

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Badji Mokhtar -Annaba-
Badji Mokhtar University -Annaba-

جامعة باجي مختار -عنابة



Faculté des Sciences

Département de Biochimie

Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention de Magister en microbiologie

Option : Bioprocédés

Thème

Biodégradation des herbicides : cas du fluazifop-p-butyl

Présenté par : M^{elle} MERAH NESMA

Jury de soutenance :

Président :	BOUTEBBA Aïssa	Pr	Université d'Annaba
Promoteur :	BORDJIBA Ouahiba	Pr	Université d'Annaba
Examineur :	MERAD Tarek	M.C	Université d'Annaba
Examineur :	FERKOUS Fouad	Pr	Université d'Annaba
Membre invité :	DJERIBI Ryad	M.C	Université d'Annaba

Année 2010

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents qui m'ont

Soutenue et aidée.

A mes sœurs

A mes grands-mères

Qui ont prié pour que je réussisse

A mon oncle Mourad et sa femme Mouna

A ma tante Leila et son mari Toufik

Et surtout à mon défunt grand-père Mohamed

Qui nous disait et répétait sans cesse :

«Travailler ! il faut travailler pour réussir dans la vie»

Remerciements

Après avoir remercié ALLAH le tout puissant,

Je tiens à remercier très vivement :

Mes parents, pour leur courage, leur aide morale, et pour leur rôle très important dans ma vie.

Je tiens à exprimer mon éternel reconnaissance envers monsieur le professeur DJERIBI Ryad qui m'a fait l'honneur de m'accepter dans son laboratoire, de l'intérêt constant et les précieux conseils qu'il m'a prodigués toutes ces années.

Mme BORDJIBA Ouahiba pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de m'encadrer et de mener ce travail à terme.

Que le professeur BOUTEBBA Aïssa trouve ici l'expression de ma plus vive considération et toute ma gratitude pour avoir accepté de me faire le privilège et l'honneur de présider ce jury.

Mr MERAD Tarek. Pour son courage, sa compréhension, et pour m'avoir honoré en acceptant d'examiner ce travail.

Mr FERKOUS Fouad. Trouve ici l'expression de toute ma gratitude et mes remerciements les plus chaleureux pour avoir accepté d'examiner ce travail.

RESUME

Le fluazifop-*p*-butyl, qui présente un effet herbicide, est un xénobiotique toxique pour l'environnement. Dans le but de trouver un schéma possible de bioremédiation, cette présente recherche a été menée dans le but de tester, *in vitro*, sa biodégradation. Le fluazifop- *p*-butyl a donc été utilisé comme unique source de carbone et d'énergie en présence d'un consortium microbienne prélevé d'un sol longuement traité par cet herbicide. Un système biphasique MBS/huile de silicone a été utilisé durant toute la période d'acclimatation de la biomasse microbienne. L'utilisation de cette phase tampon a pour objectif de lever, d'une part, l'inhibition par excès du xénobiotique et d'autre part, elle a permis d'augmenter sa solubilité dans la phase organique compte tenu de sa très faible solubilité dans l'eau (1 mg /l). Les batchs ont été conduits à 30°C avec une vitesse d'agitation de 190 rpm. La fermentation a été suivie par mesure de la densité optique, la détermination du poids sec et l'évolution du pH du milieu. Le pouvoir émulsifiant ainsi que l'hydrophobicité du consortium sélectionné ont également été étudiés.

Les résultats obtenus après une période d'acclimatation du consortium de plusieurs mois (une année) ont révélé par le biais des mesures de DO, les mesures du poids sec, une forte adaptation de celui-ci au fluazifop-*p*-butyl, utilisé comme unique source de carbone et d'énergie. L'utilisation du système biphasique a permis, non seulement de lever l'inhibition due au substrat, mais il a également permis une meilleure assimilation du xénobiotique comparée à celle obtenu en système monophasique (milieu minéral). L'étude microbiologique a permis d'identifier une seule souche capable d'utiliser l'herbicide comme unique source de carbone. Il s'agit de l'espèce *Aeromonas hydrophila*. Cette souche bactérienne exhibe une forte hydrophobicité ainsi qu'un pouvoir émulsifiant vis-à-vis du xénobiotique.

Les conditions expérimentales utilisées au cours de cette étude ont permis, une fois de plus, de révéler l'efficacité de la phase organique dans la biodégradation du fluazifop-*p*-butyl et ceci en réduisant la période d'acclimatation du consortium sélectionné.

ABSTRACT

Fluazifop-*p*-butyl, which has a herbicidal effect, is a xenobiotic toxic to the environment. In order to find a possible scheme of bioremediation, the present research was conducted to test in vitro his biodegradation. Fluazifop-*p*-butyl has been used as the sole source of carbon and energy in the presence of a microbial consortium collected from a soil treated at length by this herbicide. A biphasic system MBS / silicone oil was used throughout the acclimation period of microbial biomass. Using this buffer phase aims to raise one hand, inhibition by excess of xenobiotic and secondly, it has increased its solubility in the organic phase due to its very low solubility in water (1 mg / l). Batches were conducted at 30°C with a stirring speed of 190 rpm. Fermentation was monitored by measuring the optical density, dry weight determination and evolution of the medium pH. The emulsifying power and the hydrophobicity of the selected consortium were also studied.

The results obtained after a period of acclimatization of the consortium of several months (one year) revealed through measurements of DO, measurements of dry weight, a strong adaptation of it with fluazifop-*p*-butyl, used as sole source of carbon and energy. The use of two-phase system allowed not only to lift the inhibition due to the substrate, but it also allowed for better assimilation of xenobiotic compared to that obtained by monophasic system (mineral medium). The microbiological study identified a single strain able to use the herbicide as sole carbon source. It is the species *Aeromonas hydrophila*. This bacterial strain exhibits a high hydrophobicity and an emulsifying power vis-à-vis the xenobiotic.

The experimental conditions used in this study have, once again, to prove the effectiveness of the organic phase in the biodegradation of fluazifop-*p*-butyl and this by reducing the period of acclimatization of the consortium selected.

الملخص

فلويازي فوب بوتيل ، التي لديها تأثير مبيدات الحشائش ، هو أجنبي بيولوجيا السامة في البيئة. من أجل إيجاد نظام ممكن من المعالجة البيولوجية ، وأجري البحث الحالي لاختبار التحلل البيولوجي في المختبر. وقد استخدمت فلويازي فوب بوتيل كمصدر وحيد للكربون والطاقة في وجود اتحاد الميكروبية التي تم جمعها من التربة المعالجة على طول هذه المبيدات. ومبس نظام ثنائي الطور / تم استخدام زيت السيلكون طوال فترة التأقلم الكتلة الحيوية الميكروبية باستخدام هذه المرحلة عازلة تهدف إلى رفع يد واحدة ، عن طريق تثبيط تتجاوز ذوبانه أجنبي بيولوجيا وثانيا ، فإنه قد زادت في المرحلة العضوية بسبب ذوبانه منخفضة جدا في الماء (1) ملغم / لتر. أجريت في الدفعتين 30 درجة مئوية مع التحريك من سرعة 190 دورة في الدقيقة. تم رصد التخمر من خلال قياس الكثافة البصرية ، وتحديد الوزن الجاف وتطور الرقم الهيدروجيني المتوسط. ودرست أيضا سلطة الاستحلاب وللا مائية للاتحاد المحدد.

وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها بعد فترة من التأقلم للاتحاد لعدة أشهر (سنة واحدة) من خلال قياسات تفعل ، قياسات الوزن الجاف ، والتكيف مع القوي، فلويازي فوب بوتيل، كما يستخدم مصدر وحيد للكربون والطاقة. يسمح استخدام نظام مرحلتين ليس فقط لرفع المنع بسبب الركيزة ، ولكنه يسمح أيضا لتحسين استيعاب أجنبي بيولوجيا مقارنة مع تلك التي حصلت عليها نظام حيد الطور (المتوسطة المعدنية). وحددت الدراسة الميكروبيولوجية سلالة واحدة قادرة على استخدام مبيدات الأعشاب كمصدر وحيد للكربون. إنه *Aeromonas hydrophila* الأنواع. هذه المعروضات سلالة بكتيرية وللا مائية عالية وقوة الاستحلاب وجها لوجه للأجنبي بيولوجيا.

الظروف التجريبية المستخدمة في هذه الدراسة ومرة أخرى ، لإثبات فعالية العضوية في مرحلة التحلل الحيوي لل فلويازي فوب بوتيل وذلك عن طريق تقليل فترة من التأقلم للاتحاد المحدد.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique du fluazifop-*p*-butyl (Tu *et al.*, 2001).

Figure 2 : Les voies de dégradation du fluazifop-*p*-butyl dans le céleri ((Sherrie *et al.*, 2004).

Figure 3 : Effet de l'addition des sels inorganiques sur la dégradation du *p*-nitrophénol (Jones et Alexander, 1988).

Figure 4 : Effet du bouillon de culture sur l'élimination du 3,5-dichlorobenzoate par une culture acclimatée (Kim et Marier, 1986).

Figure 5 : Batch réalisé en système biphasique (MBS/huile de silicone).

Figure 6 : Croissance du consortium microbien en système biphasique (MBS/huile de silicone) en présence du fluazifop-*p*-butyl (30 µg/ml).

Figure 7 : Croissance du consortium sur la surface de la gélose nutritive (GN) après 24 h d'incubation à 30°C.

Figure 8 : Croissance du consortium microbien acclimaté en système monophasique et en présence de 30 µg/ml du fluazifop-*p*-butyl.

Figure 9 : Evolution de la croissance du consortium microbien en système monophasique et en système biphasique.

Figure 10 : Evolution du pH du milieu lors de la croissance du consortium microbien en système monophasique et en système biphasique.

Figure 11 : Evolution de l'activité émulsifiante du consortium acclimaté au fluazifop-*p*-butyl.

Figure 12 : Observation de l'activité émulsifiante au cours de la croissance du consortium en système biphasique (huile de silicone/MBS).

Figure 13 : Isolement du consortium incriminé dans la dégradation du fluazifop-*p*-butyl sur MBS solide après 20 jours d'incubation.

Figure 14 : Isolement de la souche bactérienne sur gélose nutritive.

Figure 15 : Observation microscopique de la souche bactérienne isolée après coloration de Gram (Gross. ×100).

Figure 16 : Croissance de la souche bactérienne sur milieu mannitol-mobilité après 24 h d'incubation.

Figure 17 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 E.

Figure 18 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 NE.

Figure 19 : Evolution du poids sec de la biomasse en système monophasique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mode d'action des principales familles des pesticides (Mestel, 1989).

Tableau 2 : Persistance de certains pesticides (El Bakouri, 2002).

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques du fluazifop-*p*-butyl (Tu *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Ecotoxicité du fluazifop-*p*-butyl.

Tableau 5 : Identification des composés à partir de l'étude du métabolisme du fluazifop-*p*-butyl dans le céleri ((Sherrie *et al.*, 2004).

Tableau 6 : Facteurs augmentant la récalcitrance d'une Molécule (Hutzinger et Veerkamp, 1981).

Tableau 7 : Les différents types d'interactions entre les micro-organismes (Grady, 1985).

Tableau 8 : Effets de différents solvants sur la production du 1,2-époxyoctane par *Nocardia corallina* B-276. 20 ml de suspension cellulaire, 0,1 de 1-octène et 2 ml de solvant incubés sous agitation pendant 24 heures à 30°C (Furuhashi *et al.*, 1986).

Tableau 9 : Propriétés physiques de l'huile de silicone 47 V 20 (El Aalam *et al.*, 1993).

Tableau 10 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la souche isolée.

Tableau 11 : Resultats de la lecture des galeries biochimiques API 20 E et API 20 NE après 24 h d'incubation à 37°C et 30°C.

Sommaire

1. Introduction	1
2. Généralités	3
2.1. Les pesticides	3
2.1.1. Définition	3
2.1.2. Types des pesticides	3
2.1.3. Les propriétés physico-chimiques des pesticides	4
2.1.4. Classification des pesticides	4
2.1.4.1. La nature chimique.....	4
2.1.4.2. Les activités biologiques.....	5
2.1.4.3. Le mode de pénétration.....	5
2.1.4.4. L'effet obtenu.....	5
2.1.4.5. L'utilisation.....	5
2.1.4.6. Epoque d'application.....	5
2.1.4.7. Le mode d'action.....	5
2.1.5. Utilisation des pesticides	7
2.1.5.1. Usage en agriculture.....	7
2.1.5.2. Usage pour la santé animale.....	7
2.1.5.3. Usage pour la santé publique.....	7
2.1.5.4. Usage pour l'industrie.....	8
2.1.6. Le transfert des pesticides dans l'environnement	8
2.1.7. La toxicité des pesticides sur la santé	9
2.1.7.1. Les risques directs : la toxicité aiguë.....	9
2.1.7.2. Les risques différés dans le temps : la toxicité chronique.....	10
2.1.8. La toxicité des pesticides sur l'environnement	10
2.1.9. Les modes de dégradation des pesticides	11
2.1.9.1. Dégradation abiotique.....	11
2.1.9.1.1. La dégradation chimique.....	12
2.1.9.1.2. La dégradation physique.....	12
2.1.9.2. Dégradation biotique.....	13

2.1.10. La persistance des pesticides	13
2.2. Les herbicides	15
2.2.1. Définition	15
2.2.2. Composition	15
2.2.3. Caractéristiques	16
2.2.4. Classification des herbicides	16
2.2.4.1. Selon le but poursuivi.....	16
2.2.4.1.1. Herbicides totaux.....	16
2.2.4.1.2. Herbicides sélectifs.....	16
2.2.4.1.3. Herbicides utilisés pour des usages particuliers.....	17
2.2.4.2. Selon le moment d'application.....	17
2.2.4.2.1. Traitements préventifs.....	17
2.2.4.2.2. Traitements curatifs.....	17
2.2.4.3. Selon la voie de pénétration et leur mode d'action.....	18
2.2.4.3.1. Herbicides à pénétration par les organes souterrains.....	18
2.2.4.3.2. Herbicides à pénétration foliaire.....	18
2.2.4.4. Selon la nature chimique.....	19
2.2.4.4.1. Les carboxyliques aliphatiques.....	19
2.2.4.4.2. Les phénols.....	19
2.2.4.4.3. Les carboxyliques aromatiques.....	20
2.2.4.4.4. Les phenoxy-carboxyliques.....	20
2.2.4.4.5. Les acides benzoïques.....	20
2.2.4.4.6. Les acides phtaliques.....	20
2.2.4.4.7. Les dinitroanilines.....	20
2.2.4.4.8. Les benzonitriles.....	20
2.2.5. Le mode d'action des herbicides	21
2.2.5.1. Herbicides de contact.....	21
2.2.5.2. Herbicides systémiques.....	21
2.2.6. La Sélectivité des herbicides	22
2.2.6.1. Sélectivité de position.....	22
2.2.6.2. Sélectivité d'application.....	22
2.2.6.3. Sélectivité anatomique.....	23
2.2.6.4. Sélectivité physiologique.....	23
2.2.7. Facteurs du milieu et comportement des herbicides	23
2.2.7.1. Le climat.....	23
2.2.7.2. Le sol.....	25
2.2.7.3. La plante.....	25

2.2.8. L'acheminement ou le devenir des herbicides dans les plantes	26
2.2.8.1. La translocation des herbicides.....	26
2.2.8.2. L'altération de la phytotoxicité.....	27
2.3. Fluazifop-<i>p</i>-butyl	29
2.3.1. Définition	29
2.3.2. Usages agricoles	30
2.3.3. Propriétés chimiques et physiques	31
2.3.4. Mécanismes de dissipation	32
2.3.4.1. La volatilisation.....	32
2.3.4.2. Photodégradation.....	32
2.3.4.3. Dégradations microbiennes.....	32
2.3.4.4. Adsorption.....	33
2.3.4.5. Décomposition chimique.....	33
2.3.5. Comportement dans l'environnement	33
2.3.5.1. Sols.....	33
2.3.5.2. Eaux.....	34
2.3.5.3. Végétations.....	34
2.3.6. Toxicités pour l'environnement	35
2.3.6.1. Oiseaux et mammifères.....	35
2.3.6.2. Espèces aquatiques.....	35
2.3.6.3. D'autres organismes non visés.....	36
2.3.7. Considération sur les applications	36
2.3.7.1. Effets synergiques.....	36
2.3.7.2. Effets antagoniques.....	37
2.3.8. Métabolisme du fluazifop-<i>p</i>-butyl dans le céleri	37
2.3.9. Les métabolites du fluazifop-<i>p</i>-butyl dans l'environnement	39
2.4. La biodégradation	40
2.4.1. Définition	40
2.4.2. Les composés récalcitrants	40

2.4.3. Mécanisme de dégradation	42
2.4.3.1. Le métabolisme fortuit.....	42
2.4.3.2. Cométabolisme.....	43
2.4.4. Les facteurs biologiques de la biodégradation	44
2.4.4.1. Les microorganismes.....	44
2.4.4.2. Les enzymes.....	44
2.4.5. Les voies métaboliques de la biodégradation	45
2.4.5.1. La voie aérobie.....	45
2.4.5.2. La voie anaérobie.....	46
2.4.6. Les cultures mixtes	46
2.4.6.1. Importance des populations microbiennes mixtes pour la biodégradation de composés xénobiotiques.....	46
2.4.6.2. Les interactions entre les micro-organismes.....	47
2.4.7. Les causes limitant la biodégradation des composés xénobiotiques dans l'environnement	48
2.4.8. L'aération dans la biodégradation	48
2.4.8.1. Son importance.....	48
2.4.9. Acclimatation	49
2.4.10. La biodégradation en système biphasique eau/ solvant organique	53
2.4.10.1 Les adaptations physiologiques des cellules en présence des solvants Organiques.....	53
2.4.10.2. Le rôle des solvants organiques dans la biodégradation.....	54
2.4.10.3. La biodégradation en milieu biphasique dans la nature.....	55
3. Matériels et méthodes	57
3.1 Screening et sélection des microorganismes	57
3.1.1. Origine du consortium microbien	57
3.1.2. Le Fluazifop-<i>p</i>-butyl	58
3.2. Le milieu de culture biphasique	59
3.2.1. Milieu de base salin MBS (phase aqueuse)	59

3.2.2. Huile de silicone (phase organique).....	59
3.3. Sélection et acclimatation du consortium microbien en système biphasique (MBS/huile de silicone).....	61
3.4. Les méthodes analytiques.....	62
3.4.1. Mesure de la densité optique (DO).....	62
3.4.2. Mesure du pH.....	62
3.4.3. Mesure du poids sec (PS).....	63
3.4.4. Mesure de l'activité émulsifiante.....	63
3.4.5. Mesure de l'adhérence des cellules.....	63
3.5. Les essais de dégradation du fluazifop-<i>p</i>-butyl en cultures batch	64
3.5.1. La biodégradation du fluazifop- <i>p</i> -butyl en batch biphasique	64
3.5.2. La biodégradation du fluazifop- <i>p</i> -butyl en batch monophasique	64
3.5.3. La biodégradation du fluazifop- <i>p</i> -butyl en culture pure.....	65
3.6. Isolement et identification du consortium sélectionné.....	66
3.6.1. Isolements sur milieu MBS solide.....	66
3.6.2. Purification sur gélose nutritive.....	66
3.6.3. Identification.....	66
4. Résultats et discussion.....	67
4.1. Acclimatation du consortium microbien en culture batch.....	67
4.2. Etude des performances du système biphasique (MBS/huile de silicone).....	70
4.3. Etude de l'hydrophobicité du consortium microbien.....	75
4.4. Détermination de l'activité émulsifiante du consortium dégradant le fluazifop- <i>p</i> -butyl.....	75
4.5. Etude microbiologique du consortium dégradant le fluazifop- <i>p</i> -butyl.....	77

4.6. Résultats de l'étude de la dégradation du fluazifop-<i>p</i>-butyl par <i>Aeromonas hydrophila</i>.....	82
---	-----------

CONCLUSION.....	84
------------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85
---	-----------

ANNEXE

1. Introduction :

L'intensification de l'agriculture s'est accompagnée d'une utilisation importante de pesticides qui a généré une pollution généralisée des sols et des eaux. Problème environnemental majeur d'actualité (Monard, 2008).

Ce sujet est au centre des préoccupations des scientifiques, des pouvoirs publics, des utilisateurs et du grand public. Les études imposées dans ce domaine sont de plus en plus nombreuses et complexes. Elles permettent progressivement de prévoir le comportement de ces substances dans l'environnement de manière assez précise.

Les études les plus fréquentes concernent la présence de ces molécules dans le sol (Senesi, 1993), la contamination des eaux, la dégradation biotique et abiotique des produits antiparasitaires (Muller *et al.*, 1978 ; Bollag, 1982), leur utilisation comme source de carbone par les microorganismes présents dans le sol et enfin l'identification de résidus qui apparemment semblent avoir un lien avec elles (Calderbank, 1989 ; Bollag, 1982).

L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent les plus grandes quantités de pesticides. Ainsi environ 400 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Bouziani, 2007).

Récemment dans notre pays, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est le milieu agricole d'abord qui utilise des tonnes de pesticides. Ces produits sont consacrés en majorité pour le traitement des cultures, la lutte contre les rongeurs et pour augmenter la production agricole. Ainsi l'épandage est courant sur les champs dans le but de détruire les parasites pour la protection des récoltes.

Les analyses des résidus de pesticides pour évaluer le degré de contamination des milieux naturels (les cultures, les eaux superficielles...) ne sont pas faites systématiquement. Des analyses effectuées sur des échantillons d'eau prélevés dans la région de Staouli (Alger) et d'Annaba ont montré que dans plus de 30% des échantillons, la concentration de certaines molécules organochlorées et organophosphorées dépasse les valeurs préconisées par l'O.M.S. Cette utilisation nationale des produits phytosanitaires dans les cultures, fait craindre une pollution massive des sols, des eaux superficielles, des nappes souterraines et de tous les milieux physiques dans toutes les régions du pays.

Cette situation est d'autant plus préoccupante que l'usage des pesticides doit être répété périodiquement. Cette répétition au long terme, entraîne nécessairement une accumulation en pesticides et de leurs résidus dans nos milieux naturels, mettant en danger toute la population par leur toxicité multiforme (Bouziani, 2007).

Face à ces problèmes récurrents, de nombreuses recherches ont été mises en œuvre, d'une part afin de diminuer le pouvoir polluant (toxicité ou rémanence) des pesticides utilisés, et d'autre part dans le but de traiter les eaux et les sols pollués de façon efficace. Aujourd'hui, de nombreuses techniques existent pour traiter les eaux et les sols chargées en pesticides. Il s'agit le plus souvent de traitements physiques ex : adsorption sur charbon actif (Martin-Gullon et Font, 2001), ou chimique ex : procédés d'oxydation variés (Acero *et al.*, 2000). Ces procédés relativement coûteux, ne sont finalement que très peu mise en œuvre et des alternatives moins onéreuses ont été imaginées. Les traitements biologiques entraînent la consommation par biodégradation ou minéralisation des substances polluantes par une biomasse capable d'utiliser le pesticide comme source nutritive.

Le pesticide auquel nous nous sommes intéressés dans cette étude est le fluazifop-*p*-butyl, un herbicide largement utilisé à travers le monde. C'est un herbicide sélectif de post-levée commercialisé sous le nom de Fusilade super. Il est utilisé pour la lutte contre les graminées annuelles et vivaces dans la culture de la betterave à sucre, légumineuses, l'artichaut, chou, épinard et les arboricultures fruitière. C'est un herbicide systémique rapidement absorbé et permettant un contrôle constant des graminées. Il appartient à la famille des aryloxyphénoxypropionates qui sont des inhibiteurs de l'acétyl coenzyme A (Cluzeau, 1996).

L'objectif principal de cette présente étude s'inscrit dans ce contexte et vise à étudier l'aptitude d'un consortium microbien issus de biotopes différents, à dégrader et à utiliser le fluazifop-*p*-butyl présent dans le milieu comme seule et unique source de carbone et d'énergie.

2. Généralités :

2.1. Les pesticides :

2.1.1. Définition :

Le terme pesticide désigne un produit chimique employé contre les parasites animaux et végétaux des cultures susceptibles d'être nuisible à l'homme ou à l'environnement (Periquet, 1989).

Les pesticides appartiennent à la grande famille des produits phytosanitaires (relatifs aux soins à donner aux végétaux), qui englobe plus largement les pesticides et d'autres produits chimiques ou naturels.

2.1.2. Types des pesticides :

Il existe plusieurs types de pesticides, mais les grands groupes de ces produits chimiques sont :

- **Les insecticides** : sont des produits capables de provoquer la mort des insectes, parmi les insecticides on peut citer : les carbamates, les pyréthroides, les organophosphorés, et les organochlorés.
- **Les herbicides** : ce sont des produits chimiques complexes destinés au contrôle des mauvaises herbes et de végétations ligneuses. Les herbicides agissent sur une cible biochimique d'action, parfois plusieurs, la conséquence est généralement le blocage d'une fonction, avec des répercussions dommageable pour la cellule végétale.
- **Les fongicides** : les fongicides sont des produits chimiques utilisés pour lutter contre les champignons et les moisissures. Ils sont le plus souvent de nature synthétique (Anonyme 5, 2005). Les fongicides ont plusieurs actions, une action biochimique, action sur les métabolites, et une action sur les liaisons vanderwals, hydrogènes, ioniques, covalentes (Devillers, 2005).

2.1.3. Les propriétés physico-chimiques des pesticides :

Les pesticides regroupent une grande diversité de structures chimiques et chaque molécule constitue une entité qui se caractérise par un ensemble de propriétés bien spécifiques (taille moléculaire, encombrement stérique, basicité ou acidité, constante de dissociation, coefficient de partage actanol-eau, solubilité dans l'eau, tension de vapeur) (Bidelman, 1988 ; Koskinen *et al.*, 1990).

En milieu acide, les bases faibles prédominent sous forme protonée, tandis que les acides faibles sont sous forme non dissociée (Calvet, 1989).

Le caractère hydrophobe d'un pesticide augmente lorsque sa solubilité dans l'eau diminue, et il en résulte une rétention plus intense par la matière organique du sol (Baily et Waite, 1970 ; Calvet *et al.*, 2006).

La force d'attraction entre la molécule adsorbée et une surface argileuse est directement proportionnelle à son pôle dipolaire et inversement proportionnelle à sa constante diélectrique.

Plus un cation a un pouvoir de polarité élevé, plus l'adsorption sera importante (Baily et Waite, 1970).

La taille de la molécule va avoir un effet sur l'adsorption par le volume et la surface qui lui sont associés. Le volume aura une influence en particulier sur la capacité des produits organiques à être adsorbés sur les surfaces internes des minéraux. L'orsqu'on examine l'adsorption d'un composé, les caractéristiques de la molécule pesticide ne doivent pas être considérées de manière individuelle, car elles interagissent simultanément.

2.1.4. Classification des pesticides :

Les pesticides peuvent être classés selon :

2.1.4.1. La nature chimique :

On distingue des produits inorganiques, des produits organiques, des produits extraits des plantes, des produits de synthèse, des médiateurs chimiques et autres.

2.1.4.2. Les activités biologiques :

On parle des composés à action purement physique ou des produits à action physiologique ou biologique.

2.1.4.3. Le mode de pénétration :

On distingue les pesticides d'ingestion, les pesticides d'inhalation et les systémiques qui sont absorbés par les végétaux dont la sève devient toxique pour le prédateur. De la même façon on distingue les insecticides de contact et ceux de la translocation interne.

2.1.4.4. L'effet obtenu :

On parle d'insecticides ou de fongicides polyvalents, herbicides totaux, produits sélectifs ou spécifiques.

2.1.4.5. L'utilisation :

Les pesticides peuvent être utilisés soit en traitement préventif (prophylactiques) soit en traitement curatif (thérapeutique) dont l'effet peut être local (topique) ou général (systématique).

2.1.4.6. Epoque d'application :

Pesticides de poste-semi ou de pré-semi, et de post ou pré-levée.

2.1.4.7. Le mode d'action :

Voir tableau 1 (Mestel, 1989).

Tableau 1 : Mode d'action des principales familles des pesticides (Mestel, 1989).

PESTICIDES	MODE D'ACTION
Organophosphorés	Ils agissent par contact et par ingestion sur le système nerveux des ravageurs.
Arylacides	Ils sont absorbés par le feuillage. Puis véhiculés dans la sève des plantes à détruire (2,4D, dichloroprop...).
Triazines	Ils sont absorbés par la racine et bloquent la photosynthèse (atrazine....).
Amides	Ils inhibent la synthèse des lipides à longue chaîne (alachlore.....).
Ammoniums quaternaires	Ils ont une grande rapidité d'action : -le diquat et le paraquat agissent sur le processus de photosynthèse des végétaux et sont non-sélectif. -le difenzoquat agit sur la croissance et est sélectif.
Toluidines	Ils bloquent la division cellulaire (trifluraline...).
Amino-phosphates	Ce sont des herbicides de contact non sélectifs (glyphosate).
Dérivés de l'acide benzoïque	Ils agissent de façon systémique et sont de faible sélectivité.
Aryloxyphenoxy propionates	Ils inhibent la synthèse des lipides (diclofop methyl...)

2.1.5. Utilisation des pesticides :

Il ya une croissance très importante de l'utilisation des pesticides surtout dans les payes en voie de développement.

2.1.5.1. Usage en agriculture :

Même si les grandes famines tendent à disparaître, la pénurie alimentaire reste de manière chronique et constitue un des problèmes de notre temps. On estime que 50% de la population mondiale ne reçoit pas une ration alimentaire suffisante. L'Afrique étant le continent le plus touché (Gille, 1991).

La solution à ce problème impose l'augmentation et la rentabilité des cultures. L'homme doit donc protéger ses récoltes contre les ravageurs et en même temps accroître la productivité de ses cultures.

En effet la production agricole mondiale subit une baisse de 40% due aux dégâts des parasites et des ravageurs de culture. Ces pertes sont plus importantes dans les pays en voie de développement.

En Afrique la production agricole subit une perte annuelle de 42% dont 13% due aux insectes, 13% aux maladies fongiques et 16% aux mauvaises herbes. Ceci explique la nécessité d'une protection phytosanitaire efficace et adéquate (Anonyme 4, 1999).

2.1.5.2. Usage pour la santé animale :

Un certain nombre de maladies du cheptel est traités par des insecticides et des acaricides, en l'occurrence la gale et la teigne. Les animaux sont souvent traités par des insecticides chimiques.

La désinfection des locaux d'élevage entre aussi dans le cadre, elle se fait par le phosphore d'aluminium et le phosphore de zinc.

2.1.5.3. Usage pour la santé publique :

La santé publique tire profit de l'utilisation des pesticides dans l'éradication des maladies transmises par les vecteurs et dans la lutte contre les moustiques.

En effet des maladies telles que le paludisme, la bilharziose, le typhus et la peste ont pu être éradiquées ou du moins, vu leur endémicité fortement diminuée par une lutte antivectorielle par les pesticides.

En 1935 on dénombrait 6000 cas de peste en Afrique, à la suite de traitement raticide, on ne dénombrait plus que 4000 cas en 1949 (Lamrini, 1978).

2.1.5.4. Usage pour l'industrie :

C'est un usage moindre par rapport à l'usage agricole et animal.

Il concerne surtout le stockage des denrées alimentaires et des produits altérables par l'attaque de certaines moisissures.

2.1.6. Le transfert des pesticides dans l'environnement :

Une fois pulvérisés, les pesticides peuvent :

- Dériver vers l'atmosphère avant même que le produit n'ait atteint le sol. Ce type de phénomène est bien évidemment accentué en période de grand vent ou dans le cas d'une application aérienne (par avion ou par hélicoptère).

- Atteindre le sol et ensuite :

- Se volatiliser : c'est l'une des causes principales de fuites de pesticides hors de la zone cible, ces pertes dépassent souvent en importance celles dues à la dégradation chimique, ou au ruissellement et à la lixiviation (Taylor et Spencer, 1990), les molécules pesticides peuvent être véhiculées fort loin par les courants aériens et compensés par la dilution très rapide dans l'atmosphère. La constante de Henry, rapport de la pression de vapeur à la solubilité dans l'eau, rend mieux compte du taux de volatilisation d'une substance que seule pression de vapeur (Jury, 1984 ; Spencer et Cliath, 1990 ; Dabène et Marié, 1993). On a, d'autre part, rapporté que les vapeurs pouvaient être concentrées dans les gouttelettes de brouillard puis redéposées sur les végétaux (Glotfelty, 1987).
- Être emportés par ruissellement vers les eaux superficielles ou percoler vers les nappes phréatiques.
- Rester en solution dans l'eau contenue dans le sol où ils peuvent alors démarrer leur processus de biodégradation.

- Être “adsorbés” par certains constituants du sol (colloïdes minéraux et organiques), c’est-à-dire stockés puis “désorbés” c’est-à-dire relargués dans l’eau contenue dans le sol.
- Atteindre des animaux et/ou des plantes“ non cibles“ et être absorbés par eux, stockés dans les graisses animales ou dans les tissus végétaux puis en partie rejetés (sueur selles, évapo-transpiration).

2.1.7. La toxicité des pesticides sur la santé :

Les risques que font peser les pesticides sur la santé se situent à deux niveaux :

2.1.7.1. Les risques directs : la toxicité aiguë

Le risque d’une intoxication aiguë par les pesticides concerne :

- Les utilisateurs.
- Les personnes situées à proximité immédiate lors du traitement et qui, par le fait de dérive de produit (vent par exemple) seraient directement exposées au produit.
- Les personnes fréquentant les espaces justes après le traitement (enfants ingérant des particules de terres ou des végétaux traités).

Selon le réseau de toxicovigilance (phyt’attitude) mis en place par la MSA, les intoxications liées à l’utilisation de pesticides se font principalement :

- Par la peau et les muqueuses, par contact direct.
- Par inhalation, en respirant les poussières ou les vapeurs de produit.
- Par ingestion, en portant ses doigts à sa bouche(en fumant une cigarette ou en mangeant un sandwich.....).

Les symptômes sont principalement cutanés, digestifs, oculaires, neuromusculaires, ORL Respiratoires et des céphalées.

Ces pathologies sont en grande partie évitable à condition de se protéger correctement lors de l’utilisation des produits (Spea, 1991).

2.1.7.2. Les risques différés dans le temps : la toxicité chronique

Ces risques sont à la fois :

- Inévitables, car les sources d'exposition passives aux résidus de pesticides sont multiples (eau, air, aliment).
- difficiles à évaluer, car si à forte dose, les effets cancérigènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction sont avérés pour de nombreux pesticides (Hayes, 1991), l'évaluation se complique fortement pour l'exposition, durant toute une vie, à un cumul de molécules, présente toute l'année à de micro-doses, simultanément dans l'eau, dans l'air et dans l'alimentation.

De nombreuses études ont été publiées sur les effets des pesticides sur la santé à long terme (Leblanc, 1995). Les associations entre expositions aux pesticides et effets chroniques sont plus fréquemment évoquées notamment :

- pour les cancers : les lymphomes et les cancers de l'enfant (tumeurs cérébrales, leucémies, néphroblastomes), en particulier lors d'une exposition prolongée de la mère pendant la grossesse.
- pour les troubles de la reproduction : les malformations congénitales, les retards de croissance, la mortalité fatale, l'infertilité masculine/féminine.
- pour les troubles neurologiques : la maladie de Parkinson et dans une moindre mesure, la maladie d'Alzheimer, la baisse des performances cognitives.

2.1.8. La toxicité des pesticides sur l'environnement :

Le manque de sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible peut provoquer des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les produits phytosanitaires via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré ou au travers de leur peau. Ayant franchi diverses barrières, le toxique atteint les sites du métabolisme où il est stocké. Les effets néfastes sur la microflore du sol pourraient, à long terme, avoir des répercussions sur la chaîne trophique. Hormis les abeilles domestiques (Sabik, 1991 ; Louveaux, 1984), on ne dispose aujourd'hui que de données fragmentaires sur la toxicité de la plupart des matières actives sur les insectes, les nématodes, les poissons ainsi que sur les vertébrés (oiseaux, mammifères).

Dès les années 50, les oiseaux ont été touchés indirectement par l'utilisation des pesticides et plus particulièrement du DDT. En effet, au Canada, les chercheurs ont pu constater que certains oiseaux disparaissaient tel que le faucon Pèlerin. Les doses efficaces pour combattre les insectes n'étaient pas nécessairement toxiques pour les oiseaux, mais puisque les pesticides persistaient pendant des décennies, ils s'accumulaient dans la chaîne alimentaire des oiseaux ce qui finissait par les tuer.

Même si la dose ingérée n'est pas suffisante pour causer la mort, des effets secondaires peuvent apparaître tel que l'amincissement des coquilles des œufs (Madhum et Freed, 1990). De nos jours, les organochlorés sont de moins en moins utilisés dans les pays développés, ils ont été remplacés par des organophosphorés ou des carbamates qui sont des inhibiteurs de cholinestérase. Ce sont des insecticides particulièrement efficaces qui combattent de nombreux insectes mais également très toxiques. De plus, étant donné qu'ils se décomposent rapidement dans l'eau ou le sol, les récoltes doivent être traitées à plusieurs reprises.

Les pesticides peuvent également provoquer des dégâts importants sur la faune aquatique ; les mortalités de poissons ne sont pas rares. Pimentel *et al.*, (1993) estiment qu'aux Etats Unis 6 à 14 millions de poissons sont morts chaque année à cause des pesticides entre 1977 et 1987.

En ce qui concerne la mortalité de mammifères, elle est généralement engendrée par l'ingestion de nourriture contaminée. L'exposition à certains pesticides peut également engendrer des baisses de fertilité (Leblanc, 1995).

2.1.9. Les modes de dégradation des pesticides:

Les dégradations biotiques et abiotiques des pesticides conduisent à l'atténuation naturelle des molécules dans les sols.

2.1.9.1. Dégradation abiotique:

La frontière entre les altérations biotiques et abiotiques est difficile à définir mais certains auteurs définissent comme abiotiques, toutes les réactions initiées par des composé chimiques réactifs, des fonctions moléculaires du sol ou catalysées par des substances comme les surfaces organiques ou minérales (Scheunert, 1992). La photodécomposition est un processus de dégradation purement abiotique qui n'est possible que lorsque la molécule est capable d'absorber le rayonnement UV ($\lambda > 290\text{nm}$) (Scheunert, 1992).

La dégradation abiotique regroupe les processus de transformation physiques et chimiques subis par les pesticides (Ristori, 1995).

2.1.9.1.1. La dégradation chimique :

La dégradation chimique peut se faire dans la solution du sol ou dans l'eau, l'hydrolyse acide ou basique est la réaction la plus fréquente. Elle conduit le plus souvent à des produits intermédiaires polaires (Calvet *et al.*, 2006) et donc des hydrosolubles que le composé parent (Senesi, 1993).

Dans le sol le rôle de l'acide humique dans la transformation abiotique des pesticides est moins étudiée que celui des argiles (Amstrong, 1991 ; Mietinnen, 1993). Pour les argiles la transformation est en fonction de cation ou du métal de transition impliqué dans l'adsorption (Fusi, 1991 ; Fusi, 1993).

Hormis son influence sur l'état d'ionisation de la matière active, le pH agit sur les processus de dégradation dont le mécanisme peut être différent selon que le milieu est acide ou basique (Hequet, 1995). Dans certains cas les molécules d'eau se comportent en catalyseurs de l'hydrolyse abiotique, lorsqu'elles sont sous forme hautement polarisée à la surface d'un oxyde (Wolf, 1990).

Le pH et la température semblent également avoir un impact sur le processus d'hydrolyse qui est favorisé lorsque cette dernière augmente (Taylor, 1995 ; Dominique, 2000 ; El Bakouri, 2002).

2.1.9.1.2. La dégradation physique :

Le premier facteur nécessaire à une transformation physique est un facteur qui apporte l'énergie. Le processus est basé sur une interaction entre la lumière et la matière, la lumière se manifestant par une radiation électromagnétique (Somasundaram et Coats, 1990).

Les pesticides sont absorbés souvent à des longueurs d'ondes différentes et la photodégradation peut être extrêmement significative à la surface des plantes, des débris végétaux, dans l'eau, dans l'atmosphère, ou la durée de vie va également dépendre des conditions météorologiques et même à la surface du sol (Chester, 1989 ; Cui, 2002).

2.1.9.2. Dégradation biotique:

Les réactions biotiques correspondent aux transformations se produisant dans les organismes vivants du sol ou catalysées par des enzymes à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (Scheunert, 1992). On distingue les oxydations, les réductions et les hydrolyses.

Parmi les altérations biotiques deux situations se différencient : dans le premier cas, le pesticide est dégradé en produits inorganiques de faible poids moléculaire (CO₂, H₂O, Cl⁻), cette dégradation totale s'appelle la minéralisation.

Dans le deuxième cas, le pesticide est partiellement dégradé en molécules organiques de faible poids moléculaire.

Lorsque la dégradation est accompagnée d'une augmentation de biomasse des organismes qui obtiennent via ces réactions l'énergie et le carbone pour la synthèse biologique, elle correspond au métabolisme. En absence de croissance, la dégradation partielle est appelée cométabolisme ; les microorganismes provoquent la transformation chimique des pesticides en utilisant une autre source de C et d'énergie pour leur croissance (Scheunert, 1992 ; Soulas, 1999).

Les produits de transformation biotique des pesticides ou métabolites, principalement issus de processus co-métaboliques sont parfois des intermédiaires dans la séquence de minéralisation. Ainsi la minéralisation et la formation de métabolites de dégradation sont liées alors que ces processus sont opposés : en effet alors que la minéralisation est le seul processus conduisant à l'élimination totale d'un composé xénobiotique dans l'environnement, la formation de métabolites permet l'apparition de nouveaux xénobiotiques qui suivant leur plus ou moins grande toxicité par rapport à la molécule mère s'inscrivent respectivement dans les processus d'activation ou de détoxification des sols (Scheunert, 1992).

2.1.10. La persistance des pesticides:

Quand les pesticides ne sont pas dégradés ou partiellement dégradés, ils se stabilisent dans les sols en se liant essentiellement à la matière organique. Ces liaisons sont plus au moins fortes et évoluent dans le temps. D'autre part, la persistance d'un produit est influencée par les conditions environnementales (température, humidité, pH) et par l'activité de la biomasse microbienne et par la présence d'autres pesticides ou substances chimiques dans le sol (Albin, 1999). Tableau 2 montre la persistance de certains pesticides (El Bakouri, 2002).

Tableau 2 : Persistence de certains pesticides (El Bakouri, 2002).

FAMILLE DES PESTICIDES	PERSISTANCE
Organochlorés	2 à 5 ans
Dérivés de l'urée	4 à 10 mois
Triazines	3 à 18 mois
Acides benzoïques	3 à 12 mois
Amides	2 à 10 mois
Phenoxy	1 à 5 mois
Toluidines	6 mois
Nitriles	4 mois
Carbamates	2 à 8 semaines
Acides aliphatiques	3 à 10 semaines
Organophosphorés	7 à 84 jours

2.2. Les herbicides :

2.2.1. Définition :

Les herbicides peuvent être d'origine minéral, mais ils sont actuellement presque tous issus de produits organiques de synthèse.

Les herbicides sont destinés à combattre les adventices, c'est-à-dire des plantes qui ne sont pas désirées là où elles apparaissent.

Les herbicides sont appelés parfois désherbants, notamment en horticulture.

Ce sont des matières actives ou des produits formulés ayant la propriété de tuer les végétaux (Anonyme 1, 1971).

2.2.2. Composition :

Comme tous les autres pesticides, un produit herbicide correspond d'abord au nom commercial du produit commercialisé par un distributeur ou un fabricant. Ce produit commercial ou spécialité commerciale se compose de deux types de constituants : les matières actives qui lui confèrent son activité herbicide et les formulants qui complètent la formulation. Les formulants sont soit des charges ou des solvants qui n'ont qu'un rôle de dilution des matières actives, soit des produits qui améliorent la préparation (Vidal *et al.*, 1992).

Pour sa qualité :

- La stabilité (émulsifiant, dispersif, etc...).
- La présentation (colorant, parfum, répulsif, etc...).
- La facilité d'emploi (vomitif, etc...).

Pour son comportement physique lors de la pulvérisation : mouillant, adhésif, etc...

Pour son activité biochimique : surfactant, phytoprotecteur (safener).

2.2.3. Caractéristiques :

Les caractéristiques d'un produit herbicide portent sur la désignation de la matière active, le nom du produit commercial, le fabricant et éventuellement du distributeur local, la teneur de la matière active dans le produit, le type de formulation, le mode d'emploi, la dose d'emploi et la culture cible. La teneur en matière active s'exprime en g/l pour les formulations liquides et en pourcentage (%) pour les formulations solides (Singh et Wright, 2002).

La dose d'emploi en produit commercial s'exprime en l/ha pour les formulations liquides et en kg/ha (ou parfois en g/ha) pour les formulations solides. La dose d'emploi en matière active s'exprime toujours en g/ha.

2.2.4. Classification des herbicides :

Il existe aujourd'hui de nombreux herbicides à la disposition des agriculteurs. On peut Les classer selon différents critères.

2.2.4.1. Selon le but poursuivi:

2.2.4.1.1. Herbicides totaux :

Ces herbicides visent la destruction de toutes les espèces présentes. Ils peuvent avoir une rémanence (persistance de l'effet du produit après son utilisation) très courte ou très longue. L'exemple le plus connu est certainement le Round'up et sa matière active, le glyphosate (Daniel *et al.*, 1999).

2.2.4.1.2. Herbicides sélectifs :

Ils visent à détruire les adventices sans endommager la prairie ou la culture.

- **Sélectivité de nature physiologique :** la plante cultivée est capable de se débarrasser de l'herbicide.
- **Sélectivité de position :** certains herbicides ne descendent pas dans le sol.

- **Sélectivité liée aux caractères morphologiques des plantes** : forte pilosité, cuticule imperméable au produit, méristème protégé,
- **Sélectivité liée au stade de développement des plantes** : adventices jeunes et faibles alors que les plantes cultivées sont fortes.
- **Sélectivité artificielle** : certains produits contiennent des phytoprotecteurs ou "safeneurs" qui stimule la décomposition de l'herbicide chez la plante cultivée.

2.2.4.1.3. Herbicides utilisés pour des usages particuliers:

- Défanage des pommes de terre.
- Dévitalisation des souches.
- Inhibiteur de croissance.

2.2.4.2. Selon le moment d'application:

2.2.4.2.1. Traitements préventifs:

- **Herbicides pour traitement en présemis ou préplantation** : éradication en période de nonculture, nettoyage d'un sol resali par les adventices.
- **Herbicides pour traitement de prélevée ou de postsemis** : longue rémanence pour empêcher la germination des graines d'adventices.
- **Herbicides résiduels** : destinés à tenir un sol propre. L'épandage est donc réalisé avant la levée des adventices.

2.2.4.2.2. Traitements curatifs :

- **Herbicides pour traitement de postlevée** : souvent des herbicides foliaires appliqués après la levée des plantes considérées. Ils doivent donc être très sélectifs. La majorité des produits utilisés en prairie se retrouve dans cette catégorie (Hardy et Halvelka, 1975; Bethlenfalvay et Phillips, 1977).

2.2.4.3. Selon la voie de pénétration et leur mode d'action :

2.2.4.3.1. Herbicides à pénétration par les organes souterrains :

- **Actions sur la photosynthèse :**

- Triazines : amétryne, atrazine, prométryne, terbuthylazine, etc....
- Diazines – uraciles : bromacile
- Triazinones : hécazinone, métribuzine
- Urées substituées : diuron, chlortoluron, etc....

- **Action sur la division cellulaire :**

- Toluidines : pendiméthaline, trifluraline, etc....
- Action sur l'élongation cellulaire :alachlore, métazachlore, métolachlor, etc....
- Inhibition de la synthèse des caroténoïdes : isoxaflutole, clomazone

2.2.4.3.2. Herbicides à pénétration foliaire :

- **Actions sur la photosynthèse :**

- Bipyridyles : paraquat, diquat
- Diazines : bentazone, pyridate, etc....

- **Actions sur les membranes cellulaires :**

- Dinitrophénols : dinoterbe
- Benzonitriles : ioxynil, bromoxynil

- **Action sur la division cellulaire :**

- Carbamates : asulame

- **Action sur l'élongation cellulaire :**

- Aryloacides : 2,4-D, 2,4-MCPA, dichlorprop (2,4-DP), mécoprop (MCPP)
- Dérivés picoliniques : triclopyr, piclorame

- **Action sur la bio-synthèse :**

-Acides aminés : glufosinate-ammonium, glyphosate, sulfosate.

-Lipides : graminicides (fluazifop-P-butyl, haloxyfop-R, etc....) (Robert, 1999).

2.2.4.4. Selon la nature chimique :

Suivant la composition moléculaire et la configuration, les herbicides peuvent être classés en familles. On distingue deux grandes catégories :

- Les composés organiques
- Les composés inorganiques

A la différence des quelques composés inorganiques utilisés généralement dans le contrôle des plantes non sélectives et spécialement efficaces contre les vivaces ; il existe les sulfamates d'ammonium (AMS) ; les arsénites de sodium (Na As O_2), les chlorates de sodium et le tétrahydrate métaborate de sodium ($\text{Na}_2 \text{B}_4 \text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). La majorité des herbicides sont des composés organiques caractérisés par la présence d'un ou plusieurs atomes de carbone, celui-ci capable de se lier à d'autres électrons, présentant ainsi différentes formes de chaînes : linéaires, ramifiées ou cycliques (Hess, 1987).

Suivant la présentation de cette chaîne et sa structure, on distingue plusieurs familles d'herbicides :

2.2.4.4.1. Les carboxyliques aliphatiques :

Composés d'une chaîne de carbone avec un groupement carboxyle (**-COOH**) et d'autres éléments tels que le chlore. Exemple : le dalapon (2,2-dichloropropionique acide).

2.2.4.4.2. Les phénols :

Caractérisés par la présence d'un cycle phényle avec un hydroxyle (-OH) substitué à un hydrogène du cycle. Exemple : le DNOC et le DNBP (dinoseb).

2.2.4.4.3. Les carboxyliques aromatiques :

Cette famille d'herbicides est composée d'une structure aromatique (cycle benzène) avec un ou plusieurs groupes carboxyl (-COOH) et différents substituants comme le chlore et le méthyle. Exemple : téréphtalique acide.

2.2.4.4.4. Les phenoxy-carboxyliques :

Cette famille comprend les herbicides dont leurs molécules sont présentées par une structure aromatique (benzène) avec un atome oxygène lié directement à un groupe carboxyl et plusieurs substituants surtout le chlore. Ces herbicides sont rarement utilisés sous formes d'acides, mais plutôt sous formes de sels et d'esters solubles respectivement dans l'eau et dans l'huile. Exemple : le 2,4-D ; le MCPA.

2.2.4.4.5. Les acides benzoïques:

Cette famille d'herbicides comprend des membres comme : le dicamba ; le 2, 3,6-TBA ; ils sont composés d'un cycle benzène, d'un groupe carboxyl et de plusieurs éléments tels que le (Cl, O, CH₃, NH₂) substitués à l'atome d'hydrogène.

2.2.4.4.6. Les acides phtaliques:

Représentés par le DCPA (tetrachlorotéréphtalique acide) et le Naptalam (N-1-naphthalamique acide).

2.2.4.4.7. Les dinitroanilines:

Ces herbicides sont caractérisés par un cycle phényle avec deux groupes d'NO₂. Exemple : le 2,6-dinitroaniline.

2.2.4.4.8. Les benzonitriles:

Ces herbicides possèdent un cycle phényle avec un groupe nitrile (C_N) comme le Bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile). Le bromoxynil ne s'emploie jamais seul,

mais en combinaison avec d'autres herbicides comme le MCPA et le 2,4-D (Wood Powell, 1977).

2.2.5. Le mode d'action des herbicides:

L'absorption et la translocation des herbicides dans la plante sont liées à leur action physiologique, mais le mécanisme par lequel les plantes sont détruites est appelé mode d'action (Wood Powell, 1977).

Suivant leurs modes d'action, les herbicides peuvent être classés en herbicides de contact et herbicides systémiques.

2.2.5.1. Herbicides de contact:

Ces herbicides agissant là où ils sont déposés, possédant une toxicité aiguë, ils détruisent la végétation juste après les minutes ou les quelques heures qui suivent leur translocation. Néanmoins ils peuvent avoir une translocation très limitée vers les parties supérieures de la plante à travers les cellules non vitales du xylème (Wood Powell, 1977).

Ces herbicides sont plutôt destinés à lutter contre des adventices jeunes ; en effet des plantes plus développées sont difficiles à bien enrober, mais aussi de plus trouvent dans leurs racines, des réserves suffisantes pour redémarrer. De même, ils sont inopérants sur les vivaces qui repartent très rapidement (Anonyme 2, 1980).

Dans les plantes, ils agissent essentiellement, par blocage de la respiration ou de la photosynthèse et par la désorganisation des membranes cellulaires, en augmentant leur perméabilité, provoquant ainsi la perte de leurs constituants cellulaires. Les plus typiques sont l'acide sulfurique, le dinoseb (DNBP), le diquat, le paraquat et l'acide cacodylique (Wood Powell, 1977).

2.2.5.2. Herbicides systémiques:

Les herbicides systémiques sont encore appelés de translocation ; en effet après avoir pénétré à l'intérieur de la plante, ils sont véhiculés par la sève jusqu'aux lieux où ils agissent, en général leur mode d'action interfère avec le fonctionnement normal d'un ou plusieurs

processus physiologiques et/ ou métaboliques de la plante. Ces produits sont connus par leur toxicité chronique induisant une action lente, ainsi la mort de la plante survient après une longue période dépassant même les semaines (Foucard, 1982).

Ces herbicides en pénétrant les membranes cellulaires (leur mouvement entre les cellules se fait à travers les plasmodesmes) s'accumulent dans la forme toxique à leur site(s) d'action, sans avoir à perturber le système vital durant leur transit.

Les herbicides systémiques peuvent être absorbés, circuler et agir dans la même forme moléculaire à laquelle ils ont été appliqués, comme ils peuvent être absorbés dans une forme moléculaire, se déplacer dans une autre forme et induire leur effet toxique dans une forme moléculaire différente (Wood Powell, 1977).

2.2.6. La sélectivité des herbicides:

L'utilisation des herbicides est basée sur leur capacité à détruire certaines plantes (les mauvaises herbes), sans porter préjudice à d'autres (plantes cultivées) ; c'est la sélectivité. La sélectivité des herbicides correspond à une modification d'au moins une des phases de l'action des produits dans la plante : mise en contact du produit avec la cible, pénétration, transport éventuel, site d'activité et métabolisme de dégradation.

On distingue divers types de sélectivité :

2.2.6.1. Sélectivité de position :

L'herbicide de pré-levée, appliqué en surface, ne se répartit que dans la couche superficielle du sol à quelques centimètres de profondeur (Dunigan *et al.*, 1972; Goring et Laskowski, 1982). C'est dans cette zone que germe la plupart des espèces de mauvaises herbes, dont les graines sont de petites tailles : au contact du produit, elles subiront son activité herbicide. Au contraire, les semences des cultures sont positionnées plus profondément et échappent au contact du produit qui n'aura pas d'action sur leur germination.

2.2.6.2. Sélectivité d'application :

Il s'agit d'éviter le contact du produit avec la plante cultivée lors de la pulvérisation. L'herbicide est appliqué seulement sur les mauvaises herbes de l'inter-rang en prenant soin de

ne pas atteindre la ligne de culture. Cette technique est employée surtout avec des herbicides totaux dans des cultures à grand écartement.

2.2.6.3. Sélectivité anatomique :

Ces types de sélectivité concernent principalement les produits de post-levée (Khan *et al.*, 2006) : la pénétration par les feuilles peut être gênée par la présence de poils ou par l'épaisseur de la cuticule de l'épiderme. Le port des feuilles modifie également l'adhérence de la pulvérisation à leur surface : les feuilles de graminées, dressées et étroites, retiennent moins bien les gouttelettes que celles des dicotylédones, souvent larges et étalées.

2.2.6.4. Sélectivité physiologique :

La sélectivité peut être obtenue par des différences de comportement physiologique entre les végétaux : la sélectivité de l'atrazine pour le maïs tient en partie à son moins bon transport dans cette plante que dans les espèces sensibles et surtout à la présence d'enzymes qui dégradent la molécule d'atrazine, avant qu'elle ne parvienne à son site d'action, le chloroplaste.

2.2.7. Facteurs du milieu et comportement des herbicides:

Les facteurs du milieu influencent l'efficacité des herbicides et la réussite des pulvérisations, mais également leur sélectivité : tout facteur qui améliorera l'efficacité d'un produit ou d'une pulvérisation, en réduira du même coup la sélectivité (Hall *et al.*, 1999). Quatre éléments peuvent être pris-en considération : le climat, le sol, la plante traitée et les techniques d'application.

2.2.7.1. Le climat :

L'action des facteurs climatiques sur le comportement des herbicides se situe aussi bien avant la pulvérisation, que pendant ou après celle-ci.

▪ **Avant l'application :**

- Si la plante traitée subit une période de sécheresse, la cuticule des feuilles aura tendance à s'épaissir : dans ce cas, les produits de post-levée pénétreront moins facilement dans les feuilles.
- Une pluie avant l'application augmente l'humidité du sol, ce qui favorise la diffusion et la disponibilité des produits à pénétration racinaire.

▪ **Pendant l'application :**

- Si la température est élevée ou si l'air est sec, les gouttelettes de bouillie risquent de s'évaporer avant d'avoir atteint leur cible ; ce phénomène est encore plus accentué dans le cas des pulvérisations en bas-volume.
- La rosée : l'influence de la rosée sur les pulvérisations de post-levée dépend de son intensité : si la rosée est légère, c'est-à-dire si les gouttes ne tombent pas quand on touche les plantes, elle améliore la dilution du produit et facilite sa pénétration dans les feuilles. Au contraire, si la rosée est importante, c'est-à-dire si les gouttes tombent quand on touche les plantes, la pulvérisation sera captée par la rosée, entraînée sur le sol et perdue.
- Le vent : il est déconseillé d'effectuer une application d'herbicide, si le vent est trop fort à cause du risque de dérive de la pulvérisation, qui n'est plus positionnée correctement et qui peut même causer des dégâts sur une parcelle voisine.

▪ **Après l'application :**

- Pour les herbicides à pénétration racinaire (produits de pré-levée), répandus sur sol nu : une pluie après l'application améliore la disponibilité du produit à la surface du sol ; cependant, une pluie érosive qui survient après l'application risque d'entraîner le produit par ruissellement.
- Pour les herbicides à pénétration foliaire (produits de post-levée), épandus sur le feuillage : la pluie diminue l'efficacité des produits par entraînement du dépôt ; le délai nécessaire entre la pulvérisation et la pluie dépend du produit et de la vigueur de la pluie.

2.2.7.2. Le sol :

Les herbicides de pré-levée sont très dépendants de l'état physique du sol :

- Les applications seront peu régulières sur un sol trop motteux et la détérioration des mottes laissera apparaître du sol qui n'aura pas reçu de produit.
- Si le sol est couvert par un paillis dense, la pulvérisation sera captée et n'atteindra pas la zone racinaire.
- Leur disponibilité dans la solution du sol dépend de la texture : le produit est adsorbé par les feuillets d'argile ou les colloïdes de la matière organique. Dans ce cas, la dose d'emploi doit être augmentée. Avec les argiles, le produit retenu sera restitué progressivement dans la solution du sol et la persistance du produit sera augmentée. Inversement, la rémanence sera faible dans les sols riches en matières organiques, car les micro-organismes qu'ils contiennent, vont dégrader rapidement les produits (Burnet et Hodgson, 1991). En sol sableux, les risques de phytotoxicité sont accrus, puisque tout le produit apporté est disponible (Frochot, 1977).
- Ces pulvérisations ne diffusent convenablement en surface que si l'humidité du sol est suffisante.

2.2.7.3. La plante :

L'efficacité des herbicides dépend de deux facteurs liés à leur cible, son espèce et son stade de développement :

- La spécificité des produits herbicides est un élément primordial du choix du produit, tant par rapport aux mauvaises herbes à détruire que pour la culture à protéger. Elle se définit par le spectre d'efficacité et la sélectivité des produits (Tissut et Severin, 1984).
- La destruction d'une mauvaise herbe au stade plantule demandera moins de produit qu'une plante adulte. De plus, la pulvérisation de produits de post-levée atteint difficilement les parties basses des végétaux trop développés à cause d'un effet "parapluie".

- La sensibilité d'une plante dépend de son stade de développement : par exemple, la cuticule des feuilles de maïs s'amincit à partir de la sixième feuille ; à ce stade, les risques de phytotoxicité des produits de post-levée sont plus élevés pour le maïs.

2.2.8. L'acheminement ou le devenir des herbicides dans les plantes :

2.2.8.1. La translocation des herbicides :

Les herbicides absorbés par les plantes se subdivisent en deux catégories :

Ceux qui s'immobilisent dans leurs sites d'absorption, ce sont les herbicides immobiles, et les mobiles qui eux se déplacent vers d'autres parties de la plante, ce mouvement dans la plante est appelé **translocation** (Wood Powell, 1977).

En général, la translocation des ions et des molécules d'herbicides, se fait de la même manière que le transport de l'eau et des solutés, elle s'opère par trois différentes voies :

- Le courant de transpiration associé au xylème.
- Le courant des photosynthates associé au phloème.
- Le symplaste associé aux liaisons cellulaires cytoplasmiques.

Les herbicides mobiles pénétrant par les racines, s'acheminent à travers le courant de transpiration dans le xylème pour arriver jusqu'aux régions supérieures de la plante, une fois dans les feuilles, ils vont s'immobiliser dans leurs tissus ou être transporter ailleurs par le courant des photosynthates. La vitesse de cette translocation étant de 09m/heure (Wood Powell, 1977).

Les herbicides foliaires absorbés, vont soit s'immobiliser dans les feuilles soit circuler dans la plante, par le courant des photosynthates ; ceci se déroule surtout en période de grande intensité lumineuse. On donne l'exemple des herbicides comme le 2,4-D et le MCPA dont le déplacement est totalement lié au mouvement des sucres dans la plante (Wood Powell, 1977).

- La vitesse de translocation par le phloème varie de 10 à 100 cm à l'heure.
- Le transport des produits chimiques, en dehors du système vasculaire, à travers le symplaste, est un transport polaire comparable à celui des auxines naturelles.

Certains herbicides mobiles sont en perpétuelle circulation dans la plante comme le dalapon, c'est un herbicide racinaire qui se déplace par le xylème pour arriver aux feuilles, une fois dans ces dernière il peut refaire son chemin jusqu'aux racines et ainsi de suite répétant ce cycle jusqu'à sa complète dégradation ; d'autres comme le 2,3,6-TBA peuvent circuler entre le système de la plante, et la solution du sol avoisinante.

- La mobilité des molécules d'herbicides dans la plante est sujette à plusieurs processus qui peuvent l'altérer ou au contraire l'accélérer.

2.2.8.2. L'altération de la phytotoxicité :

La phytotoxicité des herbicides absorbés par la plante peut être altérée par certains processus capables, de désactiver les produits actifs, les rendant non phytotoxiques ou d'activer ceux qui sont inactifs les transformant en produits plus phytotoxiques.

Les processus par lesquels les substances herbicides sont décomposées ou transformées, ne sont pas uniquement des réactions biochimiques dues à la catalysation enzymatique mais aussi des réactions purement chimiques se produisant entre les molécules d'herbicides et les constituants cellulaires, et des réactions de photocatalyse associées à l'action photosynthétique. La vitesse et le mode de transformation de chaque herbicide varient suivant les différentes espèces de plantes et leurs variétés, ainsi que la concentration de l'herbicide et le stade de croissance de la plante en question (Wood Powell, 1977).

La désactivation des herbicides dans la plante est appelée **dégradation**, elle constitue le produit de quelques réactions qui sont :

- L'oxydation et la réduction.
- La beta- oxydation.
- L'hydrolyse.
- L'hydroxylation.
- La déhalogénéation.
- La déalkylation.
- La conjugaison.

Ainsi que l'adsorption des molécules d'herbicides à la paroi des tissus conducteurs provoquera leur immobilisation.

La transformation des herbicides non phytotoxiques en des produits plus actifs est toujours le résultat de réactions métaboliques et chimiques comme : la conversion par hydrolyse des dérivés des phenoxy alcanœiques (sels esters, amides et nitriles), non phytotoxiques à des formes acides indispensables à leur action, et la transformation du 2,4-D B inactif dans la plante au 2,4-D phytotoxique par la beta-oxydation.

Généralement les processus de dégradation dans la plante se font plus lentement que ceux se produisant chez les microorganismes, insectes et mammifères. Ceci est due au fait que ces derniers ont de meilleurs systèmes de circulation et d'excrétion (Wood Powell, 1977).

2.3. Fluazifop-*p*-butyl :

2.3.1. Définition :

Le fluazifop-*p*-butyl c'est un herbicide d'origine anglaise (**Zeneca**) se présente sous la forme d'un concentré émulsifiable de couleur ambrée. C'est l'isomère biologiquement actif du fluazifop-butyl (Fusilade).

Il est absorbé par les feuilles et les racines. Doté de propriétés systémiques, il agit en empêchant la formation de l'ATP ; élément indispensable au métabolisme (Cluzeau, 1996).

Il s'ensuit un manque d'énergie nécessaire à la synthèse de matière ce qui provoque l'arrêt rapide (48h) de la croissance de la plante.

Actif sur graminées annuelles et vivaces, il s'utilise en post-levée des adventices et présente une grande sélectivité vis-à-vis des cultures de dicotylédones.

Sa persistance d'action est de l'ordre de 1mois. C'est un pesticide très toxique appartenant à la classe C (la classe la plus toxique). La figure 1 montre la structure chimique du fluazifop-*p*-butyl (Tu *et al.*, 2001).

- Sa formule chimique : (2R)-2-[4-[5(trifluorméthyl) 2 pyridinyl] oxy] phenoxy] propanoic acid.
- Sa formule brute : $C_{19}H_{20}F_3NO_4$
- Son nom commercial : Fusilade super.

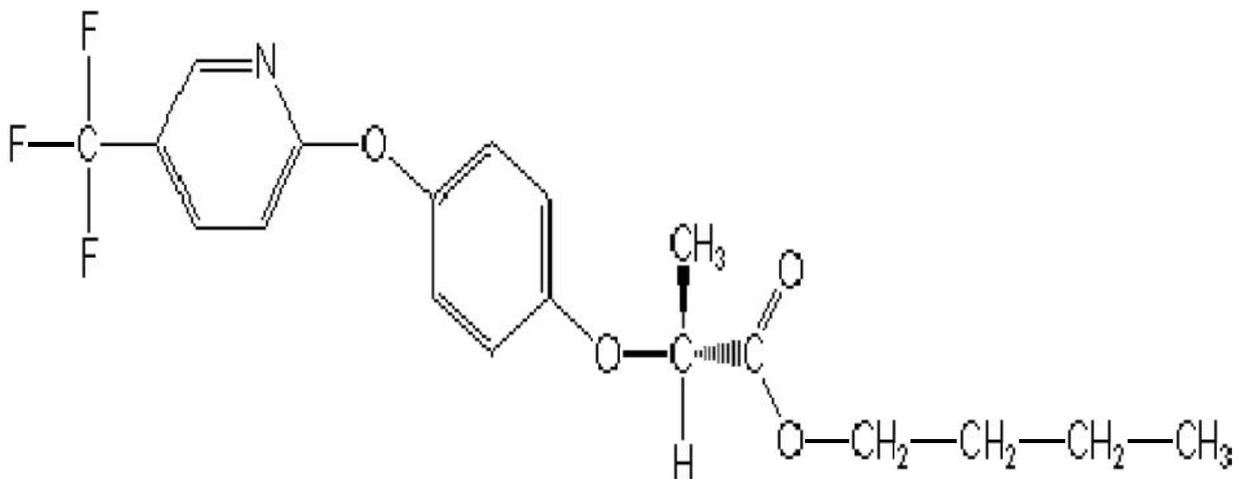


Figure 1 : Structure chimique du fluazifop-*p*-butyl (Tu *et al.*, 2001).

2.3.2. Usages agricoles :

❖ Betterave à sucre :

- Mauvaise herbes cibles : adventices annuelles.
- Dose d'emploi : 0.75 litre PC/ha.
- Epoque d'application : 1-4 feuilles au stade début-tallage des adventices.

❖ Ail, Artichaut, Asperge, Céleris, Cornichon, Chicorée Witloof (production de racines), Choux, Echalote, Epinard, Laitue, Scarole (plein champ), Scorsonère salsifis (plein champ) :

- Mauvaise herbes cibles : graminées annuelles et vivaces.
- Dose d'emploi : 1.25 l/ha pour les annuelles et 2.5 l/ha pour les vivaces.
- Epoque d'application : en post levée des adventices (3 à 5 feuilles de graminées ou 20 cm du chiendent).
- Délai avant récolte :
 - Artichaut et Asperge : 21 jours.
 - Ali, Echalote et Epinards : 28 jours.
 - Cornichon : 30 jours.
 - Céleris, Choux feuillus, Choux fleurs, Choux pommés et Laitue : 42 jours.
 - Chicorée Witloof (production de racines) : 56 jours.

2.3.3. Propriétés chimiques et physiques :

Voir tableau 3 (Tu *et al.*, 2001).

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques du fluazifop-*p*-butyl (Tu *et al.*, 2001).

Etat physique	concentré émulsifiable de couleur ambrée (liquide)
Solubilité dans l'eau à 20°C	1.1mg à pH de 5 à 6.5
Solubilité dans les solvants organiques à 20°C	acétate éthyle : miscible, acétone : miscible, dichloromethane : miscible, hexane : miscible, méthanol : miscible, toluène : miscible et xylène : miscible
Pression de vapeur à 25°C (mPa)	0.12
Constante de Henry à 25°C (Pa m³ mol⁻¹)	0.056
Constante de Henry à 20°C	2.60 X 10 ⁻⁰⁶
Densité à 20°C (g ml⁻¹)	1.22
Point de fusion (°C)	-46
Coefficient de Partage octanol / eau (Log P) à pH 7, 20°C	4.5
Tension superficielle à 23.5°C	33.6mN/m
Viscosité, cinématique à 20°C	54.2cSt
Propriétés comburantes	Non oxydant
Propriétés explosives	Non explosif
Poids moléculaire	383.4
Odeur	Faible odeur d'alcool
Vitesse d'hydrolyse (stabilité)	Stable au pH de 5 avec un temps de demi-vie :78 jours(s) au pH de 7 et un temps de demi-vie : 29 heure(s) au pH de 9

2.3.4. Mécanismes de dissipation :

Fluazifop-*p*-butyl se dégrade principalement par l'hydrolyse, et secondairement par métabolisme microbien. Il n'est pas dégradé par photolyse ou d'autres moyens chimiques.

Le fluazifop-*p*-butyl peut fortement se lier aux particules de sol et il n'est pas soluble dans l'eau ; ne se volatilisent pas facilement.

2.3.4.1. La volatilisation :

Fluazifop-*p*-butyl est non-volatile dans le domaine, toutefois son potentiel de volatilisation augmente avec l'augmentation de la température de l'humidité du sol et au déclin de teneur en argile et en matières organiques (Helling *et al.*, 1971).

2.3.4.2. Photodégradation :

Anonyme 3 (1994) a signalé une perte négligeable de la photodégradation étudiée dans le laboratoire. Il est relativement stable à la dégradation par les UV ou le soleil (Exttoxnet, 1996). Aucune étude publiée concernant la photodégradation du fluazifop-*p*-butyl a été trouvée.

2.3.4.3. Dégradations microbiennes :

La dégradation du fluazifop-*p*-butyl dans l'environnement peut se produire par l'hydrolyse ou par la dégradation microbienne. Les sols avec des conditions qui favorisent le métabolisme microbien (la chaleur et l'humidité) aura le plus haut taux de dégradation (Negre *et al.*, 1993). D'après WSSA en 1994 la demi-vie du fluazifop-*p*-butyl est de 15 jours.

Le Métabolisme par les microbes du sol convertit en premier l'herbicide sous sa forme acide (Fluazifop acide), qui est ensuite dégradée par les microbes, et peut avoir une demi-vie de moins de 1 semaine (Exttoxnet, 1996).

2.3.4.4. Adsorption :

Le fluazifop-*p*-butyl se lie fortement avec les sols. Gessa *et al.*, (1987) ont constaté que le fluazifop-*p*-butyl peut former des liaisons irréversibles à certains sols argileux par plusieurs mécanismes différents.

Malgré qu'il ait une forte adsorption sur les sols, Kulshresha et Urano (1995) ont constaté que le fluazifop-*p*-butyl lessivé à au moins 15 cm de profondeur dans les champs de Soja en Inde.

Fluazifop-*p*-butyl est décrit comme étant d'une faible mobilité dans les sols et ne présente pas un risque non négligeable de la contamination des eaux souterraines (Extoxnet, 1996 ; Anonyme 3, 1994).

2.3.4.5. Décomposition chimique :

Fluazifop-*p*-butyl se dégrade facilement par hydrolyse à fluazifop acide dans les sols et l'eau. La hausse des températures peut augmenter la vitesse d'hydrolyse (Balinova et lalova, 1992). Aucun mécanisme de dégradation chimique n'a été rapporté.

2.3.5. Comportement dans l'environnement :

Fluazifop-*p*-butyl est rapidement hydrolysé en fluazifop acide dans la végétation, les sols et l'eau. Chez les plantes, l'acide fluazifop (herbicide) est actif. Dans les sols et l'eau, à la fois l'ester et l'acide formés sont métabolisés par les microbes du sol ou les sédiments et en panne d'herbicide inactifs composés. La demi-vie moyenne de l'ester formé dans le sol est une à deux semaines. Fluazifop-*p*-butyl se lie facilement avec les particules du sol, limitant ainsi le lessivage et le ruissellement du sol.

2.3.5.1. Sols :

Fluazifop-*p*-butyl est rapidement hydrolysé en fluazifop acide dans les sols (Smith, 1987). Fluazifop-*p*-butyl est rapidement hydrolysé par des microbes à fluazifop acide dans les sols (Smith, 1987).

La demi-vie moyenne du fluazifop-*p*-butyl est une à deux semaines (Anonyme 3, 1994). Les conditions qui promouvoir l'activité microbienne dans les sols, tels que les niveaux d'humidité élevés et la dégradation est de faveur (Negre *et al.*, 1988 ; Negre *et al.*, 1993).

Smith (1987) rapporte que dans les sols humides, seulement 8% du fluazifop-butyl reste dans le sol après 48 heures, alors que dans les sols secs, plus de 90% de l'ester reste après 48heures.

Une étude a montré que l'isomère S, qui n'est plus utilisée dans la marque fusilade formulations ®, est plus facilement métabolisée par les microbes que l'isomère R (Negre *et al.*, 1993). La Dégradation complète des formulations vendues aujourd'hui (composée essentiellement de l'isomère R), va prendre plus de temps que le S et R-isomère fluazifop-butyl mélangé.

2.3.5.2. Eaux :

Fluazifop-*p*-butyl il n'est pas soluble dans l'eau. Parce qu'il se lie fortement aux sols, il n'est pas très mobile dans les sols et ne pose pas un risque important de contamination des eaux souterraines (Anonyme 3, 1994).

Dans l'eau, fluazifop-*p*-butyl hydrolyse rapidement à fluazifop acide, avec la vitesse d'hydrolyse croissant avec l'augmentation du pH (Negre *et al.*, 1988). Fluazifop acide est stable dans l'eau à tous les pH testés.

2.3.5.3. Végétations :

Fluazifop-*p*-butyl est complètement métabolisé dans la plante en fluazifop acide deux à quatre semaines après l'application (Balnova et Lalova, 1992; Kulshresha *et al.*, 1995).

L'acide est plus long à se dégrader, avec des résidus restants dans la plante jusqu'à 45 jours après le traitement (Balnova et Lalova, 1992).

2.3.6. Toxicités pour l'environnement :

2.3.6.1. Oiseaux et mammifères :

Des études ont montré que le fluazifop-*p*-butyl est légèrement à pratiquement non toxique pour les mammifères et les oiseaux qui ingèrent, est uniquement (légèrement) toxique pour la peau et les yeux des animaux (irritant la peau, yeux, voies respiratoires) (Extoxnet, 1996). Il est nocif s'il est inhalé, comme il peut causer des lésions oculaires à d'autres animaux. Le tableau 4 montre les doses létales (DL50) du fluazifop-*p*-butyl sur les animaux.

Tableau 4 : Ecotoxicité du fluazifop-*p*-butyl.

Toxicité du fluazifop-<i>p</i>-butyl sur les animaux	Valeurs
Rats mâles-toxicité par voie orale DL50 de fluazifop- <i>p</i> -butyl (mg/kg)	> 4,000
Rats femelles-toxicité par voie orale aigue DL50 (mg/kg)	2.451
Colin de virginie-toxicité par voie orale DL50 de fluazifop- <i>p</i> -butyl (mg/kg)	>4659
Canards-toxicité par voie orale DL50 de fluazifop- <i>p</i> -butyl (mg/kg)	> 4659

2.3.6.2. Espèces aquatiques :

Fluazifop-*p*-butyl peuvent facilement passer dans les tissus des poissons, il est hautement toxique pour les poissons et autres écosystèmes aquatiques espèces, notamment les invertébrés (**Daphnies 48h CL50>10mg/l**).

Des études ont montré une toxicité très élevée chez le **Crapet arlequin (96h CL50=0.53mg/l)** (Extoxnet, 1996).

Fluazifop-*p*-butyl n'est pas homologué pour utilisation dans les systèmes aquatiques.

2.3.6.3. D'autres organismes non visés :

Fluazifop-*p*-butyl a été démontré qu'il inhibe la croissance fongique (Abdel-Mallek *et al.*, 1996 ; Gorlach-Lira *et al.*, 1997).

Abdel-Mallek *et al.*, (1996) ont constaté que les populations fongiques ont été temporairement (une à deux semaines) diminuées à des taux supérieurs à 3.0 µg/g et pour des périodes de temps plus longues (plus de huit semaines) à des taux supérieurs à 6.0 µg/g.

Fluazifop-*p*-butyl n'a pas un effet significatif sur les champignons lorsqu'elles sont appliquées sur le terrain à des taux recommandés.

Le composé fluazifop-*p*-butyl est peu toxique pour les abeilles. DL50 par voie orale pour les abeilles sont supérieurs à 0,20 mg / abeille (Kidd et James, 1991).

2.3.7. Considération sur les applications :

Fluazifop-*p*-butyl est inefficace dans des conditions de sécheresse. Les herbicides de régulation de la croissance ne sont qu'efficaces lorsque les plantes sont en croissance. En cas de sécheresse, aucune installation nouvelle de croissance ne se produit, et l'herbicide est rendu inefficace.

Certains herbicides restent dans la plante jusqu'à ce que la nouvelle croissance curriculum vitae, mais fluazifop-*p*-butyl est rapidement métabolisé par la plante et par conséquent n'est plus présent lorsque la croissance reprend (des semaines ou un mois plus tard).

2.3.7.1. Effets synergiques :

La synergie est un effet positif de complémentarité dans une organisation. Elle se produit lorsque deux ou plusieurs herbicides sont mélangés et appliqués ensemble et l'impacte du mélange est plus grand que lorsque les herbicides sont appliqués séparément.

Les effets synergiques sont les avantages d'économiser de l'argent (montant dépensé sur les herbicides) et de réduire le montant total de l'herbicide appliqué, ce qui minimise les risques de contamination de l'environnement. Un inconvénient de l'utilisation de plusieurs herbicides, toutefois, est que la recherche adéquate (par le fabricant et les autres) n'a pas été menée concernant les effets globaux et la toxicité des mélanges de ce genre.

Des effets synergiques du fluazifop-*p*-butyl mélangé avec plusieurs herbicides ont été constatés. Harker et O'Sullivan (1991) ont constaté qu'un mélange du fluazifop-*p*-butyl et

Séthoxydime fournis sont plus contrôlé sur les espèces de graminées que les deux herbicides appliqués séparément. En outre, parce que chaque herbicide assure un meilleur contrôle sur autres ensembles d'espèces de graminées, les effets du mélange des herbicides ont été complémentaires ainsi que des synergies. Par exemple, fluazifop-*p*-butyl permet de mieux contrôler le blé et l'orge, alors que Séthoxydime assure un meilleur contrôle de la sétaire verte (Harker et O'Sullivan, 1991).

2.3.7.2. Effets antagoniques :

Des effets antagonistes ont été signalés entre le fluazifop-*p*-butyl et Auxin mimic. Lorsqu'ils sont appliqués ensemble, l'Auxin mimic contrôle efficacement les plantes à feuilles larges, mais le contrôle naturel d'herbes fourni par le fluazifop-*p*-butyl est perdu.

2.3.8. Métabolisme du fluazifop-*p*-butyl dans le céleri :

Voir figure 2 et tableau 5 ((Sherrie *et al.*, 2004):

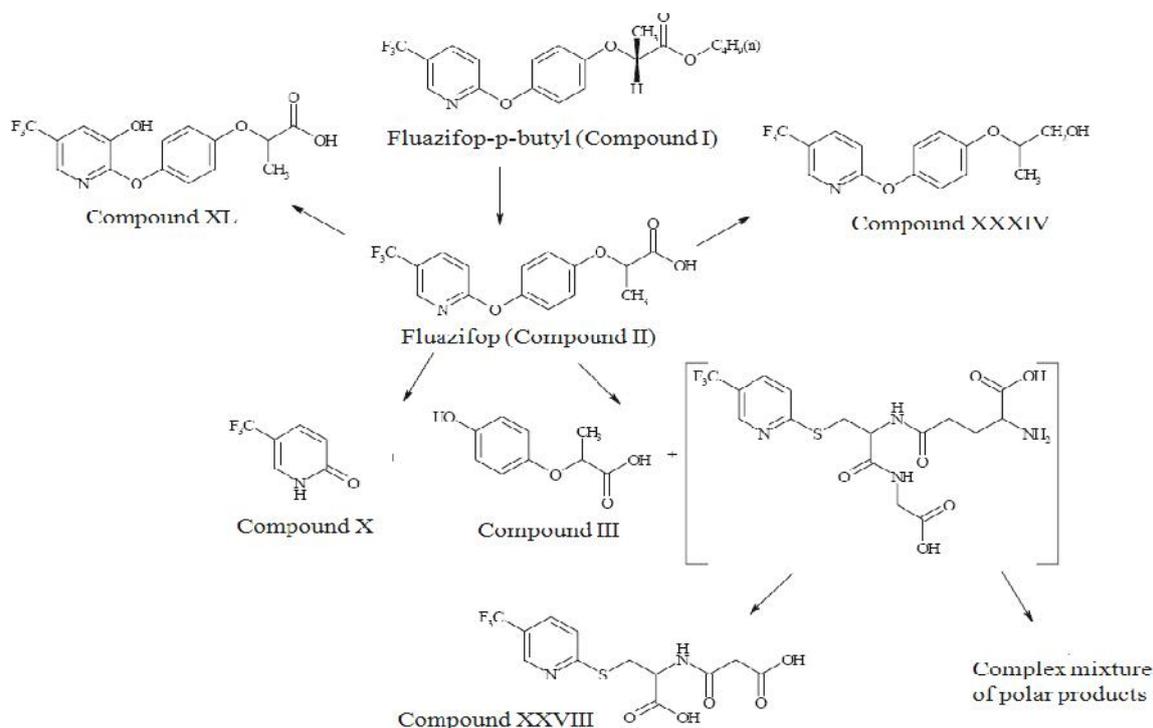


Figure 2 : Les voies de dégradation du fluazifop-*p*-butyl dans le céleri ((Sherrie *et al.*, 2004).

Tableau 5 : Identification des composés à partir de l'étude du métabolisme du fluazifop-*p*-butyl dans le céleri ((Sherrie *et al.*, 2004).

Les Noms commun	Les formules chimiques	Les structures chimiques
Fluazifop- <i>P</i> -butyl	(2R)-2-[4[-5(trifluormethyl) 2 pyridinyl] oxy] phenoxy] propanoic	
Fluazifop	2-(4-[5-(trifluoromethyl-2-pyridinyloxy]phenoxy)propionic acide	
composé III	2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acide	
composé X	5-trifluoromethyl-2-pyridone	
composé XL	2-[4-(3-hydroxy-5 trifluoromethyl-2- pyridyloxy)phenoxy] propionic acide	
Composé XXXIV	2-[4-(5-trifluoromethyl-2 pyridyloxy) phenoxy] propanol	
Composé XXVIII	N-[1-carboxy-2-(5-trifluoromethyl-2- pyridylthio)ethyl] malonamic acide	

2.3.9. Les métabolites du fluazifop-*p*-butyl dans l'environnement :

Les produits de dégradation importante du fluazifop-*p*-butyl sont fluazifop-acide et 5-trifluorométhyl-2-pyridone.

Fluazifop-acide n'est pas très persistant dans les sols aérobie (demi-vie de 11 à 26 jours) mais il est stable dans les sols inondés (anaérobie). Fluazifop-acide est considéré comme mobile (Koc de 8,3 à 51), et le 5-trifluorométhyl-2-pyridone est très mobile (Kells, 1984). Pour le métabolite secondaire 2-(4-hydroxyphényl)-5-trifluorométhylpyridine il n'y a pas de données sur sa mobilité, mais il devrait être similaire à celle de fluazifop-acide.

2.4. La biodégradation :

2.4.1. Définition :

La biodégradation peut être définie comme la capacité intrinsèque d'une substance à être transformée par des microorganismes. La biodégradation est l'élimination d'un composé organique d'un écosystème par l'activité métabolique de la biocénose présente dans ce système. Les produits finaux de la biodégradation sont la biomasse, dioxyde de carbone, l'eau, et selon le cas, de composés inorganiques additionnels tels que l'ammonium, les sulfates... (Pitter et Chudoba, 1990).

Dans la biodégradation on distingue :

a) Biodégradation primaire : processus qui correspond à une transformation plus ou moins importante d'une molécule ou d'un produit, mais sans que cette transformation ne parvienne au stade de gaz carbonique et biomasse. Cette biodégradation primaire (ou apparente) correspond, selon les cas, à une ou plusieurs réactions de bioconversion ; elle est accompagnée, généralement, de la perte d'une ou plusieurs propriétés réactionnelles et de la perte ou de la modification d'une ou plusieurs propriétés physico-chimiques de la molécule ou du produit.

b) Biodégradation ultime : la biodégradation ultime survient quand un composé chimique est totalement transformé en dioxyde de carbone, biomasse et autres constituants inorganiques. Pendant la dégradation le composé peut être présent comme la seule source de carbone et d'énergie ou dans un système mixte avec d'autres sources d'énergie. Quel que soit le cas, la dégradation du composé est liée aux processus métaboliques cellulaires, c'est-à-dire, à la croissance cellulaire. Ceci constitue la différence fondamentale qui sépare les mécanismes de dégradation ultime et primaire (Larson, 1984).

2.4.2. Les composés récalcitrants :

La récalcitrance est la capacité que possède un composé de persister dans un environnement particulier sans changer de forme (Fewson, 1988). Les molécules récalcitrantes ont été très étudiées (Alexander, 1973 ; Faber, 1979 ; Grady, 1985 ; Janssen *et al.*, 1987 ; Janssen *et al.*, 1989 ; Leisinger, 1987 ; Reineke *et al.*, 1982).

En réalité, les composés récalcitrants se divisent en 4 groupes (Alexander, 1973) :

- ✚ Les composés totalement réfractaires à toute attaque biologique quelques soient les circonstances. Exemple : les polymères synthétiques, polyéthylène, chloropolyvinyl.
- ✚ Les composés dégradés très lentement dans la nature ou in vitro, exemple : la lignine.
- ✚ Les composés dégradés rapidement in vitro, mais qui ne le sont pas d'une manière significative dans la nature, ex : les pesticides.
- ✚ Les composés qui sont le substrat des microorganismes en culture mais qui persistent occasionnellement. Exemple : les hydrocarbures pétrochimiques.

Dans l'environnement, la dégradation des composés chimiques synthétiques est principalement due à l'activité microbienne. La connaissance des raisons de leur récalcitrance faciliterait donc la dépollution des sols et de l'eau. D'une manière générale, les causes susceptibles d'engendrer la récalcitrance d'un composé sont les suivantes (Fewson, 1988 ; Van Ginkel et Kolvenbach, 1991) :

- ✚ La concentration en substrat est soit trop élevée (toxique), soit trop faible (Zaidi *et al.*, 1988). Boethling et Alexander (1979) expliquent que pour les concentrations trop faibles de substrat, l'énergie de réaction est libérée trop lentement pour satisfaire la demande microbienne. Ainsi les microorganismes, étant incapables de se multiplier, leur densité reste trop faible pour dégrader plus activement et de manière appréciable le composé.
- ✚ Le substrat s'adsorbe ou se lie de manière covalente à l'argile ou l'humus. Il peut aussi être physiquement inaccessible aux microorganismes (sous forme gazeuse par exemple).
- ✚ La température, le pH, la pO₂ (pression partielle en oxygène) ou les conditions ioniques sont inadéquats pour la réaction biochimique requise (Alexander, 1973).
- ✚ L'absence des microorganismes adéquats pour cause, par exemple, de prédation, de parasitisme ou d'une faible viabilité dans le milieu.
- ✚ L'absence de nutriments et de cométabolites nécessaires à la croissance microbienne.
- ✚ La molécule est de grande taille et insoluble, ou encore les enzymes extracellulaires susceptible de l'attaquer font défaut.

✚ Le substrat :

- N'est pas transporté dans la cellule.
- N'est pas le substrat des enzymes disponibles.
- N'induit pas la synthèse d'enzymes et de facteurs de transport appropriés.
- Est converti en produits toxiques.

Tableau 6 : Facteurs augmentant la récalcitrance d'une Molécule
(Hutzinger et Veerkamp, 1981).

TYPES DE COMPOSES OU SUBSTITUANTS	Plus facilement biodégradable	Moins facilement biodégradable
Hydrocarbures	Alkanes à faible poids moléculaire Alkanes linéaires Hydrocarbures paraffiniques Structures mono et bicycliques	Alkanes à poids moléculaire élevé Alkanes ramifiés Hydrocarbures aromatiques Structures polycycliques
Substituants des noyaux aromatiques	-OH- COOH- NH2- OCH3	-F-CL- NO2- CF3- SO3H
Composés aliphatiques chlorés	CL branché à plus de 6 atomes de carbone du carbone terminal	CL branché à 6 atomes ou moins du carbone terminal

2.4.3. Mécanisme de dégradation :

2.4.3.1. Le métabolisme fortuit :

Un microorganisme donné aura la capacité de dégrader un composé xénobiotique s'il possède le matériel enzymatique nécessaire pour catalyser les réactions cataboliques. Ainsi, le patrimoine génétique microbien est le premier facteur qui déterminera si le composé est biodégradable ou non.

En second, les conditions physicochimiques de l'environnement décideront si la réaction de dégradation pourra s'effectuer ou non. En somme, pour se faire un milieu donné, la biodégradation requiert les conditions spécifiques suivantes :

- La présence de l'organisme approprié.
- L'induction des enzymes requises pour catalyser la chaîne métabolique.
- Les conditions physicochimiques favorables pour assurer une vitesse de réaction significative.

Ainsi, même pour un substrat naturel, la biodégradation requiert des événements spécifiques. Les enzymes sont plus spécifiques envers le type de réaction qu'elles catalysent qu'en vers le substrat même de la réaction. Elles peuvent donc dégrader des composés non habituels en tant qu'analogues de substrat. Les composés xénobiotiques bénéficient de cette flexibilité pour être dégradés par des enzymes déjà existantes dans le milieu. Ce mécanisme s'appelle métabolisme fortuit et représente le mécanisme majoritaire d'attaque des composés chimiques (Grady, 1985). Cependant, si ce dernier est incapable d'inducteur naturel. Compte tenu du nombre de réactions en chaîne et des événements requis pour la biodégradation d'un composé xénobiotique, il semble plus probable que celle-ci soit le fait d'une communauté microbienne plutôt que d'une souche unique.

2.4.3.2. Cométabolisme :

Dans ce cas, **le polluant ne sert pas de source principale de carbone** ou d'énergie. Le micro-organisme a besoin d'une source primaire de substrat, et le polluant est considéré comme un **substrat secondaire**. Il s'agit alors d'une biodégradation par cométabolisme, dans laquelle un substrat secondaire est dégradé en même temps qu'un substrat primaire. Ce mode de dégradation est essentiel pour la plupart des polluants organochlorés (Baker et Herson, 1994). Un exemple d'alcane cométabolisé est le cyclohexane dégradé par *Mycobacterium austroafricanum* en présence d'isooctane (Marchal *et al.*, 2003).

Une espèce *Pseudomonas sp.* peut cométaboliser divers composés dans la nature comme le 2,4 D (2,4 dichlorophénoxyacétique), le Dalapon (acide 2,2 dichloropropionique) et le 2,4,5 T (acide 2,4,5 trichlorophénoxyacétique). Un autre exemple peut être donné par l'indole qui est cométabolisé par *Aspergillus niger* (Kamath et Vaidyanathan, 1990).

Le cométabolisme est une réaction non spécifique, catalysée par des bactéries méthanogènes et acétogènes (Middeldorp *et al.*, 1999).

2.4.4. Les facteurs biologiques de la biodégradation :

2.4.4.1. Les microorganismes :

Le terme microorganisme couvre un groupe hétérogène d'être vivant de taille microscopique et pour la plupart, unicellulaire. Les microorganismes appartiennent à deux principaux groupes :

- Les procaryotes qui n'ont pas de noyau. Ils comprennent les eubactéries et archéobactéries.
- Les eucaryotes dont l'ADN est contenu dans un noyau délimité par une double membrane. Ils comprennent les protozoaires, les algues unicellulaires et les champignons.

Les champignons et les bactéries ont évolué durant des millions d'années et ont développé la capacité à dégrader toutes sortes de composés chimiques après une période d'adaptation. (Sophie, 2002).

2.4.4.2. Les enzymes :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Elles induisent des augmentations très importantes des vitesses de réaction dans un environnement qui, sans elles, ne serait pas favorable à ces réactions biochimiques. Elles sont produites par les cellules (animales, végétales ou microbiennes).

D'un point de vue structural, toutes les enzymes sont des protéines spécialisées de structure tridimensionnelles et dont les masses moléculaires varient entre 10^3 et 10^6 Da.

L'activité enzymatique d'un enzyme est reliée à la structure conformationnelle de ce dernier, qui présente certaines régions spécifiques à sa surface, formant ainsi un site actif.

L'activité de l'enzyme disparaît avec la perte de sa conformation. L'interaction entre l'enzyme et le substrat a lieu sur ce site actif et conduit à la réaction chimique. Les sites actifs sont spécifiques pour un substrat donné ou une série de substrats. Les enzymes sont classés en six groupes, selon leur activité (Durand *et al.*, 1982 ; Lenz, 1993) :

- Hydrolases
- Estérases
- Isomérases
- Réductases
- Lyases et ligases

Elles donnent lieu à différents mécanismes catalytiques. Pour la biodégradation des polymères, ces mécanismes sont typiquement l'hydrolyse et l'oxydation biologique.

2.4.5. Les voies métaboliques de la biodégradation :

La biodégradation des composés organiques dans l'environnement dépend de deux voies métaboliques principales :

 **La voie aérobie**

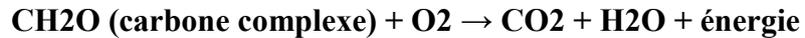
 **La voie anaérobie**

Les micro-organismes obtiennent l'énergie nécessaire pour la croissance cellulaire et le maintien des niveaux de base en catalysant le transfert des électrons d'un électron donneur en un électron accepteur. Des sources importantes d'électrons accepteurs incluent l'oxygène dissous, les nitrates, les sulfates, et le Fe(III) (Tiehm et Schulze, 2003).

2.4.5.1. La voie aérobie :

L'oxydation mono terminale est le principal processus utilisé par la plupart des bactéries dans la respiration, conduisant à la formation de l'alcool primaire puis de l'aldéhyde et de l'acide gras correspondant (Nieder et Shapiro, 1975; Grund *et al*, 1975 ; Soltani, 2004). Les acides gras formés peuvent être oxydés par α , β ou ω -oxydation ; les composés formés pourront par la suite être incorporés aux lipides cellulaires. Une élongation de la chaîne carbonée est alors possible. Cette oxydation mono terminale pour donner l'alcool primaire est catalysée par un ensemble complexe d'hydrolases faisant intervenir un système de transporteur d'électrons permettant l'incorporation de l'atome d'oxygène (cytochrome P450 par exemple).

Dans la respiration bactérienne, les cycles centraux impliqués dans le métabolisme sont la glycolyse, le cycle de Krebs et le système de transport d'électrons. La réaction générale se résume comme suit :



Dans le cas de la dégradation par fermentation, la molécule organique est à la fois donneur et accepteur d'électron. Ce processus est le principal fournisseur d'électrons (hydrogène) et contrôle la réaction de déhalogénéation réductrice, mécanisme majeur de l'atténuation naturelle des solvants chlorés.

2.4.5.2. La voie anaérobie :

Ces dernières années, un effort a été apporté pour isoler les micro-organismes anaérobies, élucider les mécanismes biochimiques et réaliser des expérimentations sur le devenir des xénobiotiques en absence d'oxygène. À l'intérieur des zones anaérobies, les nitrates, le fer (III), les sulfates et le carbone peuvent, servir d'électrons accepteurs terminaux durant la biodégradation des composés organiques (hydrocarbures pétroliers, composés chlorés, pesticides...) (Jourdain et Charissou, 2007).

2.4.6. Les cultures mixtes :

2.4.6.1. Importance des populations microbiennes mixtes pour la biodégradation de composés xénobiotiques :

La minéralisation complète d'un composé peut avoir besoin du métabolisme séquentiel de deux organismes(ou plus) car une seule espèce dans une culture microbienne ne contient pas la diversité génétique qui pourrait se trouver dans une culture mixte ou consortium.

Les études de biodégradation mises en œuvre avec des communautés de cultures mixtes ont des avantages par rapport aux études effectuées avec les souches pures.

D'abord, et principalement, parce que la capacité de biodégradation de la communauté est beaucoup plus grande, surtout quand il s'agit de la dégradation des composés xénobiotiques.

Ensuite, la résistance de la communauté aux composés toxiques est beaucoup plus élevée, car il ya une grande probabilité qu'un micro-organisme qui les détoxique soit présent.

Enfin, la minéralisation des composés xénobiotiques nécessite parfois l'activité concentrée d'espèces multiples (Slater et Bull, 1982 ; Grady, 1985 ; Block *et al.*, 1989 ; Thouand, 1993).

2.4.6.2. Les interactions entre les micro-organismes :

La dégradation d'un composé xénobiotique et à priori sa dégradation complète est souvent réalisée par une population mixte de micro-organismes (Feinderg *et al.*, 1980 ; Grady, 1985 ; Kilpi *et al.*, 1988 ; Slater, 1981 ; Slater et Bull, 1982 ; Slater et Lovah, 1982).

Parmi les interactions possibles entre micro-organismes on peut trouver la compétition pour un même substrat, mais aussi le mutualisme avec par exemple la dégradation du parathion, ou le commensalisme lors de la dégradation du dalapon (Senior *et al.*, 1976).

Le tableau 7, montre les différents types d'interactions pouvant exister entre différents micro-organismes.

Tableau 7 : Les différents types d'interactions entre les micro-organismes (Grady, 1985).

		Effet de l'organisme j sur l'organisme i		
		Positif	Nul	Négatif
Effet de l'organisme i sur l'organisme j	Positif	Mutualisme	Commensalisme	Parasitisme et Prédation
	Nul	Commensalisme	Neutralisme	Amensalisme
	Négatif	Parasitisme et Prédation	Amensalisme	Compétition

2.4.7. Les causes limitant la biodégradation des composés xénobiotiques dans l'environnement :

La biodégradation est une condition nécessaire mais non suffisante pour lutter contre la pollution de l'environnement. En effet, inoculés dans le sol ou l'eau, les microorganismes subissent un stress, dû aux conditions naturelles, qui peut mettre en échec leurs capacités de biodégradation. Les raisons de cet échec peuvent être de natures diverses :

- La concentration du composé dans la nature peut être trop faible pour permettre la croissance des microorganismes (Alexander, 1985).
- L'environnement peut contenir des substances qui inhibent la croissance des microorganismes ou leur activité (toxines).
- Les microorganismes peuvent être sujets à des phénomènes de prédation (protozoaires), de parasitisme ou de compétition.
- Les microorganismes peuvent utiliser d'autres substrats organiques disponibles dans le milieu.
- Les microorganismes peuvent être incapables de se mouvoir, par les pores du sol, pour accéder au composé polluant.

2.4.8. L'aération dans la biodégradation :

2.4.8.1. Son importance :

L'emphase dans les études sur la biodégradation des composés découlant de l'activité humaine a été largement mise sur les processus aérobies et d'oxydation, parce qu'ils sont les mieux connus et parce que les techniques aérobies sont relativement simples comparées aux méthodes de culture anaérobie (Singleton, 1994). Une autre raison de leur utilisation étendue est que les procédés aérobies ont été considérés les plus efficaces et faciles d'application (Kobayashi et Rittmann, 1982).

Les traitements aérobies requièrent le transfert d'oxygène dans l'eau car seul l'oxygène dissout est utilisable par les cellules (Bailey et Ollis, 1986). La faible dissolution de l'oxygène dans l'eau (maximum de 10 mg/l à la température ambiante) exige que ce dernier soit fourni constamment dans le milieu de culture. Par conséquent, l'aération est un processus hautement

énergivore et dispendieux nécessitant des équipements coûteux et une consommation importante d'énergie lorsque utilisé à grande échelle.

Malgré cela, l'aération sert non seulement à combler les besoins en oxygène des micro-organismes entre autre pour oxyder le solvant mais aussi à agiter le milieu, à éloigner les produits de la fermentation du voisinage immédiat des cellules et à apporter de nouvelles substances nutritives (Koffi, 1999). L'agitation et l'aération influencent ainsi positivement la croissance des microorganismes.

2.4.9. Acclimatation :

L'acclimation des micro-organismes aux composés chimiques organiques est une étape cruciale du processus de biodégradation, spécialement s'il s'agit de composés considérés comme difficilement biodégradables. On appelle phase d'acclimatation l'intervalle de temps pendant lequel la biodégradation d'une molécule n'est pas détectée. Pendant cette période il va se produire, chez les microorganismes, des ajustements physiologiques, morphologiques ou/et génétique aux nouvelles conditions environnementales. Ceci laisse les micro-organismes plus aptes à se développer sous le nouvel environnement (Kim et Maier, 1986 ; Wiggins *et al.*, 1987 ; Wiggins et Alexander, 1988).

La durée de cette phase peut varier de quelques heures à plusieurs semaines, voire quelques mois et va dépendre de la nature et concentration du polluant (Hickman et Novak, 1984 ; Kim et Maier, 1986 ; Aelion *et al.*, 1989).

L'utilisation de constantes cinétiques pour prédire la concentration d'un composé dans un environnement et le temps d'exposition des populations potentiellement affectées, peut donner de faux résultats si la phase d'acclimatation n'a pas été en compte (Robertson et Button, 1987).

➤ Plusieurs mécanismes ont lieu durant l'acclimatation :

- ✚ Stephenson *et al.*, (1989) ont proposé que le temps d'acclimatation corresponde à l'induction enzymatique. Les enzymes peuvent être divisées en deux groupes selon leur présence ou leur apparition chez les micro-organismes : celles qui sont présentes en permanence dans la cellule sont appelées constitutives, et celles synthétisées lors de la présence d'un substrat sont appelées enzymes inductives.

Ainsi, la phase d'acclimatation a été aussi nommée phase d'induction (Pitter et Chudoba, 1990).

- ✚ Des changements dans les caractéristiques génétiques ou des mutations ont été associés à certains phénomènes d'acclimatation (Subba-Rao *et al.*, 1982 ; Schmidt *et al.*, 1983). L'acclimatation peut être phénotypique ou génotypique. Dans le premier cas, l'information génétique dans la cellule reste inchangée ; seulement le degré d'expression des gènes est altéré. Dans le processus génotypique il y'a des modifications génétiques et les gènes modifiés sont transmis aux cellules filles.

Les changements dus à la mutation induite sont fréquemment associés aux longues périodes d'acclimatation. Néanmoins, l'échange des matériaux extrachromosomiques (plasmides) a été décrit comme un mécanisme relativement rapide (Reineker et Knackmuss, 1979). Fujita *et al.*, (1991) ont montré que quelques espèces manipulées génétiquement présentaient une activité de dégradation supérieure à celle développée par des espèces banales.

- ✚ D'autres explications possibles pour la phase d'acclimatation font appel au manque de nutriments inorganiques suffisants (Lewis *et al.*, 1986 ; Jones et Alexander, 1988) voir figure 3. Pitter et Chudoba (1990) ont signalé l'effet du dioxyde du carbone sur la durée de la phase d'acclimatation. Les bactéries hétérotrophes ont la possibilité de fixer le CO₂. Celui-ci sert à la construction des unités utilisées lors de la biosynthèse et comme unité constructrice pendant la synthèse de molécules plus complexes (purines, pyrimides, acides aminés,...). Ainsi le CO₂ étant un nutriment essentiel pour les micro-organismes hétérotrophes, il doit absolument être présent aux concentrations requises dans le milieu de culture.

L'effet du CO₂ sur la durée de la phase d'acclimatation augmente avec la réduction de la concentration de l'inoculum. En effet, aux faibles concentrations d'inoculum la quantité de CO₂ produite par la respiration endogène est très faible. Aux fortes concentrations d'inoculum une quantité suffisante de CO₂ est produite et donc la croissance bactérienne et l'élimination du substrat ne sont pas affectées.

➤ **L'acclimatation a été aussi expliquée par des processus tels que :**

- ✚ L'utilisation préférentielle d'autres composés organiques avant que le composé chimique d'intérêt ne soit dégradé, comme le montre la figure 4 (Kim et Maier, 1986 ; Wiggins et Alexander, 1988 ; Aelion *et al.*, 1989).
- ✚ L'adaptation des micro-organismes aux toxines ou à la destruction des inhibiteurs présents dans l'environnement.
- ✚ La perturbation de la croissance des organismes responsables de la dégradation par la prédation due aux protozoaires (Alexander, 1981).

Un autre mécanisme explique la phase d'acclimatation comme le temps nécessaire pour la multiplication d'une population initialement faible d'organismes actifs (Ventullo et Larson, 1986 ; Wiggins *et al.*, 1987).

Quand les micro-organismes acclimatés sont soumis aux différents environnement et/ou substrats, ils ont tendance à s'acclimater au nouvel environnement. Simultanément à l'acclimatation aux nouvelles conditions, il se produit quelque fois la disparition ou la perte de l'habilité des micro-organismes à se développer sous les conditions précédentes. Le temps nécessaire pour la « désacclimatation » varie selon le type de micro-organisme, le facteur responsable de l'acclimatation initiale et le type d'acclimatation (Senthilnathan et Ganczarczyk, 1988).

L'acclimatation phénotypique est temporaire et peut être perdue rapidement quand le facteur d'induction est éliminé. Arbuckle et Kennedy (1989) ont trouvé que les boues activées acclimatées à la dégradation des composés phénoliques, perdaient leur aptitude dégradante quand elles ont été privées du substrat auquel elles avaient été acclimatées. Chudoba *et al.*, (1986), en travaillant avec un système en semicontinu ont observé, pendant la phase endogène de la dégradation, une augmentation suivie d'une diminution du taux maximal d'élimination du substrat, q_{\max} . Ils ont expliqué l'augmentation de q_{\max} par la multiplication des organismes, et la diminution par une inactivation des enzymes due à une longue absence du substrat exogène.

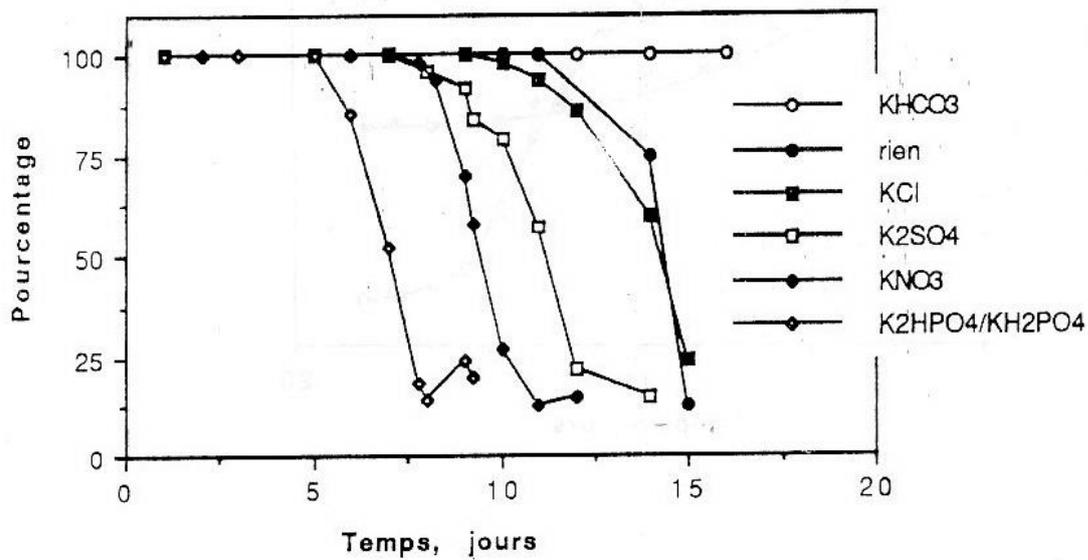


Figure 3 : Effet de l'addition des sels inorganiques sur la dégradation du p-nitrophénol (Jones et Alexander, 1988).

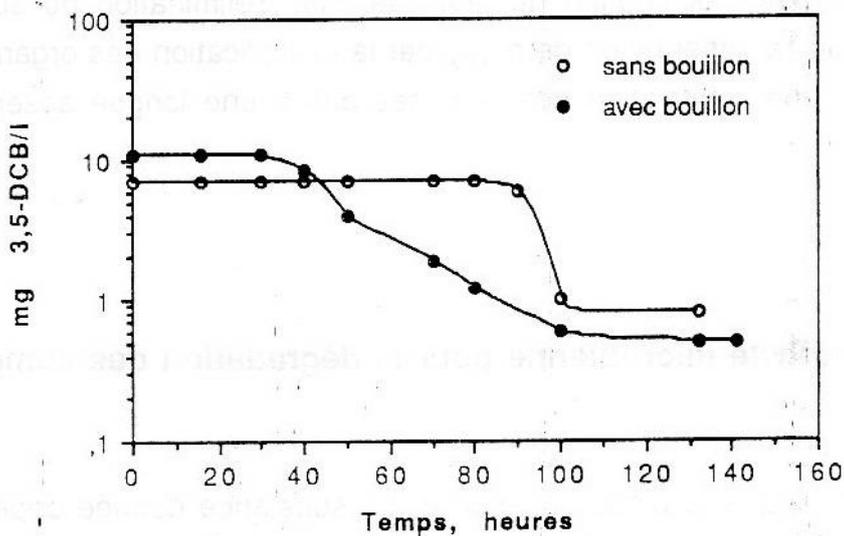


Figure 4 : Effet du bouillon de culture sur l'élimination du 3,5-dichlorobenzoate par une culture acclimatée (Kim et Marier, 1986).

2.4.10. La biodégradation en système biphasique eau/ solvant organique :

2.4.10.1. Les adaptations physiologiques des cellules en présence des solvants organiques :

La dégradation des hydrocarbures faiblement solubles dans l'eau, par des microorganismes, est réalisée selon 2 types de modèles (Roy *et al.*, 1979) :

- Par un contact direct entre les cellules et les larges gouttelettes d'hydrocarbures.
- Par la consommation de la fraction solubilisée de l'hydrocarbure dans la phase aqueuse.

Pour cette classe de substrats, les microorganismes doivent assurer certaines adaptations physiologiques. Notamment, la formation d'émulsifiants ou la modification de la surface cellulaire leur adsorption (Rosenberg *et al.*, 1983 ; Harrop *et al.*, 1989 ; Van Loosdrecht *et al.*, 1989 ; Rosenberg, 1989 ; Duvnjak *et al.*, 1987).

En effet, la composition cellulaire en lipides (acides gras et phospholipides) change en présence de composés lipophiliques dans le milieu et de ce fait, elle peut être très diverse et complexe. Ingram (1977) a étudié l'effet d'une série de solvants organiques et d'additifs alimentaires sur la composition lipidique d'*E.coli*. L'addition d'acétone, cyclohexanone, diméthyl sulfoxyde, dioxane, éthylène glycol, éthylène glycol monoéthyl éther, méthyl éthyl cétone, nitrate de sodium et tétrahydrofurane augmentent la synthèse de lipides contenant des acides gras insaturés. Par contre, amyl acétate, aniline, benzène, tétrachlorure de carbone, acétate d'éthyl, chlorure de méthylène augmentent la synthèse d'acides gras saturés. L'acide benzoïque augmente brusquement la proportion en acide laurique, qui, généralement est un composé mineur chez *E.coli*. Le benzoate de sodium et le propionate de calcium peuvent même induire la synthèse d'acides gras non habituels.

Au cours de la fermentation, l'émulsion hydrocarbure/ eau résulte de 3 facteurs :

- L'agitation du milieu de culture.
- La production d'émulsifiants par les cellules.
- La production de facteurs de solubilisation par les cellules.

Les émulsifiants, en dispersant le milieu, facilitent l'action des facteurs de solubilisation. Le second mécanisme, c'est-à-dire la croissance des microorganismes aux dépens de la fraction solubilisée seulement, semble être le mécanisme majeur de dégradation des substrats immiscibles (Reddy *et al.*, 1982). Cependant, il n'est pas certain que dans la nature, la vitesse de dissolution des composés insolubles gouverne leur vitesse de dégradation (Stucki et Alexander, 1987). D'autres paramètres (facteurs physicochimiques, présence de la microflore adaptée), sont déterminants pour la cinétique de biodégradation.

2.4.10.2. Le rôle des solvants organiques dans la biodégradation:

Omori *et al.*, (1975) ont testé 101 échantillons de sol avec 2 % de styrène comme source de carbone. Etant au delà de la limite de solubilité du styrène dans l'eau, aucun microorganisme n'a été sélectionné. Pour s'affranchir de ce problème, les systèmes biphasiques phase aqueuse/ phase organique peuvent améliorer la réaction faisant intervenir des substrats ou des produits de réactions toxiques ou insolubles dans l'eau (Brink et Tramper, 1985 ; Ward et Young, 1990 ; El Aalam, 1993).

Furuhashi *et al.*, (1986) ont montré que l'époxydation du styrène en styrène oxyde par *Nocardia corallina* B-276 est aussi bien inhibée par le substrat que par le produit de réaction. En effet, les productions de styrène oxyde et de CO₂ sont réduites quand la concentration du styrène augmente. L'addition du solvant n-hexadécane dans le milieu permet l'augmentation de la production de styrène oxyde par *Nocardia corallina* B-276. En absence de solvant, le styrène oxyde est produit sous forme de traces seulement. Ainsi, la présence de solvant a réduit l'inhibition par le styrène (substrat) et celle par le styrène oxyde (produit).

L'effet de différents solvants sur la cinétique de production de 1,2-époxyoctane à partir du 1-octène par la même souche *Nocardia corallina* est rapporté dans le tableau 8.

Bestetti *et al.*, (1989) ont aussi utilisé 10% de dibutylphthalate comme solvant pour s'affranchir de tout effet toxique du styrène durant la croissance de *Pseudomonas putida*.

Tableau 8 : Effets de différents solvants sur la production du 1,2-époxyoctane par *Nocardia corallina* B-276. 20 ml de suspension cellulaire, 0,1 de 1-octène et 2 ml de solvant incubés sous agitation pendant 24 heures à 30°C (Furuhashi *et al.*, 1986).

Solvant	Vitesse de production ($\mu\text{mol}/\text{mg. Cellule}/\text{jour}$)
1-Chlorododécane	4,1
1-Chlorotétradécane	3,9
1-Bromododécane	2,0
1-Bromotétradécane	1,8
n-Dodécanol	0,1
n-Dodécanal	0,1
Méthylododécanoate	0,1
Méthyltridécanoate	0,5
di-2-Ethylhexylsebacate	3,7
2,6,10,14-Tétraméthylpentadécane	3,5
n-Dodécylbenzène	4,1
n-Tridécylbenzène	3,7
Diéthylbenzène	0,1
Ethylbenzène	0,1
Tétraline	0,1
Phytol	2,6
Sans solvant	0,1

Afin de donner un exemple concret du système multiphasique, nous citerons brièvement dans le paragraphe suivant, le cas de la pollution pétrolière. En effet, celle-ci représente le cas majeur de biodégradation en milieu biphasique liquide-liquide dans l'environnement.

2.4.10.3. La biodégradation en milieu biphasique dans la nature :

Les pollutions pétrolières représentent une des principales sources de contamination organique du milieu marin. Dans le cas de déversement à proximité des côtes, une proportion notable de pétrole brut ou traité en mer peut atteindre le littoral et s'incorporer au sédiment. Des accidents survenus dans ce domaine (Sirvins et Tramier, 1985), nous pouvons citer Peter Moersk 1974, Olympic Alliance 1975, Boehlen et Olympic Bravery 1976, Ekofish 1977, Amoco Cadiz 1978, Gino et Ixtoc 1979, Tanio 1980, Golfe Persique 1983 et récemment en Alaska en 1991. Le potentiel d'autoépuration du milieu marin dépend de l'importance du

déversement, la nature du pétrole, les caractéristiques géomorphologiques et sédimentaires du site, la présence de microflore adaptée et les facteurs physicochimiques tel que la température, la teneur en nutriments et en oxygène dissous (Bodennec *et al.*, 1987 ; Haines et Atlas, 1983).

La fraction volatile est éliminée par évaporation. Cependant, la biodégradation est le processus majeur d'élimination des hydrocarbures dans la nature. Les bactéries sont les acteurs prédominants de cette dégradation dans le milieu marin et les champignons dans l'eau douce et l'écosystème terrestre. La dispersion et l'émulsification de la nappe de pétrole est une étape indispensable pour permettre sa biodégradation. La production de biosurfactants par les microorganismes facilitent beaucoup la formation de l'émulsion huile dans l'eau. Les bactéries et champignons isolés à partir de ces milieux contaminés ont généralement une grande activité d'émulsification (Broderick et Cooney, 1982). En outre, une variété de dispersants artificiels est développée mais leur application est controversée en raison des effets toxiques qu'ils peuvent induire vis-à-vis de faune et la flore marines (Foght et Westlake, 1982 ; Mulkins-Phillips et Stewart, 1974). Ainsi, ils peuvent soit favoriser la biodégradation (Robichaux et Myrick, 1972), soit, au contraire l'inhiber.

Les hydrocarbures aliphatiques et les composés aromatiques à faible poids moléculaire sont généralement dégradés contrairement aux aromatiques à poids moléculaire élevé, les résines (pyridines, quinolines, sulfoxydes) et les asphaltènes (phénols, cétones, esters, porphyrines) qui s'avèrent récalcitrants (Leahy et Colwell, 1990). Dans le sol, l'adsorption des hydrocarbures sur les particules de matière peut réduire leur toxicité envers les microorganismes. Mais cependant, l'adsorption et l'absorption conduisent aussi à la formation de complexes persistants.

3. Matériels et méthodes :

3.1. Screening et sélection des microorganismes :

3.1.1. Origine du consortium microbien :

Deux écosystèmes différents ont été ciblés dans le but d'isoler une biomasse microbienne diversifiée qui est destinée à la biodégradation du fluazifop-*p*-butyl.

Le premier échantillon a été prélevé à partir d'un sol à caractère agricole situé dans la zone de Ben-Mhidi (est Algérien). Ce sol est destiné aux cultures de vignobles. Celles-ci ont été longuement traitées, ces dernières années, par le fluazifop-*p*-butyl. Le deuxième échantillon, a été récolté dans les bassins de traitement biologique d'eaux usées (STEP) de Zerizer situés dans la région de Ben-Mhidi.

Le choix de ces deux différents écosystèmes se trouve être justifié. En effet, les boues activées, contenues dans les échantillons d'eau usées, renferment une grande diversité de micro-organismes qui sont potentiellement aptes à dégrader une large diversité de polluants d'où le fluazifop-*p*-butyl. Par ailleurs, un sol, longuement et périodiquement en contact avec le même xénobiotique, a plus de chance, de renfermer dans sa communauté microbienne, une multitude de microorganismes préalablement adaptés et acclimatés au herbicide utilisé dans cette présente recherche.

Les échantillons d'eaux usées ont été prélevés dans des flacons en verre de 250 ml à raison de 200 ml d'eau par échantillon. Ceux du sol, ont été prélevés dans des sacs en plastique à raison de 200 gramme par échantillon. Les prélèvements ont été immédiatement transportés au laboratoire sans aucune mesure particulière.

Pour une première mise en contact avec le xénobiotique, chaque prélèvement à été inoculé à 50 ml de milieu MBS stérile contenu dans des erlenmeyers de 250 ml, à raison de 20 ml pour les eaux usées et de 10 grammes pou le sol. Les erlenmeyers ont été incubés sur un agitateur de type « ping-pong » pendant une semaine à 30°C avec une agitation avoisinant les 200 rpm.

A l'issus de cette première mise en contact, chaque biomasse provenant des deux prélèvements (eau et sol) a été récupérée par centrifugation puis un mélange des deux

biomasses a été réalisé aléatoirement avant son inoculation de nouveau à du milieu MBS neuf. Cette biomasse combinée va servir pour la suite de notre recherche comme inoculum microbien unique destiné à l'acclimatation du consortium microbien ainsi qu'à la biodégradation du fluazifop-*p*-butyl.

3.1.2. Le Fluazifop-*p*-butyl :

L'herbicide utilisé dans notre travail est le fluazifop-*p*-butyl : c'est un herbicide sélectif de post-levée de la famille des aryloxyphénoxypropionates (mobiles dans le phloème), qui sont des inhibiteurs de l'acétyl coenzyme A. Il est utilisé dans la lutte contre les graminées annuelles et vivaces dans la culture de la betterave à sucre, légumineuse, l'artichaut, chou, épinard et les arboricultures fruitières (Cluzeau, 1996).

Fluazifop-*p*-butyl est un herbicide fabriqué par la firme Syngenta (Suisse), importé et commercialisé en Algérie. Il est disponible dans des bouteilles de 1 litre sous forme de solution émulsive concentré contenant le fluazifop-*p*-butyl à raison de 150 g/litre. Son nom commercial est le Fusilade super est un herbicide systémique rapidement absorbé et permettant un contrôle constant des graminées.

C'est un herbicide très toxique appartenant à la classe C [la classe la plus toxique], son poids moléculaire [383.4]. La matière active est le fluazifop-*p*-butyl, qui est absorbé par le feuillage des graminées adventives et une moindre proportion par leur système racinaire. Après pénétration, la matière active se transforme très vite en fluazifop acide qui migre rapidement avec les courants de sève ascendante et descendante pour exercer son action sur les zones en croissance des graminées (Méristèmes).

- Formule brute : $C_{19}H_{20}F_3NO_4$
- Formule chimique : (2R)-2-[4[-5(trifluorméthyl) 2 pyridinyl] oxy] phénoxy] propanoic acid.

3.2. Le milieu de culture biphasique :

Le milieu de culture biphasique est constitué de deux phases liquides non miscibles :

3.2.1. Milieu de base salin MBS (phase aqueuse) :

Il s'agit d'un milieu à base de sels minéraux «MBS», est utilisé en tant que milieu de base, siège de la biodégradation, se compose de : 10 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 1.75 g KH_2PO_4 ; 4 g K_2HPO_4 ; 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.15 g CaCl_2 , 1 g NaCl ; 5 mg FeCl_3 ; 1 mg $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1 mg CuSO_4 ; 1 mg Na_2MoO_4 ; 1 mg ZnCl_2 (El Aalam *et al.*, 1993). Le pH du milieu est ajusté à 7,0. Le milieu de culture doit être stérilisé, avant utilisation, à 121°C pendant 15 minutes.

Le milieu MBS utilisé dans cette présente étude pour la sélection et l'acclimatation d'un consortium microbien en présence du fluazifop-*p*-butyl comme unique source de carbone et d'énergie au sein d'un système biphasique.

Le MBS sera aussi employé sous sa forme solide (20 g/litre d'agar) complété du fluazifop-*p*-butyl pour l'isolement et la purification des souches sélectionnées. Ce dernier est directement introduit dans la boîte de pétri à la concentration choisie avant gélification.

3.2.2. Huile de silicone (phase organique) :

L'emploi d'une phase organique (tampon) dans cette présente recherche présente un double objectif. D'une part, elle permet d'améliorer la solubilité du fluazifop-*p*-butyl «très peu soluble dans l'eau» pour une meilleure diffusion du produit dans la phase aqueuse. D'autre part, elle permet de diminuer la nature inhibitrice du xénobiotique en abaissant sensiblement sa concentration dans la phase aqueuse.

La phase organique utilisée dans le cadre de cette recherche, constituée d'huile de silicone Rhodorsil 47V20 (méthyl polysiloxane) dont les caractéristiques sont rapportées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Propriétés physiques de l'huile de silicone 47 V 20 (El Aalam *et al.*, 1993).

Propriété	Huile Rhodorsil 47 V 20
Viscosité à 25°C, mm²/s	20
Aspect	Liquide limpide incolore
Densité à 25°C	0.950
Point éclair, °C	230
Point d'ébullition	>300
Point de congélation, °C	-60
Indice de réfraction à 25°C	1.4
Tension superficielle à 25°C, mN/m	20.6
Tension de vapeur à 200°C, mbar	1,33.10⁻²
Conductibilité thermique, W/m.k	0.14
Constante diélectrique à 25°C, 0-100kHz	2.7

Dans la littérature, l'huile de silicone est toutefois davantage utilisée dans les réacteurs biphasiques agités (phase organique/ phase aqueuse).

Dans un travail antérieur, cette huile a été sélectionnée parmi plusieurs solvants organiques (Pristane, Isopar L, Isopar V, Hydrocarbure perfluoré et l'huile de silicone 47 V 20) (Penaud, 1989). Parmi ceux-ci, seule l'huile de silicone 47 V 20 a présenté les caractéristiques recherchées chez une phase organique, à savoir :

- Peu coûteuse et ses propriétés physicochimiques.
- Son caractère inerte (absence de toxicité et absence de biodégradabilité) vis-à-vis des microorganismes est une des principales raisons de son choix (El Aalam *et al.*, 1993 ; Gardin *et al.*, 1999).
- Préconisent l'huile de silicone comme le solvant le mieux biocompatible (Arriaga *et al.*, 2006).

- Non miscible en phase aqueuse (insolubilité dans l'eau) (Collins et Daugulis, 1997).
- Faible volatilité.
- Agit comme un réservoir protégeant ainsi les microorganismes vis-à-vis de la toxicité du xénobiotique (Ghautier *et al.*, 2003 ; Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993 ; Gardin *et al.*, 1999 ; Prokop *et al.*, 1971).

D'autre part, l'huile de silicone permet une absorption élevée de l'oxygène et des xénobiotiques hydrophobes, augmentant ainsi le potentiel de transfert (Dumont *et al.*, 2006).

3.3. Sélection et acclimatation du consortium microbien en système biphasique (MBS/huile de silicone) :

L'acclimatation ainsi que la sélection du consortium microbien apte à biodégrader le fluazifop-*p*-butyl comme unique source de carbone et d'énergie a été réalisée en système biphasique MBS/huile de silicone (culture discontinue). Le milieu de culture biphasique est composé de deux phases liquides non miscibles contenues dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml. Ainsi, 40 ml de milieu minéral MBS (phase aqueuse) sont additionnés de 10 ml d'huile de silicone (phase organique). Le fluazifop-*p*-butyl «substrat», seule source de carbone et d'énergie, est ajouté dans la phase organique à raison de 30 µg/ml. La phase aqueuse est, quant à elle, inoculée avec 10 ml de l'inoculum microbien (biomasse) préalablement préparé. Les erlenmeyers, hermétiquement scellés à l'aide de bouchons en silicone voir figure 5, sont incubés à 30°C et agités à 190 rpm sur un agitateur de type « ping-pong » pendant une semaine. A l'issue de ces premières fermentations, les cultures sont arrêtées, puis centrifugées à 5000 rpm pendant 20 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type NUVE NF 615 (France). Les culots obtenus sont lavés avec une quantité minimale de tampon phosphate (pH 7), puis recentrifugés une seconde fois à 5000 rpm. La biomasse ainsi recueillie est mise en suspension dans du tampon phosphate et servira d'inoculum pour les prochaines fermentations qui seront menées dans les mêmes conditions de culture.



Figure 5 : Batch réalisé en système biphasique (MBS/huile de silicone).

3.4. Les méthodes analytiques :

Au cours de la période d'acclimatation et d'adaptation du consortium microbien en présence de l'herbicide, présent dans le milieu comme unique source de carbone et d'énergie, les fermentations sont suivies régulièrement par des mesures de densités optiques des cultures, mesures du pH du milieu de croissance et également par la détermination des poids sec des cultures. En outre, des testes de viabilité sont réalisés afin de s'affranchir de la viabilité des microorganismes.

3.4.1. Mesure de la densité optique (DO) :

La densité optique est un paramètre qui permet de suivre la croissance de la biomasse présente dans le milieu liquide. La mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm est effectuée par le biais d'un spectrophotomètre modèle « SECOMAM-ONCIFV 10.2 ».

3.4.2. Mesure du pH :

La variation du pH du milieu de culture est un indicateur de la croissance de la biomasse microbienne. La détermination de ce paramètre est réalisée par le biais d'un pH mètre modèle « HANNA instruments ».

3.4.3. Mesure du poids sec (PS) :

L'évolution de la biomasse au cours de la fermentation en système monophasique est également suivie par la mesure du poids sec de la culture microbienne. Ainsi, 5 ml de la culture sont centrifugés à 5000 rpm pendant 20 minutes à l'aide d'une centrifugeuse modèle NUVE NF 615. Les culots obtenus sont suspendus dans 5 ml d'eau distillée stérile et centrifugés une seconde fois à 5000 rpm. Après un deuxième lavage à l'eau distillée stérile, les culots sont repris encore une fois dans 5 ml d'eau distillée stérile qui seront placés dans des coupelles préalablement tarées. Après une première pesée des coupelles, celles-ci sont déposées dans une étuve à 110°C. Après une nuit de séchage, les coupelles sont retirées et pesées une seconde fois. La différence de poids obtenue entre les poids d'avant et après séchage constitue le poids de la biomasse microbienne contenue dans l'échantillon de culture.

3.4.4. Mesure de l'activité émulsifiante :

L'activité émulsifiante a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm au cours de la croissance de la culture du consortium en système biphasique phase aqueuse/Fluazifop-*p*-butyl comme source de carbone et d'énergie selon la méthode décrite par (Ryu *et al.*, 1995).

2 ml de la culture sont centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse NUVE NF 615 à 5000 rpm pendant 15 minutes. On prélève 1 ml du surnageant auquel on ajoute 2% de Fluazifop-*p*-butyl (20 microlitres). Le mélange est fortement agité pendant plusieurs secondes jusqu'à l'obtention d'une parfaite émulsion de la phase organique. La densité optique (DO) est lue à 630 nm à T_0 (juste après l'agitation) et à $T_{10 \text{ minutes}}$. C'est cette dernière valeur qui est prise en considération pour le suivi de l'activité émulsifiante durant la fermentation.

3.4.5. Mesure de l'adhérence des cellules :

L'adhérence des cellules microbiennes au substrat (fluazifop-*p*-butyl) est mesurée selon le protocole **BATH** (bacterial adherence to hydrocarbon) développé par (Rosenberg, 1984). Une quantité minimale de la culture microbienne est prélevée et centrifugée une première fois à l'aide d'une centrifugeuse NUVE NF 615 à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le culot obtenu est lavé avec du tampon phosphate (0.1 M), puis centrifugé une seconde fois. Il est remis en suspension dans du tampon phosphate et la DO est déterminée à 600 nm (**DO₁**). On ajoute 0.2

ml du substrat (fluazifop-*p*-butyl) à 1 ml de la suspension microbienne. Le mélange est agité au vortex pendant 1 minute. Après 15 minutes de repos, la phase aqueuse est récupérée et la DO est déterminée de nouveau (**DO₂**). Le pourcentage d'adhérence des cellules est donné par la formule suivante :

$$1 - (DO_1/DO_2)$$

3.5. Les essais de dégradation du fluazifop-*p*-butyl en cultures batch :

3.5.1. La biodégradation du fluazifop-*p*-butyl en batch biphasique :

Après plusieurs semaines d'acclimatation du consortium microbien en présence du xénobiotique, la biodégradation du fluazifop-*p*-butyl est suivie, dans un premier temps, en système biphasique (MBS/huile de silicone). Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant un milieu de culture composé de 80% de milieu minéral MBS (40 ml) et de 20% d'huile de silicone (10 ml).

Les erlenmeyers ont été inoculés avec 10 ml d'un inoculum constitué du consortium préalablement acclimaté au fluazifop-*p*-butyl. Ce dernier a été ajouté au milieu à la concentration de 30 µg/ml. Les erlenmeyers, hermétiquement scellés, sont incubés pendant une semaine à 30°C sous une agitation avoisinant les 200 rpm obtenue à l'aide d'un agitateur de type « ping-pong ». L'évolution de la culture a été suivie par mesure de la densité optique (DO) et par la mesure du pH.

Après une semaine d'incubation, la biomasse est récupérée par centrifugation, et les phases liquides (MBS et huile de silicone) sont remplacées par du milieu neuf pour un nouveau batch.

3.5.2. La biodégradation du fluazifop-*p*-butyl en batch monophasique:

La dégradation du fluazifop-*p*-butyl par le consortium préalablement acclimaté et sélectionné pendant une période de deux mois en batch biphasique, a également été suivie en absence de

la phase organique (huile de silicone). Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant uniquement le milieu minéral MBS (50 ml).

Les erlenmeyers ont été inoculés avec 10 ml d'un inoculum constitué du consortium préalablement acclimaté au fluazifop-*p*-butyl. Ce dernier a été ajouté au milieu à la concentration de 30 µg/ml. Les erlenmeyers, hermétiquement scellés, sont incubés pendant une semaine à 30°C sous une agitation avoisinant les 200 rpm obtenue à l'aide d'un agitateur de type « ping-pong ». L'évolution de la culture a été suivie par mesure de la densité optique (DO) et par la mesure du pH.

La fermentation est suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm, et l'évolution du pH. Des testes de viabilités sont effectués régulièrement, par ensemencement sur de la gélose nutritive, afin de s'affranchir de la viabilité des microorganismes.

3.5.3. La biodégradation du fluazifop-*p*-butyl en culture pure :

Des essais de biodégradation du fluazifop-*p*-butyl en cultures pures ont été réalisés en système monophasique. Les fermentations ont été menées dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml contenant 50 ml de milieu minéral MBS. Le milieu minéral a été inoculé avec de la biomasse prélevée à partir de cultures réalisées sur milieu MBS solide et incubées pendant plusieurs semaines (1 mois environ). Le fluazifop-*p*-butyl a été ajouté au milieu à une concentration de 30 µg/ml.

Les fermentations ont été suivies par la mesure de la densité optique à 600 nm, la mesure du poids sec de la culture, l'évolution du pH et également par le dosage du fluazifop-*p*-butyl dans la phase aqueuse. Le suivi de l'élimination du substrat dans le milieu de culture a été réalisé à l'aide de la technique LC-MS-MS (alternativement HPLC-MS). Le dosage a été rendu possible grâce à l'aimable collaboration du professeur **Patrick Di-Martino** de l'université Cergy-Pontoise (France).

3.6. Isolement et identification du consortium sélectionné :

A l'issue d'une année d'acclimatation et de sélection du consortium microbien en présence du fluazifop-*p*-butyl, des tentatives d'isolements, de purifications et d'identifications des microorganismes composant la biomasse acclimatée ont ainsi été effectuées.

3.6.1. Isolements sur milieu MBS solide :

Les isolements ont été effectués, dans un premier temps, sur milieu MBS solide coulé en boîte de pétri. Ainsi, 10 µl du fluazifop-*p*-butyl sont soigneusement incorporés, comme unique source de carbone et d'énergie, dans le milieu gélosé juste avant son refroidissement. 1 ml de l'inoculum prélevé à partir de la culture microbienne est aseptiquement étalé sur la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite mises en incubation à 30°C pendant 3 à 4 semaines.

3.6.2. Purification sur gélose nutritive :

A l'issue de 4 semaines d'incubation en présence du xénobiotique sur milieu MBS solide, les colonies obtenues sont soigneusement prélevées et individuellement repiquées sur de la gélose nutritive coulée en boîtes de pétri. Après incubation à 30°C pendant 24 h, des examens macroscopiques sont réalisés et la pureté des colonies obtenues est contrôlée à l'aide d'examens microscopiques après coloration de Gram.

3.6.3. Identification :

L'identification préliminaire des souches isolées sur milieu MBS solide a été réalisée, en plus des examens macroscopiques et microscopiques, par la mise en évidence des enzymes : oxydase et catalase. La mobilité cellulaire a également été testée. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, une colonie isolée est prélevée et soigneusement ensemencée par simple pique centrale dans le milieu mannitol mobilité. Après 24 h d'incubation à 30°C, l'apparition d'un voile autour de la pique central indique la présence d'une mobilité. La dégradation du mannitol est mise en évidence par virage de la couleur du milieu (du rouge au jaune).

L'identification des espèces bactériennes à l'aide des galeries biochimiques **API 20 E** et **API 20 NE** (Bio Mérieux, France), a également été réalisée après purification des différentes colonies bactériennes obtenues sur gélose nutritive.

4. Résultats et discussion :

4.1. Acclimatation du consortium microbien en culture batch :

La sélection d'un consortium microbien en présence du fluazifop-*p*-butyl comme seule et unique source de carbone et d'énergie a été réalisée en culture batch (culture discontinue). En raison de la faible solubilité du fluazifop-*p*-butyl dans l'eau (1 mg/l) et de sa toxicité vis-à-vis des microorganismes, un milieu de culture biphasique a donc été utilisé au cours de l'acclimatation du consortium microbien en présence du xénobiotique. Le milieu de culture est constitué de deux phases liquides non miscibles : l'huile de silicone et le milieu MBS (20 : 80 V/V). Dans ce système, le fluazifop-*p*-butyl est ajouté dans la phase organique à la concentration initiale de 30 µg/ml. Ainsi, la concentration du xénobiotique dans la phase aqueuse est maintenue très faible tout au long de la fermentation (batch). Ce système a donc pour rôle d'éviter l'inhibition de la croissance microbienne par excès de substrat.

A l'issus de 4 semaines d'acclimatation du consortium en présence du fluazifop-*p*-butyl, les résultats obtenus suite aux différents batch réalisés en système biphasique (MBS/huile de silicone) sont représentés par la figure 6.

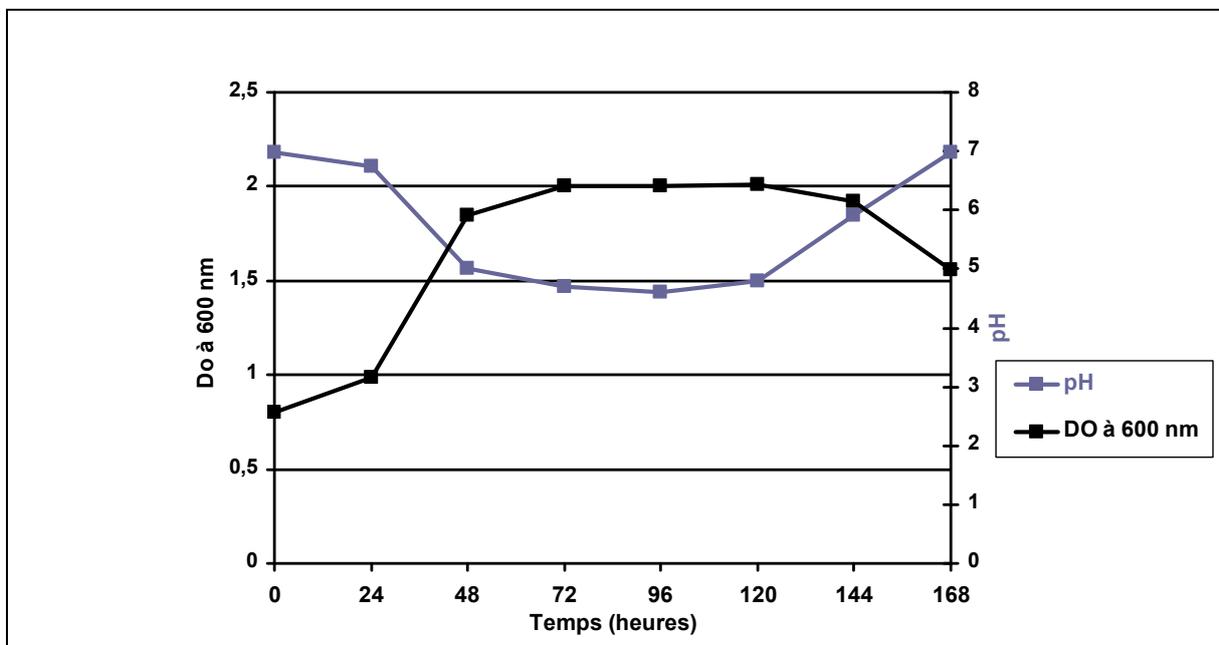


Figure 6 : Croissance du consortium microbien en système biphasique (MBS/huile de silicone) en présence du fluazifop-*p*-butyl (30 µg/ml).

L'allure des courbes obtenues, a permis de mettre en évidence quatre phases de croissance assez distinctes. La première phase révèle, sur la base des densités optiques mesurées, une sensible augmentation de la biomasse microbienne après 24 h de croissance en présence du xénobiotique. Au cours de cette phase de croissance, le consortium microbien semble s'être, apparemment, adapté au fluazifop-*p*-butyl, en absence de tout effet inhibiteur visible de ce dernier, et a donc pu l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie. L'absence, remarquée, d'une phase de latence au niveau de la courbe de croissance semble justifier le comportement assez intéressant du consortium. Au-delà des premières 24 h, l'allure de la courbe révèle une accélération assez nette et un dédoublement de la croissance du consortium jusqu'à atteindre un maximum de DO au bout de 72 h d'incubation seulement. Cette seconde phase, qui est une preuve supplémentaire du phénomène d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de croissance, correspond en réalité à la phase exponentielle de croissance proprement dite durant laquelle il y a diminution de la quantité de substrat disponible pour les microorganismes dans le milieu de culture.

Une troisième phase de croissance est amorcée dès la 72^{ème} heure et s'étend jusqu'à la 120^{ème} heure d'incubation de la culture. Il s'agit de la phase stationnaire de croissance qui révèle un ralentissement assez marqué de la croissance cellulaire en raison d'une quasi-disparition du substrat dans la phase aqueuse du milieu en plus de l'accumulation des produits de dégradation.

Par ailleurs, le suivi de la variation du pH a révélé une acidification progressive du milieu de culture. Cette nette diminution du pH, qui semble s'étendre jusqu'à la 96^{ème} heure d'incubation, est sans aucun doute liée à l'activité cellulaire présente dans le milieu de culture. Ce comportement de la culture semble être similaire à celui observé par Gillian *et al.*, (2001). En effet, les auteurs ont mentionné un changement du pH du milieu durant le processus de biodégradation des herbicides par certains microorganismes.

Dès la 120^{ème} heure d'incubation, une chute de la densité optique est amorcée. Cette quatrième phase de croissance correspond à la phase de déclin cellulaire. Elle correspond à une décroissance cellulaire consécutive au phénomène de lyse entraînant une libération des protéines dans le milieu. La présence de ces composés azotés justifie, probablement, l'augmentation du pH de la culture.

Les résultats obtenus à l'issue des tests d'acclimatation du consortium microbien, révèlent l'absence d'effet toxique encore moins inhibiteur du fluazifop-*p*-butyl. Bien au contraire, il semble que le consortium microbien a pu se développer en présence du xénobiotique additionné au milieu de culture comme seule et unique source de carbone et d'énergie. Cela semble confirmer une fois encore la forte adaptation et la très grande acclimatation des souches microbiennes à celui-ci.

Il est important de préciser que nous avons mené la sélection des souches en présence de la phase organique qui a sans aucun doute permis non seulement d'accélérer la période d'acclimatation de la biomasse microbienne mais également d'atténuer l'effet inhibiteur du xénobiotique sur la croissance souvent constaté en début de période d'acclimatation. Ces observations ont été faites par Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) et Gardin *et al.*, (1999) ; El Aalam *et al.*, (1993) suite à leurs travaux sur la biodégradation des composés xénobiotiques, en système biphasique (milieu minéral/l'huile de silicone).

Plusieurs études ont montré que la présence d'une phase organique améliore les performances des fermentations faisant intervenir des réactions pour lesquelles les substrats ou les produits sont soit toxiques, soit insolubles dans l'eau (Furuhashi *et al.*, 1986 ; Lee et Chang, 1989 ; Lebeault, 1990).

Afin de s'acquiescer de la viabilité des microorganismes mis en présence avec le xénobiotique, des tests de viabilité cellulaire ont donc été réalisés, régulièrement, par simple étalement d'une öse, prélevée dans la culture, sur la surface d'une gélose nutritive. Au bout de 24h d'incubation seulement, une croissance microbienne a été régulièrement révélée à la surface de la gélose, ce qui témoigne d'une réelle viabilité des microorganismes figure 7.

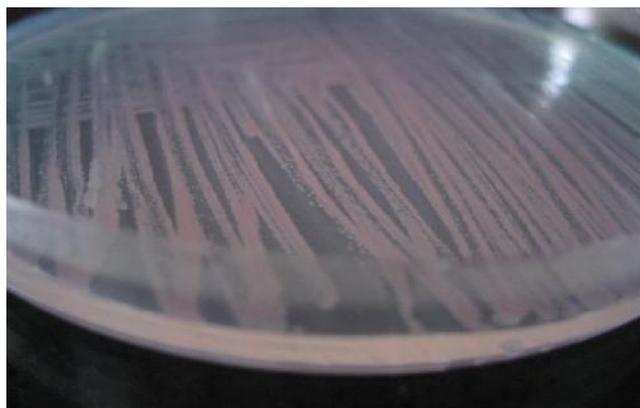


Figure 7 : Croissance du consortium sur la surface de la gélose nutritive (GN) après 24 h d'incubation à 30°C.

4.2. Etude des performances du système biphasique (MBS/huile de silicone) :

Après environ cinq mois (20 semaines) de sélection et d'acclimatation du consortium incriminé dans la biodégradation du fluazifop-*p*-butyl en système biphasique, l'étude de la biodégradation du xénobiotique en batch monophasique (MBS seul), cette fois-ci, a également été étudiée. L'intérêt de cette étude comparative entre les deux systèmes vise à déterminer l'utilité ainsi que l'efficacité de la phase organique (huile de silicone) non seulement dans le processus de dégradation mais également à l'égard de la viabilité du consortium impliqué dans le processus. Dans le cas du système biphasique, le substrat est ajouté dans la phase organique à raison de 30 µg/ml comme décrit précédemment. Alors que dans le système monophasique, le fluazifop-*p*-butyl est ajouté, comme seule source de carbone et d'énergie, à la même concentration directement dans le milieu MBS. Les fermentations ont été conduites à 30°C avec une vitesse d'agitation de 190 rpm. La croissance des cultures a été suivie par mesure de la DO à 600 nm. La variation du pH du milieu a été mesurée régulièrement au cours de l'incubation.

Les résultats des différents essais de biodégradation menés en système monophasique sont illustrés par la figure 8. L'allure de la courbe de croissance révèle nettement l'absence totale d'effet inhibiteur du fluazifop-*p*-butyl sur la croissance du consortium microbien

préalablement acclimaté. En effet, une croissance typique est ainsi obtenue avec une augmentation de la DO de la culture et une acidification du milieu (diminution du pH).

Le maximum de croissance est obtenu après 144 h d'incubation (06 jours) à 30°C. Le consortium microbien préalablement acclimaté est visiblement capable de croître en présence du fluazifop-*p*-butyl comme seule source de carbone et d'énergie en système monophasique. Celui-ci semble s'être adapté pour dégrader et résister à de fortes concentrations le fluazifop-*p*-butyl même en absence de l'huile de silicone. Ce phénomène observé témoigne une fois de plus d'une forte adaptation et d'une très grande acclimatation des souches microbiennes au xénobiotique.

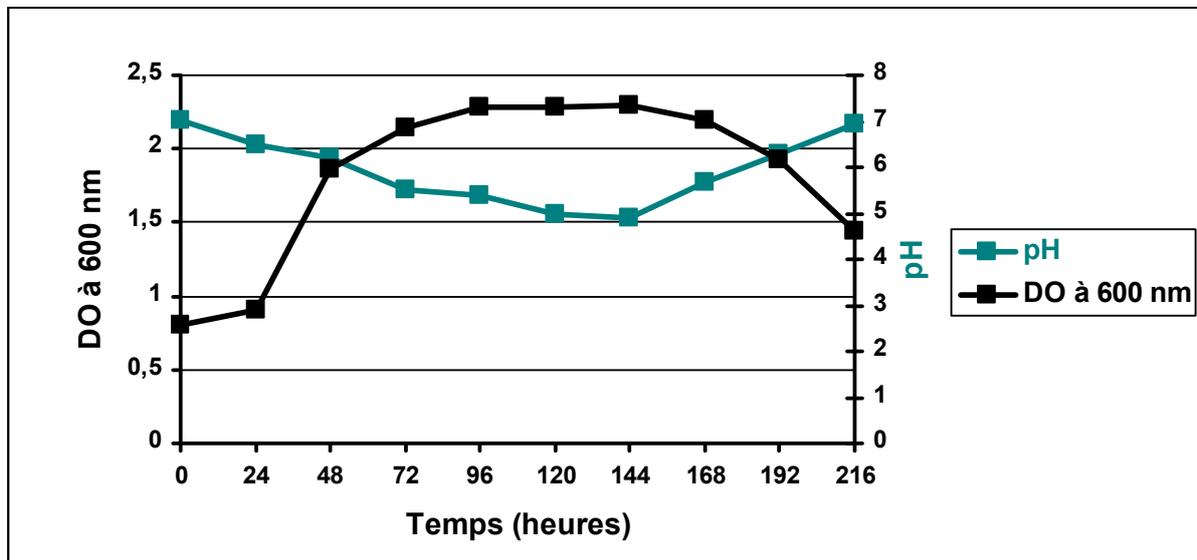


Figure 8 : Croissance du consortium microbien acclimaté en système monophasique et en présence de 30 µg/ml du fluazifop-*p*-butyl.

Par ailleurs, et dans un but de comparaison des deux systèmes de culture soulignée plus haut, l'intérêt de l'apport de la phase tampon (huile de silicone) dans le processus de biodégradation du fluazifop-*p*-butyl est révélé par les figures 9 et 10. En effet, la comparaison des allures des courbes obtenues en système monophasique et en système biphasique montre, clairement, que ce dernier semble atténuer visiblement l'effet inhibiteur du produit sur la croissance du consortium microbien portant longuement acclimaté au xénobiotique. Ces

observations ont été souvent rapportées par plusieurs auteurs au cours des travaux de biodégradation menés en présence d'une phase tampon dans le milieu.

Bien que la même concentration du substrat (30 µg/ml) ait été ajoutée, celle-ci ne semble pas avoir le même effet sur l'activité microbienne. En absence de l'huile de silicone la densité optique du milieu a atteint, en moyenne, un maximum de DO estimé à 2,30, alors qu'en présence de l'huile de silicone, elle a été estimée à 2,74 (figure 9). Ces observations ont également été constatées pour les variations du pH (figure 10).

Cette comparaison entre les deux systèmes a ainsi permis de mettre en évidence, l'intérêt réel de l'huile de silicone, notamment dans le transfert du substrat vers le milieu aqueux (MBS). En réalité, le fluazifop-*p*-butyl se retrouve dans la phase organique en état de stock et est libéré graduellement dans le milieu minéral où il sera dégradé par la microflore. Sa concentration se retrouve donc diminuée dans la phase aqueuse. Ce mode de transfert, à pour but d'empêcher tout phénomène de toxicité du substrat pouvant entraver une dégradation optimale et dans de bonnes conditions de culture de ce dernier. Au contraire, dans le cas du système monophasique, l'effet tampon ou inhibiteur de l'huile est levé. Les microorganismes, même s'ils sont adaptés au xénobiotique, semblent ne pas pouvoir utiliser, en raison de sa toxicité, le substrat d'une manière optimale particulièrement lorsque ce dernier est ajouté directement dans le milieu à de fortes concentrations (limite de solubilité). La faible activité métabolique exhibée, en milieu monophasique, par le consortium se trouve apparemment justifiée lorsque l'huile de silicone n'est pas présente dans le milieu de culture.

Des observations similaires ont été souvent rapportées par plusieurs auteurs au cours des travaux de biodégradation menés en présence d'une phase tampon dans le milieu. Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) ont montré, que les souches bactériennes sélectionnées dans un mélange de composés chlorés et non chlorés, exhibent une grande activité dans le système biphasique comparée à celle obtenu en système monophasique.

L'efficacité des systèmes biphasiques a été révélée au cours de la biodégradation du toluène (Daugulis et Boudreau, 2003), du benzène (Yeom et Daugulis, 2001), du phénanthrène (Muñoz *et al.*, 2005), du xylène, de l'acétate de butyle (Gardin *et al.*, 1999), du pyrène (Mahanty *et al.*, 2008) et également du styrène (Djeribi *et al.*, 2005 ; El Aalam *et al.*, 1993).

En règle générale, le processus de dégradation dans la phase aqueuse est souvent faible en raison de la faible solubilité du substrat. Toutefois, le taux de dégradation peut augmenter après adhésion des microorganismes à la surface d'une phase organique (Zaidi *et al.*, 1988 ; Kilpi *et al.*, 1988 ; Slater et Bull ; 1982). L'intérêt de la présence d'une phase organique a également été soulevé par Penaud (1989) au cours des travaux menés sur la biodégradation du styrène.

En effet, l'avantage du milieu biphasique vient du fait que l'huile de silicone n'est ni biodégradable, ni toxique pour les microorganismes (Gardin *et al.*, 1999; Bar et Grainer, 1987; Penaud, 1989; El Aalam *et al.*, 1993 ; Collins et Daugulis, 1997; Arriaga *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006 ; Fazaelpoor et Shojaosadati, 2004 ; fazaelpoor *et al.*, 2006). Le fluazifop-*p*-butyl représente donc la seule source de carbone et d'énergie pour la culture du consortium.

Labrecque (2003), lors des travaux sur la dégradation du xylène par *Saccharomyces cerevisiae* a trouvé que le taux de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est maintenu dans le système biphasique malgré une concentration élevée de xylène. Alors que dans le système monophasique la viabilité des levures diminue après seulement quatre jours.

Malgré l'absence d'huile de silicone en système monophasique, une nette croissance du consortium a quand même eu lieu. Celui-ci semble s'être adapté au fluazifop-*p*-butyl en absence de phase organique dans le milieu. Des observations similaires ont été rapportées par Miguel *et al.*, (1995). Les auteurs ont sélectionné des souches de *Pseudomonas sp.* sur milieu biphasique ainsi qu'en milieu monophasique. Les résultats indiquent que le système biphasique a permis une meilleure conservation du consortium comparativement au système monophasique.

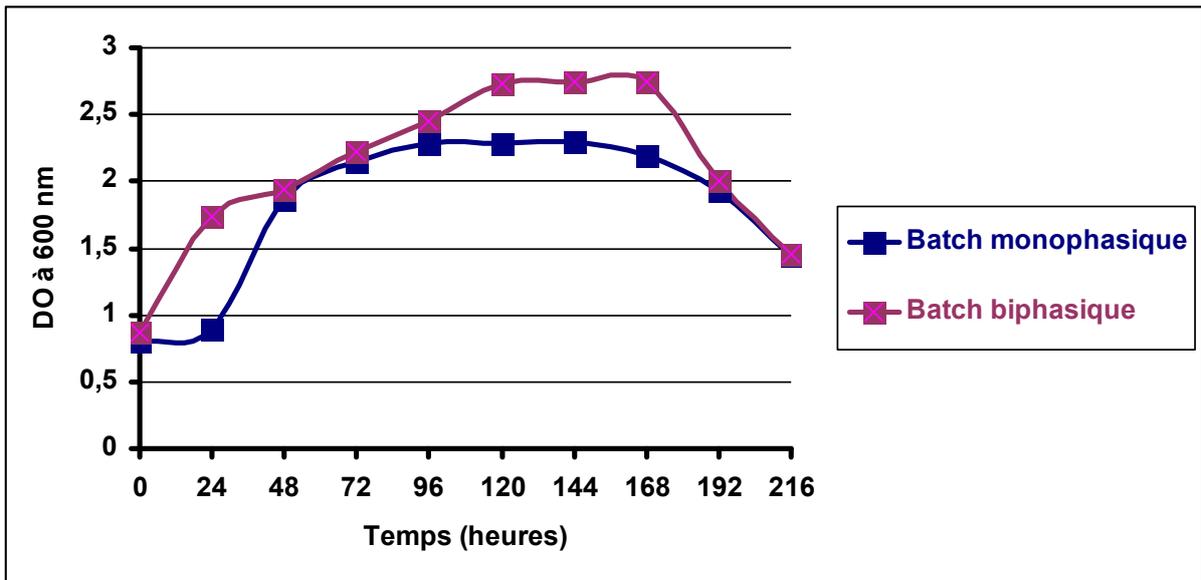


Figure 9 : Evolution de la croissance du consortium microbien en système monophasique et en système biphasique.

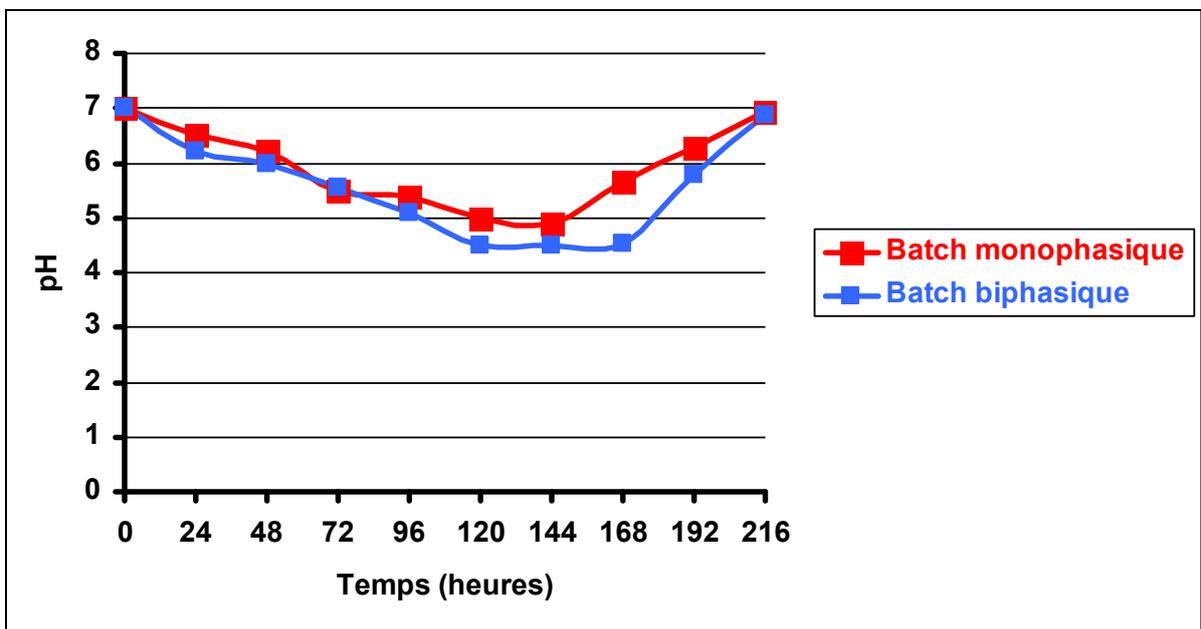


Figure 10 : Evolution du pH du milieu lors de la croissance du consortium microbien en système monophasique et en système biphasique.

4.3. Etude de l'hydrophobicité du consortium microbien :

La mesure de l'hydrophobicité du consortium microbien réalisée selon le protocole **BATH** (bactériale adherence to hydrocarbon) (Rosenberg, 1984), a révélé que le consortium microbien acclimaté au fluazifop-*p*-butyl exhibe une affinité non négligeable vis-à-vis du xénobiotique. En effet un pourcentage d'hydrophobicité de plus de **55,67%** a été obtenu chez les cellules microbiennes ce qui révèle un fort pouvoir d'adhérence de celles-ci au produit dissous dans le milieu. L'hydrophobicité élevée de ces souches microbiennes leur permet aussi d'exhiber une forte adhérence vis-à-vis de l'huile de silicone (hydrophobe) et permet une meilleure sélection. Ascon-Cabrera et Lebeault (1993), suite à leurs travaux sur la biodégradation d'un mélange de composés xénobiotiques chlorés et non chlorés par des souches bactériennes au sein d'un système biphasique, ont montré que lors de la dégradation de l'éthyle butyrate par *Trichosporon sp.*, **45%** de la biomasse reste fixée à l'interface et **55 %** se trouve dans la phase aqueuse. Ils ont déduit que le métabolisme de l'éthyle butyrate a eu lieu dans la phase aqueuse et au niveau de l'interface des gouttelettes d'huile. Miguel *et al.*, (2005) ont prouvé que l'augmentation globale de l'hydrophobicité de la biomasse est un facteur clé orientant vers une meilleure sélection de micro-organismes compétents au cours de leurs travaux sur la dégradation du 2,4,6- trichlorophénol par une culture mixte en système biphasique.

4.4. Détermination de l'activité émulsifiante du consortium dégradant le fluazifop-*p*-butyl :

Après dix mois d'acclimatation en présence du xénobiotique, l'étude de l'activité émulsifiante du consortium a été menée dans le but de rechercher une éventuelle production de biosurfactants par le consortium sélectionné. L'activité émulsifiante de la culture a été menée au cours de la croissance du consortium en système biphasique selon la méthode décrite par (Ray *et al.*, 1995). Les fermentations ont été conduites sous agitation à 30°C. L'activité émulsifiante ainsi que la croissance cellulaire ont donc été suivies parallèlement par mesure de la DO respectivement à 630 nm et à 600 nm.

Les résultats ainsi obtenus sont illustrés par la figure 11. Il apparaît selon l'allure de la courbe relative à l'activité émulsifiante que celle-ci évolue de façon régulière et parallèle à la croissance cellulaire pour atteindre un maximum de production au bout de 144 h d'incubation. En plus, l'observation de la figure 12 révèle, en effet et de manière visuelle, un fort pouvoir

émulsifiant exhibé par la culture microbienne en présence du xénobiotique. Ainsi, après une longue période d'acclimatation, il semble que le consortium possède désormais une grande affinité au fluazifop-*p*-butyl, témoignant, une fois de plus, de sa capacité à émulsifier le xénobiotique et à l'utiliser comme unique et seule source de carbone et d'énergie. Des observations similaires ont été rapportées par Djeribi *et al.*, (2005) lors de leurs travaux sur la biodégradation du styrène.

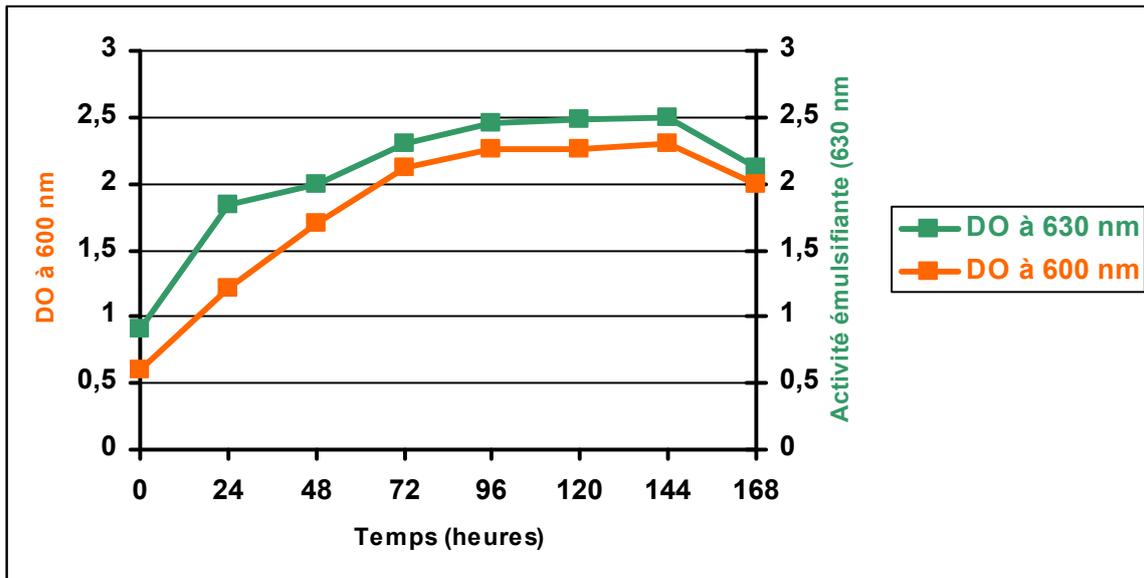


Figure 11 : Evolution de l'activité émulsifiante du consortium acclimaté au fluazifop-*p*-butyl.



Figure 12 : Observation de l'activité émulsifiante au cours de la croissance du consortium en système biphasique (huile de silicone/MBS).

4.5. Etude microbiologique du consortium dégradant le fluazifop-*p*-butyl :

L'étude microbiologique consiste en l'isolement et la caractérisation des microorganismes composant le consortium après une période d'acclimatation et d'adaptation de plus d'une année en présence du fluazifop-*p*-butyl utilisé comme seule et unique source de carbone et d'énergie.

Au bout de 3 semaines d'incubation des boîtes de pétri, les résultats des observations macroscopiques préliminaires sont illustrées par la figure 13.

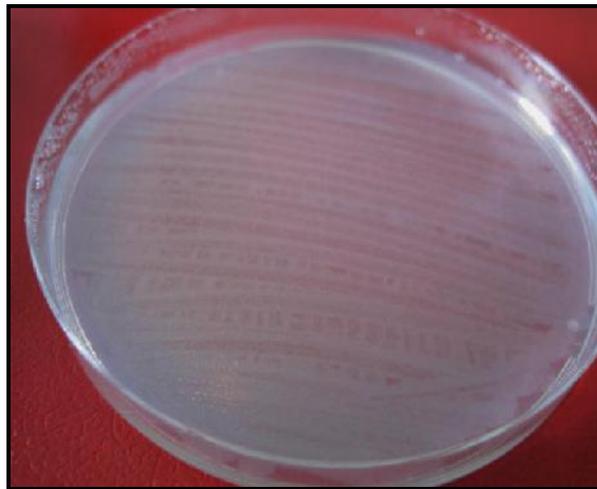


Figure 13 : Isolement du consortium incriminé dans la dégradation du fluazifop-*p*-butyl sur MBS solide après 20 jours d'incubation.

Une biomasse assez homogène s'est développée et a pu, vraisemblablement, utiliser le xénobiotique comme seule source de carbone disponible dans le milieu. La présence du substrat ne semble pas avoir eu un quelconque effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes.

Une série de repiquages, sur gélose nutritive coulée en boîtes de pétri, à partir de la biomasse obtenue ont donc été réalisés dans le but de s'acquies de sa nature ainsi que de son degré de pureté.

Les résultats obtenus suite aux examens macroscopiques effectués (figure 14), ont révélé la présence d'un seul type de colonie à la surface du milieu de culture. Elles sont toutes de nature opaque, rondes et de couleur rose.

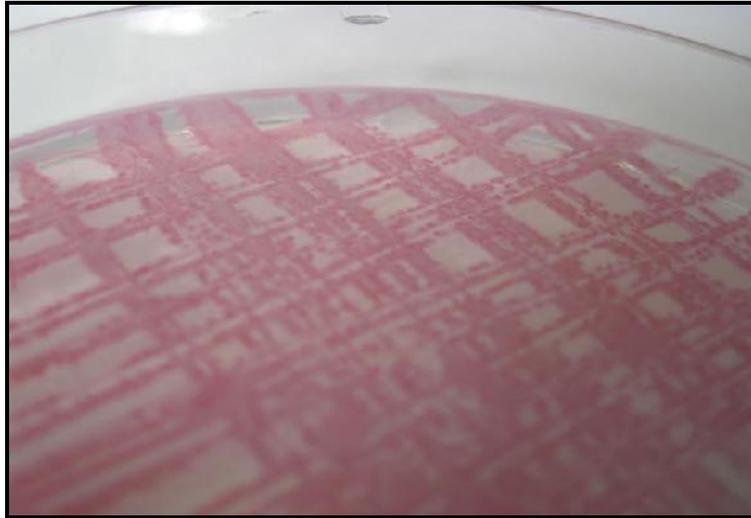


Figure 14 : Isolement de la souche bactérienne sur gélose nutritive.

L'examen microscopique de quelques colonies prises aléatoirement à la surface du milieu gélosé, a révélé, après coloration différentielle de gram, la présence de petits bacilles (coccobacilles) colorés en rose (Gram -) (figure 15).

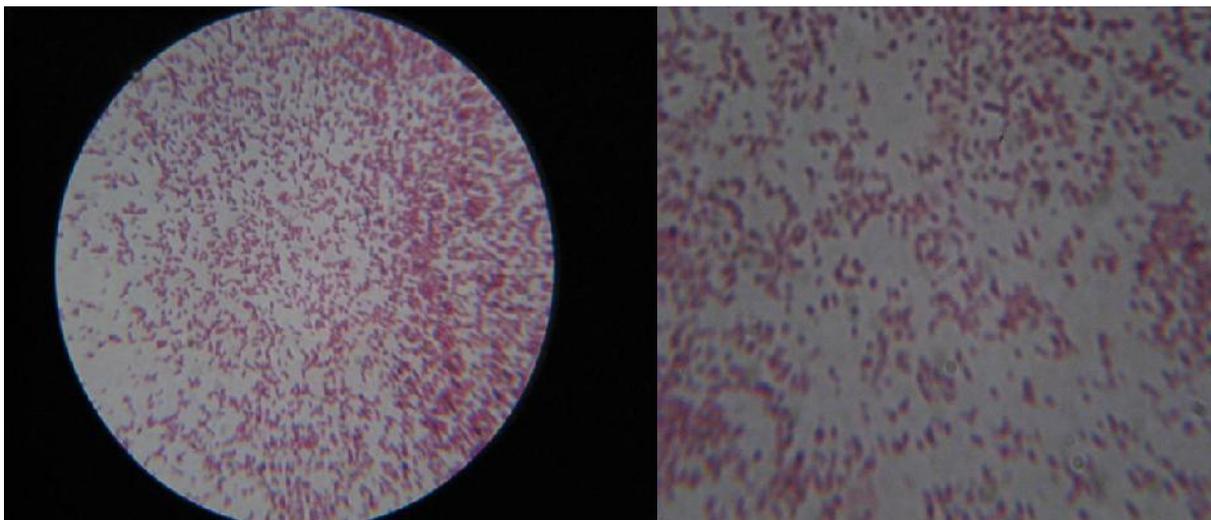


Figure 15 : Observation microscopique de la souche bactérienne isolée après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

Les résultats obtenus suite aux examens macroscopiques, microscopiques suivis des tests de la catalase et de l'oxydase sont regroupés dans le tableau 10. Le test de la mobilité cellulaire a révélé, quant à lui, une mobilité chez la souche isolée et purifiée (figure 16).

Tableau 10 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la souche isolée.

Caractère	Souche
Cellule	très petit Cocco-bacille, court
Colonie	ronde, bombée, lisse, régulière, opaque, rose
Gram	négatif
Test de catalase	+
Test oxydase	+



Figure 16 : Croissance de la souche bactérienne sur milieu mannitol-mobilité après 24 h d'incubation.

L'identification de l'espèce bactérienne apparemment seule incriminée dans la biodégradation du fluazifop-*p*-butyl a été rendue possible grâce à l'utilisation des galeries biochimiques **API 20 E** et **API 20 NE** (Bio Mérieux, France). Les résultats ainsi obtenus sont révélés par les figures 17 et 18 regroupées dans le tableau 11. L'ensemble des caractéristiques biochimiques compilées à partir des deux types de galeries (tests complémentaires) a permis d'identifier, ainsi, l'espèce *Aeromonas hydrophila* comme étant la seule souche bactérienne présente dans le milieu et capable de métaboliser le xénobiotique comme unique source de carbone disponible.

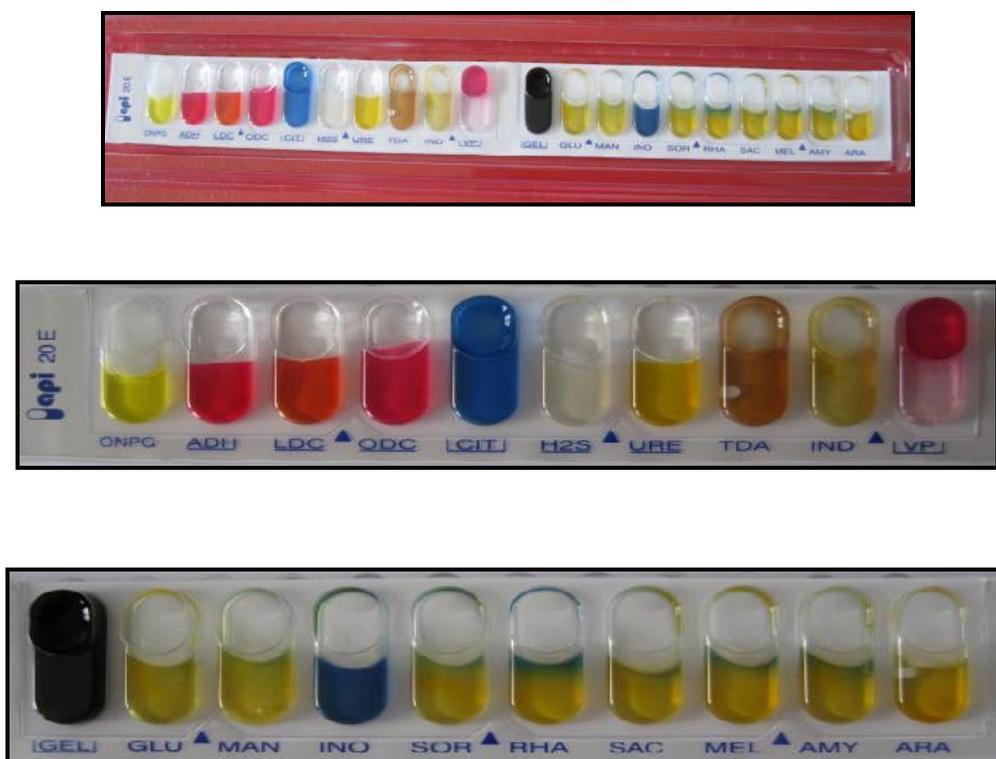


Figure 17 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 E.

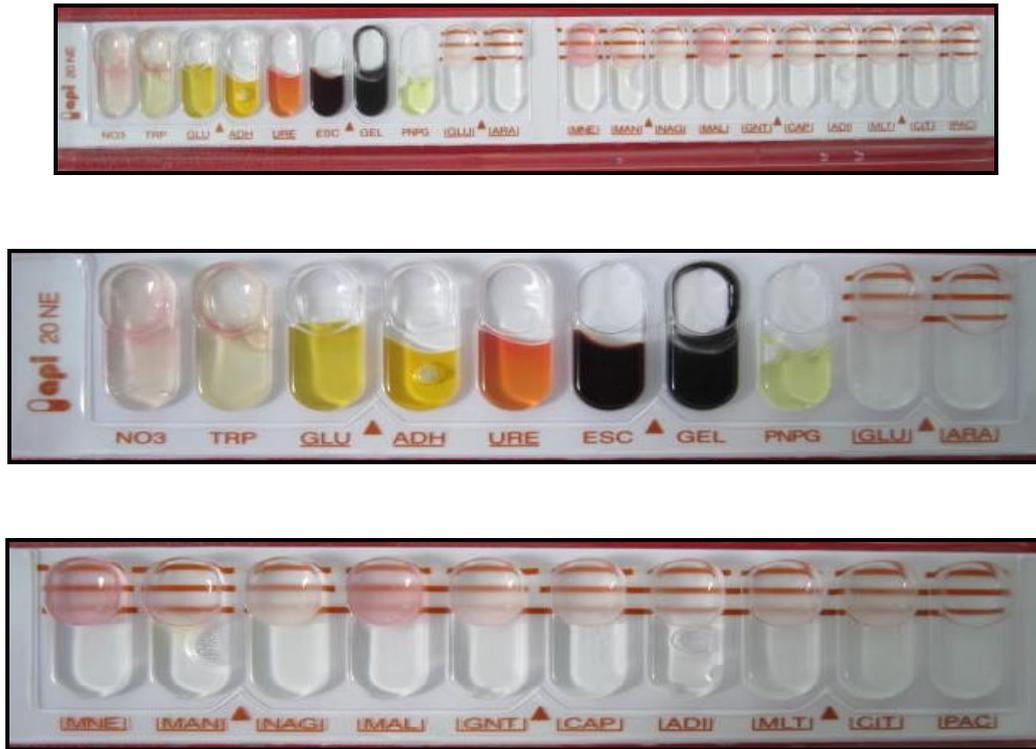


Figure 18 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 NE.

La souche *Aeromonas hydrophila* est une bactérie ubiquitaire des environnements aquatiques (Araujo *et al.*, 1991 ; War- Burton *et al.*, 1994 ; Brandi *et al.*, 1999). Schubert (1991) à considéré l'eau usée comme l'un des principaux réservoirs de cette bactérie. Elle est pathogène opportuniste, responsable de certaines infections chez les animaux (Shotts *et al.*, 1972) et chez l'homme (Janda et Duffey, 1988; Voss *et al.*, 1992; Ghanem *et al.*, 1993). Elle a été trouvée incriminée dans la biodégradation du benzyldimethylalkylammonium chloride (Patrauchan et Oriel, 2003), ainsi d'autres xénobiotiques (Lokendra *et al.*, 2000 ; Yatome *et al.*, 1981 ; Chappe *et al.*, 1995).

Tableau 11 : Resultats de la lecture des galeries biochimiques API 20 E et API 20 NE après 24 h d'incubation à 37°C et 30°C.

API 20 E		API 20 NE	
Test d'identification	Souche	Test d'identification	Souche
ONPG	+	NO3	+
ADH	+	TRP	-
LDC	+	GLU	+
ODC	+	ADH	+
CIT	+	URE	+
H ₂ S	-	ESC	+
URE	-	GEL	+
TDA	+	PNG	+
IND	-	GLU	+
VP	+	ARA	-
GEL	+	MNE	+
GLU	+	MAN	+
MAN	+	NAG	+
INO	-	MAL	+
SOR	+	GNT	+
RHA	-	CAP	+
SAC	+	ADI	-
MEL	-	MLT	+
AMY	+	CIT	+
ARA	-	PAC	-
Identification	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Identification	<i>Aeromonas hydrophila</i>

4.6. Résultats de l'étude de la dégradation du fluazifop-*p*-butyl par *Aeromonas hydrophila* :

La biodégradation du fluazifop-*p*-butyl par *Aeromonas hydrophila* a donc été testée, cette fois-ci, en batch monophasique (absence de la phase organique). Le fluazifop-*p*-butyl est additionné dans le milieu de culture à la concentration initiale de 30 µg/ml. La disparition du xénobiotique dans le milieu a été suivie pendant une semaine. Parallèlement, l'évolution de la biomasse bactérienne a été, quant à elle, suivie par la détermination du poids sec de la culture. Les résultats obtenus après environ une semaine de fermentation sont illustrés par la figure 19.

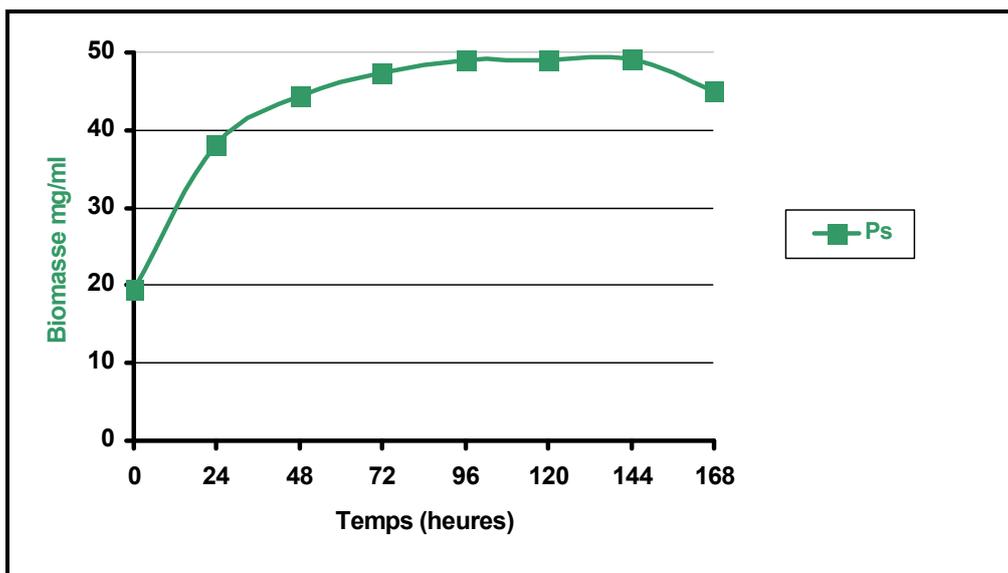


Figure 19 : Evolution du poids sec de la biomasse en système monophasique.

Ainsi, l'allure de la courbe indique une augmentation de la biomasse de la culture pure ce qui est en soi une preuve supplémentaire de l'aptitude d'*Aeromonas hydrophila* à métaboliser et utiliser de façon quasi-certaine le fluazifop-*p*-butyl comme seule et unique source de carbone et d'énergie. Le maximum de croissance, estimé en poids sec, a été atteint après 144 h (06 jours) d'incubation. Cependant, il n'a pas été possible de doser par LC-MS-MS le substrat présent dans le milieu. Sa très faible concentration dans la phase aqueuse en plus de la forte dilution réalisée sur l'échantillon de départ (300 fois), n'ont malheureusement pas permis de détecter la molécule du fluazifop-*p*-butyl présente dans l'échantillon.

CONCLUSION

Le fluazifop-*p*-butyl est un herbicide très toxique et très peu soluble dans l'eau (1 mg/litre). Un système biphasique (MBS/huile de silicone) a donc été utilisé afin de lever l'inhibition vis-à-vis des microorganismes due à la présence du xénobiotique.

A l'issue d'une année d'adaptation et d'acclimatation en présence du fluazifop-*p*-butyl présent dans le milieu de culture comme unique et seule source de carbone et d'énergie disponible, l'espèce *Aeromonas hydrophila* a donc été isolée, purifiée et identifiée à partir d'un consortium initialement inoculé au milieu MBS en présence du xénobiotique.

L'aptitude qu'a *Aeromonas hydrophila* à s'acclimater et à métaboliser le fluazifop-*p*-butyl est due en grande partie à la présence de la phase organique (huile de silicone). L'étude de l'hydrophobicité de la souche incriminée dans le métabolisme du fluazifop-*p*-butyl, a donc permis de révéler une forte adhérence des cellules au substrat (environ 56%) ce qui témoigne d'une affinité non négligeable de cette espèce bactérienne vis-à-vis de l'unique substrat présent dans le milieu. Cette affinité, a une fois encore, été confirmée par la mise en évidence du pouvoir émulsifiant de la souche bactérienne.

Cependant, la disparition du fluazifop-*p*-butyl dans le milieu grâce aux essais de dosage effectués par LC-MS-MS, n'a malheureusement pas pu être révélée voir confirmée. Des difficultés liées vraisemblablement au traitement de l'échantillon de départ ont ainsi empêché la détection du xénobiotique dans la phase aqueuse. La difficulté majeure est sans aucun doute liée à la forte dilution de l'échantillon, lui-même présent à une très faible concentration dans le milieu. Il serait donc, impératif, de reprendre les essais de dégradation du xénobiotique en culture pure et de trouver un protocole de dosage adapté qui permet une possible et sensible détection du fluazifop-*p*-butyl présent dans la phase aqueuse.

Par ailleurs, il serait également intéressant, après cette étude préliminaire, d'étudier et de définir expérimentalement les voies métaboliques de biodégradation du fluazifop-*p*-butyl par *Aeromonas hydrophila*, afin de comprendre quel serait le stade ultime de la biodégradation et/ou la bioconversion du xénobiotique dans le milieu aqueux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Abdel-Mallek A.Y., Abdel-Kader M.I.A., Omar S.A., 1996. Effect of the herbicide Fluazifop-butyl on fungal populations and activity in soil. *Water Air Soil Pollut.* 86:151-157.
2. Acero J.L., Stemmler K., Von Gunten U., 2000. Degradation kinetics of atrazine and its degradation products with ozone and OH radicals: a predictive tool for drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 34: 591-59.
3. Aelion C.M., Dobbins D.C., Pfaender F.K., 1989. Adaptation of aquifer microbial communities to the biodegradation of xenobiotic compounds: influence of substrate concentration and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:75-86.
4. Albin O.M., 1999. Encyclopédie universitaire. Dictionnaire de l'écologie Ed. ISBN, France. P1399.
5. Alexander M., 1973. Biotechnology report. Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 611-647.
6. Alexander M., 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science.* 211: 132- 138.
7. Alexander M., 1985. Biodegradation of organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 18: 106-111.
8. Armstrong D.E., 1991. Adsorption catalyzed chemical hydrolysis of atrazine. *Environ. Sci. Technol.* 2: 683-688.
9. Anonyme 1., 1971. Conseils pratiques pour l'emploi des herbicides. Document A de ITTCF (Institut Technique des Céréales et des Fourrages) Paris 20P. 1-1 : 05-13.
10. Anonyme 2., 1980. Cultivar, special desherbage. 7-9.
11. Anonyme 3., 1994. The WSSA herbicide handbook. Weed Society of America. Champaign, Illinois. P352.
12. Anonyme 4., 1999. Agenda annuel de l'amiphy, Association Marocaine de négociants, importateurs et Formulateurs des produits phytosanitaires.
13. Anonyme 5., 2005. 166-World.Health. Organisation. The W.H.O. Recommended classification. Ed-WHO. Library cataloguing. In. Publication Data. 2-9.
14. Araujo R.M., Arribas R.M., Pares R., 1991. Distribution of *Aeromonas* species in water with different levels of pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 71-182.
15. Arbuckle W.B., Kennedy M.S., 1989. Activated sludge response to a parachlorophenol transient. *J.W.P.C.F.* 61: 476-480.

16. Arriaga R., Muñoz S., Hernandez B., Guieysse S., Revah S., 2006. Gaseous hexane biodegradation by *Fusarium solani* in two liquid phase packed-bed and stirred tank bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2390–2395.
17. Ascon-Cabrera M., Lebeault J.M., 1993. Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1717-1724.
18. Bailey J.E., Ollis D.F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed., McGraw-Hill, New York. P984.
19. Baily R., Waite M., 1970. Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soil. *Residue Reviews.* 32: 29-92.
20. Baker., Herson., 1994. *Bioremediation*. McGraw-Hill Inc. P 375.
21. Balinova A. M., Lalova M.P., 1992. Translocation, metabolism and residues of Fluazifop-butyl in soybean plants. *Weed Res.* 32: 143-147
22. Bar R., Grainer J.L., 1987. Acid fermentation in water-organic solvent two liquid phase system. *Biotechnol. Prog.* 2: 109-114.
23. Bestetti T., Galli E., Benigni C., Orsini F., Pelizzoni F., 1989. Biotransformation of styrenes by a *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 252-256.
24. Bethlenfalvay G.J., Phillips D.A., 1977. Effect of light intensity on efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 60: 868-871.
25. Bidelman T.F., 1988. Atmospheric transport and air surface exchange of pesticides. *Water, air and soil pollution.* 115: 115-166.
26. Block J.C., Flambeau J.P., Kuenemann P., Thouand G., Vasseur P., 1989. Aspects microbiologiques de la biodegradation: une revue. *Proc. Du congrès international Evaluation de la dégradation des substances organiques dans l'environnement*, Paris.
27. Bodennec G., Desmarquest J.P., Jensen B., Kantin R., 1987. Evolution des hydrocarbures et de l'activité bactérienne dans des sédiments marins contaminés par un déversement de pétrole brut et traité. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 29: 153-178.
28. Boethling R.S., Alexander M., 1979. Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1211-1216.
29. Bollag J.M., 1982. Microbial metabolism of pesticides in Rosazza. JP(ed), *Microbial transformation of bioactive compounds*. CRC. Press. Inc. Boca Rton. 126-18.
30. Bouziani M., 2007. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. *Le guide de la médecine et de la santé*. Santémaghreb.

31. Brandi G., Sisti M., Giardini F., Schiavano G.F., Albano A., 1999. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas spp.* in different types of water. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 211-215.
32. Brink L.E.S., Tramper J., 1985. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1258-1269.
33. Broderick L.S., Cooney J.J., 1982. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. *Dev. Ind. Microbiol.* 23: 425-434.
34. Burnet M., Hodgson B., 1991. Differential effects of the sulfonylurea herbicides chlorsulfuron and sulfometuron methyl on microorganisms. *Arch. Microbiol.* 155: 521-525.
35. Calderbank A., 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Reviews of environmental contamination and toxicology.* 180: 71-103.
36. Calvet R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils *Environ Health pers.* 145-177.
37. Calvet R., Bariusso E., Benoit P., Bedos C., Charnay M.P., Coquet Y., 2006. Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole. INRA. P46.
38. Chappe P., Mourey A., Manem J., Kilbertus G., 1995. La microflore de dégradation des lipides dans des boues activées riches en graisses. *Bull Acad. Soc. Lorr. Sci.* 34 : 187-195.
39. Chester M., 1989. Environmental fate of alachlor and metolachlor. *Rev. Environ. Contam. T.* 110: 1-74.
40. Chudoba J., Chudoba P., Cech J.S., 1986. Effect of the endogenous phase duration on the maximum substrate removal rate in mixed cultures. *Wat. Res.* 20: 1505-1509.
41. Cluzeau S., 1996. Index Phytosanitaire. Trente-deuxième édition. Paris: A.C.T.A. P283.
42. Collins L.D., Daugulis A.J., 1997. Characterization and optimization of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 18-22.
43. Cui T., 2002. Riboflavin- photosensitized degradation of Atrazine in a freshwater environment chemosphere. *47: 991-999.*
44. Dabène L., Marié H., 1993. Caractéristiques utiles pour l'évaluation du comportement de quelques matières actives dans l'environnement. *Recueil de fiches synthétiques et guide de lecture.* Ministère de l'agriculture et de la pêche Paris, France.

45. Daniel O., Meier M.S., Schlatter J., Frischknecht P., 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants: Ecologic functions, health implications, and nodulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.* 107: 109-114.
46. Daugulis A.J., Boudreau N.G., 2003. Removal and destruction of high concentration of gaseous toluene in a two-phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylosoxidans*. *Biotechnol Lett.* 25: 1421-1424.
47. Devillers H., 2005. Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides. Ed TEC et DOC. Lavoisier. P278.
48. Djeribi R., Dezenclous T., Pauss A., Lebeault J.M., 2005. Removal of styrene from waste gas using a biological trickling filter. *Eng. Life Sci.* 5 : 450–457.
49. Dominique Z., 2000. Les résidus de pesticides dans les plantes. Ed INRA.
50. Dumont E., Andrès Y., Le Cloires P., 2006. Mass transfer coefficients of styrene and oxygen into silicone oil emulsions in a bubble reactor. *Chem. Eng. Sci.* 61: 5612-5619.
51. Dunigan E.P., Frey J.P., Allen L.D., McMahon A., 1972. Herbicidal effects of the nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill. *Agron. J.* 64: 806-808.
52. Durand G., Monsan P., 1982. Les enzymes. Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris.
53. Duvnjak Z., Kosaric N., 1987. Deemulsification of petroleum w/o emulsions by selected bacterial and yeast cells. *Biotechnol. Lett.* 9: 39-42.
54. El Aalam S., Pauss A., Lebeault J.M., 1993. High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic-water continuous reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Accepted for publication.
55. El Bakouri H., 2002. Etude de l'adsorption de l'endosulfan sur certaines matrices végétales. Rapport de stage. Réf: UFR/02-01. Thèse de doctorat Université de Tranger. Maroc.
56. Extoxnet., 1996. Fluazifop-p-butyl. Pesticide information profiles. Extension toxicology network.
57. Faber M.D., 1979. Microbial degradation of recalcitrant compounds and synthetic aromatic polymers. *Enzyme Microb. Technol.* 1: 226-232.
58. Fazaelpoor M.H., Shojaosadati S.A., 2004. The effect of silicone oil on biofiltration of hydrophobic compounds. *Environ. Prog.* 21: 221 – 224.
59. Fazaelpoor M.H., Shojaosadati S.A., Farahani E.V., 2006. Two Liquid Phase Biofiltration for Removal of *n*-Hexane from Polluted Air. *Environ. Eng. Sci.* 23: 954-959.
60. Feinderg E.L., Ramage P.I.N et Trudgill P.W., 1980. The degradation of *n*-alkylcycloalkanes by a mixed bacterial culture. *J. Gen. Microbiol.* 121: 507-511.

61. Fewson C.A., 1988. Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Tibtech.* 6:148-153.
62. Foght J.M., Westlake D.W.S., 1982. Effect of dispersant Corexit 9527 on the microbiol degradation of Prudhoe Bay oil. *Can. J. Microbiol.* 28: 117-122.
63. Foucard J.C., 1982. Mode d'action des herbicides et conseils pratiques d'application. Hortiforum, Orléans, ch. 01-03 : 1-13.
64. Frochot H., 1977. C.O.L.U.M.A. Les herbicides et le sol. Paris: A.C.T.A. P143.
65. Fujita M., Ike M., Hasimoto S., 1991. Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms. *Wat. Res.* 25: 979-984.
66. Furuhashi K., Shintani M., Takagi M., 1986. Effects of solvents on the production of epoxides by *Nocardia corallina* B-276. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 218-223.
67. Fusi P., 1991. Adsorption et décomposition catalytiques des pesticides sur les minéraux argileux in Regnault- Roger 2005.
68. Fusi P., 1993. Interactions of two acetanilide herbicides with clay surfaces modified with Fe (III) oxyhydroxydes and hexadecyltrimethyl ammonium in Regnault- Roger 2005.
69. Gardin H., Lebeault J.M., Pauss A., 1999. Biodegradation of xylene and butyl acetate using an aqueous-silicon oil two-phase system. *Biodegradation.* 10: 193-200.
70. Gessa C., Pusino A., Solinas V., Petretoo S., 1987. Interaction of Fluazifop-butyl with homoionic clays. *Soil Sci.* 144: 420-424.
71. Ghanem E. H., Missa M. E., Eraki H. M., 1993. *Aeromonas-nssociaied* gastroenteritis in Egypt. *Zbt. Mikrobiol.* 148 : 441-447.
72. Ghautier E., Déziel E., Villemur R., Juteau P., Lépine F., Beaudet R., 2003. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *J. Appl. Microbiol.* 94: 301-311.
73. Gille F., 1991. Pesticides and the thierd world. *J. Toxicol. Environm. Health.* 32: 11-31.
74. Gillian A.T., Ousley M., Walker A., Shaw E., Morgan A.W., 2001. Degradation of substituted phenylerea herbicides by *Arthrobacter globiformis*. Strain D47 and characterization of plasmid-associated hydrolyse. Gene puhA. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 2270-2275.
75. Glotfelty K., 1987. Pesticides in fog. *Nature.* 325: 602-605.
76. Goring C.A.I., Laskowski D.A., 1982. The effects of pesticides on nitrogen transformations in soils. *Agronomie.* 22:689-720.

77. Gorlach-Lira K., Stefaniak O., Slizak W., Owedyk I., 1997. The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. *Microbiol. Res.* 152: 319-329.
78. Grady C.P.L.J., 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27:660-674.
79. Grund A., Shapiro J., Fennewald M., Bacha P., Leahy J., Markbreiter K., Nieder M., Toepfer M., 1975. Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*, *J Bacteriol.* 123: 546–556.
80. Haines J.R., Atlas R.M., 1983. Biodegradation of petroleum hydrocarboné in continental shelf regions of the Bering sea. *Oil. Petrochem. Pollut.* 1: 85-96.
81. Hall L., Beckie H, and Wolf T. 1999. How herbicides work. In *how herbicides work: Biology to application.* Agriculture, Food and Rural Development, Edmonton, AB.
82. Hardy R.F.W., Halvelka V.D., 1975. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In P.S.Nutman (ed.). *Symbiotic nitrogen fixation in plants.* Cambridge Univ Press, New York, NY. 421-439.
83. Harrop A.J., Hocknull M.D., Lilly M.D., 1989. Biotransformations in organic solvents: a difference between gram-positive and gram-negative bacteria. *Biotechnol. Lett.* 11: 807-810.
84. Hayes W. J., 1991. Dosage and other factors influencing toxicity. In W. J. Hayes & E. R. Laws: *Handbook of Pesticide Toxicology.* Academic Press, San Diego, CA, USA. 39-105.
85. Harker K. N., O'Sullivan P. A., 1991. Effect of imazamethabenz on different growth stages of green foxtail, Tatory buckwheat and wild oat. *Can. J. Plant .Sci.* 71: 821–829.
86. Helling C.S., Kearney P.C., Alexander M., 1971. Behavior of pesticides in soil. *Adv. Agron.* 23: 147-240.
87. Hequet F., 1995. Approche méthodologique des conditions d'hydrolyse de l'Atrazine. In site Internet n°5.
88. Hess F.D., 1987. Herbicides effects on the cell cycle of meristematic plant cells *Rev Weed. Sci.* 3:183-203.
89. Hickman G.T., Novak J.T. 1984. Acclimation of activated sludge to pentachlorophenol. *J.W.P.C.F.* 56: 364-369.
90. Hutzinger O., Veerkamp W., 1981. Xenobiotic chemicals with pollution potential. *FEMS symposium.* 12: 3-45.

91. Ingram L.O., 1977. Changes in lipids composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1233-1236.
92. Janda, J. M., Duffey P. S., 1988. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.* 10: 980-997.
93. Janssen D.B., Kuijk L., Witholt B., 1987. Feasibility of specialized microbial cultures for the removal of xenobiotic compounds. In proceeding of the international meeting of biological treatment of industrial waste gases. Francfort, Allemagne, 21-24juin.
94. Janssen D.B., Oldenhuis R., Van Den Wijngaard A.J., 1989. Degradation of xenobiotic compounds by microorganisms. *VDI Berichte.* 735: 25-39.
95. Jones S.H., Alexander M., 1988. Effect of inorganic nutrients on the acclimation period preceding mineralization of organic chemicals in lake waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3177-3179.
96. Jones D.S., Adair C.G., Mawhinney W.M., Gorman S.P., 1996. Standardization and comparison of methods employed for microbial cell surface hydrophobicity and charge determination. *Int. J. Pharm.* 131: 83-9.
97. Jourdain M.J., Charissou A.M., 2007. Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des Cinétiques. P148.
98. Jury R., 1984. Behaviour assessment model for trace organics in soil: III. Application of screening modes. *J. Environ qual.* 13: 573-579.
99. Kamath A.V., Vaidyanathan C.S., 1990. New pathway for the biodegradation of indole in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 275-280.
100. Kells J. J., Meggitt W. F., Penner D., 1984. Absorption, translocation, and activity of Fluazifop-*p*-butyl influenced by plant growth stage and environment. *Weed Sci.* 32: 143-149.
101. Khan M.S., Zaidi A., Rizvi P.Q., 2006. Biotoxic effects of herbicides on growth, nodulation, nitrogenase activity, and seed production in chickpeas. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 37: 1783-1793.
102. Kidd H., James D. R., 1991. *The Agrochemicals Handbook, Third Edition.* Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, (as updated). Eds. 7-7.
103. Kilpi S., Himberg K., Yrjala K., Backstrom V., 1988. The degradation of biphenyl and chlorobiphenyls by mixed bacterial cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 19-26.
104. Kim C.H., Maier W., 1986. Acclimation and biodegradation of chlorinated organic compounds in the presence of alternated substrates. *J.W.P.C.F.* 58: 157-164.

105. Kobayashi H., Rittmann B.E., 1982. Microbial removal of hazardous organic compounds. *Env. Sci. Tech.* 16: 170-183.
106. Koffi A.R., 1999. Valorisation combinée du lisier de porc et du perméat de lactosérum de fromagerie par fermentation aérobie au moyen d'une culture de levures. Thèse (Ph. D.), Université Laval. P211.
107. Koskinen B., 1990. The retention processus. In cheng H.H. *Pestic in soil environment: Process, impacts and modelling.* SSSA Madisson, Wisconsin book. Sci. 2: 51-77.
108. Kulshresha E., Urano K., 1995. Onecide, a new herbicide Fluazifop-butyl. *Jap. Pestic. Inf.* 41: 28-31.
109. Labrecque M.H., 2003. Étude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Thèse de Maître ès sciences (M. Sc.), Université Laval. Québec.
110. Lamrini A., 1978. Contribution à l'étude de la pollution aquatique par les pesticides organochlorés. Thèse de doctorat vétérinaire, institut agronomique et vétérinaire Hassan II. Maroc.
111. Larson R.J., 1984. Kinetic and ecological approaches for prediction biodegradation rates of xenobiotic organic chemicals in natural ecosystems. *Current perspectives in microbial ecology.* Klug M.J et Reddy C.A.Ed., ASM Pub., Washington. 677-686.
112. Leahy J.G., Colwell R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbon in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.
113. Lebeault J.M., 1990. Biological purification of waste gases by fermentation in a multiphase bioreactor. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 55: 1425-1428.
114. Leblanc G. A., 1995. Are Environmental sentinels signalling ? *Environmental Health Perspectives.* 103: 888-890.
115. Lee Y.H., Chang H.N., 1989. Biosynthesis of acrylamide from acrylonitrile in aqueous two phase system. *Biotechnol. Lett.* 11: 23-26.
116. Leisinger T., 1987. Mechanisms of adaptation in bacterial pure and mixed cultures. In proceeding of the international meeting of biological treatment of industrial waste gases. Francfort, Allemagne, 21-24 juin.
117. Lenz R.W., 1993. Biodégradable polymères. *Advances in polymer science.* 107: 1-40.
118. Lewis D.L., Kollig H.P., Hodson R.E., 1986. Nutrient limitation and adaptation of *microbiol.* 51: 598-603.
119. Lokendra S., Sai Ram M., Agar Wal M.K., Alam S.L., 2000. Characterisation of *Aeromonas hydrophila* strains and their evaluation for biodegradation of night soil. *World J. Microbiology. Biotechnology.* 16 : 625-630.

120. Louveaux J., 1984. Les traitements phytosanitaires et les insectes pollinisateurs, Pesson : Pollinisation et productions végétales. INRA-Paris. 663: 565-575.
121. Madhun Y.A., Freed V.H., 1990. Impact of pesticides on the environment. In: Pesticides in the soil environment. Soil Science Society of America Book Series, 2, Madison, WI, USA. 429-466.
122. Mahanty B., Pakshirajan K., Dasu V.V., 2008. Biodegradation of pyrene by *Mycobacterium frederiksbergense* in a two-phase partitioning bioreactor system. *Bioresour. Technol.* 99: 2694-2698.
123. Marchal S., Penet F., Solano J.P., Vandecasteele., 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation, oil & gas science and technology-Rev.IFP. 58: 441-448.
124. Martin-Gullon I., Font R., 2001. Dynamic pesticide removal with activated carbon fibres. *Wat. Res.* 35: 516-520.
125. Mestel R., 1989. In the environment such as pesticides-that disrupt the endocrine system. 12: 16-109.
126. Mietinnen T., 1993. Biochemical and chemical degradation of 3-chloro-4 (Dichloromethyl) -5- hydroxyl- 2(5H) - Furanone (MX) in surface and drinking water. *Chemosphere.* 27: 1707-1718.
127. Middeldorp P.J.M., Luijten B.A., Van Eekert M.H. ,Van Eekert S.W.M., Kengen G.W.M. Schraa., Stams A.J.M., 1999. Anaerobic microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes. *Bioremediation Journal.* 3: 151-169.
128. Miguel A., Ascon-Cabrera M., Lebeault J.M., 1995. Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 80: 270-275.
129. Monard C., 2008. Biodégradation des herbicides en sols tempérés-contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1. France.
130. Mulkins-Phillips G.J., Stewart J.E., 1974. Effects of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. *Appl. Microbiol.* 28: 547-552.
131. Muller W.F., Scheunert J., Kozman K., Kogel W., 1978. Comparative metabolism of hexachlorobenzene and pentachloronitrobenzene in plants, rats and rhesus monkeys. *Ecotox. Environ. Saf.* 2: 437-445.
132. Muñoz R., Rolving C., Guieysse B., Mattiasson B., 2005. Aerobic phenanthrene biodegradation in a two-phase partitioning bioreactor. *Water Sci. Technol.* 52: 265- 271.
133. Muñoz R., Arriaga S., Hernández S., Guieysse B., Revah S., 2006. Enhanced hexane biodegradation in a two phase partitioning bioreactor: Overcoming pollutant transport limitations. *Process Biochemistry.* 41: 1614-1619.

134. Negre M., Gennari M., Cignetti A., Zanini E., 1988. Degradation of Fluazifop-butyl in soil and aqueous systems. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1319-1322.
135. Negre M., Gennari M., Andreoni V., Ambrosoli R., Celi L., 1993. Microbial metabolism of Fluazifop-butyl. *J. Environ. Sci. Health B28.* 5: 545-576.
136. Nieder., Shapiro., 1975. Physiological function of the *Pseudomonas putida* PpG6 (*Pseudomonas oleovorans*) alkane hydroxylase: monoterminal oxidation of alkanes and fatty acids, *J Bacteriol.* 122: 93-98.
137. Omori T., Jigami Y., Minoda Y., 1975. Isolation identification and substrate assimilation specificity of some aromatic hydrocarbon utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1775-1779.
138. Patrauchan M.A., Oriol P.J., 2003. Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp.K. *J. Appl. Microbiology.* 94: 266-272.
139. Penaud F., 1989. Etude en réacteur de la biodegradation de composés xénobiotiques apportés en phase liquide ou gazeuse. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne.
140. Periquet A., 1989. Toxicologie des résidus de pesticides: Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation, Paris. 251-299.
141. Pimentel D., Acquay H., Biltonen M., Rice P., Silva M., Nelson J., Lipner S., Godan S., Horowitz A., Damore M., 1993. Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In Pimentel & Lehman : The pesticide question: environment, economics and ethics. Routledge, Chapman and Hall, New York. 47-84.
142. Pitter P., Chudoba J., 1990. Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press, Florida.
143. Prokop A., Erickson L.E., Lopez P., 1971. Growth models of cultures with two liquid phases: Substrate dissolved in dispersed phase experimental observations. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 241-256.
144. Reddy P.G., Singh H.D., Roy P.K., Baruah J.N., 1982. Predominant role hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1241-1269.
145. Reineker W., Knackmuss H.J., 1979. Construction of haloaromatics using bacteria. *Nature.* 277:385-386.
146. Reineker W., Wessels S.W., Rubio M.A., Latorre J., Schwien U., Schmidt E., Schlomann M., Knackmuss H.J., 1982. Degradation of monochlorinated aromatics following transfer of genes encoding chlorocatechol catabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 14:291-294.
147. Ristori S., 1995. Adsorption mechanisms and abiotic catalytic transformations of some agrochemicals by clay minerals.

148. Robert S., 1999. Classification of Herbicides According to Mode of Action.
149. Robertson B.R., Button D.K., 1987. Toluene induction and uptake kinetics and their inclusion in the specific affinity relationship for describing rates of hydrocarbon metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2193-2205.
150. Robichaux T.J., Myrick H.N., 1972. Chemical enhancement of the biodegradation of crude oil pollutants. *J. Petrol. Technol.* 24: 16-20.
151. Rosenberg E., Kaplan N., Pines O., Rosenberg M., Gutnick D., 1983. Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acibetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 157-160.
152. Rosenberg M., 1984. Bacterial adherence to hydrocarbon: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 289-295.
153. Rosenberg E., 1989. Biofilms on water-insoluble substrates. Structure and function of biofilms. Eds. W.G. Characklis and P.A. Wilderer. 59-71.
154. Roy P.K., Singh H.D., Bhagat S.D., Baruah J.N., 1979. Characterization of hydrocarbon emulsification and solubilization occurring during the growth of *Endomycopsis lipolytica* on hydrocarbons. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 955-974.
155. Ryu B.H., Kim H.J., Bae S.K., Kim J.D., Kong J.Y., 1995. Purification and characterization of biosurfactant from marine *Pseudomonas* sp. CHCS-2. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 10: 582-588.
156. Sabik H., 1991. Analyse de traces de pesticides organiques : intérêt, méthodologie, exemple, Thèse de doctorat en Chimie. Université d'Angers, juin 1991.
157. Scheunert I., 1992. Transformation and degradation of pesticides in soil. In: *Terrestrial behavior of pesticides. Chemistry of Plant Protection*, Springer-Verlag, Berlin. 8: 77-103.
158. Schmidt E., Hellwig M., Knackmuss H.J., 1983. Degradation of chlorophenols by a defined microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1038-1044.
159. Schubert R. H. W., 1991. Aeromonads and their significance as potential pathogens in water. *J. Appl. Bacteriol-Symposium Sup.* 70: 131-135.
160. Senesi N., 1993. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter: Molecular and mechanistic aspects. *Aatoasi series.* 32: 47-74.
161. Senior E., Bull A.T., Smith J.H., 1976. Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide Dalapon. *Nature.* 263: 476-479.
162. Senthilnathan P.R., Ganczarczyk J.S., 1988. Adaptation and deadaptation kinetics of activated sludge. *Proc. 43rd Ind.Waste conf. Purdue Univ.* 301-307.

163. Sherrie L.K., David G.A., William P. E., Diana L., 2004. Fluazifop-*p*-butyl. Report of the metabolism assessment review committee. United State Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 15-16.
164. Shotts E. B. Jr., Gaines J. L. Jr., Martin L., Prestwood A. K., 1972. *Aeromonas* induced deaths among fish and reptiles in eutrophic inland lake. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 161-603.
165. Singh G., Wright D., 2002. In vitro studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:12-16.
166. Singleton I., 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and Applied research. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 59: 23.
167. Sirvins A., Tramier B., 1985. La biodégradation des hydrocarbures. *Rech. N°171.* 16 : 1344-1352.
168. Slater J.H., 1981. Mixed cultures and microbial communities. *In* S.J.H. Bushell M.E. (ed), mixed cultures fermentations. Academic Press, New York. 1-24.
169. Slater J.H., Bull A.T., 1982. Environnement microbiology: biodegradation. *Phill.Trans. Roy. Soc. London.* 297: 575-597.
170. Slater J.H., Lovah D., 1982. Biodegradation and the significance of microbial communities. *In* G.D.T. (ed), biochemistry of microbial degradation. Marcel Dekker, New York. 112-131.
171. Smith A.E., 1987. Persistence studies with the herbicide Fluazifop-butyl in Saskatchewan soils under laboratory and field conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 150-155.
172. Soltani M., 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse Chimie analytique, UMR 7573, Chimie Paris. P18.
173. Somasundaram H., Coats K., 1990. Pesticides transformation products in the environment. ACS, symposium. Series. 459: 2-9.
174. Sophie G., 2002. Biodégradation de matériaux polymères a usage agricole : étude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental. P19.
175. Soulas G., 1999. Pesticide biodegradability in soil: basic concepts for bioremediation applications. Colloque Biodépol'99 – Rennes, France.
176. Spea R., 1991. Recognised and possible exposure to pesticides. *In* W. J. Hayes & E. R. Laws: Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, San Diego, CA, USA. 245-274.

177. Spencer H., Cliath L., 1990. Movement of pesticides from soil to atmosphere. In D. A Kurtz: long range transport of pesticides. Levis publishers, Chelsea, Michigan, USA. 1-16.
178. Stephenson T., Lester J.N., Perry R., 1989. Acclimatization to nitrilotriacetic acid in activated sludge process. *Chemosphere*.13: 1033-10470.
179. Stucki G., Alexander M., 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 292-297.
180. Subba-Rao R.V., Rubin H.E., Alexander M., 1982. Kinetics and extend of mineralization of organic chemicals at trace levels in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1139-1150.
181. Taylor F., Spencer M., 1990. Volatilization and vapour transport process. In pesticides in the soil environment. Soil. Science Society of America Book series, Madoson, Weed Scien, USA. N°2. 53: 213-269.
182. Taylor F., 1995. Factors influencing the breakdown of sulfonylurea herbicides in solution and in soil.
183. Tiehm A., Schulze S., 2003. Intrinsic aromatic hydrocarbon biodegradation for groundwater remediation, revue de l'institut français du Pétrole. N°4. 58: 449-462.
184. Tissut M., Severin F., 1984. Plantes, herbicides et désherbage. Paris : A.C.T.A. P251.
185. Touand G., 1993. Maitrise des inocula bactériens utilisés dans les essais de biodegradation aerobie. Thèse de doctorat, Université de Nancy I.
186. Tu M., Hurd C., Randall J.M., 2001. Weed control methods handbook: tools and techniques for use in natural areas. The Nature Conservancy.
187. Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Nordés W., Zehnder A.J.B., 1989. Bacterial adhesion : a physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 17: 1-15.
188. Van Ginkel C.G., Kolvenbach M., 1991. Relations between the structure of quaternary alkyl amonium salts and their biodegradability. *Chemosphere.* 23: 281-289.
189. Ventullo R.M., Larson R., 1986. Adaptation of microbial communities to quaternary ammonium compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 356-361.
190. Vidal D., Martinez J., Bergareche C, Miranda A.M., Simon E., 1992. Effect of methabenzthiazuron on growth and nitrogenase activity in *Vicia faba*. *Plant Soil.* 144: 235-245.
191. Voss L. M., Rhodes K. H., Kenneth A., Johnson M. D., 1992. Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: An environmental disease. *Mayo Clin. Proc.* 67: 422-427.

192. War-Burton D.W., Mc Cormick J.K., Bowem B., 1994. Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water: development of methodology for testing bottled water in Canada. *Can. J. Microbiol.* 40: 145-148.
193. Ward O.P., Young C.S., 1990. Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 482-493.
194. Wiggins B.A., Jones S.H., Alexander M., 1987. Explanation for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 791-796.
195. Wiggins B.A., Alexander M., 1988. Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2803-2807.
196. Wolf N. L., 1990. Abiotic transformation of pesticides in natural waters and sediments.
197. Wood Powell E., 1977. *Weed sciences principles*. West publishing company, 21^{ème} N.D Reprint. 1979-598.
198. Yatome C., Ogawa T., Ldaka E., 1981. Degradation of p-aminoazobenzene by means of cell-free extracts from *Aeromonas hydrophila* Var. 24 B and *Pseudomonas pseudomallei* 13 NA. *Appl. Microbiology. Biotechnology.* 12: 189-191.
199. Yeom S., Daugulis A.J., 2001. Benzène degradation in a two phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylosoxidans*. *Process Biochem.* 36: 765-772.
200. Zaidi B.R., Stucki G., Alexander M., 1988. Low chemical concentration and pH as factors limiting the success of inoculation to enhance biodegradation. *Environ. Toxicol. Chem.* 7: 143-151.

ANNEXE

1. Milieux de culture :

1.1. Gélose nutritive :

- **Composition :**

Extrait de viande1 g/l
Extrait de levure.....2 g/l
Peptone5 g/l
Chlorure de sodium.....15 g/l
pH à 37°C..... 7,4
Préparation : 28 g par litre d'eau distillée. Autoclavage classique.

1.2. Milieu Mannitol mobilité :

- **Composition :**

Peptone tryptique de viande.....20 g
Gélose.....4 g
Mannitol.....12 g
KNO₃.....1 g
Rouge de phénol à 1%.....4 ml
Préparation : 22 g par litre d'eau distillée. Autoclavage classique.

2. Solutions :

2.1. Tampon phosphate à pH 7 :

- **Composition:**

NaH₂PO₄1,2 g
Na₂HPO₄0,885 g
Eau distillée.....1000 ml

2.2. Tampon phosphate sodium (PBS) :

- **Composition:**

KH₂PO₄0,29 g
K₂HPO₄.....1,19 g
NaCl4,93 g
Eau distillée.....1000 ml
pH.....7,2 ± 2

3. Les colorants :

3.1. Solution de Lugol :

- **Composition :**

Iode1 g
Iodure de potassium.....2 g
Eau distillée.....200 ml

3.2. Violet de Gentiane :

- **Composition :**

Colorant.....1 g
Alcool 96°.....10 cm³
Phénol cristallisé.....2 g
Eau distillée.....100 cm³

3.3. Fuschine phénique de ZIEHL :

- **Composition :**

Fuschine basique.....1 g
Alcool 96°.....10 cm³
Phénol.....5 g
Eau distillée.....100 cm³