a observé qu'après 24 heures en anaérobiose, la croissance d'une souche de bactérie lactique nommée DKF a été inhibée par abaissement du pH qui chute à 5,4.

A partir de ce moment, nous pouvons formuler deux hypothèses :

- Après le 20^{ème} jour, la biodégradation du Decis continue sans croissance de la souche DX. Un tel phénomène est possible si on considère que la dégradation du Decis est réalisée grâce à des exoenzymes sécrétées par la souche DX.
- La baisse du pH est responsable de la dégradation du Decis au-delà du 20^{ème} jour. Cette dernière hypothèse est soutenue par les résultats de plusieurs chercheurs dont Douglas (1976), Coulibaly et Smith (1990) et Racke (1992) qui ont clairement mis en évidence le rôle des solutions acides dans la dégradation des pesticides.

3-5-4-Dégradation du Sumithion par la souche SY en présence de 20 mM de glucose

Nous constatons que la croissance de la souche SY est très rapide en présence de glucose (figure 27). Cette croissance commence pratiquement sans phase de latence. La croissance de la souche SY est accompagnée d'une forte dégradation du sumithion et du glucose. En effet la totalité du glucose est dégradée après 10 jours d'incubation. Au bout de 10 jours

d'incubation on note une dégradation du sumithion de 71,5%. Soit une vitesse maximale de dégradation de $1,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Cette dégradation est également couplée à une baisse du pH. En effet, le pH passe de 7,2 à 5,8 le 10^{ème} jour et à 3,8 le 20^{ème} jour. La croissance de la souche SY s'arrête après 10 jours d'incubation. On constate que la dégradation du Sumithion est alors inhibée jusqu'au 20^{ème} jour. Ensuite la dégradation reprend et se poursuivait jusqu'au 35^{ème} jour. La vitesse moyenne de dégradation des 20 mg/l de Sumithion par la souche SY en présence de glucose est faible ($0,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$ comparativement aux résultat obtenus en absence de glucose ($1 \text{ mg l}^{-1} \text{ j}^{-1}$).

Là également la baisse du pH a dû provoquer l'arrêt de la croissance. Les hypothèses émises au niveau de la dégradation du Decis en présence de glucose par la souche DX peuvent encore être retenues ici.

La dégradation de 20 mg/l de Sumithion est inhibée en présence de glucose dans la mesure où en son absence la dégradation totale a lieu au bout de 10 jours d'incubation (cf paragraphe 3-3-8-2).

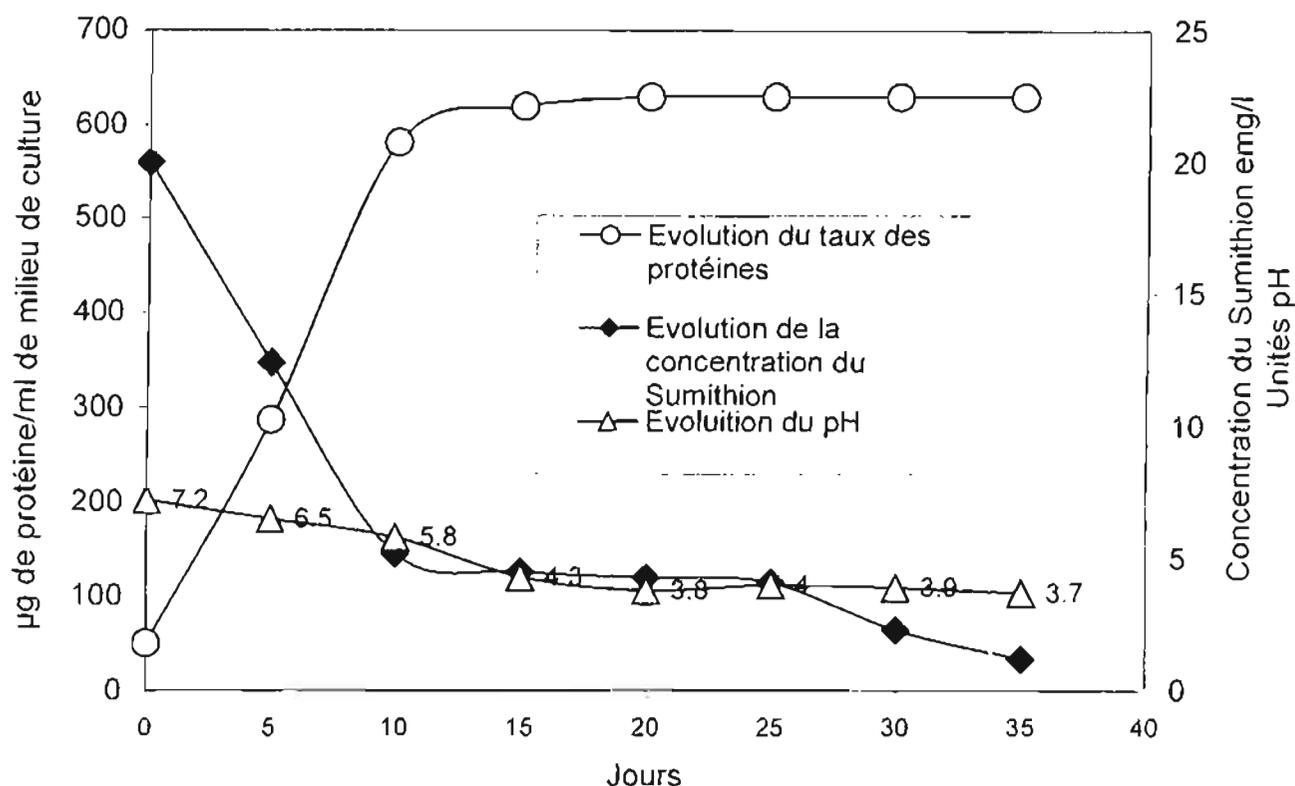


Figure 27: Suivi de la dégradation du Sumithion (20 mg/l) et de la croissance de la souche SY en présence de 20 mM de glucose

3-5-5-Etude de la biodégradation du Decis et du Sumithion dans le sol par les souches DX et SY.

L'étude de la biodégradation d'un pesticide dans le sol est indispensable si ce dernier est destiné à être utilisé dans l'agriculture. En effet la connaissance de la demi-vie du pesticide dans le sol est capitale pour sa modélisation. L'essai de laboratoire offre un avantage certain dans la mesure où il donne la possibilité d'établir le schéma de dégradation et un bilan précis des voies d'élimination y compris les fractions volatiles. La possibilité qu'offre ce type d'essai de bien différencier l'influence de chaque paramètre (type de sol, température, concentration, humidité) sur la cinétique de dégradation en fait un outil irremplaçable pour les études de modélisation.

Pour réaliser l'étude de la dégradation des pesticides dans le sol, il est coutume d'utiliser des concentrations en pesticides proches des doses appliquées lors des traitements des cultures. Ainsi les concentrations initiales utilisées lors de ces études ne dépassent guère 5 mg/kg. En ce qui nous concerne, nous avons cherché à étudier la dégradation du Decis et du Sumithion appliqué à une dose importante (20mg/l). Ce qui a permis d'étudier d'une part la dégradation de ces pesticides dans un sol contaminé et d'autre part de tester l'efficacité de nos inocula pour une éventuelle biorémediation du Decis et du Sumithion dans le sol.

Après les 60 jours de réduction tous les 16 pots avaient un potentiel redox inférieur à -100 mV (tableau VI). Ce qui est favorable à la croissance des bactéries anaérobies facultatives. Ces bactéries vont épuiser l'oxygène du milieu favorisant la croissance des anaérobies strictes.

Les résultats obtenus lors de l'étude de la biodégradation du Decis et du Sumithion dans le sol montrent une meilleure dégradation des pesticides en présence des souche DX et SY. En effet, en présence de l'inoculum DX dans le sol stérile on note 100% de dégradation du Decis en 20 jours d'incubation contre 40,5% en absence de DX (figure 28). De même on enregistre 100% de dégradation du Sumithion en 20 jours en présence de SY contre 33% en son absence (figure 28). Ces résultats sont en faveur d'une biodégradation respective

Tableau VI : *Evolution du potentiel redox pendant les 60 jours de réduction du sol

	Potentiel redox en mV mesuré au bout de :						
	0 jour	10 jours	20 jours	30 jours	40 jours	50 jours	60 jours
Pot1	+17	-5	-89	-98	-120	-180	-190
Pot2	-2	-45	-67	-85	-98	-118	-169
Pot3	+3	-7	-28	-34	-54	-95	-120
Pot4	-6	-18	-68	-82	-108	-159	-205
Pot5	-8	-27	-50	-64	-98	-92	-115
Pot6	-4	-19	-63	-95	-125	-139	-191

*Six pots parmi les 16 ont été choisis au hasard pour cette étude. Le potentiel redox a été relevé en enfonçant l'électrode à 5 cm dans le sol boueux.

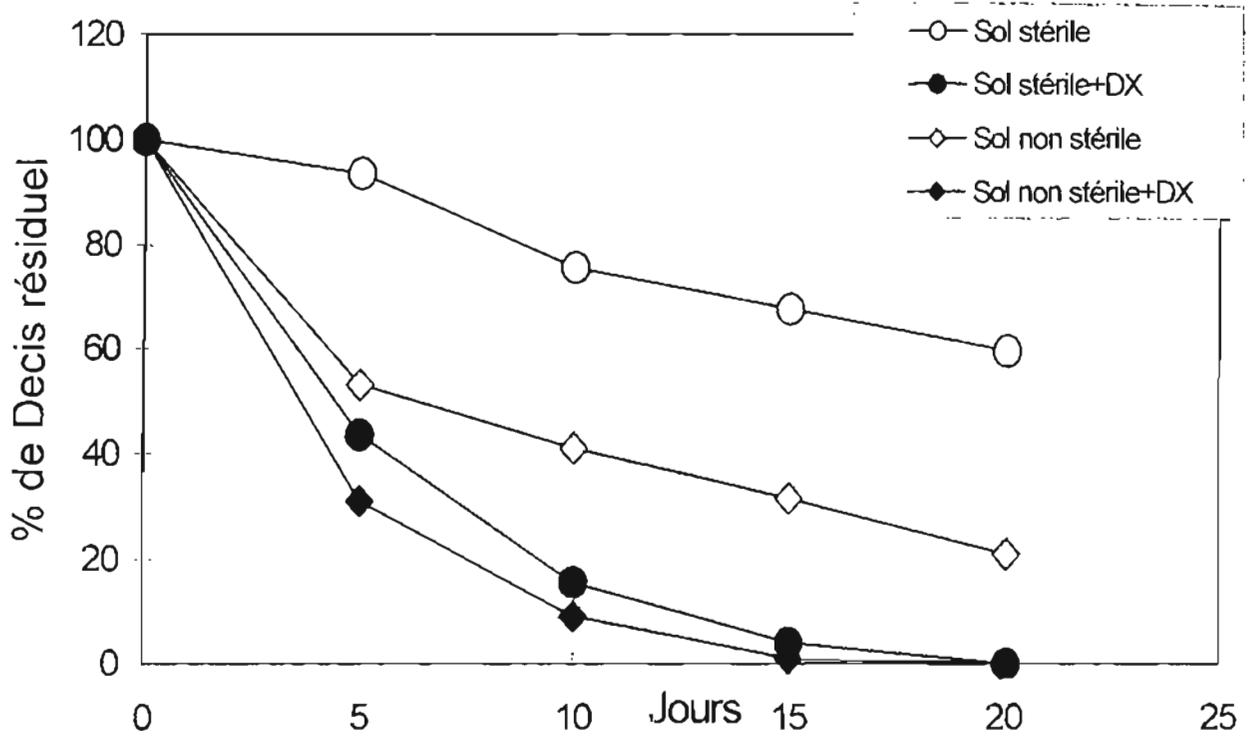
Les souches ont été inoculées en les injectant en profondeur. L'inoculation a été réalisée avec des souches en phase exponentielle de croissance à raison d'environ $5 \cdot 10^6$ cellule/g de sol.

du Decis et du Sumithion par les inocula DX et SY. La part de cette biodégradation anaérobie dans le sol est de 59,5% pour le Decis et 67% pour le Sumithion.

Avant l'introduction des microorganismes dans le sol ce dernier contenait une microflore apte à dégrader les pesticides. Ainsi, si nous considérons la part de la biodégradation du Decis due essentiellement à la flore endogène nous avons 38,5% qui correspondent à 79% (sol non stérile)-40,5% (sol stérile). Cette biodégradation par la flore endogène est de 43,5% avec le Sumithion. De plus, la biodégradation du Decis et du Sumithion par les inocula DX et SY est accrue dans le sol non stérile par rapport au sol stérile. Ces derniers résultats sont en faveur d'un cométabolisme du Decis et du Sumithion dans le sol.

Un constat important qui ressort de nos résultats est que la dégradation du Decis et du Sumithion a lieu dans le sol stérile. En effet, dans le sol stérile on note un taux de dégradation de 40,5% pour le Decis et 33% pour le Sumithion en 20 jours. On sait que certaines substances du sol peuvent avoir une activité catabolique vis-à-vis de certains pesticides. C'est ainsi que la dégradation du malathion est accélérée sur un complexe argilo-humique-Cu²⁺ montrant ainsi le rôle particulier du cuivre dans la biodégradation des pesticides dans le sol (Bastide *et al.*, 1985). On montre également l'importance des cations métalliques, de la teneur en argile et de la teneur en carbone dans la biodégradation des pesticides dans le sol (Bastide *et al.*, 1985).

a



b

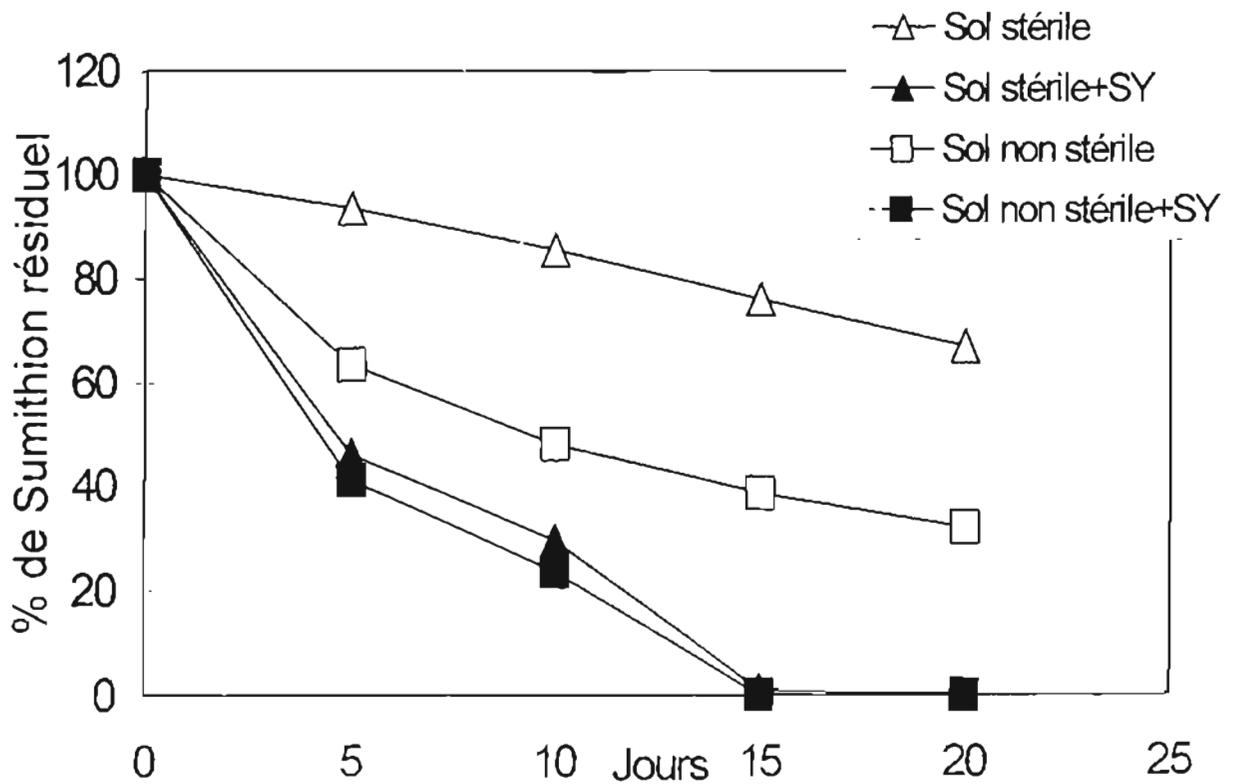


Figure 28: Biodégradation du Decis (a) et du Sumithion (b) dans le sol en fonction des différents traitements.

Des études similaires à notre qui ont été réalisées sur des microorganismes isolés du sol et adaptés aux conditions de laboratoire en présence de pesticides ont abouti à la biodégradation de l'Isoproturon (86% en 72 heures), le Clortoluron (93% en 72 heures), du fénitrothion (66% en 72 heures). Ces microorganismes peuvent être lyophilisés et utilisés dans la biorémédiation des sols contaminés par ces pesticides (Cernakova, 1995; Harison *et al.*, 1998). Ce qui montre que les souches SY et DX peuvent être utilisées dans la résolution des problèmes de contamination des sols par le Sumithion et le Decis.

Les paramètres d'étude de la biodégradation dans le sol tels que la température et le type de sol, peuvent avoir influencés les résultats que nous avons obtenus. En effet une étude de la biodégradation du fénitrothion réalisée dans un sol en Inde a montré que la biodégradation de ce pesticide libère deux métabolites à 25°C et trois à 40°C. Les résultats de cette étude ont également montré que les métabolites proviennent de réactions telles qu'une désulfuration oxydative, le clivage hydrolytique de la liaison P-O-aryl et une déméthylation du pesticide (Roy *et al.*, 1996).

CONCLUSION GENERALE

La première partie de notre étude a consisté à utiliser la biométhanisation pour estimer la capacité de quelques inocula à biodégrader en anaérobiose, six pesticides parmi les plus utilisés en agriculture au Burkina Faso. De cette étude il ressort que le Pyridaphenthion, le Malathion et le Sevimol sont facilement biodégradables tandis que le Decis, le Sumithion et l'Ultracide se sont avérés difficilement biodégradables en condition anaérobie, à l'obscurité.

Ceci nous a permis de retenir le Decis, le Sumithion et l'Ultracide afin de réaliser une acclimatation de nos inocula. Cette acclimatation a permis d'obtenir des inocula stables et performants capables de dégrader rapidement le Decis, le Sumithion et l'Ultracide dans les conditions anaérobies.

La deuxième partie de notre étude a concerné l'optimisation de la biodégradation de ces trois pesticides par l'acclimatation. En effet il est bien connu que l'optimisation de la biodégradation des substrats xénobiotiques passe très souvent par une acclimatation. Ainsi, nous avons entrepris d'acclimater notre inoculum prélevé dans une station d'épuration d'abattoir et fonctionnant en condition méthanogénique. Pendant l'acclimatation quelques paramètres physico-chimiques importants influençant la biodégradation anaérobie ont été suivis. Il ressort de cette étude que les paramètres essentiels sont en faveur d'une biodégradation anaérobie et permettent même une biométhanisation des différents pesticides. L'ajustement du pH au cours de l'acclimatation ne s'est pas avéré nécessaire. Les AGV, le taux de sulfures dissout ainsi que les valeurs de DCO étaient favorables pour une biométhanisation de nos inocula. Les taux d'abaissement de la DCO obtenus après deux ans d'acclimatation avec les pesticides à 20 mg/l étaient de 63,16% pour le Decis, 60,11% pour l'Ultracide et 55,63% pour le Sumithion au bout de 30 jours d'incubation. Ce qui est acceptable au vu de la nature des substrats utilisés. De plus, le taux d'abaissement de la DCO nous a permis de constater une amélioration des rendements d'épuration de 21,6%, pour le Decis, 13,61% pour l'Ultracide et de 15% pour le Sumithion. Ces résultats traduisent une amélioration de la capacité biodégradante de nos inocula au cours de l'acclimatation. La recherche du meilleur facteur de croissance a

montré que l'extrait de levure reste le facteur de croissance privilégié pour la biodégradation anaérobie du Decis, de l'Ultracide et du Sumithion.

La troisième partie de notre étude a consisté à suivre la cinétique de biodégradation du Decis, de l'Ultracide et du Sumithion par les inocula acclimatés pendant deux ans. Une biodégradation totale du Decis et du Sumithion à 20 mg/l a été observée au bout de 3 et 2 semaines respectivement. Mieux, une biodégradation totale de ces deux pesticides à 50 et 100 mg/l a été observée même si dans ce dernier cas le temps requis pour cette biodégradation est prolongé. Le suivi des cinétiques de biodégradation a montré que l'Ultracide à 50 et 100 mg/l est récalcitrant à une biodégradation anaérobie par les inocula.

Une étude réalisée avec le Decis et le sumithion à 20mg/l et en présence de 20mM de glucose et de deux souches (DX et SY) isolées des inocula acclimatées a montré que l'ajout du glucose inhibe la biodégradation de ces pesticides par acidification du milieu.

La recherche des métabolites de la biodégradation anaérobie du Decis et du Sumithion a montré que ces deux pesticides sont totalement dégradés par les consortia de bactéries acclimatées. En effet seuls des produits gazeux (CO_2 , CH_4 et N_2) ont été détectés comme produits finaux de la biodégradation du Decis et du Sumithion.

Après avoir constaté la biodégradation du Decis et du Sumithion, nous avons entrepris l'isolement d'une souche sur Decis et d'une souche sur Sumithion. Ces deux souches ont montré une capacité à biodégrader le Decis et le Sumithion dans un sol anoxique. La biodégradation du Decis dans le sol par la souche nommée DX se fait en 20 jours, pendant qu'elle est de 15 jours pour le Sumithion en présence de la souche nommée SY. La détermination de quelques caractéristiques morphologiques et physiologiques a permis de faire un rapprochement entre la souche SY et le genre *Bacillus*. L'objectif de notre étude a-t-elle été atteinte ? A cette question nous pouvons répondre par l'affirmative avec toutefois quelques réserves. En effet notre étude a permis d'obtenir des consortia de microorganismes aptes à la biodégradation rapide

de six pesticides parmi les plus utilisés par les agriculteurs Burkinabé. Mais les consortia devraient être testés au niveau pilote afin de s'assurer de leur capacité à éliminer les pesticides utilisés. Seules des études utilisant des fermenteurs pilotes ainsi que des tests en pleins champs peuvent nous permettre de trancher sur l'efficacité de nos consortia.

Nous restons convaincus que le plus important est l'ensemble des connaissances et expériences que nous avons accumulés au cours de cette étude. En effet la recherche et l'utilisation des souches performantes pourront contribuer à la protection de l'environnement face à la pollution par les polluants chimiques en générale et par les pesticides en particulier.

Dans le futur nous nous proposons de tester l'efficacité de nos consortia dans des fermenteurs pilotes à faible coût. Cela nous permettra de nous attaquer au problème des contenants des pesticides qui sont actuellement rejetés dans la nature alors qu'ils devraient être convoyés dans un lieu précis pour leur traitement.

Nous pourrions également apporter notre contribution à la résolution des problèmes de pollution des eaux et des sols notamment le cas des rejets d'eaux résiduelles contenant des substances difficilement biodégradables comme c'est le cas pour les rejets des huileries, savonneries et des tanneries.

Sur le plan fondamental nous nous proposons d'isoler et de caractériser les souches contenues dans nos consortia. Nous projetons également d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes biochimiques de la biodégradation des pesticides testés. A cet effet les voies biochimiques et les enzymes impliquées dans cette biodégradation seront investiguées.

Des acclimatations d'autres inocula seront réalisées sur d'autres substrats pesticides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afnor**, 1985. Analyse des eaux naturelles. édition Masson. Paris, France. 545 pages.
- Ala-AI, A., D. A., Vasu, and J. Huang**. 1991. Exocellular and intracellular accumulation of lead in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 is mediated by the phosphate content of the growth medium. FEMS Microbiol. Lett. **83**:283-290.
- Ala-AI, A., D. A., Vasu, and J. Huang**. 1992b. Aluminium, chromium and manganese detoxification mechanisms in *Pseudomonas syringae*: an X-ray fluorescence study. Microbiol. **70**:13-22.
- Ala-AI, A., D. A., Vasu, and H. Falter**. 1992a. Gallium toxicity and adaptation in *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol. Lett. **92**:265-272.
- Alasdair, M. C., G. D. Christian, and M. Alexander**. 1978. Phosphorus-containing pesticide breakdown products: quantitative utilization as phosphorus sources by bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **36**:668-672.
- Alexander, M., and B. K. Lustigman**. 1966. Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes. J. Agric. Food. Chem. **14**:410-413.
- Alice, C. M., H. D. Charles, R. C. Gupta, K. P. Ravinder, and D. James**. 1984. Microbial transformation of primaquine by *Candida tropicalis*, Appl. Environ. Microbiol. **47**:537-539.
- Allievi, G. C., C. Salardi, G. Valsecchi, T. Brusa, and A. Ferrari**. 1996. Influence of the herbicide bentazon on soil microbial community. Microbiol Res. **151**:105-111.
- Alonso, J. L., C. Sabater, M.J. Ibanez, I. Amoros, M. S. Botella, J. Canosco** 1997. Fenitrothion and 3-methyl-4-nitrophenol degradation by two bacteria in natural waters under laboratory conditions. J. Environ. Sci. and health part A, Environmental science and engineering and toxic and hazardous substances control (USA) **A32**:799-812.
- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe**. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological groupe. Microbiol. Rev. **43**:260-296.
- Barkay, T., and H. Pritchard**. 1988. Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress, Microbiol. Sci. **5**:165-169.
- Bastide, J., J. M. Cantier, C. M. Coste**. 1985. Mode de dégradation du propyzamide et de ses analogues dans le sol. Ed. INERA Publ. **39**:117-123.
- Bean, G. A., and A. Southall**. 1983. Effet of pyridazinone herbicides on growth of an *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol. **46**:503-505.
- Beudet, R, M.-J. Lévesque, R. Villemur, M. Lanthier, M. Chénier, F. Lépine, and J.-G. Bisailon**. 1998. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:135-141.
- Beudet, R., G. McSween, F. Lépine, S. Milot and J.-G. Bisailon**. 1997. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a liquor obtained after extraction of contaminated chips and wood powder. J. Microbiol. **82**:186-190.

- Bechard, G., J. G. Bisaillon, and R. Beaudet.** 1990. Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions. *Can. J. Microbiol.* **36**:573-578.
- Bechard, G., J. G. Bisaillon, R. Beaudet, and M. Sylvestre.** 1996. Degradation of phenol by a bacteria consortium under methanogenic condition. *J. microbiol.* **36**:503-505.
- Berry, D. F., A. J. Francis and J. M. Bollag.** 1987. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* **51**:43-59.
- Bhat, T. K., B. Singh, O. P. Sharma.** 1998. Microbial degradation of tannins: a current perspective. *Biodegradation* **9**: 343-57.
- Boopathy, R., M. Gurgas, J. Ullian, J. F. Manning.** 1998. Metabolism of explosive compounds by sulfato-reducing bacteria. *Crr. Microbiol.* **37**:127-131
- Cernakova, M.** 1995. Biological degradation of isoproturon, chlortoluron and fenitrothion. *Folia Microbiologica (Czech republic)* **40**:201-206.
- Chamkha, M.** 1997. Etude de la biodégradation anaérobie de structures polyphénoliques de type tannique, par trois souches isolées à partir de tourteaux de karité. DEA de Génie Biologique, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS), Sfax, Tunisie, 41 pages.
- Christianen, N, Ahring B. K.** 1996. Introduction of novabioremediation activity into anaerobic granular sludge using the dechlorinating bacterium DCB-2. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**:61-66.
- Chung, K. H, K. S. Ro and D. Roy.** 1996. Fate and enhancement of Atrazine biotransformation in Anaerobic Wetland Sediment. *Wat. Res.* **30**:341-346,
- Combet-blanc Y.** 1995. Caractérisation et étude physiologique d'une nouvelle bactérie lactique thermophile, *Bacillus thermoamylovorans*, isolée du vin de palme. Thèse, Université de Province Aix-Marseille I, Marseille, France, 104 pages
- Cord-Ruwisch, R.** 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **4**:33-36.
- Coulibaly, K.; J. S. Smith.** 1990. Thermostability of organophosphate pesticides and some of their major metabolites in water and beef muscle. *J. Agric. Food. Chem.* **38**:674-677.
- Crawford, J. J., G. K. Sims, R. L. Mulvaney, M. Radosevich.** 1998. Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:618-623.
- Dennie, D., I. Gladu, F. Lépine, R. Villemur, J. G. Bisaillon, and R. Beaudet.** Spectrum of the reductive Dehalogenation Activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4603-4606.
- Diel, F, M. Detscher, B. Schock, M. Ennis.** 1998. In vitro effects of the pyrethroid S-bioallethrin on lymphocytes and basophils from atopic and nonatopic subjects. *Allergy*, **53**:1052-1059.
- Donlon, B. A., F. E. Razo, J. A. Field, J. Lettinga.** 1995. Toxicity of N-substituted aromatics to acetoclastic methanogenic activity in granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:3889-3893.

- Douglas, M. M.** 1976. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method. *Appl. and Environ. Microbiol.* **32**:7-13.
- Drzyzga, O, D. N. Bruns, T. Gorontzy, K. H. Blotevogel, L. E. Von .** 1999. Anaerobic incorporation of the radio-labeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated soil after different treatment procedures. *Chemosphere*, **38**:2081-95.
- Edward, J. B., and P. L. McCarty.** 1983. Transformations of halogenated organic compound under denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1295-1299.
- Edward, T., H. S. Richard, D. B. Ringelberg, D. C. White, and W. Roger.** 1993. Isolation and Characterization of an N-Methylcarbamate Insecticide-Degrading Methylotrophic Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3339-3349.
- El Gohary, M., W. M., Awara, S. Nassar, S. Hawas.** 1999. Deltamethrin induced testicular apoptosis in rats. The propective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology* **132**:1-8.
- Eto, M.** 1974. « Chemical reactions »; *In organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*; CRC Press inc: Cleveland, Ohio, Chapter III, 57-121.
- Ferrando, M. D, E. Sancho, E. Andreumobiver.** 1996. Chronic toxicity of Fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), à Rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the cladoceran (*Daphnia magna*); *Ecotoxicol. Environ. safety.* **35**:112-120.
- Field, J. A., and G. Lettinga.** 1989. The Effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biological Wastes* **29**:161-179.
- Frkovic, A, A. Zivkovic, A. Alebicjuretic.** 1996. Organochlorine pesticide residues and polychlorinated biphenyls in human milk from northren adriatic region (Croata). *Fresenius Environ. Bull.* **5**:475-481.
- Fukuto, T. R.** 1987. « Organophosphorus and carbamates esters: The anticholinesterase insecticides ». *In Fate of Pesticides in the Environnement, Proceedings of a Technical seminar*; Division of Agriculture and Natural Resources, University of California Press: Oakland, chapitre I.
- Ginette S. S.,** 1977. Incidences agrobiologiques des traitements fongicides des céréales. *Soil Biol. Biochem.* **9**:243-245.
- Harison, I., R. U. Leader, J. J. Higgo, G. T. Y. Williams.** 1998. A study of degradation of phenoxyacid herbicides at different sites in a limestone aquifer. *Chemosphere* **36**:1211-1232.
- Harper, R. G., J. A. Frick, A. P. Capparella, B. Borup, M. Nowak, D. Biesinger, C. F. Thompson.** 1996. Organochlorine pesticide contamination in neotropical migrant passerines. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* **31**:386-390.
- Heider, J., and G. Fucks.** 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**:677-696.
- Hungate, R. E.,** 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes *In* J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed), *Methods in microbiology* Academic Press, Inc.. New York. **3B**:117-132

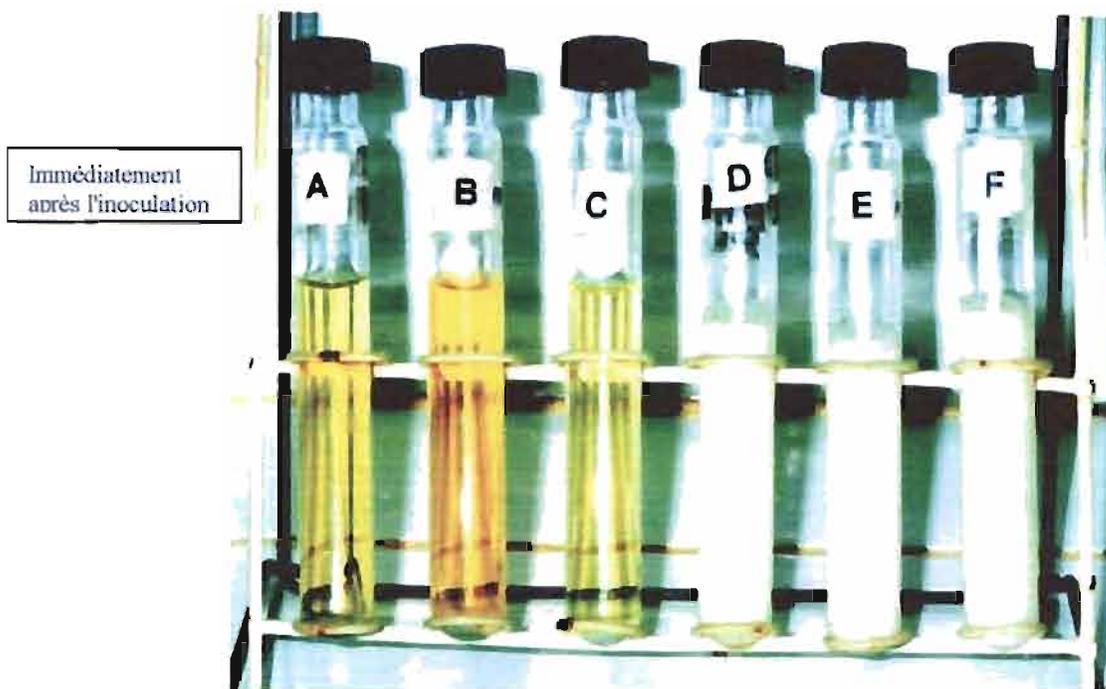
- Huynt, T. H.** 1990. Effet des pesticides sur les zoocoenoses de gastéropodes dulçaquicoles, thèse, Université de Paris-sud (Orsay), 180 pages.
- James, A. F., and G. Lettinga.** 1990. The role of phenolic and humic compounds in granular sludge. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **31**:544-550
- Jenning, A. L.;** 1991. « Some economic and social aspect of pesticide use ». *In Pesticides and Food Safety*; Tweedy, B. G., Dishburger, H.J., Ballantine, L.G., McCarthy, J., Eds., American Chemical Society: Washington, chapitre II.
- Jim, C. S., and P. A. Van Veld.** 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure, time, inoculum, and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:428-435.
- Johnson, J. M., G. W. Ware.** 1998. Pesticide Litigation Manual, 8th Ed. Clark Boardman Callaghan, New York, 816 pages.
- Joseph, M., S., J. A. Robinson, and J. M. Tiedje.** 1983. Kinetics of microbial dehalogenation of haloaromatic substrates in methanogenic environments. *Appl. and Environ. Microbiol.* **45**:1466-1473.
- Kennes, C, W. M. Wu, L. Bhatnagar, and J. G. Zeikus.** 1996. Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by methanogenic pentachlorophenol-degrading granules. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **44**:801-806.
- Kenneth, A.H.,** 1990. The biochemistry uses of pesticides, 2nd édition, Press. LTD, 511 pages.
- Khatsiela, V. W, D. H. Pieper, and R. M. Wittich.** 1999. Initial reactions in the biodegradation of 1-chloro-4-nitrobenzene by a newly isolated bacterium, strain LW1. *Appl. environ. Microbiol.* **65**:1405-12.
- Kilbane, J. J., D. K. Chatterjee, and A. M Chakrabarty.** 1983. Detoxification of 2,4,5, trichloro phenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1697-1700.
- Lagrange, B.** 1980. Biométhane. Tome 2. Principe technique utilisation. Edisubs/Energies alternatives, pp 5-20.
- Lieberman, M. T., and M. Alexander,** 1981. Effect of organic matter and nitrification in sewage. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **25**:554-560.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall,** 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* **193**:265-275.
- Mabury, S. A., J. J. Cox, and D. G. Crosby.** 1996. Environmental fate of rice pesticides in California. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **147**:71-117.
- Macarie, H., A. Noyola and J. P. Guyot.** 1992. Anaerobic treatment of a petrochemical wastewater from a terephthalic acid plant. *Wat. Sci. Tech.* **25**:223-235.
- McCrary, M. H.,** 1915. Table de Mac Crady. *J. Infect. Diseases.* **17**:183-212.
- Mendez, J. H, R. C. Martinez; J. S. Martin,** 1986. Simultaneous polarographic determination of parathion and paraoxon. Catalytic hydrolysis of parathion by palladium(ii); *Anal. Chem.,* **58**:1969-1972.

- Menzer, R. E.** 1991 « Water and soil pollutants ». In Casarette and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, 4th ed., Amdur, M. O., Doull, J., Klaassen, C. D., Eds.; Pergamon Press Inc: Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, N. Y. Chapitre XXVI.
- Middlekauf, R. D.** 1986. Pesticides residue in food: Legal and scientific issues. Food Drug Cosmet. Law J. **42**:251-264.
- Miller, G. C., and V. C. Hebert,** 1987. « Environmental photodecomposition of pesticides ». In Fate Pesticides Proceedings of a technical seminar; Division of Agricultural and natural resources, university of California Press: Oakland. Chapitre VIII.
- Miller, T. L., and M. J. Wolin.** 1974. A serum bottle modification of Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl. Microbiol. **27**:985-987.
- Moletta, R.** 1993. La digestion anaérobie: du plus petit au plus grand. Biofutur. 13-25.
- Moore, J. K., H. D. Braymer, and A. L. Larson.** 1983. Isolation of *Pseudomonas* sp which utilizes the phosphate herbicide glyphosate. Appl. Environ. Microbiol. **46** :312-320.
- Morrison, R. J., N. Harrison, and P. Gangaiya.** 1996. Organochlorine contaminants of the fiji islands. Environ. Poll. **93**:159-167.
- Mulbry et al.,** 1996. Biodégradation of the organophosphate insecticide Coumaphos in highly contaminated soils and in liquid wastes. Pest. Sci. **48**:149-155.
- Murphy, S. D.** 1987. "Role of metabolism in pesticide selectivity and toxicity". In Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspective, Costa, L. G., Galli C.L., Murphy S. D., Eds; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, Germany, pp 18-32.
- Nath, B. S., A. Suresh, B. M. Varma, and R. P. S. Kumar.** 1997. Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera=Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. Ecotoxicol. Environ. safety (USA), **36**:169-173.
- Nishihara, T, S. Hasebe, J. Nishikawa, and M. Rondo.** 1997. Biodegradation of aniline, anthracene, chlornitrophen, fenitrothion and linear alkylbenzène sulfonate in pond water. J. Appl. Microbiol. **82**:441-447.
- Ohshiro, K., T. Kakuta, T. Sakai, H. Hirota, T. Hoshino, and T. Uchiyama.** 1996. Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil. Journal of fermentation and bioengineering (Japan. **82**:299-305.
- Ollivier, B., R. Cordruwisch, A. Lombardo, and J. L. Garcia.** 1985. Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium. Arch. Microbiol. **142**:307-310.
- Ossombo, N., S. Desacher, R. Buvet** 1985 La jacinthe d'eau (suite et fin), Biom, **3**, 10 pages.
- Ouattara, A. S., and V. A. Jacq.** 1992. Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from Senegal ricefields. FEMS Microbiol. Ecol. **101**:217-228.

- Ouattara, C. A. T.** 1994. La biodégradation des sous produits des industries agro-alimentaires pour la protection de l'environnement: cas des tourteaux de karité des huileries de Bobo-dioulasso (Burkina Faso), Thèse, Université de Ouagadougou, FAST. 128 pages
- Paige, J. N., J. C. Sarah, and G. F. Parkin.** 1997. Kinetics of alachlor transformation and identification of metabolites under anaerobic conditions. *Wat. Res.* **31**:3107-3115.
- Pfennig, N., and F. Widdel.** 1981. Ecology and physiology of some anaerobic bacteria from the microbial sulfur cycle. In: *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. H. Bothe and A. Trebst (eds), Springer-Verlag (Pub.) Heidelberg. P. 169-177.
- Pignetello, J. J., L. K. Johnson, M.M. Martinson, R L. Crawford.** 1983. Response of the microflora in outdoor experimental PCP: environmental factors. *Can. J. Microbiol.* **32**:38-46.
- Racke, K. D.** 1992 « Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices ». In *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*; Chambers, JE, Levi, PE, Eds.; Academic press Inc: San Diego. Chapitre III.
- Ramade, F.,** 1992. Précis d'écotoxicologie, édition Masson, Paris, 300 pages.
- Razo, F. E., B. Donlon, G. Lettinga, J. A. Field.** 1997. Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:525 –538.
- Renner, G., and C. Hopfer.** 1987. Subacute toxicity studies on pentachlorophenol (PCP) and the isomeric (TCH, TCC, TCR). *Toxicol. Environ. Chem.*, **14**:301-312.
- Reyes, S-A, and G. Lettinga.** 1991. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:544-550.
- Roy, S., R. Kumar, and C. B. Sharma.** 1996. Biodegradation of fenitrothion in soil. *Biomedical-chromatography.* **10**:60-64.
- Santos, T. C. R., J. C. Rocha, R. M. Alomo, E. Martinez, C. Ibanez, and D. Barcelo.** 1998. Rapid degradation of propanil in rice crop fields. *Environ. Sci. Technol.* **32**:3479-3484.
- Savadogo, P. W., C. A. T. Ouattara, A. S. Ouattara, et A. S. Traoré.** 1999. Biodégradation anaérobie d'un pyréthrénoïde et d'insecticides organophosphorés par des cultures bactériennes mixtes non définies. *Science et technique, Sciences naturelles* **23**:16-25.
- Savadogo, P.W.** 1996. Biodégradation des pesticides et polluants industriels utilisés dans l'agriculture. DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 79 pages.
- Shalini, R., R. Kumar, S. Roy, and C. B. Sharma.** 1996. Biodegradation of fenitrothion in soil. *Biomedical-Chromatography (United Kingdom).* **10**:60-64.
- Shelton D. R., and J. M. Tiedje.** 1984. General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:850-857.
- Shelton D. R., and J. M. Tiedje.** 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:840-848.

- Sipes, I. G. and A. J. Gandolfi.** 1991. « Biotransformation of toxicants ». In Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, 4th ed.; Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, CD, Eds., Pergamon Press Inc: Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, New York. Chapitre IV.
- Sleat, R. et Robinson J. P.,** 1984. The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds, J. Appl. Bacteriol. **57**:384-386.
- Soren, P. P., and B. K. Ahring** 1992. The influence of sulfate on substrate utilization in a thermophilic sewage sludge digester. Microbiol. Biotechnol. **36**:805-809.
- Spain, J. C., and P. A. Van Veld.** 1983. Adaptation of natural microbial Communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure, time, inoculum, and chemical structure. Appl. Environ. Microbiol. **45**:429-435.
- Stamper, D. M., O. H. Tuovinen.** 1998. Biodegradation of the acetanilide herbicide alachlor, metolachlor and propachlor. Crit. Rev. Microbiol **24**:1-22.
- Thomson, W. T.** 1994. Agricultural Chemicals, Book I, Insecticides. Thomson Publications, Fresno, California, 278 pages.
- Toé A. M.** 1994. Dégradation du pentachlorophénol par les *Micromycètes*. Etude particulière des *Deuteromycètes*. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fournier Grenoble I, 156 pages.
- Tomlin, C.** 1994. The Pesticide Manual, 10th Ed. British Crop Protection Council.
- Traoré, A. S.,** 1992. Biogas production from *Calotropis procera*: a latex plant found in west africa. Bioresource Technol., **41**:105-109.
- Traoré, A. S., and V. A. Jacq.** 1991. A simple membrane-filter technique for the enumeration of s-reducing bacteria in soil and water samples. J. Microbiol. Meth., **14**:1-4.
- Traoré, S.A.** 1978. Contribution à l'étude *in situ* des bactéries sulfato-réductrice dans quelques sols tropicaux. Doc. Multigr. ORTOM , Centre de Dakar-Fann, 36 pages.
- Villarini, M., M. Moretti, R. Pasquini, S-G Scassellati, Fatigoni, M. Marcacelli, S. Monarca S., A. V. Rodriguez.** 1998. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes = DNA damage (" comet " assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. Toxicol. **130**:129-139.
- Wahid, M. A., C. Ramakrishna, and N. Sethunathan.** 1980. Instantaneous degradation of parathion in anaerobic soils. J. Environ. Qual. **9**:127-130.
- Waliszewski, S. M., V. T. Pardo, K. N. Waliszewski.** 1996. Organochlorine pesticide levels in bovine meat. Fresenius Environ. Bul. **5**:369-373.
- Ware, G. W.** 1994. The Pesticide Book, 4th Ed. Thomson Publications, Fresno, California. 386 pages.
- Yu-Yunlong, Song-Fengming, Zheng-Zhong.** 1997. Isolation and identification of a broad-spectrum bacterial strain (*Alcaligenes sp*) degrading pesticides. Journal of Zhejiang Agricultural University (China). **23**: 111-115.

ANNEXES



- A: Sumithion (Témoin)
 B: Sumithion + SY
 C: Sumithion + glucose + SY
 D: Decis (Témoin)
 E: Decis + DX
 F: Decis + glucose + DX

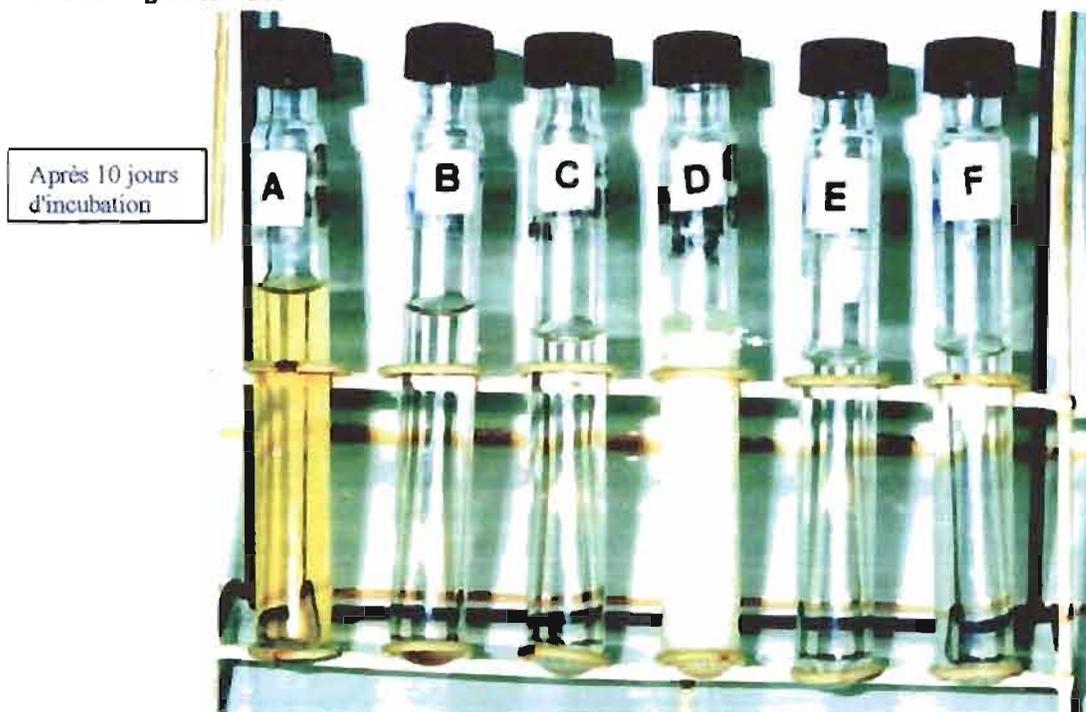
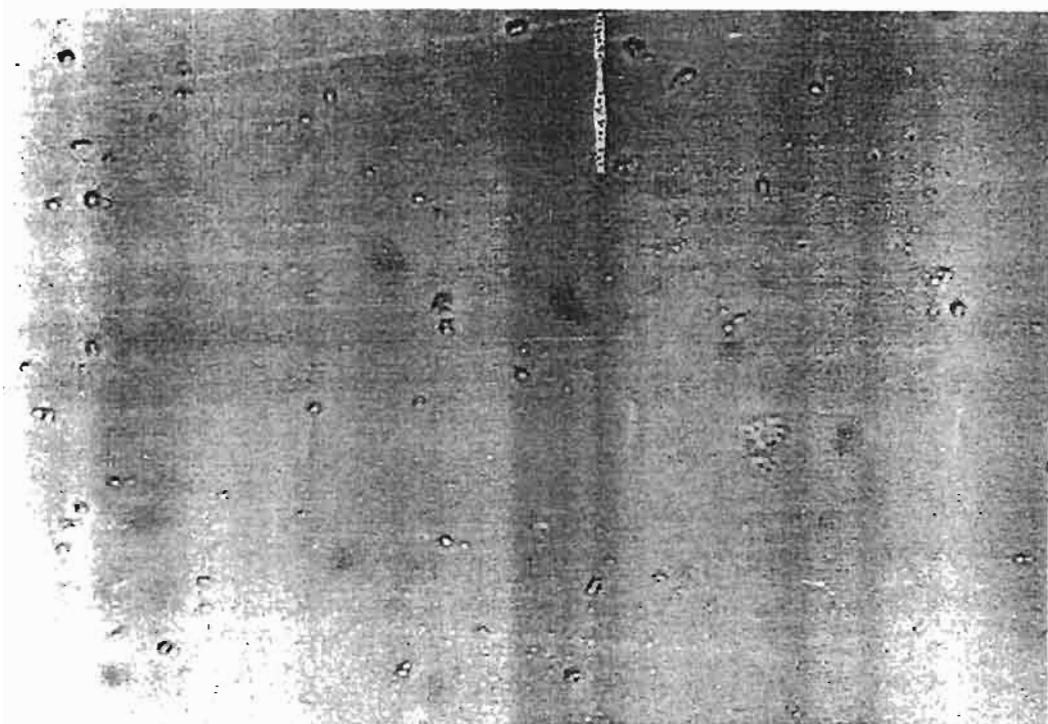
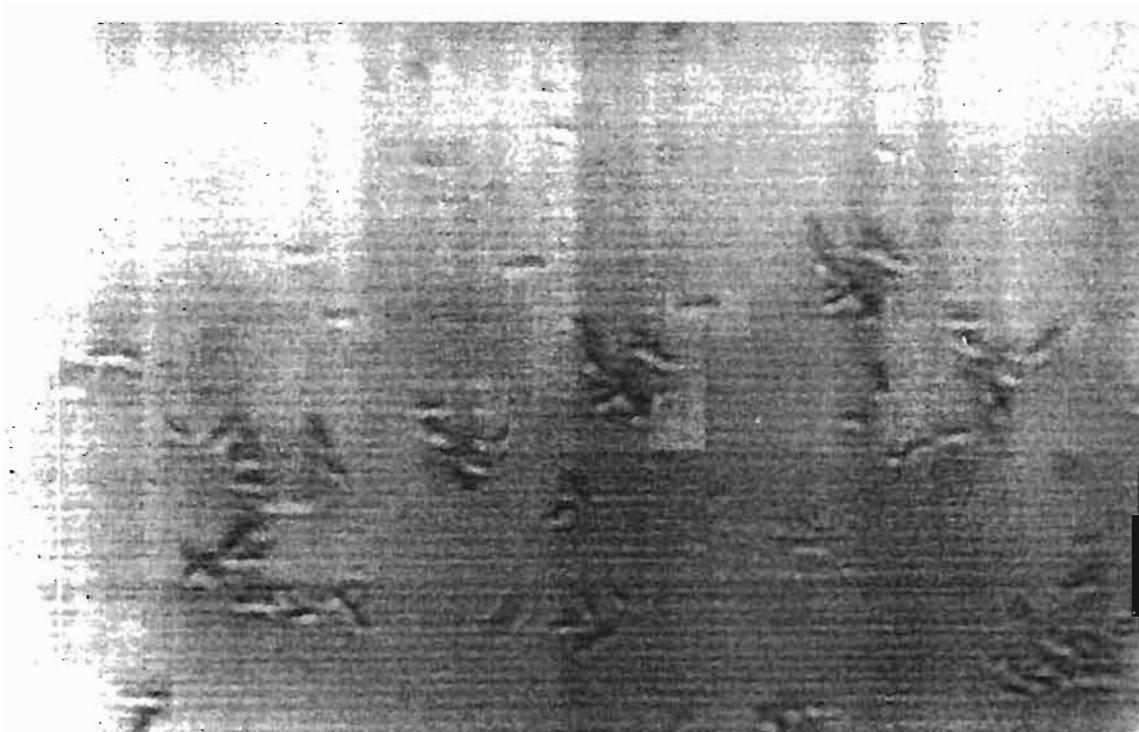


Figure: Photo montrant la biodegradation du Decis à la concentration initiale 20mg/l et du Sumithion à la concentration initiale de 20 mg/l par les souches DX et SY.

La solution du Sumithion est jaune tandis que la solution de Decis est blanchâtre (aspect laiteux). Après la biodegradation le contenu des tubes apparaît limpide.



Photographie des cellules de la souche DX en contraste de phase
Après 24 heures de croissance sur glucose
Grossissement x 400



Photographie des cellules de la souche SY en contraste de phase
Après 24 heures de croissance sur glucose
Grossissement x 400

LISTE DES PUBLICATIONS

MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

Savadogo, P.W. 1996. Biodégradation des pesticides et polluants industriels utilisés dans l'agriculture. Mémoire de DEA en Sciences Biologiques Appliquées, Option Biochimie et Microbiologie, FAST. Université de Ouagadougou, 79 pages.

ARTICLE PUBLIE

Savadogo, P.W., C.A.T. Ouattara, A. S. Ouattara, et A. S. Traoré. 1999. Biodégradation anaérobie d'un pyréthrénoïde et d'insecticides organophosphorés par des cultures bactériennes mixtes non définies. *Revue Science et Technique, Sciences Naturelles*, **23**:15-24

COMMUNICATIONS

Savadogo, P. W., C. A. T. Ouattara, A. S. Ouattara, A. S. Traoré. 1996. Biodégradation des pesticides par les micro-organismes du sol. Communication lors du 2^{ème} Forum National de Recherche Scientifique et des Innovations Technologiques (FRSIT) tenu à Ouagadougou du 9 au 13 avril.

Savadogo, P. W., C. A. T. Ouattara, A. S. Ouattara, A. S. Traoré. 1998. Dégradation anaérobie des pesticides utilisés en agriculture au Burkina Faso par des cultures bactériennes mixtes en vue de la sauvegarde de l'environnement. Communication lors des journées de réflexion sur "l'interaction Université-industries dans le domaine des matériaux et de l'environnement" à la FAST, université de Ouagadougou, les 26 et 27 novembre.

Barro, N., Savadogo P. W. et Traoré A. S. 1999. Etat de contamination microbiologique de quelques aliments de rue et charcuterie de grande consommation dans la ville de Ouagadougou. Communication lors de l'Atelier International sur les petites Industries agro-alimentaires pour une alimentation saine en Afrique de l'Ouest tenu à Ouagadougou du 22 au 24 novembre.

Savadogo PW. 2001. Environmental problems in landfill : particular case of leachate. Rapport de recherche bibliographique présenté lors du stage sur la Biotechnologie appliquée à l'agriculture et aux bio-industries ; 18 avril au 20 juillet à Gembloux en Belgique.

POSTER

Savadogo, P. W., C. A. T. Ouattara, A. S. Ouattara, A. S. Traoré. 1998. La Biotechnologie au Service de L'Environnement : cas particulier de la Dépollution de l'environnement par les micro-organismes. Poster présenté au 3^{ème} FRSIT tenu à Ouagadougou du 29 mars au 03 avril.

LISTE DES PRINCIPAUX PESTICIDES UTILISES EN AGRICULTURE AU BURKINA FASO

DIRECTION DE LA PROTECTION DES VEGETAUX ET DU CONDITIONNEMENT
 PROJET PROTECTION DES VEGETAUX
 AGRICULTURE CANADA
 ACDI 960/10325
 01 BP 5362 OUAGADOUGOU 01 BURKINA FASO TEL/ 30-13-47/30-11-61
 fax: (226)30-31-98

NOM COMMERCIAL	MATIERE ACTIVE	FAMILLE CHIMIQUE	DESTINATION
Actellic	Pyrimiphos-méthyl	Insecticide"Organo-phosphoré"	Stock
Actellic super	Pyrimiphos-méthyl Cypeméthrine	Insecticide"Organo-phosphoré" Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse"	Stock
Alphaméthrine	Alphaméthrine	Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Apron plus	Métalaxyl Furathiocarbe Carboxime	Fongicide"Phénylamide" Insecticide"Carbamate" Fongicide"Anilide"	Semences
Basudine	Diazinon	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Baythion	Phoxime	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Callidim	Diméthoate	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Calliman	Manèbe	Fongicide"Dithiocarbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Callixur	Propoxur	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Calthio	Lindane TMTD ou Thirame	Insecticide"Organo-chloré" Fongicide"Dithiocarbamate"	Semences
Carbofuran	Carbofuran	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Celphos	Phosphure d'aluminium	Insecticide dérivé du phosphore	Stocks
Chlorophacinone	Chlorophacinone	Rodenticide"Anticoagulant"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Cyalon	Lambdacyhalothrine	Insecticide"Pyréthinoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Cymbush	Cyperméthrine	Insecticide"Pyréthinoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Cypercall	Cyperméthrine	Insecticide"Pyréthinoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Décis	Deltaméthrine	Insecticide"Pyréthinoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Dimilin	Diflubenzon	Insecticide"Benzoyl urée"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Dursban	Chlorpyriphos-éthyl	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Fastac	Alphaméthrine	Insecticide"Pyréthinoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Fénitrothion	Fénitrothion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère

NOM COMMERCIAL	MATIERE ACTIVE	FAMILLE CHIMIQUE	DESTINATION
Ficam	Bendiocarbe	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Furadan	Carbofuran	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Fyfanon	Malathion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Gammophèle	Lindane	Insecticide"Organochloré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Garlon	Trichlopyr	Herbicide"Pyridine"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Granox	Carbendazime Captafol Carbofum	Fongicide"Carbamate" Fongicide"Phtalimide" Insecticide"Carbamate"	Semences
K-Othrine	Deltaméthrine	Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse"	Stocks
Karaté	Lambdacyalothrine	Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Kitazine	Kitazine	Fongicide"Antibiotique"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Klerat	Brodifacum	Rodenticide"Anticoagulant"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Malathion	Malathion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Nomolt	Téflubenzuron	Insecticide"Benzoyl urée"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Ofunack	Pyridaphenthion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Peltar	Manèbe Thiophanate-méthyl	Fongicide"Dithiocarbamate" Fongicide"Benzimidazole"	Semences
Phosphinon	Phosphur D'aluminium	Insecticide dérivé du phosphore	Stocks
Phostoxin	Phosphur d'aluminium	Insecticide dérivé du phosphore	Stocks
Pirimor	Pyrimicarbe	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Polycall	Perméthrine Pyridaphenthion Bénomyl Captafol	Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse" Insecticide"Organo-phosphoré" Fongicide"Benzimidazole" Fongicide"Phtalimide"	Semences
Primagran	Métolachlore Atrazine	Herbicide"Acétanilide" Herbicide"Triazine"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Propal M	Propoxur	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Propoxur	Propoxur	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Pyridaphenthion	Pyridaphenthion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Quélétox	Fenthion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Reldan	Chlorpyriphos-méthyl	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère

NOM COMMERCIAL	MATIERE ACTIVE	FAMILLE CHIMIQUE	DESTINATION
Rotiofen	Fénitrothion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Sévimol	Carbaryl	Insecticide"Carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Sevin	Carbaryl	Insecticide"carbamate"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Sofagrain	Deltaméthrine Pyrimiphos-méthyl	Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse" Insecticide"Organo-phosphoré"	Stocks
Sumicombi	Fénitrothion Fenvalérate	Insecticide"Organo-phosphoré" Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Sumithion	Fénitrothion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Super Homai	Thiophanate-méthyl Thirame Diazinon	Insecticide"Organo-phosphoré" Fongicide"Dithiocarbamate" Insecticide"Organo-phosphoré"	Semences
Systhoate	Diméthoate	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Tamariz	Thiobencarbe Propanil	Herbicide"Amide" Herbicide"Amide"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Ultracide	Méthidathion	Insecticide"Organo-phosphoré"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Sumi-Alpha	Fénitrothion Esfenvalérate	Insecticide"Organo-phosphoré" Insecticide"Pyréthrénoïde de synthèse"	Cult. Pluviale et/ou maraîchère
Adonis	Fipronil	Insecticide phenyl pyrazole	Cult. Pluviale et/ou maraîchère