

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1

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



N° de série :

N° d'ordre :

Thèse

Présentée pour l'obtention du **Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle LMD**
En Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement

Par

Ouided Benslama

**Isolement et caractérisation des bactéries capables de dégrader
l'herbicide Glyphosate et optimisation des conditions de culture
pour une dégradation plus efficace**

Soutenue : le 26 / 05 / 2014

Devant le jury

Président :	Mihoubi Ilhem	Pr. Université Constantine 1
Directeur de thèse :	Boulahrouf Abderrahmane	Pr. Université Constantine 1
Examineurs :	Karam Noureddine	Pr. Université d'Oran
	Houhamdi Moussa	Pr. Université de Guelma "8 Mai 1945"
	Guechi Abdelhadi	Pr. Université de Sétif 1 "Ferhat Abbas"

Année universitaire 2013/2014

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, le Professeur Boulahrouf Abderrahmane, pour son encadrement, pas seulement durant ces cinq années de thèse mais durant tout mon parcours universitaire. Merci pour ses conseils avisés, pour sa disponibilité et ses encouragements.

Je tiens à remercier le professeur Mihoubi Ilhem pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Je remercie également les professeurs Karam Noureddine, Houhamdi Moussa et Guechi Abdelhadi qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mon travail. Qu'ils en soient sincèrement remerciés.

Mes remerciements vont aussi au Professeur Michel Drancourt de l'Université Aix-Marseille, Unité des Rickettsies, Faculté de Médecine, Marseille, France qui a accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire.

Je voudrais adresser de sincères remerciements au docteur Haïtham Elbir de l'Université Aix-Marseille, qui a suivi de très près la partie de biologie moléculaire et bioinformatique de ma thèse. Il m'a fait part de ses petits secrets de laboratoire et m'a donné de très bons conseils qui au fil de nos discussions ont fait progresser ma réflexion.

Je suis très reconnaissant au Dr Véronique Roux de l'Université Aix-Marseille, pour sa disponibilité et ses conseils qui ont aussi beaucoup contribué au bon déroulement de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent au Dr Sirwan de l'Université Aix-Marseille, qui m'a fait profiter de ses connaissances sur la plate forme Biolog Omnilog.

Un merci particulier à mon amie très chère Soumaya, à qui je dois vraiment beaucoup, je te remercie pour ton soutien, ton chaleureux accueil à Marseille, tes encouragements, ta patience et encore bien plus... Merci d'être là a tout moment.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire de Génie microbiologique et application, Sarah, Dallel, khaled, Merième, Mouna, Billel et en particulier Fatah qui répond toujours présent lorsque j'avais besoin d'aide.

Je n'ai pas oublié de remercier mes joyeux compagnons de route. Un grand grand grand merci a mes amies Wafa, Kaouthar, Hind, Amira, Zineb, Sanna et Merième pour leur amitié et les moments inoubliables qu'on a passé ensemble tout au long de notre parcours.

Une pensée particulière pour mes sœurs Ikram et Yousra, mon cher frère Oussama et mon époux Malik qui ont toujours été d'un soutien inconditionnel, et surtout, d'une tolérance (presque) sans limites à mes humeurs. Sans vous, rien n'aurait été possible, et je vous en remercie.

Mes derniers remerciements, mais pas les moindres vont à mes parents Ahlem et Rabai qui ont été mes meilleurs enseignants, et auxquels je dois tout ce que j'ai actuellement. Je leur dédie ma thèse.

Les travaux de thèse ont donné lieu à des publications et à des communications dans le cadre de séminaires.

Articles

Accepté :

Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. **Ouided Benslama** and Abderrahmane Boulahrouf. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(49), pp. 5587-5595. (Impact factor : 0,54)

Impact of glyphosate application on the microbial activity of two Algerian soils. **Ouided Benslama** and Abderrahmane Boulahrouf. International journal of current microbiology and applied sciences. Vol. 2 (12), pp. 628-653. (Impact factor : 1,59)

En cours :

Enterobacter biskrae sp. nov. and *Enterobacter zibanae* sp. nov., two glyphosate-degrading bacteria isolated from soil in Biskra, Algeria. **Ouided Benslama**, Veronique Roux, Haitham Elbir, Abderrahmane Boulahrouf and Michel Drancourt

Séminaires

Isolement et caractérisation de bactéries capable de dégrader l'herbicide glyphosate a partir de trois sols algériens basée sur l'analyse génotypique, phénotypique et la MALDI TOF. **Ouided Benslama** et Abderrahmane Boulahrouf. Communication par affiche. 9^{ème} journées scientifiques de microbiologie, Hammamet, 15- 17 Novembre 2013.

Impact de l'application du glyphosate sur l'activité microbienne de deux sols algériens. **Benslama Ouided**, Boulahrouf Abderrahmane. Communication par affiche. 25^{ème} Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) à Hammamet- Tunisie du 24 au 27 Mars 2014.

Table des matières

Liste des tableaux et des figures.....	viii
Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique.....	7
1. Généralités sur les pesticides.....	8
1.1. Définition d'un pesticide.....	8
1.2. Composition et formulation.....	8
1.3. Classification des pesticides.....	9
1.3.1. Classification chimique.....	9
1.3.2. Classification biologique.....	10
1.4. Mode d'action des pesticides.....	11
2. Comportement et devenir des pesticides dans l'environnement.....	12
2.1. Apport des pesticides et leur rétention dans le sol.....	12
2.2. Les interactions moléculaires de l'adsorption sol/pesticides.....	13
2.3. La mobilisation des pesticides.....	13
2.4. La dégradation des pesticides.....	14
3. L'herbicide glyphosate.....	15
3.1. Généralités.....	15
3.1.1. Structure chimique.....	15
3.1.2. Mode d'action.....	15
3.1.3. Les spécialités commerciales à base de glyphosate.....	16
3.1.4. Les adjuvants du glyphosate.....	17
3.2. Comportement du glyphosate dans le sol.....	17
4. Dégradation microbienne des pesticides.....	18
4.1. Généralités.....	18

4.2. Facteurs de croissance des microorganismes dégradants.....	19
4.3. Mécanismes de la dégradation microbienne.....	21
4.4. Les principales réactions de la dégradation biotique et les enzymes impliquées dans la dégradation.....	25
4.5. Dégradation du glyphosate.....	28
4.5.1. La dégradation chimique.....	28
4.5.2. La photodégradation	28
4.5.3. La dégradation biologique.....	29
5. Impact du glyphosate sur la microflore du sol.....	31
6. Les microorganismes dégradant les composés organophosphorés (OP).....	32
Chapitre 1 : Isolement et identification des souches dégradant le glyphosate.....	37
1. Introduction.....	38
2. Matériel et méthodes.....	39
2.1. Sites de prélèvement.....	39
2.2. Echantillonnage.....	39
2.3. Enrichissement et isolement des souches dégradant le Glyphosate.....	40
2.4. Identification phénotypique.....	40
2.4.1. Le système API.....	40
2.4.2. La spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice-Temps de vol (Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation. Time Of Flight Mass Spectrometry) (MALDI TOF).....	41
2.4.3. La sensibilité aux antibiotiques.....	42
2.4.4. Le système de plaques phénotypiques : Phenotype MicroArrays (PM) (Biolog-Omnilog).....	42
2.5. Identification phylogénique.....	46
2.5.1. Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S.....	46
2.5.2. Amplification et séquençage du gène <i>rpoB</i>	47
2.5.3. Amplification et séquençage du gène <i>hsp60</i>	48

2.5.4. Amplification et séquençage du gène <i>gyrB</i>	48
2.5.5. Amplification et séquençage du gène <i>dnaJ</i>	48
2.5.5. Analyse des Séquences.....	48
3. Résultats et discussion.....	50
3.1. Identification des isolats.....	50
3.2. Analyse phénotypique des deux nouvelles espèces <i>Enterobacter biskrae</i> sp. nov. et <i>Enterobacter zibanae</i> sp. nov. par le système des plaques phénotypiques (PM) Biolog-Omnilog.....	83
4. Conclusion.....	91
Chapitre 2 : Biodégradation du glyphosate et son effet sur l'activité microbienne du sol.....	94
1. Introduction.....	95
2. Matériel et méthodes.....	97
2.1. Cinétique de biodégradation du glyphosate.....	97
2.1.1. Préparation des inocula.....	97
2.1.2. Suivi de l'évolution de la biomasse des différents isolats.....	97
2.2. Optimisation des conditions de culture des deux souches représentatives de la dégradation du glyphosate.....	97
2.2.1 Effet des nutriments.....	98
2.2.2. Effet de la température.....	98
2.2.3. Effet du pH.....	98
2.2.4. Effet de la concentration initiale du glyphosate.....	99
2.3. Effet du glyphosate sur l'activité microbienne du sol.....	99
2.3.1. Les sols d'étude.....	99
2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons.....	99
2.3.3. Traitement des sols.....	100
2.3.4. Analyse microbiologique du sol.....	100
2.3.4.1. Dénombrement des microorganismes.....	100

2.3.4.2. La respiration basale du sol (SBR).....	100
3. Résultat et discussion.....	102
3.1. Suivie de l'évolution de la biomasse des différentes souches en présence du glyphosate comme seule source de carbone ou de phosphore.....	102
3.2. Effet des facteurs abiotiques sur l'utilisation du glyphosate par les deux souches <i>Pseudomonas putida</i> et <i>Enterobacter zibanae</i> sp. nov.....	104
3.3. Effet du glyphosate sur la l'activité microbienne du sol.....	111
3.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols.....	111
3.4. Effet du glyphosate sur la respiration microbienne.....	113
4. Conclusion.....	115
Conclusion générale.....	117
Références bibliographiques.....	121
Annexes.....	146
Annexe 1 : Produits et milieux de cultures.....	147
Annexe 2 : Tableaux complémentaires.....	149

Listes des figures

Figure 1. La structure chimique de la forme acide du glyphosate

Figure 2. Voies de dégradation biologique du glyphosate

Figure 3. Étapes d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.

Figure 4. Étapes d'inoculation des PM à partir d'une suspension bactérienne.

Figure 5. Phases expérimentales de la technique des plaques phénotypiques (PM). Pour déterminer le profil phénotypique d'une souche bactérienne, une suspension cellulaire est préparée et inoculée sur des plaques PM. Les plaques PM sont incubées dans le système PM OmniLog (incubateur et lecteur). La réduction du colorant tétrazolium engendre la formation d'une couleur pourpre qui est enregistrée par une caméra CCD toutes les 15 min et fournit des informations quantitatives et des cinétiques de la réponse des cellules dans les plaques PM.

Figure 6. Etapes de l'identification phylogénique

Figure 7. Spectre de masse de **Arph1**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

Figure 8. Antibiogramme de l'isolat Arph1 sur milieu MH2

Figure 9. Spectre de masse de **Arph2**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

Figure 10. Antibiogramme de l'isolat **Arph2** sur milieu MH2

Figure 11. Spectre de masse de **Frglu**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

Figure 12. Antibiogramme de l'isolat Frglu sur milieu MH2

Figure 13. Spectre de masse de **Frph**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré

Figure 14. Antibiogramme de l'isolat **Frph** sur milieu MH2

Figure 15. Spectre de masse de **Bisglu**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

Figure 16. Antibiogramme de l'isolat **Bisglu** sur milieu MH2

Figure 17. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de l'ARNr 16S de différentes souches d'Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 18. Spectre de masse de référence de Bisph1. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré

Figure 19. Spectre de masse de référence de **Bisph2**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

Figure 20. La coloration de Gram de l'isolat **Bisph1**.

Figure 21. La coloration de Gram de l'isolat **Bisph2**.

Figure 22. Microscopie électronique de transmission de **Bisph1** en utilisant un 268D Morgani (Philips) à une tension de fonctionnement de 60 kV. La barre d'échelle représente 1000 nm.

Figure 23. Microscopie électronique de transmission de **Bisph2** en utilisant un 268D Morgani (Philips) à une tension de fonctionnement de 60 kV. La barre d'échelle représente 1000 nm.

Figure 24. Résultat de la galerie Api 20 E des isolats **Bisph1** en haut et **Bisph2** en bas.

Figure 25. Résultat de la galerie Api 50CH des isolats **Bisph1** à gauche et **Bisph2** à droite.

Figure 26. Résultat de la galerie API ZYM des isolats **Bisph1** en haut et **Bisph2** en bas.

Figure 27. Antibiogrammes des isolats **Bisph1** (à gauche) et **Bisph2** (à droite) sur milieu MH2

Figure 28. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de l'ARNr 16S de différentes souches de la famille d'Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 29. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de *rpoB* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 30. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de *hsp60* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 31. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de *gyrB* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 32. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de *dnaJ* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 33. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur la concaténation des gène l'ARNr 16S, *hsp60*, *rpoB*, *gyrB*, et *DnaJ* de différentes souches de la famille des

Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisés.

Figure 34. Voie de la respiration couplée à la physiologie cellulaire.

Figure 35. Analyse des PM1 (en haut), PM2A (en bas) de la souche *Enterobacter biskrae* sp. nov. Le tableau à gauche comprend les données relatives à la plaque PM (type de plaque, heure, date et type d'organisme). Le tableau à droite en haut présente la réponse de la souche pour les différentes sources présentent dans chaque puits. Au milieu une photo réelle de la plaque en couleur. Le tableau en bas présente les valeurs données par le logiciel Omnilog concernant le taux de respiration dans chaque puits.

Figure 36. Analyse des PM1 (en haut) , PM 2A (en bas) de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov.

Figure 37. Représentations graphiques du métabolisme de la souche *Enterobacter biskrae* sp. nov. et son profil phénotypique de sensibilité. Les tableaux sont des représentation des différentes plaques PM à 96 puits. Au sein de chaque représentation, le temps de la parcelle est sur l'axe des x par rapport à la valeur OmniLog sur l'axe des y. Chaque plaque est identifiée par un numéro de plaque dans la partie supérieure gauche du tableau qui identifie les tests phénotypiques pour chaque tableau. Les plaques sont arrangées selon l'ordre PM1A, PM2A, PM10, PM11, PM12, PM13, PM14, PM15, PM16. PM1 et PM2 contiennent des tests de carbone. PM10 contient le test de pH. Les puits témoins négatifs pour les essais d'utilisation de substrats métaboliques sont en position A1 de PM1 et 2A. PM11-16 contiennent des tests de sensibilité chimique. Une carte complète du contenu de chaque puits peut être consultée sur les **Tableaux complémentaires (1,2 et 3)**.

Figure 38. Représentations graphiques du métabolisme de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. et son profil phénotypique de sensibilité.

Figure 39a. Cinétique de croissance de *P.pudida*, *E. cloacae*, *R.aquatilis*, *E. biskrae* sp. nov. et *E. zibanae* sp. nov. en présence de glyphosate comme seule source de phosphore.

Figure 39b. Cinétique de croissance de *E. cloacae* and *S. marscecens* en présence de glyphosate comme seule source de carbone.

Figure 40. Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas putida* en présence du glyphosate comme seule source de phosphore avec différents nutriments.

Figure 41. Cinétique de croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. en présence du glyphosate comme seule source de phosphore avec différents nutriments.

Figure 42. Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas putida* en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et de glutamate (0,1% p/v) à des températures différentes.

Figure 43. Cinétique de croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et d'extrait de levure (0,1% p/v) à des températures différentes.

Figure 44. Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas putida* en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et de glutamate (0,1% p/v), à 30°C, à différents pH.

Figure 45. Cinétique de croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et d'extrait de levure (0,1% p/v) à 30°C, à différents pH.

Figure 46. Effet de différentes concentrations de glyphosate sur la croissance de la souche *Pseudomonas putida*.

Figure 47. Effet de différentes concentrations de glyphosate sur la croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov.

Figure 48. Dispositif de l'expérimentation de la respiration basale

Figure 49. Evolution du dioxyde de carbone des deux sols forestiers et Saharien avec et sans traitement par le glyphosate

Liste des tableaux

Tableau 1. Les microorganismes isolés dégradant les composés organophosphorés. Le symbole entre parenthèses après le mode de dégradation représente le type d'élément nutritif que le pesticide fournit aux microorganismes dégradant. C, le carbone ; N, l'azote ; P, le phosphore. ND, non défini

Tableau 2. Séquences des différentes amorces utilisées dans l'amplification et le séquençage des gènes ARNr 16S, *rpoB*, *hsp60*, *gyrB* et *dnaJ*.

Tableau 3. Propriétés morphologiques et biochimiques des différents isolats. (+) isolat positif; (-) isolat négatif.

Tableau 4. Test de sensibilité aux antibiotiques des différents isolats. (S) sensible ; (R) résistant ; (-) non testé.

Tableau 5 . Test API 20 pour les isolats Bisph1 et Bisph 2

Tableau 6 . Test API 50 CH pour les isolats Bisph1 et Bisph 2

Tableau 7. Test API ZYM pour les isolats Bisph1 et Bisph 2

Tableau 8. Test de sensibilité aux antibiotiques des deux isolats Bisph1 et Bisph 2. (S) sensible ; (R) résistant ; (R/S) intermédiaire.

Tableau 9. Les caractéristiques phénotypiques qui distinguent les membres du genre *Enterobacter* (Grimont et Grimont , 2005)

Tableau 10. Caractéristiques physico-chimique des sols forestier et Saharien

Tableau 11. Type et nombre de microorganismes détectés dans le sol Saharien et forestier avant et après incubation pendant 30 jours avec et sans ajout de glyphosate

Tableau complémentaire 1. Réactions biochimiques des souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. dans les MicroPlaques™ PM1, PM2A du Biolog après 48 heures. (+) croissance ; (-) pas de croissance.

Tableau complémentaire 2. Tests de pH des souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. dans la MicroPlaquette™ PM10 du Biolog. (+) croissance; (-) pas de croissance.

Tableau complémentaire 3. Tests de sensibilité des deux souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. dans les MicroPlaques™ PM11C- PM16A du Biolog. "R" résistante, "S" sensible. "R/S" intermédiaire

Introduction générale

Introduction générale

La prise de conscience de la nécessité de protéger les cultures est certainement simultanée à la naissance de l'agriculture (Schiavon , 1978). Depuis le Néolithique, l'Homme tire sa subsistance principale de l'agriculture. Il apprend au fur et à mesure à promouvoir les espèces exploitées et à contrer leurs compétiteurs. Qu'elle soit avant ou après la récolte, la lutte contre les nuisibles des cultures se fit d'abord par des procédés physiques et manuels, puis par des méthodes chimiques. Homère et Pline l'Ancien relatent respectivement fumigations soufrées et usage de l'arsenic comme insecticide. Au Moyen Age, l'utilisation de sels d'arsenic est relatée contre les Fourmis.

Empiriques, ces tentatives contre les ravageurs furent en général peu efficaces. Il faut attendre l'emploi, en 1763, de jus de tabac sur des pêchers infestés de pucerons pour attribuer un résultat convaincant à un traitement organique sur une culture. Jusqu'à la première moitié du XXème siècle, les produits phytosanitaires sont essentiellement des dérivés minéraux (arsenic contre le doryphore de la pomme de terre aux Etats-Unis, sulfate de cuivre contre le mildiou de la vigne en France...) ou végétaux (roténone issue des racines de Derris malaisien ou Lonchocarpus américain, pyrèthre issue des fleurs de chrysanthème) (Calvet *et al.*, 2005).

À partir de 1931 apparaissent les pesticides organiques de synthèse tels que les organochlorés dont le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) (Mouchet, 1994). Cependant, afin de pouvoir pénétrer dans les organismes à combattre, les pesticides doivent franchir des barrières lipidiques (cuticule des plantes, chitine des insectes et des mycètes). Pour cela, des formulations très lipophiles difficilement dégradables sont d'abord recherchées. Ces caractéristiques mêmes amenèrent ces pesticides à s'accumuler dans les corps gras et les tissus riches en lipide, notamment chez l'Homme, et à polluer durablement les sites traités (produits rémanents). Lorsque ce phénomène a été constaté, d'autres pesticides, plus toxiques et donc d'action plus rapide mais plus rapidement dégradés, furent promus: les organophosphorés comme le malathion (1950). Bientôt, des pesticides plus spécifiques furent élaborés, tantôt en copiant des pesticides d'origine végétale (pyréthrinoides, 1974), tantôt en stimulant les défenses naturelles des plantes (phoséthyl-aluminium, 1977) mais surtout peu lipophiles (glyphosate, ammonium quaternaires...) (Tissut *et al.*, 2006).

Depuis cette date, la consommation des pesticides est toujours en croissance. De 140 tonnes de pesticides en 1940, la consommation à l'échelle mondiale est passée en 1997 à 600 000 tonnes. Ainsi en 1991, environ 23 400 produits pesticides étaient enregistrés par l'Agence de Protection de l'Environnement aux Etats-Unis (UIPP, 2007).

Aujourd'hui, ce sont plus de 500 matières actives qui sont utilisées dans l'environnement et la consommation annuelle est estimée à environ 4 millions tonnes au niveau mondial. Seulement environ 1% de cette quantité arrive directement sur les parasites cible, tandis que près de 30 à 50% de la quantité peut être perdue dans l'air (Gavrilescu, 2005 ; Gil et Sinfort, 2005).

L'utilisation intensive des produits phytosanitaires entraîne également différentes pollution des eaux et des sols. Cette contamination est régie par plusieurs facteurs, les propriétés physico-chimiques et hydrauliques des sols, les propriétés des pesticides et le mode d'application (Gavrilescu, 2005 ; Schieweck *et al.*, 2007). De part leurs caractéristiques physico-chimiques, ces composés présentent des dangers pour l'environnement et les organismes vivants. Ils entrent dans la chaîne alimentaire, et finissent, à termes, par menacer la santé humaine.

Ce travail de recherche s'inscrit dans le contexte de pollution des sols par les molécules xénobiotiques qui par définition sont des substances possédant des propriétés toxiques même à de très faibles concentrations. Bien que ces xénobiotiques puissent être d'origine naturelle et utilisés dans le cadre de la compétition inter-espèces (Coleman *et al.*, 1997), une majorité a une origine anthropique. Une pollution est définie comme une introduction dans l'environnement (air, eau, sol) de substances portant atteinte à la santé humaine et aux écosystèmes. Elle est essentiellement liée aux activités humaines. Ainsi, la révolution industrielle entamée au XIX^{ème} siècle a largement contribué à l'état de pollution actuel de notre environnement. La prise de conscience des atteintes à l'environnement n'est que relativement récente puisque le premier meeting international sur les sols pollués n'a eu lieu qu'en 1985 au Pays Bas. Ce fut l'occasion de reconnaître le besoin de comprendre les processus à l'origine de ces pollutions et de trouver des moyens possibles de dépollution (Assink and Van den Brink, 1986). Les pollutions du sol sont d'origine industrielle, agricole ou urbaine et ces différentes sources entraînent la présence de nombreuses molécules xénobiotiques différentes. Ainsi, les polluants organiques d'origine agricole incluent les fertilisants et les pesticides.

Il est donc primordial de mettre en œuvre des moyens de dépollution des sites contaminés. Leur réhabilitation peut être réalisée par traitement physico-chimique sur site ou après excavation des sols. Ces techniques sont coûteuses et non respectueuses des écosystèmes. Cependant, pour certains polluants organiques (les hydrocarbures et certains solvants chlorés), une approche par bioremédiation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse.

Les bactéries présentes dans presque tous les types de biotopes rencontrés sur terre sont les organismes les plus ubiquitaires de notre planète. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs (Fredrickson *et al.*, 2004), de la croûte terrestre, sur la peau et dans l'intestin des animaux, mais elles peuvent également être rencontrées dans des environnements plus extrêmes tels que des lacs salés, des banquises, des sources d'eau chaude, des sols arides, etc.

Nous estimons que le nombre de cellules bactériennes dans la biosphère se situerait entre 4 et 6 10³⁰ (Whitman *et al.*, 1998), représentant une grande partie de la biomasse de notre planète. Les bactéries ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques comme par exemple dans ceux du carbone ou de l'azote avec un rôle fondamental dans la fixation de l'azote atmosphérique, fonction qui a beaucoup été étudiée depuis plusieurs dizaines d'années (Vitousek, 1991).

La capacité des bactéries hétérotrophes à dégrader une large variété de composés organiques est exploitée pour le traitement des sols pollués dans des stratégies de bioremédiation ou pour le traitement des eaux usées (Furukawa, 2003). Des bactéries sont également utilisées dans les fosses septiques pour en assurer l'épuration.

La biodégradabilité de certaines familles de pesticides a été bien étudiée. Ainsi, la biodégradation des hydrocarbures mono-aromatiques ou BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et les trois isomères du xylène, *para-*, *ortho-* et *meta-*) est bien documentée. De nombreux microorganismes aérobies, capables de les utiliser, ont été isolés et les voies de dégradation ainsi que les enzymes impliquées sont connues. Par contre, la biodégradabilité d'autres familles chimiques est mal connue. Ce manque de connaissances est soit lié au fait que des études approfondies n'ont pas été conduites, soit à la difficulté à isoler des microorganismes dégradant ces produits.

En Algérie, comme ailleurs, les agriculteurs utilisent abondamment les pesticides. En conséquence, le risque de pollution des ressources en eau par les résidus de produits phytosanitaires est susceptible d'être très élevé. Même si l'activité agricole s'efforce maintenant de présenter une image de qualité et de préservation du milieu environnemental.

Parmi les produits phytosanitaires disponibles sur le marché Algérien, le Roundup (glyphosate) est l'herbicide le plus utilisé à l'échelle mondiale (Amand et Jacobsen, 2001). Etant un herbicide facile d'emploi, efficace et de faible coût, il a été appliqué massivement, en résultant une contamination chronique des sols, des eaux souterraines et de surface.

Le territoire Algérien est caractérisé par un écosystème méditerranéen au Nord, aride au Sud et une région intermédiaire semi-aride. Malgré l'utilisation intensive du glyphosate en Algérie dans ces différents écosystèmes, aucune recherche n'a portée sur l'isolement des bactéries capables de dégrader cet herbicide des sols Algériens et sur leur éventuelle activité et/ou adaptation contre ces molécules.

Plusieurs souches bactériennes qui étaient capables de dégrader le glyphosate ont été isolées, la plupart de ces bactéries ont été isolées à partir de sites déjà traités par l'herbicide. Cependant, il ya peu de rapports sur l'isolement de bactéries provenant de sites non traités et aucun rapport de bactéries dégradant le glyphosate isolées des sols Sahariens. Les rapports précédents ont été principalement axés sur le dépistage des bactéries pour leur capacité à dégrader le glyphosate. Cependant, les études exhaustives sur la régulation physiologique dans les cellules bactériennes sont plutôt rares (Shushkova *et al.*, 2012). Ainsi, l'optimisation des conditions de culture est importante pour comprendre cette régulation physiologique, et l'identification de ces conditions rendra possible de savoir quels facteurs peuvent être appliqués pour les bactéries dans les sols au cours de la bioremédiation. La plupart des informations sur l'effet non-cible du glyphosate proviennent des études sur des sols agricoles. La connaissance de la réponse des microorganismes des sols forestiers au glyphosate est limitée, et aucune étude traitant la réponse des microorganismes des sols Sahariens n'a été faite au paravent.

Dans ce contexte, et dans la mesure où la contamination des sols Algériens par le glyphosate est avérée, nous avons choisi cette molécule pour mener notre étude, qui s'articule autour d'un axe principal, à savoir l'étude des souches bactériennes capables de dégrader le glyphosate pour une éventuelle application biotechnologique dans une stratégie de

bioremédiation . Afin de prendre en compte la diversité des sols Algériens, nous avons retenu pour notre étude trois sols différents, un sol forestier, un sol agricole de Constantine et un sol Saharien de Biskra. Ces sols aux propriétés physico-chimique contrastées, sont représentatifs des régions arides et semi-arides.

Pour isoler des bactéries capables de dégrader l'herbicide glyphosate, un ensemble d'expérimentations sera mis en œuvre. Le processus d'expérimentation est basé sur l'augmentation progressive de la concentration initiale en glyphosate dans le milieu de culture contenant ce composé comme seule source de carbone ou de phosphore afin de créer une tension sélective où seules les bactéries qui résistent au glyphosate et peuvent l'utiliser restent dans le milieu.

Pour l'identification des souches, éventuellement, isolées, les caractéristiques génotypiques et phénotypiques de ces souches seront analysées en utilisant plusieurs techniques.

Considérant, la variabilité de la capacité de dégradation des microorganismes, nous entreprendront, dans un premier temps, une étude de la dégradation du glyphosate par les différentes souches isolées, purifiées et identifiées en conditions de culture contrôlées en mesurant la turbidimétrie des milieux de culture, afin de comparer la croissance des différentes souches testées et trouver parmi elles les souches les plus performantes. Dans un deuxième temps certaines conditions de cultures pour ces souches seront étudiées afin de les optimiser dans le but de fournir une efficacité maximale de la dégradation du glyphosate.

Enfin, les effets secondaires du glyphosate sur l'activité microbiologique du sol forestier et du sol Saharien seront déterminés par l'évaluation de la composition des microorganismes cultivables et de la respiration basale avant et après traitement par l'herbicide. Cette expérimentation devait nous renseigner sur les risques écologiques du glyphosate. L'utilisation de deux terres différentes devrait également nous permettre d'apprécier l'influence des caractères physico-chimiques du sol sur l'impact du glyphosate sur l'activité microbienne du sol.

Les résultats de ces travaux font l'objet de deux chapitres successifs précédés d'une étude bibliographique abordant d'un côté les principales espèces microbiennes isolées jusqu'à maintenant capables de dégrader les composés organophosphorés et plus particulièrement le glyphosate ainsi que leur mécanismes de dégradation. Et d'un autre côté, les principaux

travaux réalisés sur l'impact du glyphosate sur la microflore du sol. Enfin, dans la conclusion générale, nous tenterons de mettre en avant les points importants apportés par notre travail, ainsi que nos futures perspectives.

Etude bibliographique

1. Généralités sur les pesticides

1.1. Définition d'un pesticide

Selon le Code de conduite de la FAO sur la distribution et l'utilisation des pesticides (Version novembre 2002), «un pesticide est une substance ou association de substances destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines et animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux ».

D'un point de vue réglementaire, nous distinguons les pesticides utilisés principalement pour la protection des végétaux que nous appelons produits phyto-pharmaceutiques (directive 91/414/CE) ou plus communément produits phytosanitaires et d'autres dénommés biocides (directive 98/8/CE). Par exemple, un insecticide sera un produit phytosanitaire s'il est utilisé sur du blé mais un biocide dès lors qu'il est utilisé sur du bois de charpentes (Devillers *et al.*, 2005).

De manière plus concise, les produits phytosanitaires, sont définis comme des substances dont les propriétés chimiques contribuent à la protection des plantes cultivées et des produits récoltés, ils améliorent ainsi à la fois la quantité et la qualité des denrées alimentaires. Leur composition et leur structure sont très variées, de sorte que leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques le sont aussi, ce qui explique leurs multiples usages, leurs dangers, ainsi que les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols (Gariido Frenich *et al.*, 2004).

1.2. Composition et formulation

Les produits phytosanitaires contiennent une ou plusieurs substances chimiques minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles. Ceux utilisés aujourd'hui sont, la plupart, de nature organique dont un petit nombre est extrait ou dérivé des plantes.

Les formulations sont en générale composées d'une ou plusieurs substances actives et d'un ou plusieurs adjuvants. La substance active exerce une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux ; c'est elle qui confère au produit l'effet désiré. L'adjuvant quant à lui est une substance dépourvue d'activité biologique jugée suffisante dans la pratique, mais capable de modifier des propriétés physiques, chimiques ou biologiques des

produits phytosanitaires. Il renforce l'efficacité, la sécurité du produit et sa facilité d'utilisation (ACTA, 2006).

La formulation correspond, aussi, à la forme physique sous laquelle le produit phytopharmaceutique est mis sur le marché. Obtenue par le mélange des matières actives et des adjuvants, elle se présente sous une multitude de formes, solides ou liquides. La teneur en matière active s'exprime en g/l pour les formulations liquides et en pourcentage (%) pour les formulations solides. La dose d'emploi en produit commercial s'exprime en l/ha pour des 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. (Coulibaly, 2005).

1.3. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités biologiques que leur classification est complexe. D'une manière générale les pesticides peuvent être classés selon deux façons: selon les organismes vivants visés et selon leurs caractéristiques chimiques.

1.3.1. Classification chimique

Il existe trois catégories de pesticides.

- les pesticides inorganiques

Il n'existe plus d'insecticides inorganiques et un seul herbicide est encore employé, aujourd'hui, comme désherbant total, le chlorate de sodium. L'essentiel des pesticides inorganiques sont des fongicides à base de soufre et de cuivre.

- les pesticides organo-métalliques

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. Des exemples de ces pesticides sont le mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse) (Calvet *et al.*, 2005).

- **les pesticides organiques**

Il existe actuellement plus de 80 familles ou classe chimiques mais leur appellation sont parfois arbitraires. Les principales familles chimiques de pesticides identifiés par des groupes d'atomes constituant une fonction chimique particulière sont : les acides carboxyliques, les amines, les carbamates, les thiocarbamates, les hétérocycles azotés, les azoles, les organophosphorés, les pyréthrinoides, les urées substituées, les sulfonilurées, les uraciles et les diphényles éther (Pesticide Manual, 1995).

1.3.2. Classification biologique

Selon les organismes vivants visés, nous distinguons plusieurs catégories de pesticides dont les principales sont les insecticides, les fongicides et les herbicides.

- **Les herbicides**

Les herbicides représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, toutes cultures confondues. Ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Les herbicides possèdent différents modes d'action sur les plantes, ils peuvent être des perturbateurs de la régulation d'une hormone de croissance telle que l'auxine, de la photosynthèse, des inhibiteurs de la division cellulaire, de la synthèse des lipides, de la cellulose ou des acides aminés.

- **Les fongicides**

Les fongicides permettent quant à eux à éliminer ou limiter le développement des champignons parasites des végétaux. Ils peuvent agir différemment sur ces organismes, soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des stérols, de l'ARN polymérase ou de l'adénosine désaminase.

- **Les insecticides**

Les insecticides sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction, différents types existent : les neurotoxines, les insecticides agissant sur la respiration et les insecticides interférant sur la mise en place de la cuticule.

Outre, ces trois familles mentionnées ci-dessus, d'autres peuvent être citées en exemple : les acaricides, contre les acariens ; les némantocides, contre les vers du groupe de nématodes ; les rodenticides, contre les rongeurs ; les taupicides, contre les taupes ; les molluscicides, contre les limaces et escargots ou encore les corvicides et corvifuges, respectivement contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture (ACTA, 2006).

1.4. Mode d'action des pesticides

Il existe plusieurs types d'actions essentiels, mais quel que soit le produit et son activité biologique, il est important de bien distinguer et connaître les deux phases essentielles de son action : son transport jusqu'au récepteur et son action sur celui-ci.

1.4.1. Transport jusqu'au récepteur

La substance active doit parvenir à un récepteur cellulaire en traversant les structures externes de la plante ou de l'insecte.

Le franchissement de la couche de protection, cire ou cuticule des plantes, chitine des insectes, nécessite en général que les molécules actives soient liposolubles. Certaines substances actives pénètrent également par les stomates des feuilles, mais chez les dicotylédones sont un inconvénient important parce qu'ils se trouvent à la face inférieure des feuilles.

Le passage des produits phytosanitaires systémiques dans les parois cellulaires se fait par la sève de la plante (plante à protéger dans le cas des insecticides et des fongicides, adventices à éliminer dans le cas des herbicides) ; les insecticides circulent, également, dans l'organisme cible jusqu'au récepteur par l'hémolymphe ; les rodenticides circulent dans le sang des rongeurs visés. Ces deux phases du transport nécessitent que la substance active soit également suffisamment hydrosoluble (ACTA, 2002).

1.4.2. Action sur le récepteur

Parvenue dans la cellule, la molécule agit sur un récepteur pharmacologique, par exemple pour prendre la place d'un médiateur naturel indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, soit pour l'activer de manière anormale, soit pour le bloquer (cas le plus fréquent). Elle doit donc avoir une structure déterminée qui lui permette d'être reconnue par le

site actif du récepteur et d'interagir avec celui-ci. La géométrie de la molécule, et donc sa stéréochimie, sont alors essentielles. Elle doit aussi avoir des fonctions complémentaires de celles du récepteur. Le produit actif neutralise donc un récepteur et bloque une fonction vitale. (ACTA, 2002).

2. Comportement et devenir des pesticides dans l'environnement

2.1. Apport des pesticides et leur rétention dans le sol

L'apport des pesticides dans le sol à plusieurs origines :

- leur emploi à des fins de protection des plantes, des animaux, de l'homme, des bâtiments et d'habitations à usages agricole,
- leur stockage et leur élimination en tant que produits non utilisés ou comme résidus dans des emballages,
- les rejets dans l'environnement à l'occasion de diverses manipulations au cours du remplissage et du nettoyage des appareils de traitement,
- les déversements accidentels,
- les dépôts d'origine atmosphérique.

Apporté dans le sol, un pesticide peut être retenu par les minéraux et la matière organique, transporté dans l'eau et dans l'air et transformé à des degrés divers jusqu'à sa complète dégradation. Ces processus contribuent au devenir des pesticides et sont le résultat des plusieurs phénomènes qui interviennent simultanément ou successivement. Le devenir d'un pesticide dans le sol dépend de quatre facteurs généraux : le climat, le sol, les propriétés moléculaires et les pratiques agricoles (Calvet *et al.*, 2005).

La rétention est un processus qui immobilise plus au moins longtemps les molécules de pesticides ou de leurs produits de transformation, qu'elles soient dissoutes ou à l'état gazeux ; c'est pourquoi nous parlons aussi d'immobilisation. C'est le transfert d'un composé de la phase liquide ou gazeuse vers la phase solide imputable à des phénomènes physico-chimique d'adsorption et de désorption réversibles ou irréversibles (Mamy, 2004).

2.2. Les interactions moléculaires de l'adsorption sol/pesticides

Les interactions moléculaires de l'adsorption sol/pesticides peuvent être classées en liaisons ioniques et/ou sorption par échange d'ions, liaisons de coordination entre des atomes donneurs des pesticides (azote ou oxygène) et les atomes accepteurs (métaux de transition ou cations échangeables), liaisons hydrogène, liaisons de Van Der Waals (Flogeac, 2004). Les facteurs influençant l'adsorption d'un pesticide par le sol sont: la température, le pH du sol et de l'eau, la distribution de taille des particules et la surface spécifique des solides, le rapport sol/eau, les propriétés physiques de l'adsorbant, et la composition du sol (matière organique, argile ou autre constituant, etc.) (Chafik, 2002).

Une étude sur l'adsorption de trois herbicides (atrazine, terbutryne et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) sur 55 matériaux terreux issue de sols de composition et d'origine très variées, montre que le mécanisme d'adsorption dépend de la nature des sols :

- les sols riches en matière organique adsorbent tous les pesticides non ioniques en grande quantité,
- les pesticides cationiques sont très adsorbés par les sols contenant beaucoup de minéraux argileux (montmorillonite et vermiculite surtout) et de matière organique,
- les pesticides anioniques sont très adsorbés par les sols riches en oxydes et hydroxydes métalliques (Barriuso et Calvet, 1992).

2.3. La mobilisation des pesticides

La rétention prend fin par la libération (ou la mobilisation) des molécules suite à des modifications de la structure de la phase solide ou de la composition de la phase liquide. La concentration d'une solution d'un pesticide mis en contact avec un solide adsorbant diminue à la suite de l'adsorption d'une partie du soluté. Après certain temps plus au moins long selon la vitesse de la réaction, la concentration devient constante et le système solution – liquide est alors à l'équilibre. Si, ensuite, la concentration de la solution est diminuée par la dilution de la phase liquide, l'équilibre thermodynamique est rompu. Le système évolue à nouveau vers un nouvel équilibre, en provoquant le passage dans la solution d'une certaine quantité de pesticides, ce passage est le phénomène de désorption. Il se produit chaque fois que la

concentration de la solution au contact de la phase solide adsorbante est diminuée jusqu'à une limite qui dépend des caractéristiques de l'adsorption (Calvet *et al.*, 2005).

2.4. La dégradation des pesticides

La dégradation des pesticides est un processus clé du devenir des pesticides dans le sol et joue un rôle majeur dans leur dissipation et leur élimination des milieux naturels. Elle est due à de nombreuses transformations chimiques qui modifient la composition et la structure des molécules apportées au sol. Ces modifications peuvent être limitées à l'élimination d'un groupe fonctionnel, conduire à divers produits de transformation et aller jusqu'à la complète dégradation avec la production de molécules minérales (minéralisation). Toute une série de molécules intermédiaires entre la molécule initiale et les molécules finales peuvent ainsi être produites (Calvet *et al.*, 2005). Dans certains cas les métabolites peuvent être plus toxiques et/ou persistants que le pesticide lui-même (Schiavon, 1988 ; Benoit, 1994 ; Remde et Traunspurger, 1994 ; Mansour *et al.*, 1999 ; Tixier *et al.*, 2002). Seule, la minéralisation des pesticides conduit à leur élimination totale des milieux naturels, ce qui lui donne une très grande importance environnementale (Calvet *et al.*, 2005). Les transformations chimiques responsables de la dégradation sont de nature abiotique et biotique.

Les transformations abiotiques sont dues à des réactions chimiques qui ne sont pas catalysées par des systèmes enzymatiques (photoréactions, des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et de conjugaison). La dégradation représente le plus souvent la principale cause de la dissipation des pesticides, sauf pour ceux qui sont très volatils.

La dégradation biotique a lieu dans les milieux naturels comme les sols, les sédiments et les eaux mais elle peut aussi se produire dans les organismes végétaux ou animaux (Calvet *et al.*, 2005). La microflore (les champignons, les algues, les protozoaires et les bactéries) de ces milieux est à l'origine de la dégradation biotique.

3. L'herbicide glyphosate

3.1. Généralités

3.1.1. Structure chimique

Le glyphosate, ou N-phosphonométhyl glycine, est un herbicide dérivé d'un acide aminé, la glycine, appartenant à la famille des organophosphorés (Malik *et al.*, 1989). Il fut découvert en 1970 par un groupe de scientifiques de l'entreprise Monsanto et a été commercialisé pour la première fois en 1974 sous l'appellation de Roundup (Williams *et al.*, 2000). La découverte de l'activité herbicide du glyphosate n'est pas le fruit du hasard; l'équipe de chercheurs avait remarqué une faible activité herbicide en présence de composés chimiquement proches du glyphosate et avait de ce fait mis en place une stratégie de synthèse en cherchant à améliorer l'activité herbicide (Alibhai et Stallings, 2001). Le glyphosate est un acide faible, sa formule chimique est la suivante :

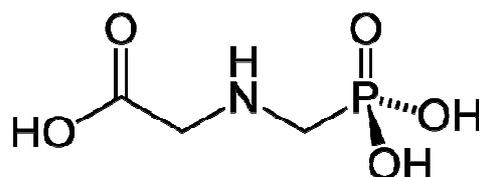


Figure 1. La structure chimique de la forme acide du glyphosate

C'est une molécule non plane en zigzag (Knuutila et Knnutila, 1985), qui se distingue par la présence de deux groupements acides, l'un carboxylique, l'autre phosphonique, et un groupement amine. Le glyphosate est amphotère, ainsi il peut être porteur d'une charge positive, être globalement neutre ou être porteur d'une ou plusieurs charges négatives, ce qui lui donne d'importantes propriétés de former des complexes avec des ions métalliques (Glass, 1987 ; Subramaniam et Hoggard, 1988 ; McBride et Kung, 1989 ; Maqueda *et al.*, 1998 ; Morillo *et al.*, 2000).

3.1.2. Mode d'action

Le glyphosate est absorbé par les feuilles et transporté par le phloème jusqu'aux extrémités des racines et à la rhizosphère (Sprankle *et al.*, 1975c) où il bloque la biosynthèse des acides aminés aromatiques en se liant à l'enzyme EPSPS (5-2-Enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthétase) (Tomlon, 1995 ; Roberts, 1998). Cette enzyme est majoritairement

située dans les chloroplastes (Blachburn et Boutin, 2003). Le déficit en acides aminés aromatiques entraîne l'arrêt de la synthèse des protéines et de la formation de certains composés phénoliques (Cole, 1985). La cessation de la croissance qui découle est alors suivie de nécrose des tissus qui aboutit à la mort de la plante. À signaler que cette voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques n'est pas présente dans le règne animal (Williams *et al.*, 2000 ; Solomon et Thompson, 2003).

Le glyphosate est efficace sur la quasi-totalité des plantes annuelles ou vivaces (Franz, 1997). Il fait partie des pesticides les plus utilisés en terme de volume (Solomon et Thompson, 2003). Non sélectif, il possède un large spectre d'action c'est-à-dire qu'il tue toutes les cultures sur lesquelles il est appliqué (Smith et Oehme, 1992 ; Solomon et Thompson, 2003). Les usages autorisés du glyphosate sont nombreux : Il est très utilisé en agriculture (technique de culture sans labours, application en pré-émergence, destruction des interculturels, culture de plantes génétiquement modifiées résistantes), plantations, forêts, aménagement des espaces vert, viticulture, vergers, aquaculture, entretien des voiries (routes, vois ferrés) (Giesy *et al.*, 2000). Les dose agronomiques homologuées varient entre 0,34 et 1,2 Kg ha⁻¹ pour les espèces annuelles et entre 1,12 et 4,48 kg ha⁻¹ an⁻¹ pour les espèces pérennes (Carlisle et Trevors, 1988). Reddy (2000) a observé que les mauvaises herbes sont détruites à 55% avec 0.56 kg ha⁻¹ et à 98% avec 4.48% kg ha⁻¹.

3.1.3. Les spécialités commerciales à base de glyphosate

Le glyphosate est utilisé principalement sous forme de sels (isopropylamine, trimethylsulfonium, sodium ou ammonium) de manière à le rendre plus soluble dans l'eau. Le glyphosate constitue la matière active la plus souvent utilisée dans les désherbants non rémanents. Les spécialités commerciales présentes sur le marché sont nombreuses: l'Ameg (CFPI Nufarm), le Cargly (Cardel), le Cosmic (Calliope), le Tchao (BHS), le Nomix (Monsanto), le Rodeo (Monsanto) ou encore le Roundup (Monsanto) qui est la gamme de désherbants à base de glyphosate la plus utilisée et celle à laquelle nous nous sommes intéressés. Les produits Roundup contiennent du glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine.

3.1.4. Les adjuvants du glyphosate

Les adjuvants utilisés dans les formulations de glyphosate sont des surfactants. Ils permettent la pénétration du glyphosate dans la plante. Sans surfactant, seul 10% de la quantité de glyphosate pénètre dans la plante. Ces surfactants sont donc indispensables afin d'optimiser l'activité biologique des sels de glyphosate.

Le polyoxyéthylène amine (Polyethoxylated tallow amine ou POEA) est le principal surfactant présent dans la gamme des produits Roundup. C'est un adjuvant cationique (Smith et Oechme, 1992 ; Williams *et al.*, 2000). De nombreuses études montrent que le POEA est plus toxique que le glyphosate (Folmar *et al.*, 1979 ; Mitchell *et al.*, 1987 ; Servizi *et al.*, 1987 ; Adam *et al.*, 1997 ; Mann et Bidwell, 1999 ; Everett et Dickerson, 2003 ; Tsui et Chu, 2003). Tsui et Chu (2003) suggère l'addition dans Roundup d'un protecteur de l'effet du POEA.

3.2. Comportement du glyphosate dans le sol

3.2.1. La rétention

Le glyphosate est amphotère, ce qui lui donne d'importantes propriétés de complexer avec des ions métalliques (Glass, 1987 ; Subramaniam et Hoggard, 1988 ; McBride et Kung, 1989 ; Maqueda *et al.*, 1998 ; Morillo *et al.*, 2000). La formation de complexes est due à des liaisons de coordination par l'azote du groupe amine et des atomes d'oxygène des groupes carboxylique et phosphonique (Subramaniam et Hoggard, 1988). Cette particularité est très dépendante du pH du sol, de la présence de cations échangeables di et trivalents et d'oxydes de fer et d'aluminium chargé positivement (Miles et Moye, 1988).

À l'exception, des sols calcaires et des sols sableux où l'adsorption est modérée (Sprankle *et al.*, 1975a ; Nomura et Hilton, 1977 ; Eberbach et Douglas, 1983 ; Piccolo *et al.*, 1994), le glyphosate est généralement fortement et rapidement adsorbé dans les sols, ce qui le rend peu mobile dans la solution du sol (Spankle *et al.*, 1975 a et b ; Hance, 1976 ; Ruppel *et al.*, 1977 ; Nomura et Hilton, 1977 ; Hensley *et al.*, 1978 ; Carlisle et Trevors, 1988 ; Gerritse *et al.*, 1996 ; Grunewald *et al.*, 2001). Mais l'ampleur de sa rétention est très variable, et dépend fortement du pH, qui lorsqu'il augmente, l'adsorption diminue (Getenga et Kengara, 2004 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Morillo *et al.*, 2000 ; Mc Connel et Hosser, 1985), cela s'explique par la charge négative du glyphosate et des surfaces des minéraux argileux, des oxydes et de

la matière organique lorsque le pH est alcalin, ce qui diminue l'adsorption. Par contre, quand le pH du sol diminue apparaissent des espèces moléculaires (glyphosate et constituants du sol) moins chargées négativement et l'adsorption est facilitée (Morillo *et al.*, 2000 ; De Jonge et De Jonge, 1999 ; Nicholls et Evans, 1991).

Le glyphosate est fortement adsorbé aux argiles. L'intensité de l'adsorption dépend de leur nature minéralogique (Glass, 1987 ; Mc Connell et Hossner, 1985). Ainsi, la montmorillonite, adsorbe plus que l'illite ou que la kaolonite.

La matière organique joue un rôle fondamental dans l'adsorption du glyphosate (Ying Yu et Qi-Xing Zhou, 2004 ; Morillo *et al.*, 2000 ; Piccolo *et al.*, 1996). Feng et Thompson, (1990) observent que 90% de la totalité des résidus de glyphosate sont retenus principalement dans la couche de surface de 0-15 cm, d'un sol forestier où la teneur en matière organique est plus élevée. De même, Barrett et McBride (2006) montrent que le glyphosate est plus adsorbé sur un sol organique que sur un sol minéral. Cette forte adsorption est expliquée par la possibilité de multiples liaisons hydrogène entre les groupe acides de l'herbicide et les groupe acides et oxygénés des composés organiques. C'est la présence de complexes organo-minéraux qui explique l'adsorption du glyphosate sur la matière organique. Le glyphosate peut également interagir avec la matière organique soluble.

4. Dégradation microbienne des pesticides

4.1. Généralités

Les microorganismes dégradant les pesticides sont en majorité des bactéries et des champignons. Leur grande diversité et la multiplicité des conditions de leur développement font qu'ils sont de puissants agents de la dégradation des pesticides. La composition de la microflore est très variable selon la nature des sols, leur pH, les teneurs en carbone organique et en minéraux argileux. La taille de la biomasse microbienne est elle, aussi, très variable en fonction des mêmes facteurs. Elle est en moyenne de 200 mg Kg⁻¹ dans les sols sableux pauvres en matière organique et peut atteindre l'ordre de 900 mg Kg⁻¹ dans les sols riches (teneur en C supérieur à 4%) (Chaussod *et al.*, 1986).

La microflore impliquée dans la dégradation des pesticides est qualifiée de dégradantes pour la distinguer de l'ensemble des microorganismes du sol ; elle n'est généralement pas

limitée à une seule espèce. Son activité dans le processus de dégradation dépend, à la fois de son patrimoine enzymatique qui détermine la nature des réactions chimiques et de son environnement qui exerce une influence sur son développement et sur sa survie. L'aspect fondamental de la dégradation due aux microorganismes est la catalyse des réactions chimiques par des enzymes ; cela nécessite que les pesticides soient à l'état dissous dans la phase liquide du sol. Nous distinguons deux situations :

- les réactions chimiques catalysées par des enzymes intracellulaires ; les pesticides doivent d'abord être absorbés pour être transformés.
- les réactions chimiques catalysées par des enzymes extracellulaires ; l'absorption des pesticides n'est pas nécessaire (Calvet *et al.*, 2005).

Par ailleurs certaines molécules sont résistantes à toute action de dégradation. Les polluants qui sont piégés dans les pores du sol, trop étroits pour que les bactéries puissent y pénétrer, deviennent inaccessibles aux microorganismes et s'accumulent. Les produits phytosanitaires peuvent aussi être complexés avec des polymères organiques résistants à la biotransformation, cas de lignines et de composés humiques. L'accumulation peut aussi être due à des conditions non favorables au développement des microorganismes (manque de nutriments par exemple). Les pesticides et leurs produits de dégradation peuvent aussi être piégés temporairement par les animaux ou les végétaux. C'est le phénomène de bioaccumulation (Coulibaly, 2005).

4.2. Facteurs de croissance des microorganismes dégradants

L'activité et la croissance des microorganismes sont influencées par des facteurs physiques, chimiques et biologiques.

4.2.1. Facteurs physiques

- **La température** : son rôle est très important en raison de son effet sur l'activité microbienne, puisqu'elle détermine la vitesse de métabolisation des nutriments. Le métabolisme de nombreux microorganismes (mésophiles) est ralenti à des températures, soit supérieures à 40°C, soit inférieures à 5°C.

- **La teneur en eau** : c'est la disponibilité en eau plutôt que la quantité d'eau présente dans un environnement donné qui est le facteur critique. Les actinomycètes et les champignons sont favorisés par rapport aux bactéries quand le potentiel hydrique est inférieur à $-15,8 \cdot 10^5$ Pa. L'activité de tous les microorganismes cesse lorsque le potentiel devient très petit (Calvet et *al.*, 2005).

- **Les surfaces solides** : une grande partie de l'activité des microorganismes est influencée, dans le sol, par les surfaces des constituants solides et a une influence sur les transformations biotiques des composés organiques (Van Loosdercht et *al.*, 1990 ; Chenu et Stotzky, 2002 ; Dec et *al.*, 2002). Les interactions avec ces surfaces ont divers effets notamment sur la croissance microbienne qui peut être augmentée, diminuée ou non affectée.

4.2.2. Facteurs chimiques

- **L'oxygène** : lorsque l'oxygénation du milieu est importante (potentiel rédox de l'ordre de 750 à 800 mV), elle favorise le développement d'une population aérobie susceptible de dégrader de nombreux pesticides. Quand l'oxygène vient à manquer, le milieu devient anoxique et d'autres populations microbiennes aérobies facultatives, voire anaérobies strictes prennent le relais. L'activité de ces microorganismes capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que l'oxygène est particulièrement importante dans le cas de la dégradation de composés halogénés (Hagglom et Bossert, 2003).

- **Le pH** : le pH affecte la diversité, l'activité et la taille des populations microbiennes. Le pH optimal de développement des bactéries se situe entre 5 et 8,5 alors que les champignons sont favorisés dans les milieux plus acides. Le pH agit également sur l'état d'ionisation des enzymes, ce qui modifie leur affinité pour les substrats.

- **Les substances organiques et inorganiques** : la teneur en carbone organique est souvent le facteur limitant pour la croissance et le développement des microorganismes hétérotrophes. Ce facteur est particulièrement important à considérer dans le cas de la dégradation de composés par cométabolisme. Dans les milieux où la teneur en carbone organique est faible, certains microorganismes développent des propriétés physiologiques particulières pour survivre et se multiplier comme la diminution de la surface de contact de la cellule avec son milieu, l'augmentation de l'affinité enzyme-substrat et l'augmentation de l'efficacité des systèmes de transport intracellulaire (Calvet et *al.*, 2005).

- **Les adjuvants des produits phytosanitaires** : ils entraînent des modifications des populations microbiennes, de l'activité globale de la microflore du sol et de l'activité spécifique de la microflore dégradante (Rouse *et al.*, 1994 ; Sanchez-Camazano *et al.*, 1995 ; Beigel *et al.*, 1999 ; Charnay *et al.*, 2000). Soit ils stimulent la dégradation du pesticides par un accroissement des populations microbiennes, due à la source additionnelle de carbone résultant des cellules microbiennes tuées par les adjuvants et facilement assimilable par la microflore survivante, ou à certains adjuvants de formulations facilement assimilables, soit ils ralentissent la dégradation du pesticides en raison de l'altération des microorganismes dégradant et du piégeage de la matière active à l'intérieur de micelles de composés tensioactifs (Calvet *et al.*, 2005).

4.2.3. Facteurs biologiques

- **Les racines** : du point de vue microbiologique, la rhizosphère est définie comme la zone d'influence du système racinaire sur la microflore tellurique. Dans cette zone, caractérisée par un important rapport de carbone provenant de la photosynthèse, la plante exerce une pression de sélection conduisant à augmenter la taille et l'activité des populations microbiennes. C'est ainsi que l'on a souvent observé une activité des populations microbiennes dégradantes plus intense dans cette partie du sol comparé à un milieu sans végétaux (Buyanosky *et al.*, 1995 ; Perkovitch *et al.*, 1996).

- **Les interactions entre organismes** : elles sont liées à la densité des populations présentes dans le sol et peuvent être soit des interactions positives ou négatives (Puitti *et al.*, 2002).

4.3. Mécanismes de la dégradation microbienne

Les microorganismes peuvent être impliqués dans la dégradation des pesticides selon cinq mécanismes d'action (Bollag et Liu, 1990) :

- **Le métabolisme direct** : qui fait des pesticides une source d'énergie utilisée pour la croissance des microorganismes,

- **Le cométabolisme** : il s'agit de transformations chimiques des pesticides mais ils ne sont pas une source d'énergie pour les microorganismes,

- **La conjugaison :** ce sont des réactions chimiques, catalysées par des enzymes exocellulaires, entre les pesticides et d'autres pesticides ou d'autres molécules présentes dans la solution du sol,
- **L'accumulation :** les pesticides ou leur métabolites sont stockés dans les corps microbiens ; il s'agit là, probablement d'une des causes de la stabilisation,
- **Les effets secondaires :** dus à l'activité des microorganismes qui peut entraîner des modifications de l'environnement chimique (consommation de l'oxygène, production de composés organiques) et de l'environnement physicochimique (pH) qui facilitent ou limitent les transformations chimiques des pesticides. Ils sont un des facteurs intervenant dans la dégradation.

Les trois premiers mécanismes conduisent à des modifications de la composition et de la structure chimique des pesticides et peuvent être véritablement considérés comme étant directement à l'origine de la dégradation. C'est à ces trois mécanismes que l'on se référera en parlant des mécanismes de la dégradation microbienne. Les deux derniers doivent plutôt être vus comme des processus, certes liés aux microorganismes, mais probablement pas impliqués directement dans la dégradation des pesticides. Une caractéristique fondamentale, au moins pour les trois premiers, est l'intervention de systèmes enzymatiques (Calvet *et al.*, 2005).

4.3.1. Le métabolisme direct

Le métabolisme direct est la conséquence de l'utilisation des pesticides comme source d'énergie (Bollag et Liu, 1990 ; Fournier, 1996b).

Beaucoup de pesticides peuvent être des sources d'éléments et d'énergie pour les microorganismes par la mise en œuvre de diverses réactions chimiques cataboliques catalysées par des enzymes. Des microorganismes, dont la plupart sont des bactéries, sont capables d'effectuer la totalité des réactions chimiques, de la molécule initiale aux molécules inorganiques finales (minéralisation). D'autres, cependant, ne peuvent effectuer qu'une partie des transformations, ce qui nécessite l'intervention de plusieurs espèces pour obtenir la minéralisation, chacune d'entre elles utilisant les transformations chimiques successives comme source d'éléments et d'énergie. Nous parlons, donc, de «consortium» de microorganismes ; par exemple il a été observé que la minéralisation du dalapon (herbicide, acide 2,2- dichloropropionique) est effectuée par l'intervention de sept espèces différentes

(Schwarzenbach *et al.*, 2003). Le rôle bénéfique d'un consortium dans la dégradation n'est pas seulement du à la présence de toutes les enzymes nécessaires à la dégradation ; il peut aussi résulter d'échange de nutriments et de l'élimination de substances inhibitrices des microorganismes dégradants.

Beaucoup de pesticides appartenant à des familles chimique diverses peuvent être minéralisés plus ou moins facilement selon la nature de leurs groupes fonctionnels, mais aussi selon l'équipement enzymatique des microorganismes (Fournier, 1996a). Ces réactions conduisent à la formation des molécules inorganiques (dioxyde de carbone, ammoniac, eau, anions sulfates et phosphates) et sont à l'origine de la complète destruction des pesticides, d'où la grande importance du processus de la minéralisation pour leur élimination des milieux naturels (Calvet *et al.*, 2005).

L'utilisation des pesticides par les microorganismes possède des caractères généraux qui sont (fournier 1996b) :

- la cinétique présente une phase de latence précédant une phase de minéralisation rapide,
- l'application ultérieure de pesticide fait disparaître la phase de latence,
- il est possible de transférer la capacité de minéraliser d'un sol traité à un sol non traité,
- un sol où se produit la minéralisation contient des bactéries spécifiques capables de l'effectuer,
- la vitesse de minéralisation est accrue par des applications successives.

Il est important de noter, d'une part, l'existence d'une microflore capable d'utiliser un pesticide comme source d'énergie, d'autre part, son adaptabilité à réaliser le processus, ce qui a des conséquences agronomiques relatives à l'efficacité des traitements phytosanitaires. La minéralisation se déroule suivant une chaîne de réactions chimiques dont la première d'entre elle est une hydrolyse, ou une oxydation, une réduction ou une addition, suivie par d'autres types de transformations. Il existe toute une gamme de biodégradabilité, depuis des biodégradations rapides, donc faciles et correspondant à une très faible récalcitrance, jusqu'à des biodégradations très lentes voire presque impossibles pour lesquelles nous parlons de grande récalcitrance. Certains groupements fonctionnels favorisent la minéralisation, d'autres, au contraire, la limitent beaucoup. Basée sur des relations structure /activité, une étude portant

sur plusieurs centaines de composés a permis d'établir une fonction mathématique donnant une estimation de la probabilité d'observer une biodégradation. Cette étude a conduit aux relations qualitatives suivantes (Calvet *et al.*, 2005) :

- **les groupes favorisant la minéralisation**, en milieu aérobie, par importance décroissante sont les composés contenant des groupes hydrolysables (esters d'acides carboxyliques, amides et anhydrides d'ester d'acides phosphoriques sont rapidement dégradés), les groupes hydroxyl, formyl et carboxyl confèrent aussi une grande biodégradation, moindre cependant que les précédents,

- **les groupes ne favorisant pas la minéralisation** sont les carbones quaternaires, les azores tertiaires, les halogènes et les groupes nitro, particulièrement dans les structures aromatiques.

4.3.2. Le cométabolisme

Le cométabolisme est un processus au cours duquel des microorganismes assurent leur maintenance et leur multiplication au dépens d'un substrat organique tout en dégradant des pesticides sans que ceux-ci soit pour eux une source d'énergie et d'éléments nutritifs. Il s'agit d'un métabolisme dont les réactions initiales sont catalysées par des enzymes peu spécifiques (Dalton et Stirling, 1988 ; Bollag et Liu, 1990). Ce mécanisme de dégradation a été décrit pour la première fois par Leadbetter et Foster en 1959 et a été désigné par le mot cométabolisme par Jensen en 1963 (Horwath, 1972). Ce processus de dégradation est très fréquent et beaucoup de microorganismes peuvent y participer (Horwath, 1972 ; Alexander, 1981 ; Fournier *et al.*, 1997). Les champignons sont particulièrement impliqués dans ce type de dégradation en raison de l'abondance de leur système enzymatique à large spectre d'activité (cytochrome P450 etc...). Le cométabolisme ne conduit pas généralement à une dégradation très poussée des pesticides quand une seule souche est concernée et produit des métabolites qui sont des molécules plus ou moins transformées comparées à la molécule initiale de pesticide. En revanche, il est possible que plusieurs souches interviennent en séquences pour accomplir la dégradation et produire des métabolites, voire même en utiliser certains comme substrats énergétiques et les minéraliser (Calvet *et al.*, 2005).

4.3.3. La conjugaison et la condensation

Des enzymes produites par la microflore sont susceptibles de faciliter des réactions de conjugaison et de condensation des molécules de pesticides, entre elles ou avec des métabolites ou d'autres composés organiques naturellement présents dans le sol (Bollag, 1983 ; Bollag et Liu, 1990).

La conjugaison conduit à l'union de deux molécules. La méthylation et l'acétylation sont deux réactions de conjugaison effectuées par la microflore du sol. C'est ainsi que la méthylation du pentachlorophénol par une culture de *Trichoderma viride* (Cserjesi et Johnson, 1972) et l'acylation de dérivés de l'aniline, métabolisme fréquent de la dégradation des pesticides, par des cultures de *Talaromyces wortmanii* et de *Fusarium oxysporium* (Tweedy et al., 1970) ont été observées.

La condensation conduit à la réunion de 2 à 5 molécules et de polycondensats de taille moléculaire plus importante quand un plus grand nombre de molécules sont réunies. Par exemple, une enzyme comme la laccase peut conduire à la formation de produit de condensation à partir de 2,4-dichlorophénol et de polychlorophénols avec l'acide syringique ou ses dérivés. De même, des réactions de condensation catalysées par des enzymes ont été observées entre des amines aromatiques, métabolites de pesticides, et divers acides phénoliques présents dans les substances humiques. En particulier, les réactions de polycondensation induites par les microorganismes jouent un rôle important dans l'incorporation des pesticides dans les substances humiques du sol (Bollag et Loll, 1983) et contribuent à la formation des résidus liés.

4.4. Les principales réactions de la dégradation biotique et les enzymes impliquées dans la dégradation

4.4.1. Réactions de dégradation biotique

La caractéristique commune à toutes les réactions mises en jeu dans la dégradation par les microorganismes est qu'elles sont toutes catalysées par des enzymes dont la plupart sont intracellulaires. Cela signifie que les réactions ont lieu à l'intérieur des corps microbiens et qu'elles sont précédées par l'absorption des pesticides. Les principales réactions chimiques impliquées sont l'hydrolyse, l'oxydation, la réduction et la conjugaison/condensation. Ces

réactions en nombre plus ou moins grand se succèdent et constituent des chaînes réactionnelles encore appelées voies métaboliques (Calvet *et al.*, 2005).

4.4.2. Les enzymes de la dégradation

Le sol contient un grand nombre d'enzymes en raison de l'abondance et de la diversité des microorganismes qui sont la principale source comparée aux végétaux et aux animaux. Elles sont en très petites quantités dans la solution du sol où elles sont rapidement dégradées. À l'extérieur des corps microbiens, elles existent dans le sol essentiellement adsorbées sur les minéraux et peut être complexées par des substances humiques. Pour agir, les enzymes intracellulaires (endoenzymes) nécessitent que les molécules organiques de substrat soient absorbées, c'est-à-dire qu'elles pénètrent à l'intérieur des cellules. Au contraire, les enzymes extracellulaires (exoenzymes) catalysent des transformations dans la solution du sol ou le plus souvent en phase adsorbées. Toutes les enzymes nécessaires à la dégradation complète des pesticides sont rarement présentes dans une seule espèce microbienne. De sorte que plusieurs espèces doivent intervenir au sein de ce qui est appelé un consortium (Fournier, 1996b). La dégradation de nombreux pesticides fait intervenir des enzymes qui ne sont pas spécifiques et qui sont impliquées dans les transformations chimiques de composés organiques naturels. De fait, assez peu d'enzymes adaptées à des pesticides particuliers ont été isolées et étudiées (Bollag et Liu, 1990). Cependant, beaucoup de pesticides ont une structure chimique différente des composés naturels et leur dégradation nécessite une évolution de l'équipement enzymatique des microorganismes.

4.4.3 Évolution de l'équipement enzymatique des microorganismes

Cette évolution est possible grâce à des échanges de gènes facilités par la très grande diversité des microorganismes du sol (Kearney et Kellog, 1985). Les microorganismes peuvent acquérir de nouvelles aptitudes à la dégradation à la suite de modifications de leur patrimoine génétique par des remaniements, des transferts de gènes et des mutations.

Les remaniements génétiques peuvent être attribués à des recombinaisons ou à des mutations de gènes. Lors des recombinaisons génétiques, des réarrangements, des duplications de gènes ou des insertions peuvent conduire à l'adaptation des microorganismes ne possédant pas initialement les enzymes appropriées (Van der Mee *et al.*, 1992). Trois voies d'échanges sont connues pour les transferts de matériels génétiques entre les souches :

- la conjugaison par l'intermédiaire de plasmides,
- la transposition par l'intermédiaire de transposons,
- la transformation via de l'ADN chromosomique.

Les transferts de matériels génétiques via les deux premières voies sont les plus fréquents. Le gène *tfdA* qui code pour la dioxygénase impliquée dans la dégradation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et qui est porté par le plasmide pRO103, a été transféré avec succès dans les bactéries indigènes du sol capables de dégrader des phénols (Lipthay *et al.*, 2001). Celles-ci sont alors devenues capables de dégrader complètement l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. La transmission du gène codant pour l'enzyme capable d'hydrolyser le carbofurane est un autre exemple de modification génétique de l'aptitude des microorganismes à dégrader des pesticides (Desaint *et al.*, 2003). Par ailleurs, comme les gènes responsables de la dégradation des pesticides sont souvent portés par des plasmides et, compte tenu de la mobilité de ces éléments, ils peuvent être facilement perdus ou échangés à la suite de divers stress (Kumr *et al.*, 1999). Ce genre d'événement contribue très certainement à la dissémination du caractère dégradant parmi les bactéries du sol et ainsi à l'augmentation du nombre de situations où le phénomène de biodégradation accélérée peut être observé.

4.4.4. Dégradation due à des enzymes extracellulaires

Ces enzymes sont peu abondantes dans la phase liquide et elles sont surtout associées à la phase solide. Il en résulte, d'une part, que leur accès est physiquement limité, et d'autre part, que leur activité peut être modifiée. L'adsorption par les minéraux argileux change les paramètres des cinétiques enzymatiques : généralement, V_{max} diminue et le maximum d'activité est décalé vers les pH plus élevés comparés aux réactions en solutions (Stotzky, 1986 ; Quiquampoix *et al.*, 1993, 1995 ; Quiquampoix, 2000) la vitesse des transformations catalysées par ces enzymes est essentiellement déterminée par la vitesse d'accès des molécules de pesticides aux surfaces qui retiennent les enzymes.

4.4.5. Dégradation due à des enzymes intracellulaires

C'est la situation la plus importante pour la dégradation microbiologique des pesticides. La vitesse de cette dégradation est déterminée par :

- la vitesse de passage des pesticides en solution (vitesse de dissolution, de désorption et de libération),
- le transport des pesticides dans les phases liquides mobile et immobile,
- les vitesses de transformation qui sont à leur tour dépendantes des vitesses d'absorption, des réactions enzymatiques et de la croissance microbienne.

Par rapport aux autres phénomènes de dégradation, la dégradation biotique due à des enzymes intracellulaires fait intervenir un facteur supplémentaire qui est la croissance microbienne. D'un point de vue général, cette analyse de détermination de la vitesse de dégradation montre qu'elle est toujours le résultat de couplages entre, d'une part des phénomènes de rétention/mobilisation et de transport, et d'autre part (Calvet *et al.*, 2005) :

- des réactions chimiques abiotiques en solution ou en phase adsorbées,
- et des réactions chimiques enzymatiques, surtout dans les corps microbiens.

4.5. Dégradation du glyphosate

4.5.1. La dégradation chimique

Les résultats trouvés dans la littérature montrent que le glyphosate est faiblement dégradé par voie chimique. Dans une étude de Rueppel *et al.* (1977) sur des sol stérilisés, le potentiel de la dégradation chimique du glyphosate s'est avéré insignifiant, ce qui leur a ramené à conclure que la dégradation chimique n'est pas la voie principale de la dégradation du glyphosate dans le sol. De même, Sprankle *et al.* (1975a) ont montré que dans les sols traités pas le glyphosate et par l'azide de sodium comme inhibiteur de l'activité microbienne, le glyphosate reste stable. Une autre étude menée par Doliner (1991) sur des eaux stérilisées et contaminées par le glyphosate, a montré que la concentration de la molécule reste stable après 32 jours d'incubation des eaux dans l'obscurité.

4.5.2. La photodégradation

Aucun résultat dans la littérature n'a signalé la photodégradation du glyphosate lorsqu'il est appliqué au sol. De même, Trotter *et al.* (1990) estime que la photolyse joue un rôle mineur dans la dégradation du glyphosate dans l'environnement. Selon une étude menée par Rueppel *et al.* (1977), le glyphosate peut résister à une exposition à la lumière naturelle de 8 heures pendant 16 jours, le même résultat est trouvé par Worthing et Hance (2000).

4.5.3. La dégradation biologique

La dégradation biologique est la principale voie de dissipation du glyphosate dans le sol (Sprankle *et al.*, 1975 a et b ; Rueppel *et al.*, 1977 ; Torstensson et Amisepp, 1977 ; Moshier et Penner, 1978 ; Carlisle et Trevors, 1988 ; Forlani *et al.*, 1999 ; Giesy *et al.*, 2000). Cette dégradation est immédiate indiquant qu'il n'y a pas de phase de latence et que la grande partie de la population microbienne est capable de dégrader le glyphosate par co-métabolisme (Wiren-Lehr *et al.*, 1997 ; Forlani *et al.*, 1999 ; Cheah *et al.*, 1998 ; Stenrod *et al.*, 2003). La dégradation microbienne du glyphosate produit le principal métabolite l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) et mène éventuellement à la production de CO₂, de phosphate et de l'eau (Forlani *et al.*, 1999; Azevedo and Araujo, 2003). Les bactéries dégradent le glyphosate par deux façons (Figure 3), conduisant à la production intermédiaire de glycine ou de AMPA (Balthazor et Hallas, 1986 ; Jacob *et al.*, 1988; Lerbs *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Forlani *et al.*, 1999). La voie de glycine commence par le clivage de la liaison carbone-phosphore du glyphosate pour produire le sarcosine (Kishore *et al.*, 1987; Pipke *et al.*, 1987; Shinabarger *et al.*, 1986), qui est ensuite converti en glycine par une sarcosine oxydase-déshydrogénase. La seconde voie consiste à cliver la liaison carbone-azote du carboxyméthyl pour produire l'AMPA. L'AMPA produit de cette voie peut être métabolisé davantage, fournissant du phosphore pour la croissance bactérienne (Jacob *et al.*, 1988).

Dans une étude de Rueppel *et al.* (1977), suivant la dégradation du glyphosate dans le sol, un sol contaminé par le glyphosate marqué sur le carbone phosphonométhyl était incubé pendant 28 jours en aérobiose, les auteurs ont pu montrer que dans ces conditions 55.3% du carbone radioactif était minéralisé, la même expérience était menée en anaérobiose, et la dégradation était également importante. Elle atteint pour le même sol incubé durant la même période dans les mêmes conditions 51.4%. Les mêmes auteurs ont montré que du même que le glyphosate la dégradation de l'AMPA se produit indifféremment en conditions aérobies et

anaérobie, mais quelle est plus lente que celle du glyphosate et que l'AMPA peut persister dans le sol un an après l'application de l'herbicide (Rueppel *et al.*, 1977 ; Heinonen-Tanski *et al.*, 1989 ; Grunewald *et al.*, 2001). Dans le sol, la biodégradation du glyphosate est fonction de la l'intensité de l'adsorption, plus le glyphosate est adsorbé, moins il est dégradé (Sprankle *et al.*, 1975a ; Eberbach, 1998 ; Mamy, 2005). Cheah *et al.* (1998) montre que, pour un sol sablo-limoneux de pH 6,7 et 1,3% de carbone organique, la minéralisation du glyphosate atteint un seuil de 90% en 60 jours , alors qu'elle est a seulement 14,6% dans un sol argilo-limoneux de pH 4,7 et 30% de carbone organique, ce résultat est expliqué par une adsorption différente de l'herbicide suivant le type de sol. En plus, la présence de phosphate dans le sol, entre en compétition sur les sites de fixation du glyphosate et diminue considérablement son adsorption, ce qui augmente la dégradation du glyphosate et inversement, la présence de Fe^{3+} ou de Al^{3+} diminue sa dégradation.

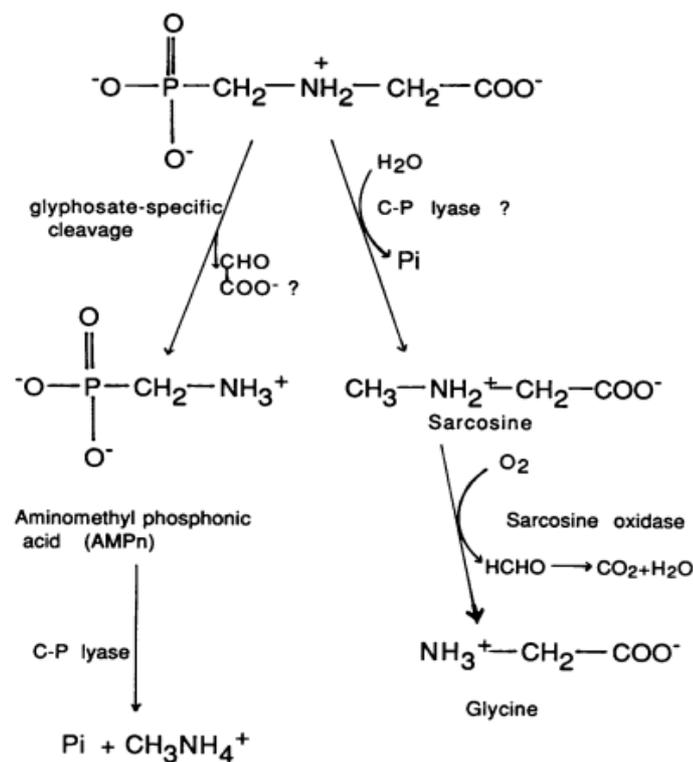


Figure 2. Voies de dégradation biologique du glyphosate

5. Impact du glyphosate sur la microflore du sol

En raison de son mode d'action, les effets indésirables du glyphosate sur les organismes non visés sont une des premières préoccupations environnementales. La voie des acides shikimiques est omniprésente dans les microorganismes (Bentley, 1990) et de nombreuses études en laboratoire ont montré un effet néfaste du glyphosate sur les microorganismes du sol (Quinn *et al.*, 1988 ; Santos et Flores, 1995 ; Krzysko-Lupicka et Orlik, 1997). Selon une revue de la documentation effectuée par Choquette (1987), le seuil d'effet retenu pour les microorganismes du sol en général est de 50 ppm. Cette dose influence la croissance des colonies sans toutefois détruire les populations. Le seuil létal retenu est de 500 ppm. Ces données proviennent toutefois d'essais sur des cultures pures en laboratoire, techniques qui sont largement critiquées puisque ces organismes isolés peuvent être atypiques de leur forme dans le sol. De plus, ils sont stimulés à de hauts taux métaboliques artificiels par la croissance en milieu de laboratoire et sont séparés de leurs associations écologiques normales. L'interprétation des résultats est difficile et l'extrapolation aux situations en milieu naturel est impossible (Grossbard, 1985).

Les essais réalisés en milieu naturel démontrent plutôt que les microorganismes augmentent dans les sols traités au glyphosate, même à des taux aussi élevés, suggérant ainsi l'utilisation du glyphosate comme substrat (Grossbard, 1985). Une stimulation de la respiration microbienne (Stratton et Stewart, 1992 ; Haney *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001), une augmentation des bactéries cultivables et des champignons (Roslycky, 1982 et Rueppel *et al.*, 1977), une stimulation de la nitrification (Heiononen-Tanski *et al.*, 1985) et de la minéralisation du carbone et de l'azote (Marsh *et al.*, 1977) ont été reportés après application du glyphosate dans le sol. Du même Veiga *et al.* (2001) et Haney *et al.* (2000) ont montré que l'activité microbienne est stimulée en présence de grandes quantités de glyphosate, alors que Wardle et Parkinson (1992) ont observé qu'il peut réduire l'activité de la biomasse microbienne, de façon transitoire, dans les premiers jours de l'application.

Grossbard (1985) conclut que, bien que le glyphosate puisse avoir un effet inhibiteur en laboratoire, cet effet est sélectif, variable en amplitude et relatif à une dose qui est bien supérieure à celle utilisée en agriculture. De plus, la proportion de glyphosate qui atteint le sol est inférieure à la dose appliquée puisqu'une partie est retenue par la végétation. Le glyphosate au sol est adsorbé aux particules et dégradé, ce qui serait une raison pour laquelle

les microorganismes tolèrent généralement mieux le glyphosate dans le sol qu'en culture pure en laboratoire. Un seuil d'effet de 2 ppm a été retenu pour les microorganismes aquatiques. Les études effectuées en laboratoire ont démontré que les différents types d'algues ne réagissaient pas tous de la même façon. Les cyanobactéries semblent généralement plus sensibles au glyphosate, quoique cette sensibilité varie beaucoup d'une espèce à l'autre. La croissance d'une espèce appartenant au genre *Aphanocapsa* était inhibée de 50 % en présence de 2 mg/l alors que pour obtenir une réaction analogue chez une autre espèce appartenant au même genre, il fallait 100 mg/l. La croissance était inhibée de 100 % à des concentrations de 10 mg/l pour les espèces les plus sensibles (Hutber *et al.*, 1979 ; Trotter *et al.*, 1990). Trotter *et al.* (1990) rapportent également qu'une valeur médiane de 11 mg/l de glyphosate inhibait totalement la croissance après une étude chez 13 espèces d'algues (2,8 à 23 mg/l). Goldsborough et Brown (1988) ont exposé des communautés d'algues périphytiques sur des substrats artificiels à différentes doses de glyphosate et ont conclu que la CE 50 était supérieure à 8,9 mg/l. À la suite d'une revue de la documentation, Tooby (1985) conclut qu'il est difficile d'évaluer les risques à partir des expériences de laboratoire puisque, en général, les effets ne sont pas observés en milieu naturel aux niveaux de doses qui peuvent être préjudiciables en laboratoire à cause de la disparition rapide du glyphosate dans l'eau. L'adsorption du produit aux sédiments réduit rapidement la disponibilité biologique du glyphosate en solution. En milieu naturel, aucun effet attribuable au glyphosate n'a pu être décelé chez des communautés de diatomées, à la suite d'une pulvérisation directe de 2,2 kg/ha dans deux cours d'eau et une mare en milieu forestier. Les changements observés dans les densités de population étaient plutôt attribués aux différences de l'habitat et aux variations saisonnières (Sullivan *et al.*, 1981 ; Trotter *et al.*, 1990 ; Grossbard, 1985 ; Tooby, 1985). En Nouvelle-Écosse, Ernst *et al.* (1987) n'ont observé aucun effet néfaste chez le périphyton qui avait colonisé des substrats artificiels dans un cours d'eau après une pulvérisation directe de 2,0 kg /ha. Ces auteurs ont cependant noté la faible quantité de glyphosate détectée dans l'eau (maximum de 39 µg/l) par rapport au taux d'application (33 fois inférieure à la dose calculée de 1,3 mg/l pour une colonne d'eau de 15 cm).

6 . Les microorganismes dégradant les composés organophosphorés (OP)

A l'heure actuelle, les pesticides les plus couramment utilisés font partie du groupe des organophosphorés. Le premier insecticide organophosphoré, le pyrophosphate de tétraéthyle, a été développé et utilisé en 1937 (Dragun *et al.*, 1984). Plus tard, plusieurs autres pesticides

organophosphorés ont été développés et commercialisés. Ces pesticides sont largement utilisés dans le monde entier pour lutter contre les ravageurs agricoles et ménagers. Dans l'ensemble, les composés organophosphorés représentent 38% du total des pesticides utilisés dans le monde (Post, 1998). Aux États-Unis seuls plus de 40 millions de kilos d'organophosphorés sont appliqués chaque année (Mulchandani *et al.*, 1999). Le glyphosate et le chlorpyrifos sont le plus largement utilisé et compte pour 20% et 11% de l'utilisation totale des pesticides, respectivement (EPA, 2004).

L'utilisation continue et excessive des composés organophosphorés a conduit à la contamination de plusieurs écosystèmes dans différentes parties du monde (EPA , 1995; McConnell *et al.*, 1999). Plusieurs composés organophosphorés sont utilisés sur les animaux pour le contrôle des parasites du corps et plusieurs d'entre eux sont solubles dans les graisses et peuvent donc entrer dans le corps facilement à travers la peau et se retrouver dans la viande et le lait (MAFF / HSE, 1995). La contamination des céréales, des légumes et des fruits par des composés organophosphorés est également bien documentée (Conseil national de la consommation, 1998). L'utilisation de microorganismes dans la décontamination des composés organophosphorés est considérée comme une approche efficace et respectueuse de l'environnement.

Parmi les composés organophosphorés, le glyphosate, le chlorpyrifos, le parathion, parathion-méthyl, diazinon, coumaphos, monocrotophos, fénamiphos et phorate ont été largement utilisés. Le phosphore est habituellement présent soit sous forme d'un ester de phosphate ou un phosphonate. Etant des esters ils ont de nombreux sites qui sont vulnérables à l'hydrolyse. Les principales réactions mises en jeu sont l'hydrolyse, l'oxydation, l'alkylation et la désalkylation (Singh *et al.*, 1999). Le cométabolisme et la biominéralisation des composés organophosphorés par des bactéries isolés ont été signalés. Une liste des microorganismes capables de dégrader ces composés est présentée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Les microorganismes isolés dégradant les composés organophosphorés. Le symbole entre parenthèses après le mode de dégradation représente le type d'élément nutritif que le pesticide fournit aux microorganismes dégradant. C, le carbone ; N, l'azote ; P, le phosphore. ND, non défini.

Composé	Microorganismes	Mode de dégradation	Référence
Chlorpyrifos	Bactéries		
	<i>Enterobacter</i> sp.	Catabolique (C,P)	Singh <i>et al.</i> (2003c)
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Cométabolisme	Mallick <i>et al.</i> (1999)
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cométabolisme	Serdar <i>et al.</i> (1982)
	<i>Micrococcus</i> sp.	Cométabolisme	Guha <i>et al.</i> (1997)
	Champignons		
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Catabolique (C)	Bumpus <i>et al.</i> (1993)
	<i>Hypholoma fascicularae</i>	ND	Bending <i>et al.</i> (2002)
	<i>Coriolus versicolor</i>	ND	Bending <i>et al.</i> (2002)
	<i>Aspergillus</i> sp.	Catabolique (P)	Obojska <i>et al.</i> (2002)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Catabolique (P)	Omar (1998)
	<i>Pencillium brevicompatum</i>	Catabolique (P)	Omar (1998)
Parathion	Bactéries		
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Cométabolisme	Sethunathan et Yoshida (1973)
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cométabolisme	Sedar <i>et al.</i> (1982)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Cométabolisme	Daughton et Hsieh (1977)
	<i>Arthrobacter</i> spp	Cométabolisme	Nelson <i>et al.</i> (1982)
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Cométabolisme	Horne <i>et al.</i> (2002a)
	<i>Bacillus</i> spp.	Cométabolisme	Nelson <i>et al.</i> (1982)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Catabolisme (C, N)	Siddaramappa <i>et al.</i> (1973)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Catabolisme (P)	Rosenberg et Alexander (1979)
	<i>Arthrobacter</i> sp.	Catabolisme (C)	Nelson <i>et al.</i> (1982)
	<i>Xanthomonas</i> sp.	Catabolisme (C)	Rosenberg et Alexander (1979)

Methyl parathion	Bactéries		
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cometabolisme	Chaudry <i>et al.</i> (1988)
	<i>Bacillus</i> sp.	Cometabolisme	Sharmila <i>et al.</i> (1989)
	<i>Plesimonas</i> sp.	Cometabolisme	Zhongli <i>et al.</i> (2001)
	<i>Pseudomonas pudida</i>	Catabolisme (C)	Rani et Lalitha-kumari (1994)
	<i>Flavobacterium balustinum</i>	Catabolisme (C)	Somara et Siddavattam (1995)
Glyphosate	Bactéries		
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Catabolisme (P)	Kertesz <i>et al.</i> (1994)
	<i>Alcalligene</i> sp.	Catabolisme (P)	Tolbot <i>et al.</i> (1984)
	<i>Bacillus megaterium</i>	Catabolisme (P)	Quinn <i>et al.</i> (1989)
	<i>Rhizobium</i> sp.	Catabolisme (P)	Liu <i>et al.</i> (1991)
	<i>Agrobacterium</i> sp.	Catabolisme (P)	Wacket <i>et al.</i> (1987)
	<i>Arthrobacter</i> sp	Catabolisme (P)	Pipke <i>et al.</i> (1987)
	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	Catabolisme (P)	Pike et Amrhein (1988)
	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	Catabolisme (P)	Obojska <i>et al.</i> (2002)
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Catabolisme (P)	Balthazor et Hallas (1986)
	Champignons		
	<i>Penicillium citrium</i>	Co métabolisme	Pothuluri <i>et al.</i> (1998)
	<i>Penicillium natatum</i>	Catabolisme (p)	Pothuluri <i>et al.</i> (1992)
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Catabolisme (N)	Klimek <i>et al.</i> (2001)
	<i>Trichoderma viridae</i>	Catabolisme (p)	Zboinska <i>et al.</i> (1992)
	<i>Scopulariopsis spand</i>	Catabolisme (p)	Zboinska <i>et al.</i> (1992)
	<i>Aspergillus niger</i>	Catabolisme (p)	Zboinska <i>et al.</i> (1992)
	<i>Alternaria alternata</i>	Catabolisme (N)	Lipok <i>et al.</i> (2003)
Coumaphos	<i>Nocardiodes simplex</i>	Cometrabolisme	Mulbry (2000)
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Cometrabolisme	Horne <i>et al.</i> (2002a)
	<i>Pseudomonas monteilli</i>	Cometrabolisme	Horne <i>et al.</i> (2002b)
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Cometrabolisme	Adhya <i>et al.</i> (1981)
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cometrabolisme	Serdar <i>et al.</i> (1982)
	<i>Nocardia</i> strain B-1	Catabolisme (C)	Mulbry (1992)

Monocrotophos	<i>Pseudomonas</i> spp.	Catabolisme (C)	Bhadbhade <i>et al.</i> (2002 b)
	<i>Bacillus</i> spp.	Catabolisme (C)	Rangaswamy et Venkateswaralu (1992)
	<i>Arthrobacter</i> spp.	Catabolisme (C)	Bhadbhade <i>et al.</i> (2002 b)
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Catabolisme (C)	Bhadbhade <i>et al.</i> (2002 a)
	<i>Bacillus megaterium</i>	Catabolisme (C)	Bhadbhade <i>et al.</i> (2002 b)
	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	Catabolisme (C)	Bhadbhade <i>et al.</i> (2002 b)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Catabolisme (P)	Singh et Singh (2003)
	<i>Clavibacter michiganense</i>	Catabolisme (P)	Singh et Singh (2003)
Fenitrothion	<i>Flavobacterium</i> sp.	Cometabolisme	Adhya <i>et al.</i> (1981)
	<i>Arthrobacter aurescenes</i>	Catabolisme (C)	Ohshiro <i>et al.</i> (1996)
	<i>Burkholderia</i> sp.	Catabolisme (C)	Hayatsu <i>et al.</i> (2000)
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Catabolisme (P)	Sethunathan et Yoshida (1973)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cometabolisme	Rosenberg et Alexander (1979)
	<i>Arthrobacterium</i> spp.	Cometabolisme	Barik <i>et al.</i> (1979)

Chapitre 1

Isolement et identification des souches dégradant le glyphosate

1. Introduction

L'utilisation excessive à grande échelle des ressources naturelles et de synthèse de composés xénobiotiques a généré un certain nombre de problèmes environnementaux tels que la contamination des écosystèmes air, eau et sol et la perturbation des cycles biogéochimiques. À l'heure actuelle, les pesticides les plus couramment utilisés appartiennent au groupe des organophosphorés. Le premier insecticide organophosphoré, le pyrophosphate tétraéthyle, a été développé et utilisé en 1937 (Dragun *et al.*, 1984). Par la suite, plusieurs autres pesticides organophosphorés ont été développés et commercialisés. Ces pesticides sont largement utilisés dans le monde entier pour lutter contre les ravageurs agricoles et ménagers. Dans l'ensemble, les composés organophosphorés représentent 38% du total des pesticides utilisés dans le monde (Post, 1998). Le glyphosate est le plus largement utilisé et représente 20% de l'utilisation totale des pesticides, (EPA, 2004).

L'intoxication due aux composés organophosphorés est un problème de santé mondial avec environ 3 millions d'empoisonnements et 200 000 décès par an (Karalliedde et Senanayake, 1999 ; Sogorb *et al.*, 2004).

La dégradation microbienne des pesticides organophosphorés et le développement de stratégies de bioremédiation pour les sols pollués fondés sur l'introduction de microorganismes à capacité bioremédiatrice, représentent un domaine de recherche important dans le monde entier (Semple *et al.*, 2001). La bioremédiation est un moyen pas cher et écologique pour éliminer ces éléments toxiques de l'environnement. L'utilisation de microorganismes dans la décontamination des sites pollués par les organophosphorés est considérée comme une approche respectueuse de l'environnement. En 1973, la première bactérie dégradant ces pesticides a été isolée à partir d'un échantillon de sol provenant des Philippines et a été identifiée comme *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 (Sethunathan et Yoshida, 1973). Depuis lors, plusieurs bactéries, quelques champignons et cyanobactéries qui peuvent utiliser des composés organophosphorés comme source de carbone, d'azote ou de phosphore, ont été isolées. Quelques consortiums avec la capacité de métaboliser les composés organophosphorés ont également été signalés (Singh et Walker, 2006; Singh *et al.*, 2003).

Les premières études du métabolisme bactérien du glyphosate ont été effectuées avec des cultures bactériennes mixtes de mélanges de sol-eau pour évaluer le devenir du glyphosate dans le sol (Nomura *et al.*, 1977 ; Ruepple *et al.*, 1977). Des études plus récentes sur les

bactéries dégradant le glyphosate ont visées la sélection et l'isolement de souches bactériennes pures avec des grandes capacités de désintoxication pour des usages potentiels dans l'industrie de la biotechnologie, tels que, par exemple, la suppression de glyphosate des cours d'eau ou encore le développement de cultures de plantes résistantes au glyphosate en se basant sur les gènes encodant les enzymes dégradant cet herbicide.

Plusieurs souches bactériennes qui étaient capables de dégrader le glyphosate ont été isolées, la plupart de ces bactéries ont été isolées à partir de sites déjà traités par l'herbicide. Cependant, il ya peu de rapports sur l'isolement de bactéries provenant de sites non traités et aucun rapport de bactéries dégradant le glyphosate isolées des sols Sahariens.

Dans ce contexte, nous avons isolé et caractérisé des bactéries susceptibles de dégrader le glyphosate à partir de trois sols non traités et aux caractéristiques physico-chimiques contrastés (un sol agricole, un sol forestier de Constantine et un sol Saharien de Biskra). L'isolement a été effectué en utilisant des cultures d'enrichissement sur milieux contenant du glyphosate comme seule source de carbone ou de phosphore. Nous avons ensuite identifié les différents isolats en se basant sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S, la spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS), le système API et le système des puces phénotypique (Biolog-Omnilog).

2. Matériel et méthodes

2.1. Sites de prélèvement

Les sols non traités retenus pour cette étude sont :

- un sol agricole situé à l'Institut des Grandes Cultures de El- Baârawiya (El-Khroub),
- un sol forestier (forêt du campus Chaâberrssas, Université Constantine 1),
- un sol Saharien de la région de Biskra.

2.2. Echantillonnage

Tous les prélèvements des échantillons de sol ont été réalisés au printemps (mois d'avril). Pour chaque sol, après avoir écarté les quinze premiers centimètres du sol, des quantités suffisantes de terre ont été prélevées de différents endroits, espacés environ de 10 m, selon l'axe Nord-Sud. Les échantillons ont été broyés et tamisés à travers un tamis de 2 mm et

divisés en deux parties. Une partie est stockée à 4°C pour l'isolement des bactéries dégradant le glyphosate, le dénombrement des microorganismes cultivables et la détermination de la respiration microbienne du sol. La deuxième partie a été séchée à la température ambiante pour les analyses des propriétés physico-chimiques

2.3. Enrichissement et isolement des souches dégradant le Glyphosate

Pour chaque type de sol, deux échantillons de sol de 5g sont introduits dans des erlenmeyers de 250 ml contenant, respectivement, 95 ml des milieux minimums stériles MMM1 et MMM2 (annexe 1). Un volume de 120 µl de l'herbicide Rondup (annexe 1) a été ajouté, par filtration (filtre 0,22µm), à chaque erlenmeyer pour atteindre une concentration finale du glyphosate de 0,5 g/l. Les cultures, ainsi obtenues, ont été incubées à une température de 30°C sous une agitation de 150 t/m pendant une semaine.

Un volume de 5 ml de chaque culture a été transféré dans 95 ml de nouveaux milieux minimums stériles (MMM1 et MMM2) contenant, chacun, 1g/l de Glyphosate, incubées 7 jours à 30°C sous agitation 150 t/m. Trois autres transferts successifs ont été réalisés dans des nouveaux milieux minimums stériles contenant 3, 6 et 12 g/l de Glyphosate. Les dernières cultures des 2 milieux (MMM1 et MMM 2) ont été diluées et ensemencées sur le milieu PCA (annexe 1) additionné de 1g/l de Glyphosate. Les cultures sont, ensuite, incubées à 30°C pendant 24 heures, les colonies ont été prélevées et repiquées jusqu'à obtention de souches pures.

2.4. Identification phénotypique

Pour la détermination des caractéristiques morphologiques et physiologiques, les isolats ont été cultivés sur la gélose Columbia (annexe 1) et incubés en aérobiose et en anaérobiose à 37°C.

2.4.1. Le système API

L'identification des espèces a été réalisée en se basant sur les tests biochimiques comprenant les kits API 50CH, API 20E et l'API ZYM (BioMérieux, France) et quelques expériences classiques, dont le principe repose sur les caractères physiologiques et biochimiques des souches (coloration de Gram, mobilité, catalase et oxydase).

2.4.2. La spectrométrie de masse par Désorption-ionisation laser assistée par matrice-Temps de vol. (Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization. Time Of Flight Mass Spectrometry) (MALDI-TOF MS)

La spectrométrie de masse par Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) a été utilisée dans cette étude en plus de l'analyse du gène de l'ARNr 16S pour l'identification des différents isolats. Cette technique est utilisée pour générer des empreintes de protéines à partir de cellules bactériennes entières, et par la comparaison de ces empreintes à une base de données de spectres de référence par l'utilisation de différents algorithmes, les bactéries peuvent être rapidement identifiées (Fenselau et Demirev, 2001). L'analyse directe des profils protéiques des différents isolats par MALDI-TOF a été effectuée comme décrit par Seng *et al.* (2009). Une colonie bactérienne bien isolée a été prélevée à partir de la gélose Columbia et étalée en couche mince sur une plaque 384 MTP cible MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Leipzig, Allemagne).

Onze dépôts distincts ont été effectués pour les différents isolats à partir de onze colonies différentes. Chaque frottis a été recouvert de 2µl de la solution matrice (solution saturée d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dans 50% d'acétonitrile, 2,5% d'acide trifluoroacétique) et laissé sécher pendant cinq minutes.

Les mesures ont été effectuées avec un spectromètre Microflex (Bruker). Les spectres ont été enregistrés en mode linéaire positif pour la gamme de masse de 2000 à 20000 Da (paramètres: source d'ions 1 (IS1), 20 kV; IS2, 18,5 kV; lentille, 7 kV). Un spectre a été obtenu après 675 tirs par un laser de puissance variable. Le temps d'acquisition est compris entre 30 secondes et 1 minute par point. Les spectres des isolats ont été importés dans le logiciel MALDI Biotyper (version 2.0, Bruker) et comparés avec les 6 213 spectres de bactéries enregistrés dans la base de données Biotyper. Le processus du test et de la technologie MALDI-TOF MS sont présentés dans la **Figure 3**.

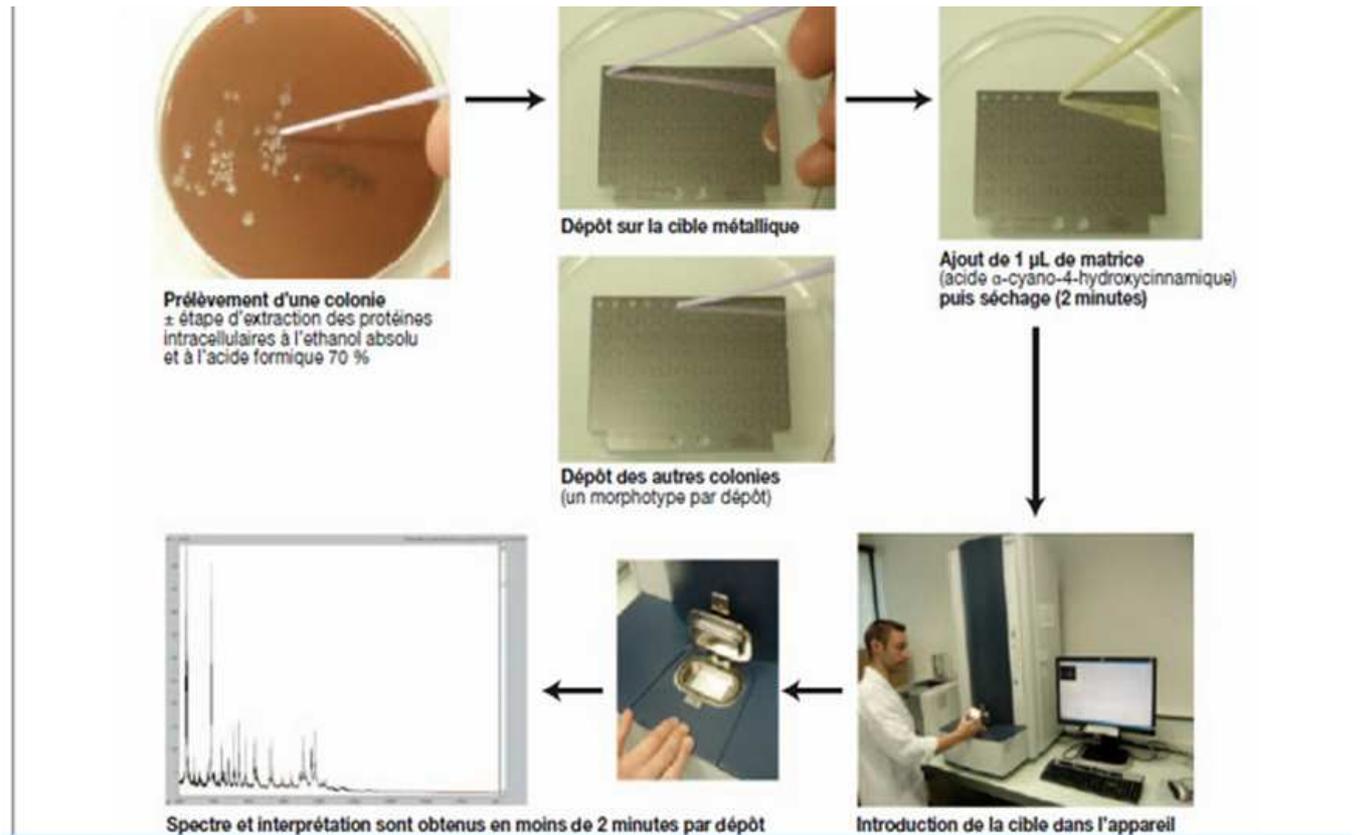


Figure 3. Étapes d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.

2.4.3. La sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée pour les différentes souches par la méthode de diffusion sur disque Kirby-Bauer. Les concentrations inhibitrices minimales (CIM) ont été déterminées en utilisant le milieu Mueller-Hinton.

2.4.4. Le système des plaques phénotypiques : Phenotype MicroArrays (PM) (Biolog-Omnilog)

Les plaques phénotypiques (PM) représentent la troisième majeure technologie, "Phenomix", à côté des puces à ADN et les technologies protéomiques, qui sont nécessaires à l'étude du génome. Tout comme les puces à ADN et les technologies protéomiques ont permis d'analyser des milliers de gènes ou de protéines tout à la fois, la technologie des puces phénotypiques permet de mesurer quantitativement des milliers de phénotypes cellulaires à la fois. La préparation des PM (BIOLOG, Hayward CA, USA) a été réalisée, comme décrit par Bochner *et al.* (2001).

2.4.4.1. Préparation des suspensions et inoculation des PM

a) préparation des fluides d'inoculation des PM

Le fluide d'inoculation (inoculating fluid) **IF-0** GN /GP (1.2x) a été préparé par l'introduction de 25 ml d'eau distillée stérile dans un flacon contenant 125 ml de IF-0 (1.2x). Un volume de 16 ml de IF-0, ainsi préparé, est pipeté dans un tube à essai stérile (20 x 150 mm).

Le **IF-0+dye** a été préparé par l'introduction, dans le flacon contenant 125 ml de IF-0 (1.2x), de 1,8 ml du mix A (Biolog Redox Dye) (100x) et de 23,2 ml d'eau distillée stérile. Un volume de 75 ml du IF-0+dye est introduit dans un flacon en plastique stérile de 120 ml.

Le **IF-10+dye** a été préparé par l'ajout de 1,5 ml du mix A (Biolog Redox Dye) (100x) et 23,5 ml d'eau stérile à 125 ml de IF-10 (1.2x). Un volume de 120 ml du IF-10+dye est pipeté dans un flacon en plastique stérile de 120 ml.

b) Inoculation des panneaux des plaques PM (Figure 4)

- préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à identifier ont été ensemencées sur la gélose BUG (Biolog Universal Growth) et incubées pendant 24 h à 37°C. Une quantité de chaque culture bactérienne est transférée, à l'aide d'un écouvillon stérile, dans un tube stérile contenant 16 ml de IF-0, puis agitée pour obtenir une suspension uniforme. La turbidité de la suspension est ajustée par ajout des cellules à 42% de transmission (T) (Turbidimètre du Biolog). Un volume de 15 ml de la suspension 42%T est transféré dans le flacon contenant 75 ml de IF-0+dye, bien mélangé pour atteindre une turbidité finale de 85% T.

- Inoculation des plaques PM (1et 2A)

Un volume de 22 ml de la suspension bactérienne 85% T a été transféré dans un réservoir stérile (50 ml). Les plaques PM (1 et 2A) sont, ensuite, inoculées par cette suspension, à raison de 100 µl /puits.

- **Inoculation des PM (10, 11C, 12B, 13A, 14A, 15B, 16A)**

Un volume de 600 µl de la suspension 85% T est introduit dans 120 ml de IF-10+dye, ce qui correspond à une dilution de 200 fois puis transféré dans un réservoir stérile (50 ml). Les plaques PM (10 -16A) sont inoculées par cette suspension, à raison de 100 µl/puits.

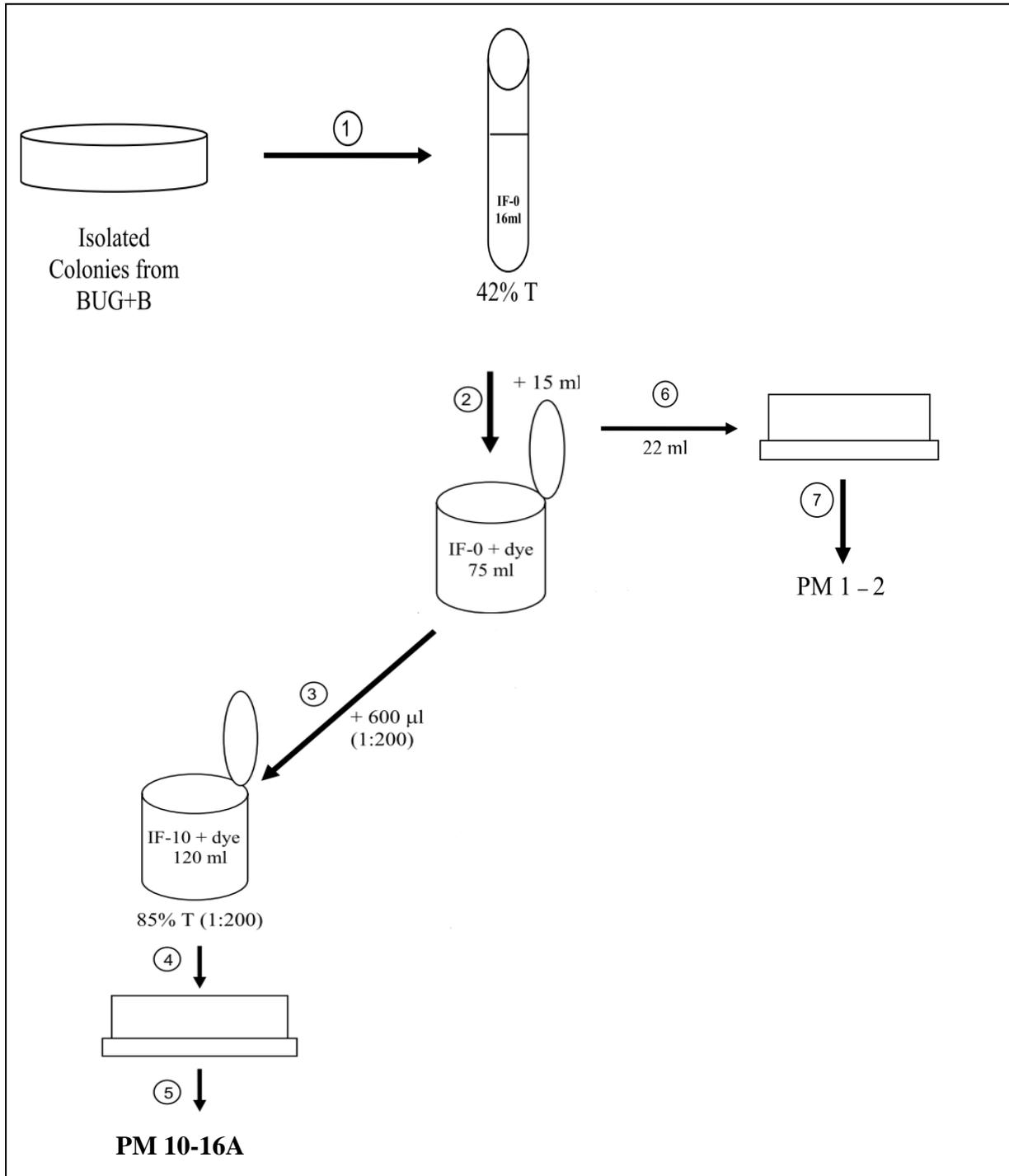


Figure 4. Étapes d'inoculation des PM à partir d'une suspension bactérienne.

2.4.4.2. Incubation et collection des données

Toutes les plaques PM ont été placées dans un incubateur OmniLog en aérobiose réglé à 30°C et contrôlé automatiquement toutes les 15 minutes pour les changements de couleur dans les puits. Les lectures sont enregistrées pendant 48 heures, et les données sont analysées par le logiciel Omnilog-PM (version OM_PM_109M), qui génère des courbes de temps en fonction de la couleur du mix A (Biolog Redox Dye) (100x). Chaque souche a été analysée en duplicata, et un résultat de consensus a été obtenu. Le processus du test et de la technologie sont présentés dans la **Figure 5**.

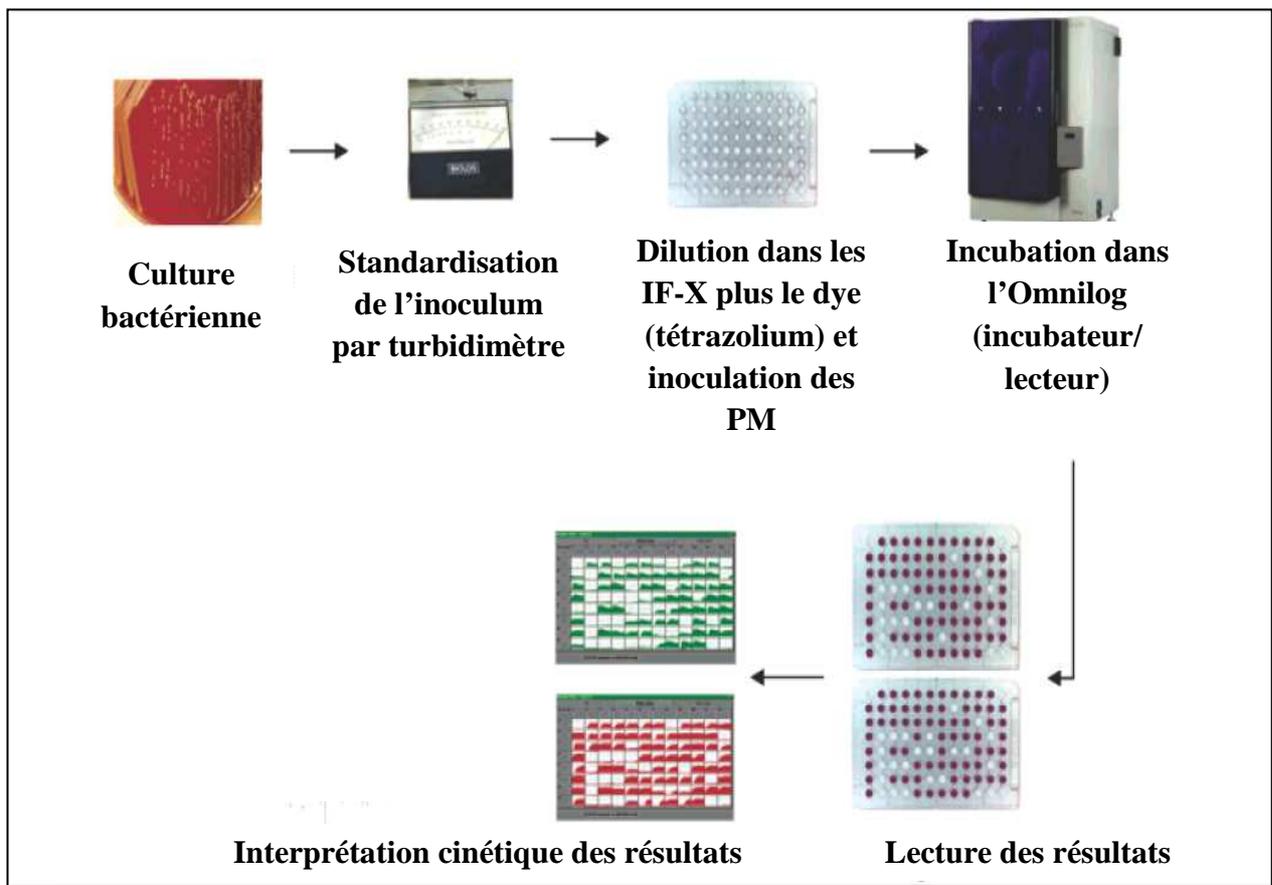


Figure 5. Phases expérimentales de la technique des plaques phénotypiques (PM). Pour déterminer le profil phénotypique d'une souche bactérienne, une suspension cellulaire est préparée et inoculée sur des plaques PM. Les plaques PM sont incubées dans le système PM OmniLog (incubateur et lecteur). La réduction du colorant tétrazolium engendre la formation d'une couleur pourpre qui est enregistrée par une caméra CCD toutes les 15 min et fournit des informations quantitatives et des cinétiques de la réponse des cellules dans les plaques PM.

2.5. Identification phylogénique

2.5.1. Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S

Le gène de l'ARNr 16S des isolats a été amplifié en utilisant la paire d'amorces FD1-RP2 (Weisburg *et al.*, 1991). L'Amplification par PCR a été réalisée dans un volume de 50 µl contenant 5 µl de la suspension bactérienne, 50 mM KCl ; 1,5 mM Mg Cl₂ ; 200 µM de chaque dNTP ; 0,2 µM de chaque amorce oligonucléotidique et 0,5 unités de l'ADN polymérase *Taq* (EuroblueTaq, Eurobio, Les Ulis, France). Le cycle thermique est composé d'une première étape de dénaturation de 5 min à 95°C suivie par 35 cycles de dénaturation de 30 sec à 95°C, d'hybridation des amorces à 52°C pendant 30 sec, d'élongation à 72°C pendant 1 min et une étape d'extension finale de 5 min à 72°C. Le produit de la réaction de PCR a été examiné par électrophorèse en déposant 5 µl des produits PCR sur un gel d'agarose à 1% marqué avec le bromure d'éthidium. Le gel a été ensuite visualisé en utilisant le Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Californie, USA). Les PCR réussies ont été transférées dans la plaque de purification PCR (Macherey Nagel Hoerd, France) filtrées à vide sur un collecteur millipore et agitées avec une plaque Heidolph Titramax 100.

Les produits de PCR purifiés ont été, ensuite, amplifiés à l'aide du kit de séquençage BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystems) comprenant le tampon de séquençage Bvd15X, et les amorces 536F, 536R, 800F, 800R, 1050F et 1050R. Le séquençage est réalisé dans un séquenceur capillaire automatisé ABI3700 (Applied Biosystems, Foster City, California, United States) (**Figure 6**).

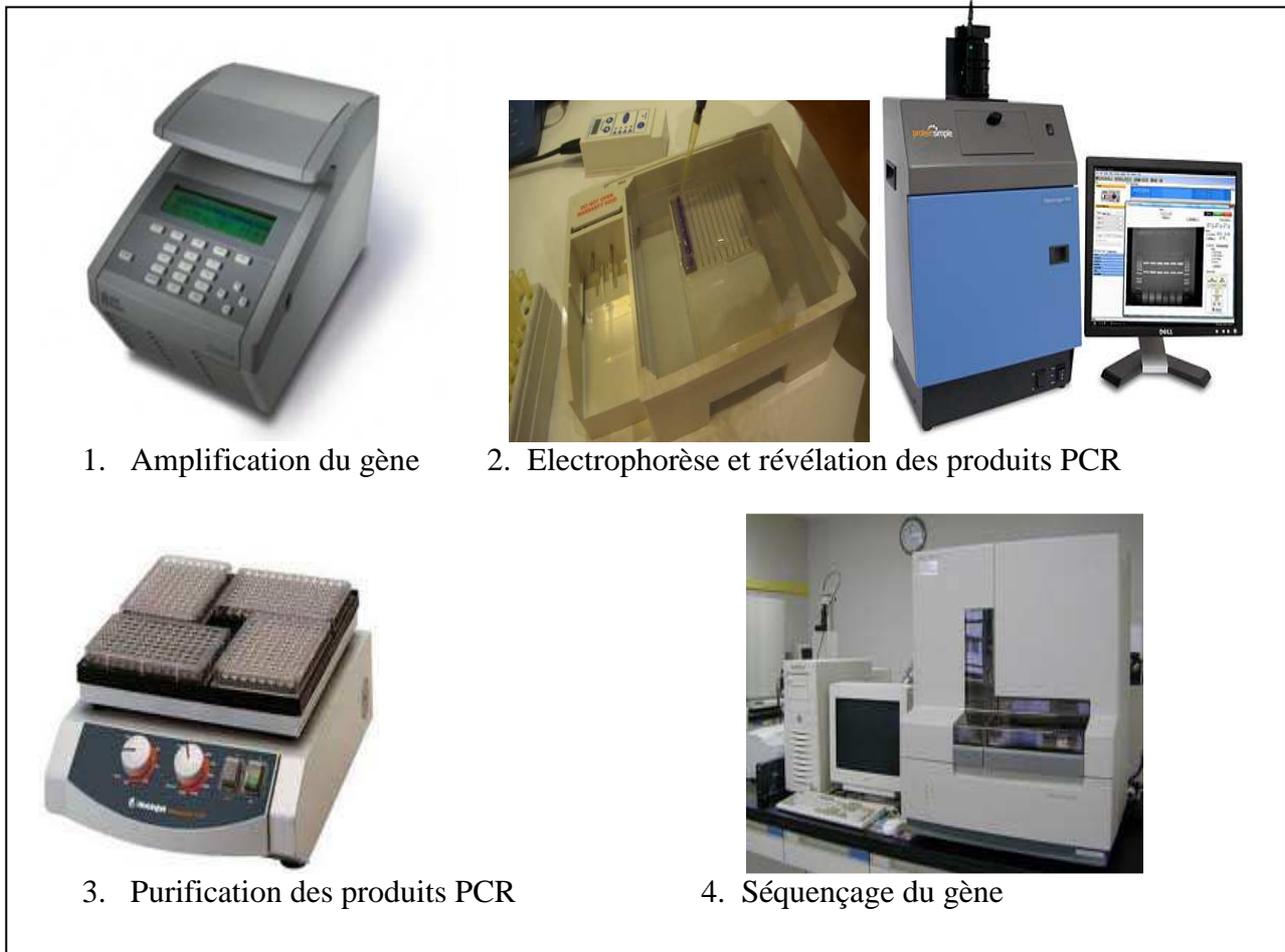


Figure 6. Etapes de l'identification phylogénique

2.5.2. Amplification et séquençage du gène *rpoB*

L'amplification du gène (*rpoB*) codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne a été réalisée en utilisant les amorces CM7 et CM31b comme décrit par Mollet *et al.* (1997) dans le même mix PCR décrit précédemment. Le cycle thermique est composé d'une étape initiale de dénaturation de 5 min à 94°C suivie par 40 cycles de dénaturation de 10 sec à 94°C, hybridation des amorces à 55°C pendant 20 sec et élongation à 72°C pendant 5 sec, et une étape d'extension finale de 5 min à 72°C. Le séquençage a été réalisé avec les amorces CM32b, CM81b en utilisant le même kit et le même séquenceur décrit pour l'ARNr 16S. La réaction de séquençage consiste à une pré-dénaturation à 94°C pendant 60 sec, suivie par 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, hybridation à 45°C pour l'amorce CM81b et à 40°C pour l'amorce CM32b pendant 20 sec et une élongation à 60°C pendant 50 sec.

2.5.3. Amplification et séquençage du gène *hsp60* (GroEL)

L'amplification et le séquençage du gène codant pour la protéine du choc thermique de 60 kDa (*hsp60*) ont été réalisés en utilisant les amorces hsp60F et hsp60R comme décrit par Iversen *et al.* (2004). Le cycle thermique de la PCR est composé d'une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 4 min, suivie de 35 cycles de dénaturation pendant 30 sec à 94°C, hybridation des amorces à 55°C pendant 1min, élongation à 72°C pendant 1 min, et une étape d'extension finale de 7 min à 72°C. La réaction BigDye® et le séquençage ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles de l'ARNr 16S.

2.5.4. Amplification et séquençage du gène *gyrB*

L'amplification et le séquençage du gène codant pour la sous-unité β de l'ADN gyrase (*gyrB*) ont été réalisés en utilisant les amorces gyr-320 et gyr-1260 comme décrit par Dauga (2002). Le cycle thermique de la PCR est composé d'une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 4 min, suivie de 35 cycles de dénaturation pendant 1 min à 94°C, hybridation des amorces à 55°C pendant 1min, élongation à 72°C pendant 2 min, et une étape d'élongation finale de 10 min à 72°C. La réaction BigDye® et le séquençage ont été réalisés dans les mêmes conditions décrites précédemment pour l'ARNr 16S.

2.5.5. Amplification et séquençage du gène *dnaJ*

L'amplification et le séquençage du gène *dnaJ*, encodant une protéine du choc thermique, ont été réalisés en utilisant les amorces DN1-1F et DN1-2R comme décrit par Nhung *et al.* (2007). Le cycle thermique de la PCR est composé d'une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, suivie de 35 cycles de dénaturation de 30 sec à 94°C, hybridation des amorces à 50°C pendant 30 sec, élongation à 72°C pendant 1 min, et une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. La réaction BigDye® et le séquençage ont été réalisés dans les mêmes conditions décrites précédemment pour l'ARNr 16S.

2.5.6. Analyse des séquences

Les séquences des amorces de l'amplification et du séquençage des gènes de l'ARNr 16S, *rpoB*, *hsp60*, *gyrB*, et *dnaJ* sont répertoriés dans le **Tableau 2**.

Les séquences nucléotidiques ont été analysées à l'aide du logiciel ChromasPro (version 1,34). Les relations phylogénétiques des gènes ont été établies à l'aide de la méthode Neighbor-Joining mis en œuvre par le logiciel MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Les séquences des gènes ARNr 16S, *hsp60*, *rpoB*, *gyrB* et *dnaJ* analysées ont été concaténées et leurs arbres phylogénétiques Neighbor-Joining ont été reconstruits à l'aide du logiciel MEGA 5.

Tableau 2. Séquences des différentes amorces utilisées dans l'amplification et le séquençage des gènes ARNr 16S, *rpoB*, *hsp60*, *gyrB* et *dnaJ*.

Amorces	Séquence (5'-3')	Référence
ARNr 16S Fd1 RP2 536F 536R 800F 880R 1050F 1050R	AGAGTTTGATCCTGGVTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACTT CAGCAGCCGCGGTAATAC GTATTACCGCGGCTGCTG ATTAGATACCCTGGTAG CTACCAGGGTATCTAAT TGTCGTCAGCTCGTG CACGAGCTGACGACA	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
<i>rpoB</i> CM7 CM31b CM32b CM81b	AACCAGTTCCGCGTTGGCCTGG CCTGAACACGCTCGGA CGGAACGGCCTGACGTTGCAT TGATCAACGCCAAGCC	Mollet <i>et al.</i> (1997)
<i>hsp60</i> Hsp60F Hsp60R	GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC ATGCATTTCGGTGGTGATCATCAG	Iversen <i>et al.</i> (2004)
<i>gyrB</i> gyr-320 gyr-1260	TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT CMCCYTCCACCARGTAMAGTTC	Dauga (2002)
<i>dnaJ</i> DN1-1F DN1-2R	GATYTRCGHTAYAACATGGA TTCACRCCRTYDAAGAARC	Nhung <i>et al.</i> (2006)

3. Résultats et discussion

3.1. Identification des isolats

Sept isolats bactériens retenus pour identification ont été isolés à partir de trois sols différents non traités par le glyphosate. Ces isolats ont montrés une capacité à croître dans un milieu de culture en présence de l'herbicide glyphosate comme seule source de carbone et d'énergie ou de phosphore. Les isolats ont été nommés comme suit:

- Les isolats **Arph 1** et **Arph 2** isolés du sol agricole à partir du milieu contenant le glyphosate comme seule source de phosphore (MMM2),
- L'isolat **Frglu** isolé du sol forestier à partir du milieu contenant le glyphosate comme seule source de carbone (MMM1),
- L'isolat **Frph** isolé du sol forestier à partir du milieu contenant le glyphosate comme seule source de P (MMM2),
- L'isolat **Bisglu** isolé du sol du Biskra à partir du milieu contenant le glyphosate comme seule source de C (MMM1),
- Les isolats **Bisph1** et **Bisph2** isolés du sol du Biskra à partir du milieu contenant le glyphosate comme seule source de P (MMM2).

Le nombre réduit des isolats est cohérent avec les études de Quinn *et al.* (1988) ; Santos et Flores (1995) ; Kryzsko-Lupicka et Orlik (1997); Liu *et al.* (1991) ; Dick et Quinn (1995) qui indiquent que seul un nombre limité de microorganismes sont capables de se développer lorsque le glyphosate est fourni comme seule source de phosphore, et lorsqu'il est utilisé comme seule source de carbone, la croissance microbienne est rare, mais la croissance est plus apparente lorsqu'il est appliqué à des concentrations élevées (Busse *et al.*, 2001). Ce résultat peut être expliqué par la toxicité des milieux artificiels due au mode d'action du glyphosate (la voie des acides shikimiques est ubiquitaire chez les microorganismes. Le glyphosate rend les microorganismes incapables de synthétiser des acides aminés aromatiques indispensables).

Même si la première étude de l'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification des bactéries remonte à 1975 par Anhalt et Fenselau (Anhalt et Fenselau, 1975), les appareils MALDI-TOF MS conçus pour être utilisés dans des laboratoires n'ont été mis en place que récemment dans le commerce. Au cours des dernières années, cette technique a été utilisée dans des études spécifiques qui ont essentiellement évalués sa capacité à identifier les différents genres bactériens chez les bactéries à coloration de Gram négative telles que *Escherichia coli* et d'autres membres de la famille des entérobactéries (Camara et Hays, 2007; Conway *et al.*, 2001), des cocci à coloration de Gram positive, telles que *Staphylococcus aureus* et des streptocoques (Edwards-Jones *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2004) et certains bacilles à coloration de Gram positive telle que *Bacillus cereus* et *Listeria* (Barbuddhe *et al.*, 2008; Ryzhov *et al.*, 2000).

Les valeurs de scores permettant l'identification présomptive et la discrimination des espèces testées de celles de la base de données sont donnés comme suit: un score > 2 permis l'identification au niveau de l'espèce, un score > 1,7 mais < 2 permis l'identification au niveau du genre, et un score <1,7 ne permis aucune identification.

L'identification par MALDI-TOF MS a donné un score valide supérieur à 2 pour la plupart des isolats permettant ainsi l'identification au niveau de l'espèce. Parmi les sept isolats identifiés par séquençage de l'ADNr 16S, le MALDI-TOF a correctement identifié cinq parmi elles. Ainsi, la sensibilité et la spécificité générique du MALDI-TOF est très élevée. Les regroupements des cinq espèces en se basant sur l'analyse phénotypique par MALDI-TOF et par la phylogénie du gène de l'ARNr 16S étaient parfaitement identiques, cela peut être expliqué par le fait que les protéines ribosomales qui ont été utilisées dans l'analyse MALDI-TOF reflètent directement et étroitement la structure de l'ARNr 16S.

L'analyse par MALDI-TOF de l'isolat **Arph1**, a donné un score de 2,5 correspondant à l'espèce *Pseudomonas putida*. Le spectre de la souche est représenté dans les **Figure 7**.

La séquence de 1500 pb du gène de l'ARNr 16S a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accès KC582298. La séquence du gène de l'ARNr 16S de la bactérie est 99,5% identique à celle du gène de l'ARNr 16S de *P. putida* (GenBank Accession No. gb|EU439424.1|), 99,4% similaire à celle de *P. putida* (GenBank Accession No. gb|EU439425.1|), 99,3% à celle de *P. putida* (GenBank Accession No. gb|FJ433882.1|) et

99% à celle de *P. putida* (GenBank Accession No. gb|JQ435693.1|). La séquence nucléotidique partielle de l'ADNr 16S de la bactérie a montré des similarités élevées à celles des différentes souches de l'espèce *P. putida*. Le résultat de l'analyse du gène de l'ADNr 16S est compatible avec celui du MALDI-TOF, des caractéristiques morphologiques et des tests biochimiques (**Tableau 3**). Par conséquent, l'isolat a été identifié comme *P. putida*. L'arbre phylogénique illustrant les résultats de l'analyse de l'ADNr 16S est représenté dans la **Figure 17**.

L'antibiogramme de l'isolat est représenté dans la **Figure 8** et sa sensibilité aux différents antibiotiques testés est établie en comparant les concentrations inhibitrices minimales (CIM) de l'isolat avec celles données par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (**Tableau 4**). L'isolat est résistant à la ticarcilline, la triméthoprime/sulfaméthoxazole, la piperacilline/tazobactam, la aztréonam et sensible aux autres antibiotiques testés.

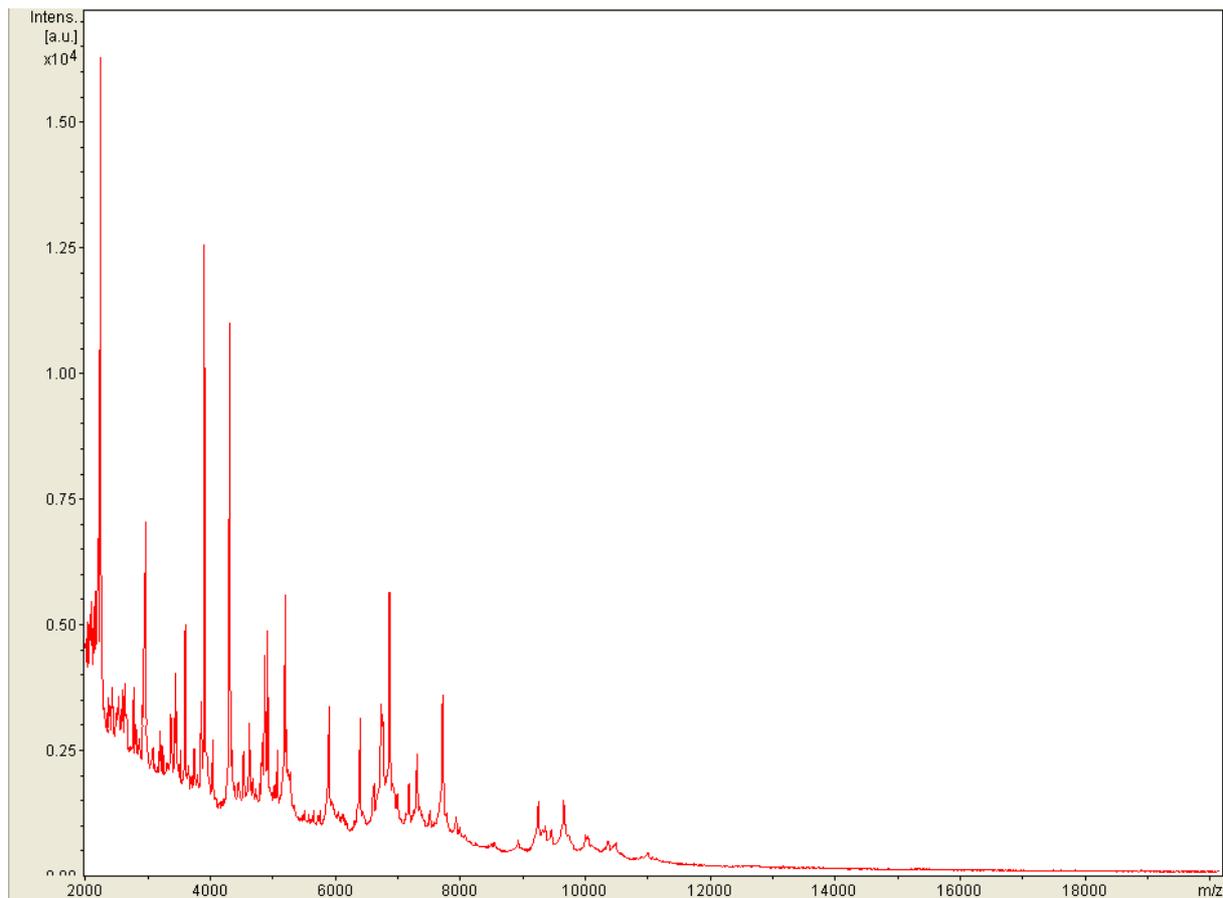


Figure 7. Spectre de masse d'Arph1. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

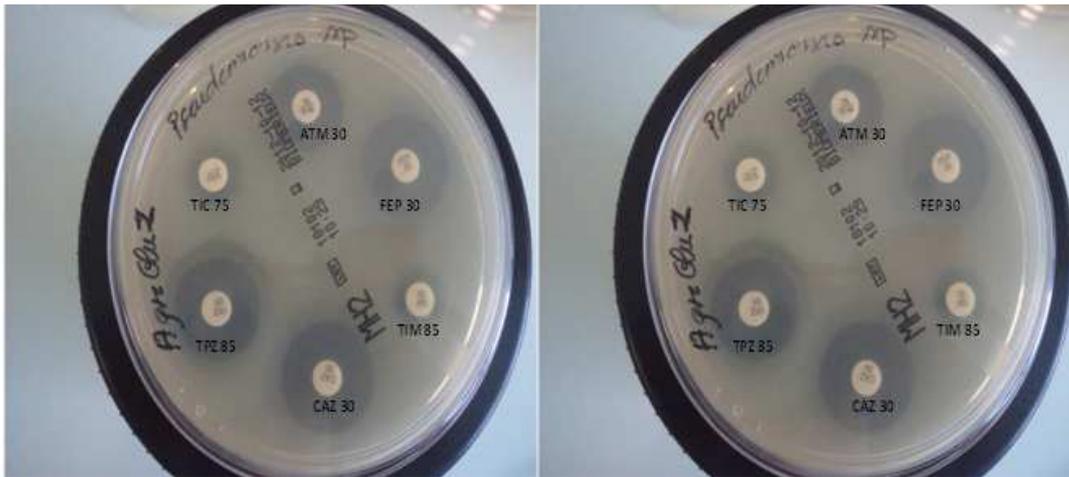


Figure 8. Antibiogramme de l'isolat Arph1 sur milieu MH2

Pour les deux isolats **Arph2** et **Frglu** les scores obtenus par l'analyse du MALDI-TOF, étaient de 2,4 et 2,3 proches de l'espèce *Enterobacter cloacae*, respectivement. Les spectres des deux souches Arph2 et Frglu sont représentés dans les **Figure 10** et **11**, respectivement.

Pour l'analyse du gène de l'ARNr 16S, l'isolat Arph2 a montré une similitude de séquence du gène de 99,1% avec la souche *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb|JF772064.1) de 98,9% avec *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb|CP003737.1) et 98,9% *Pantoea agglomerans* (GenBank Accession No. gb|AY335552.1). Alors que l'isolat Frglu a montré une similitude de 99,3% avec *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb|JX307682.1) et *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb|EF551364.1) et de 98,8% avec *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb|EF059833.1). Les séquences partielles de 1513 pb et de 1288 pb du gène de l'ARNr 16S des isolats Arph2 et Frglu ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accès KC582299 et KC582300, respectivement. En se basant sur le résultat des analyses phylogéniques, phénotypiques (**Tableau 3**) et le MALDI-TOF, les isolats Arph2 et Frglu peuvent être identifiés comme deux souches de l'espèce *E. cloacae*. L'arbre phylogénétique illustrant les résultats de l'analyse de l'ADNr 16S des deux isolats est représenté dans la **Figure 17**.

Les antibiogrammes des deux isolats **Arph2** et **Frglu** sont représentés dans les **Figure 10** et **12**, respectivement et leur sensibilité est interprétée dans le **Tableau 4**. L'isolat Arph 2 est résistant à la ticarcilline, la triméthoprime/sulfaméthoxazole, la ticarcilline/ac.

clavulanique, la aztréonam, la ceftriaxone et sensible aux autres antibiotiques testés. Quand à l'isolat Frglu, il est sensible a tous les antibiotiques testés.

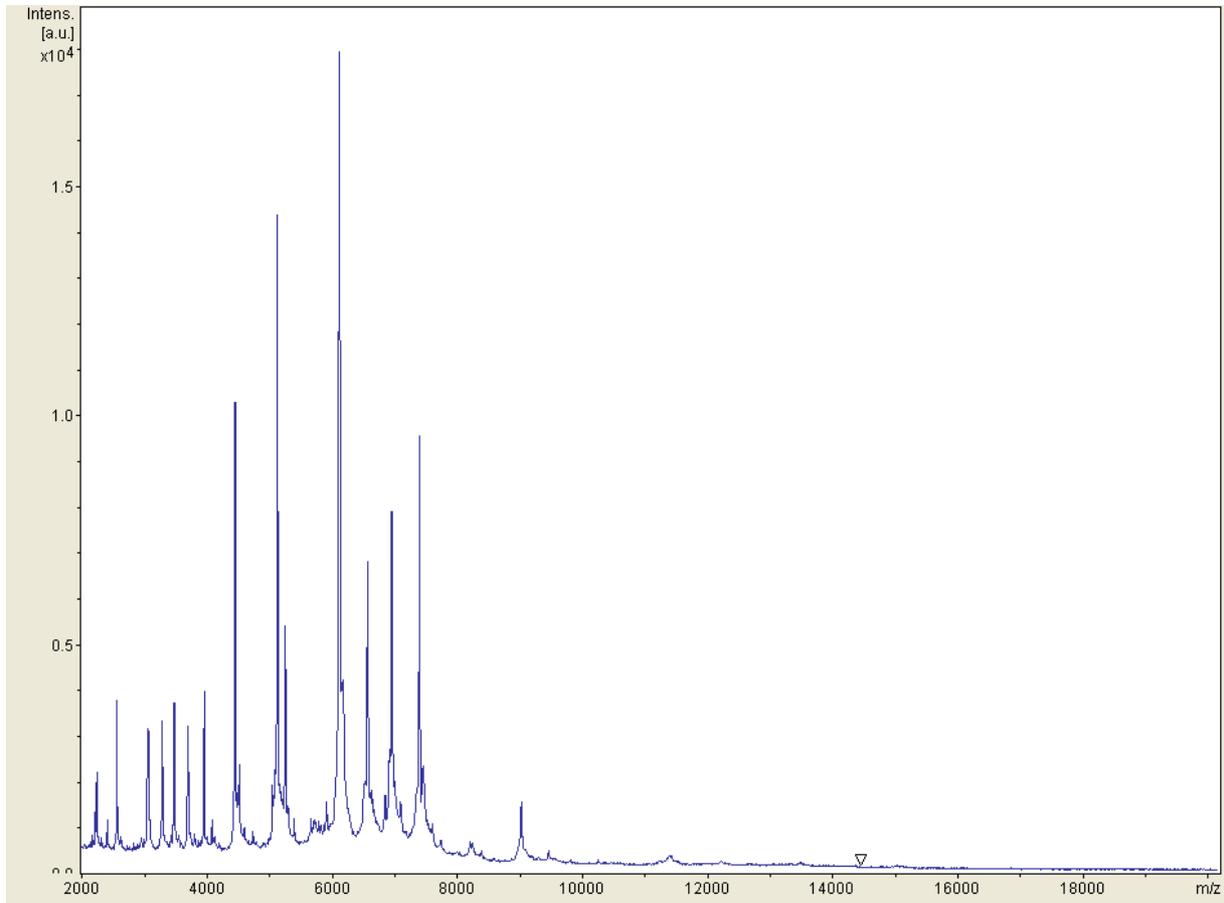


Figure 9. Spectre de masse d'Arph2. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.



Figure 10. Antibiogramme de l'isolat Arph2 sur milieu MH2

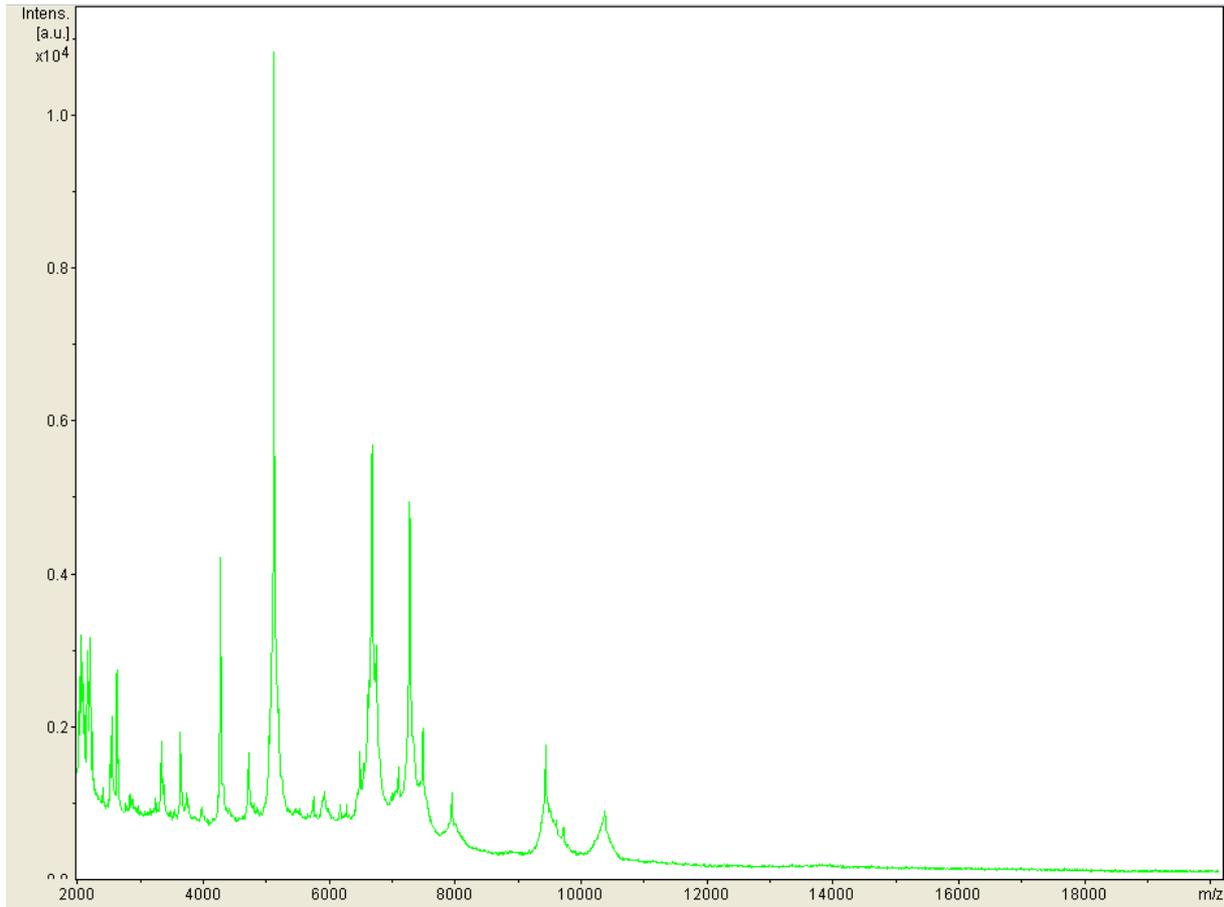


Figure 11. Spectre de masse de **Frglu**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.



Figure 12. Antibiogramme de l'isolat **Frglu** sur milieu **MH2**

Pour l'isolat **Frph**, le résultat du MALDI-TOF l'identifie comme *Rahnella aquatilis* avec un score de 2,5. Le spectre de la souche est représenté dans les **Figure 13**. Le résultat de l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S montre que l'isolat Frph partage une similitude de 99,2% avec *R. aquatilis* (GenBank Accession No. gb |FJ405361.1|), de 99% avec *R. aquatilis* (GenBank Accession No. gb |AY253921.1|) et de 98,8% avec *R. aquatilis* (GenBank Accession No. emb |X79937.1|). La séquence partielle de 1337 pb du gène de l'ARNr 16S de l'isolat Frph a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accès KC582301. L'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S regroupe l'isolat avec les souches de l'espèce *R. aquatilis* comme le montre la **Figure 17**. En se basant sur le résultat des analyses phylogéniques, phénotypiques (**Tableau 3**) et du MALDI-TOF l'isolat Frph peut être identifié comme *R. aquatilis*.

L'antibiogramme de l'isolat est représenté dans la **Figure 14** et sa sensibilité est interprétée dans le **Tableau 4**. L'isolat est sensible à tous les antibiotiques testés.

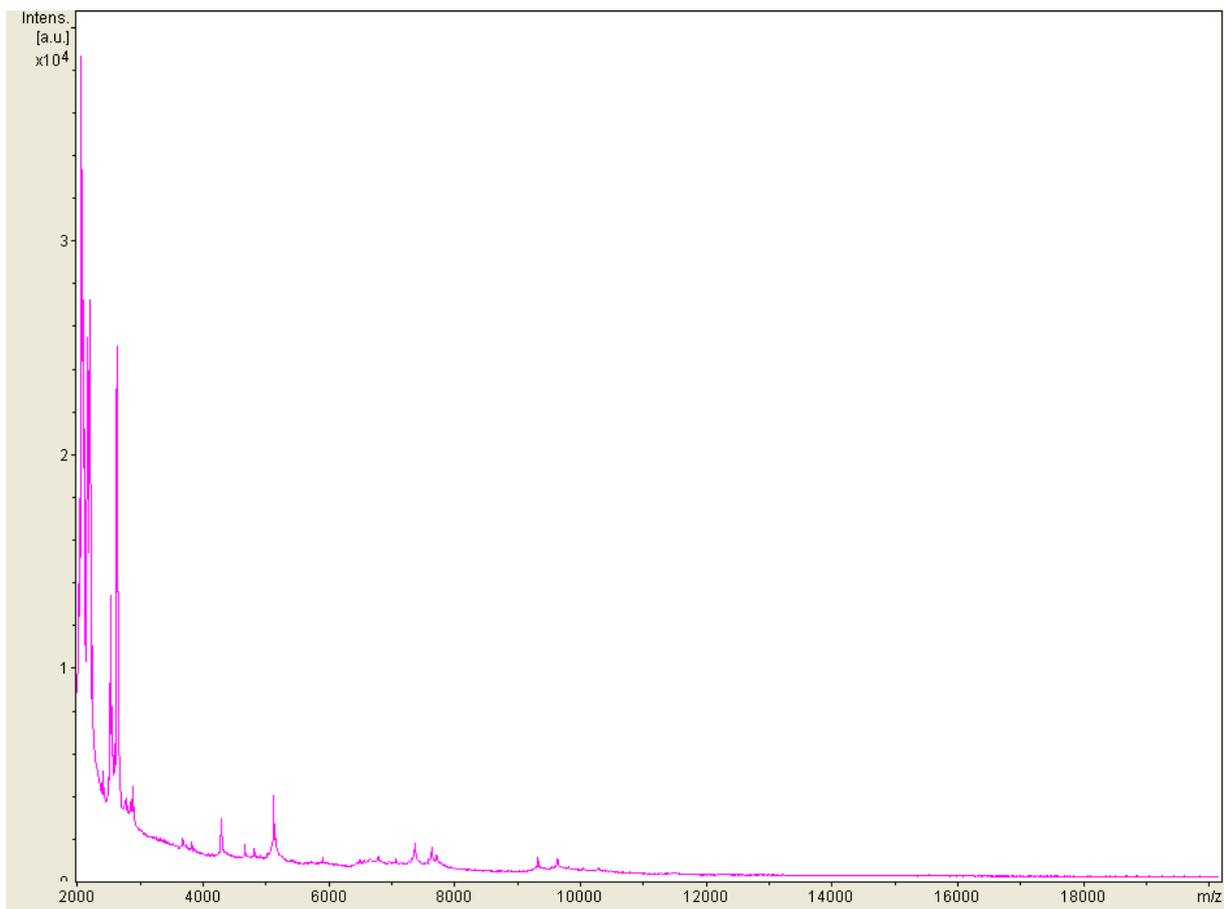


Figure 13. Spectre de masse de **Frph**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré

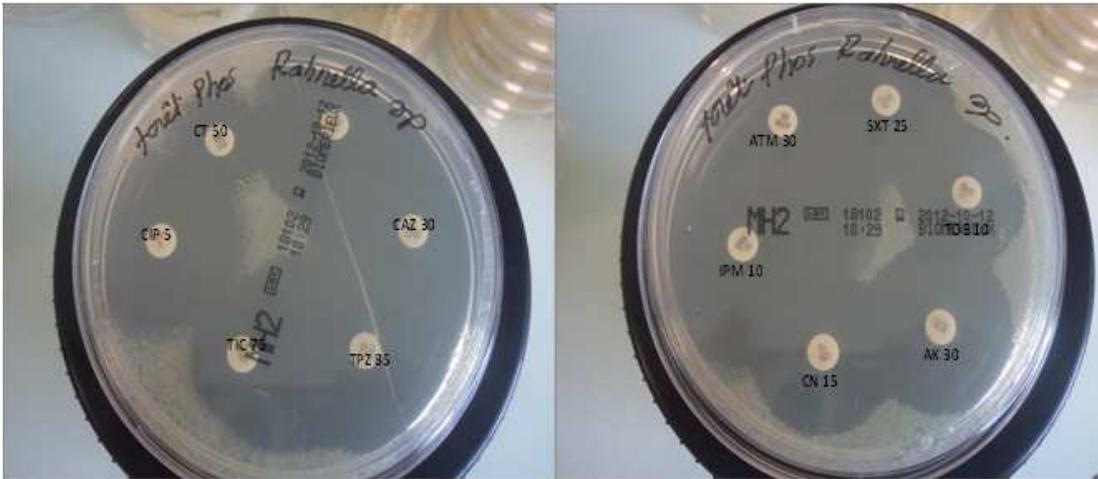


Figure 14. Antibiogramme de l'isolat Frph sur milieu MH2

Pour l'isolat **Bisglu** le score obtenu par le MALDI-TOF était 2,4 proche de l'espèce *Serratia marcescens*. Le spectre de la souche est représenté dans les **Figure 15**. Le résultat de l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S a montré que l'isolat Bisglu partage une similarité de 99,3% avec *S. marcescens* (GenBank Accession No. gb | JQ308606.1) et *S. marcescens* (GenBank Accession No. gb | JQ308604.1) et 98,9% avec *S. marcescens* (GenBank No. dbj | AB594756.1). La séquence partielle de 1233 pb du gène de l'ARNr 16S de l'isolat a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accès KC582302. L'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S regroupe l'isolat avec des souches de l'espèce *S.marcescens* comme le montre **Figure 17**. Sur la base des résultats de l'analyse phylogénétique, phénotypique (**Tableau 3**) et du MALDI-TOF, l'isolat Bisglu peut être identifié comme *S. marcescens*.

L'antibiogramme de l'isolat est représenté dans la **Figure 16** et sa sensibilité est interprétée dans le **Tableau 4**. L'isolat est sensible à tous les antibiotiques testés.

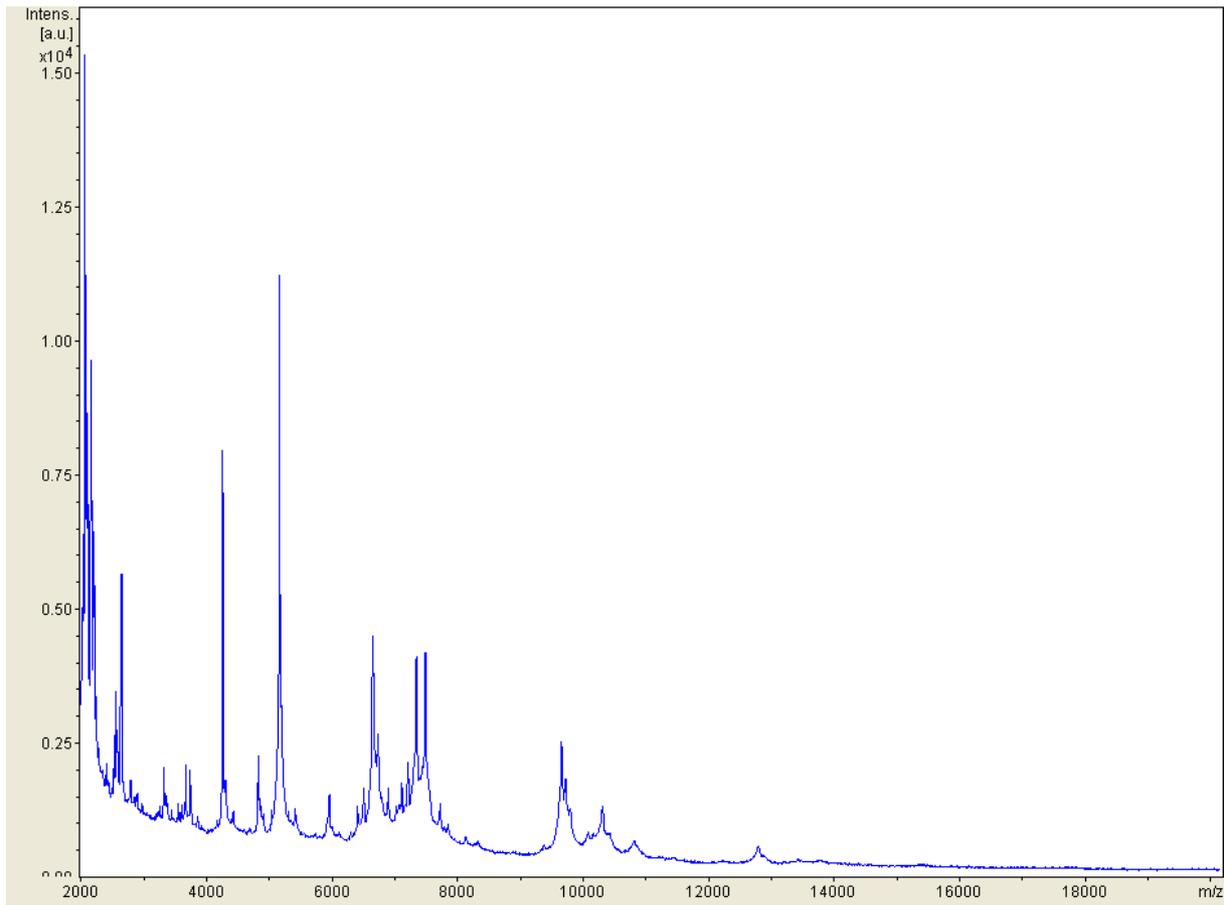


Figure 15. Spectre de masse de **Bisglu**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré



Figure 16. Antibiogramme de l'isolat **Bisglu** sur milieu MH2

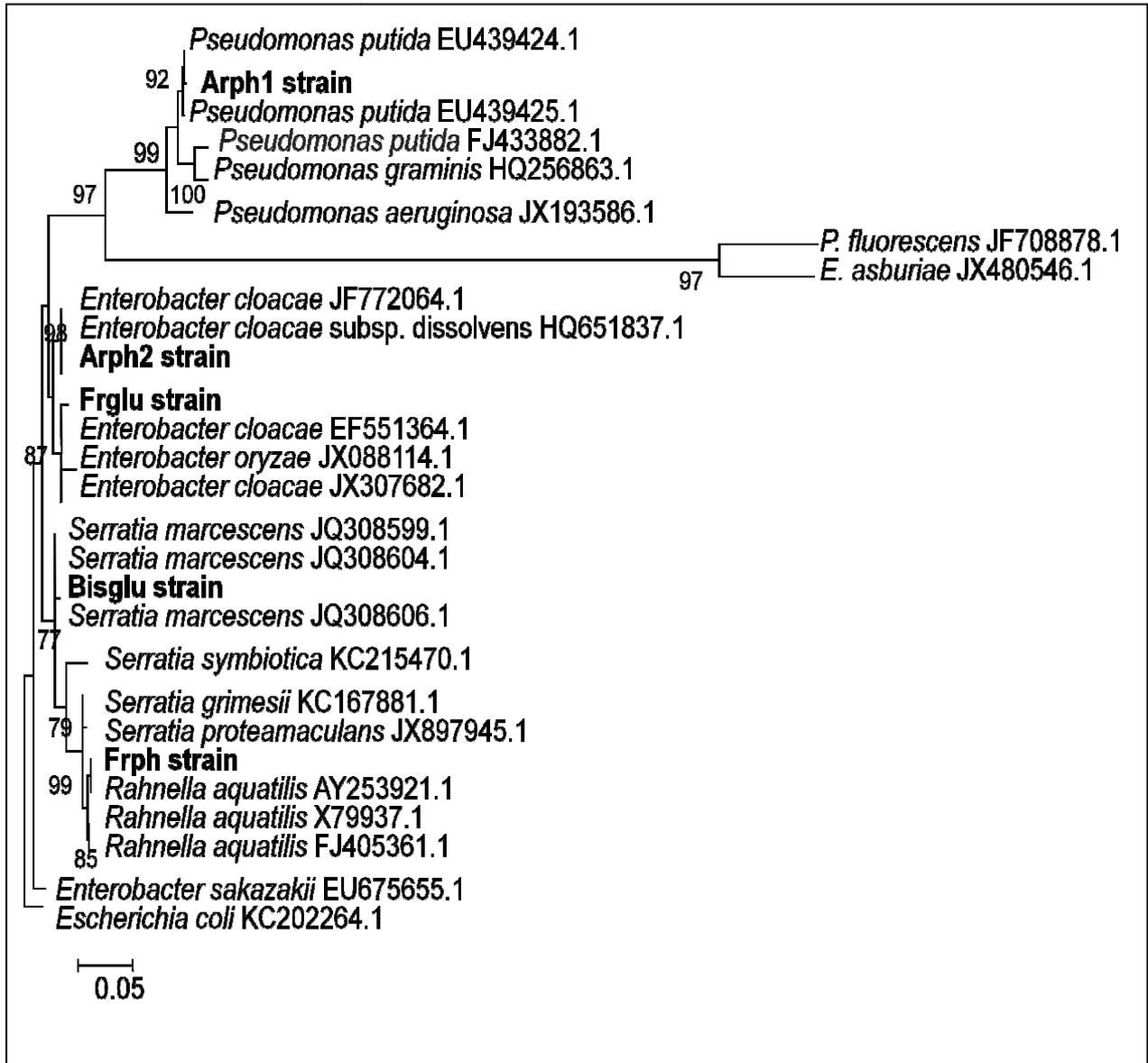


Figure 17. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de l'ARNr 16S de différentes souches d'Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées. L'échelle 0,05 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Tableau 3. Propriétés morphologiques et biochimiques des différent isolats. (+) isolat positif; (-) isolat négatif.

Propriétés	Arph1	Arph2	Frglu	Frph	Bisglu
Morphologie	bacille	bacille	bacille	bacille	bacille
Type de respiration	aéro-anaéro	aéro-anaéro	aéro-anaéro	aéro-anaéro	aéro-anaéro
Mobilité	+	+	+	+	+
Tests biochimiques					
Test de Gram	-	-	-	-	-
Oxydase/ catalase	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+
β -galactosidase	-	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	+	+	+	+
Nitrate production	-	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	+	+	-	+
Ornithine decarboxylase	-	+	+	-	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	-	+
Utilisation des sucres					
Mannose	-	+	+	+	+
Glucose	-	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	+	+	-
Sucrose	-	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	+	+
Amygdalin	-	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	+

Tableau 4. Test de sensibilité aux antibiotiques des différents isolats. (S) sensible ; (R) résistant ; (-) non testé.

Antibiotique \ Souche	Arph2 <i>Enterobacter cloacae</i>	Frglu <i>Enterobacter cloacae</i>	Bisglu <i>Serratia marcescens</i>	Frph <i>Rahnella aquatilis</i>	Arph1 <i>Pseudomonas putida</i>
Céfépime	S	S	S	-	S
Ticarcilline	R	S	S	S	R
Imipénème	S	S	S	S	S
Gentamicine	S	S	S	S	S
Amikacine	S	S	S	S	S
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	R	S	S	S	R
Colistine	-	-	-	S	S
Ticarcilline/ac. Clavulanique	R	S	S	S	-
Pipéracilline/tazobactam	S	S	S	S	R
Aztréonam	R	S	S	S	R
Ceftriaxone	R	S	S	S	-
Tobramycine	-	-	-	S	S
Ertapénème	S	S	S	S	-
Ciprofloxacine	S	S	S	S	S
Ceftazidime	-	-	-	S	S

Pour les deux isolats **Bisph1** et **Bisph2**, le score obtenu par l'analyse MALDI -TOF était de 1,8 proche du genre *Enterobacter*, ce qui suggère que les deux isolats ne peuvent être rapprochés à aucune des espèces connues dans ce genre. Les spectres de référence des deux souches sont représentés dans les **Figures 18, 19**.

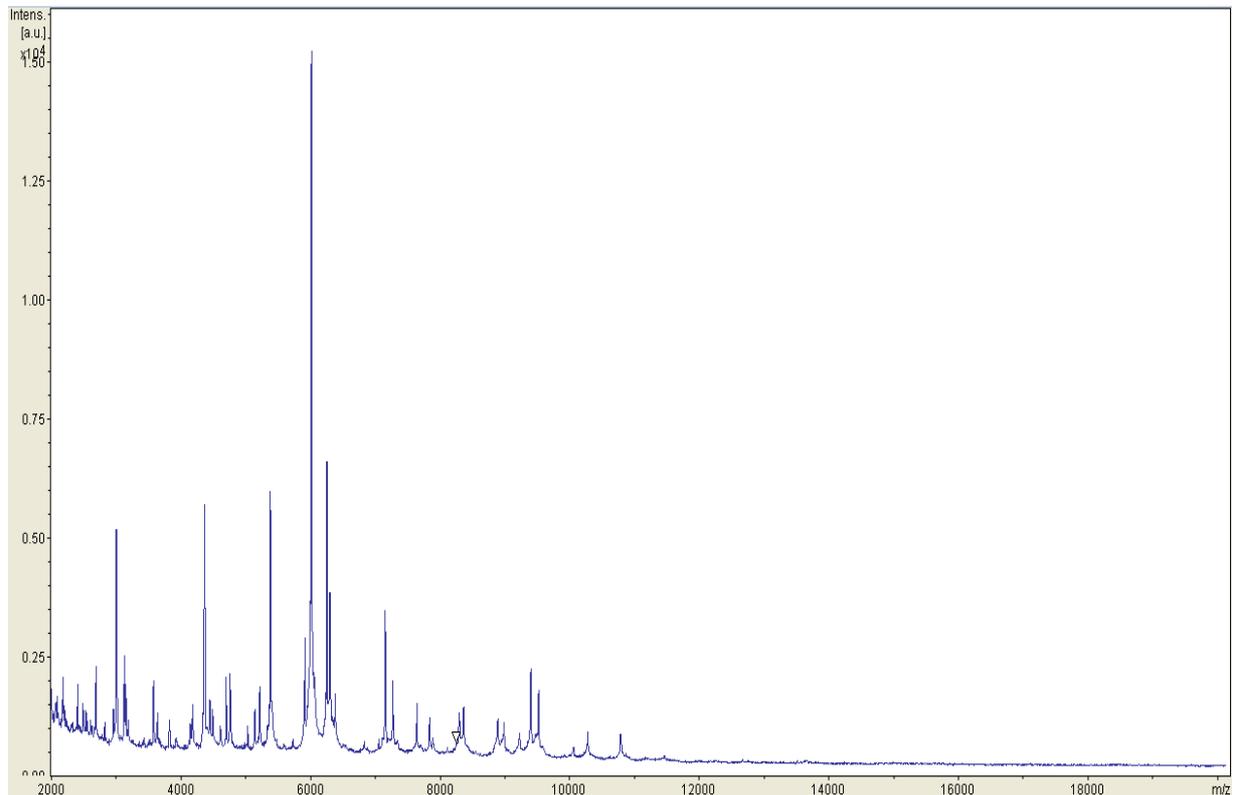


Figure 18. Spectre de masse de référence de **Bisph1**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

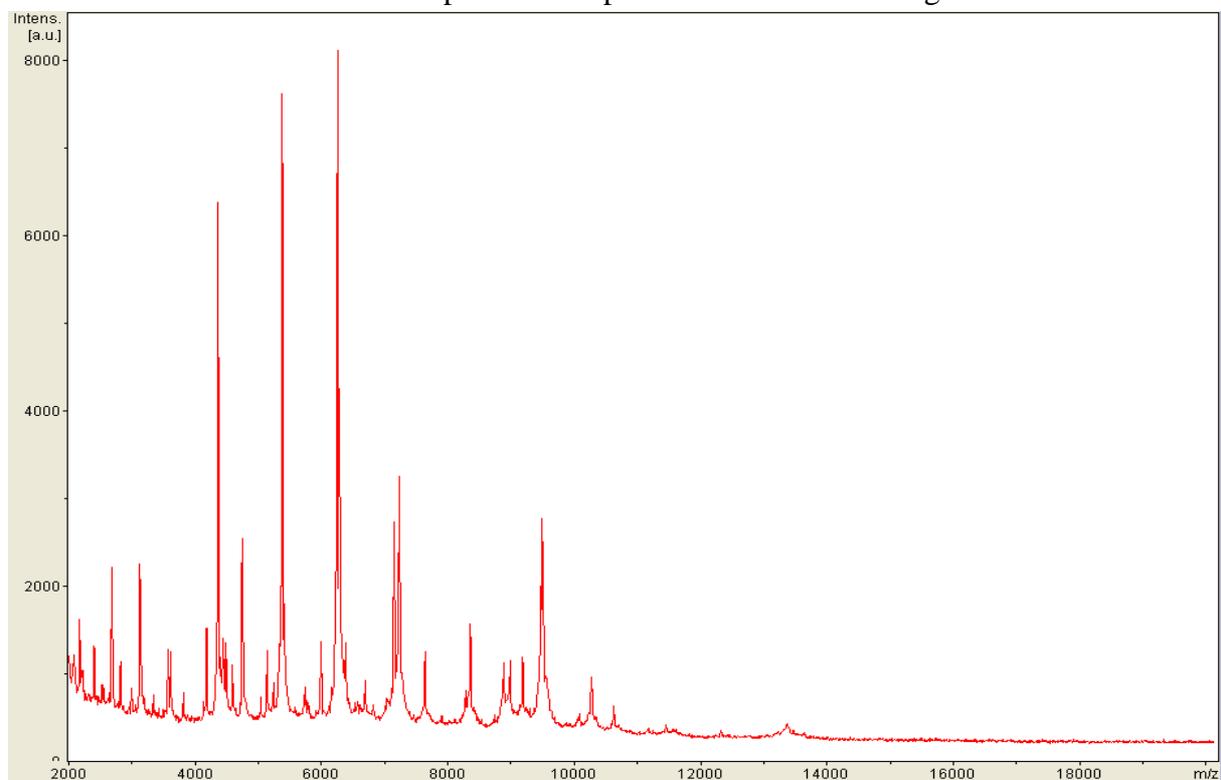


Figure 19. Spectre de masse de référence de **Bisph2**. Les spectres obtenus à partir de 11 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

Les cellules des deux isolats Bisph1 et Bisph2 sont aéro-anaérobies facultatifs, mobiles, des bacilles à coloration de Gram négative (**Figure 20, 21**), de 0,3 µm de large par 1,8 µm de long et de 0,9 µm de large par 2,1 µm de long respectivement, (**Figure 22, 23**). Elles présentent les caractéristiques générales du genre *Enterobacter*, qui sont une catalase positive, une oxydase négative, une croissance après 18- 24 h à 15- 44°C avec un optimum de croissance à 37°C sur la gélose non sélective Columbia agar additionnée de 5% de sang de mouton et de la gélose chocolat. Après une incubation en aérobiose pendant 24h à 37°C sur gélose Columbia au sang, les colonies étaient non hémolytiques et pigmentées en jaune pour l'isolat Bisph1. Toutefois les deux isolats ont divergés sur la base de certains caractères biochimiques. L'isolat Bisph1 est positif pour la production d'indole et donne une réaction positive pour les tests de : β -glucosidase, l'acide succinique, l'acide L-aspartique, le dulcitol, le D-xylose, l'acide formique, l'acide L-glutamique, l'acide D-galactonique- γ -lactone, la Tween 20, la L-asparagine, le D-glucosaminique, l'acide lactulose, le saccharose, le mono méthyl succinate, l'acide pyruvique, l'acide L-galactonique- γ -lactone, la pectine, l'amygdaline, le D-arabinose, le D-arabitol, le 2-désoxy-D-ribose, le 3-0- β -D-galacto-pyranosyl-D-arabinose, le α -méthyl-D-glucoside, le 2-hydroxy benzoïque, le β hydroxy-butyrique, l'acide 5-céto-D-gluconique et l'acide L-histidine. En revanche, l'isolat Bisph2 est négatif pour tous les composés cités précédemment et il utilisait le maltitol, le D-psicose et le D-mélibiose en tant que seules sources de carbone (**Figure 24, 25 et 26**) (**Tableau 5, 6 et 7**)

Les antibiogrammes des deux isolats Bisph1 et Bisph2 sont représentés dans la **Figure 27** et leur sensibilité, respective, est interprétée dans le **Tableau 8**.

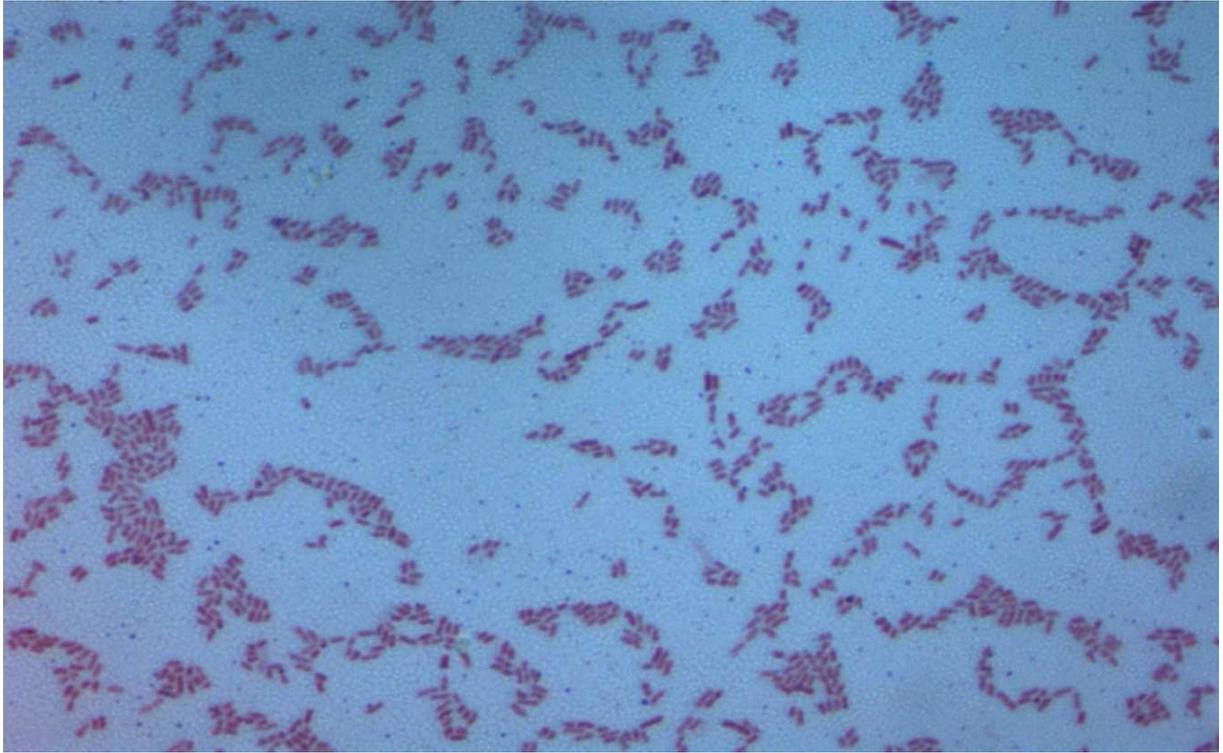


Figure 20. La coloration de Gram de l'isolat **Bisph1**.

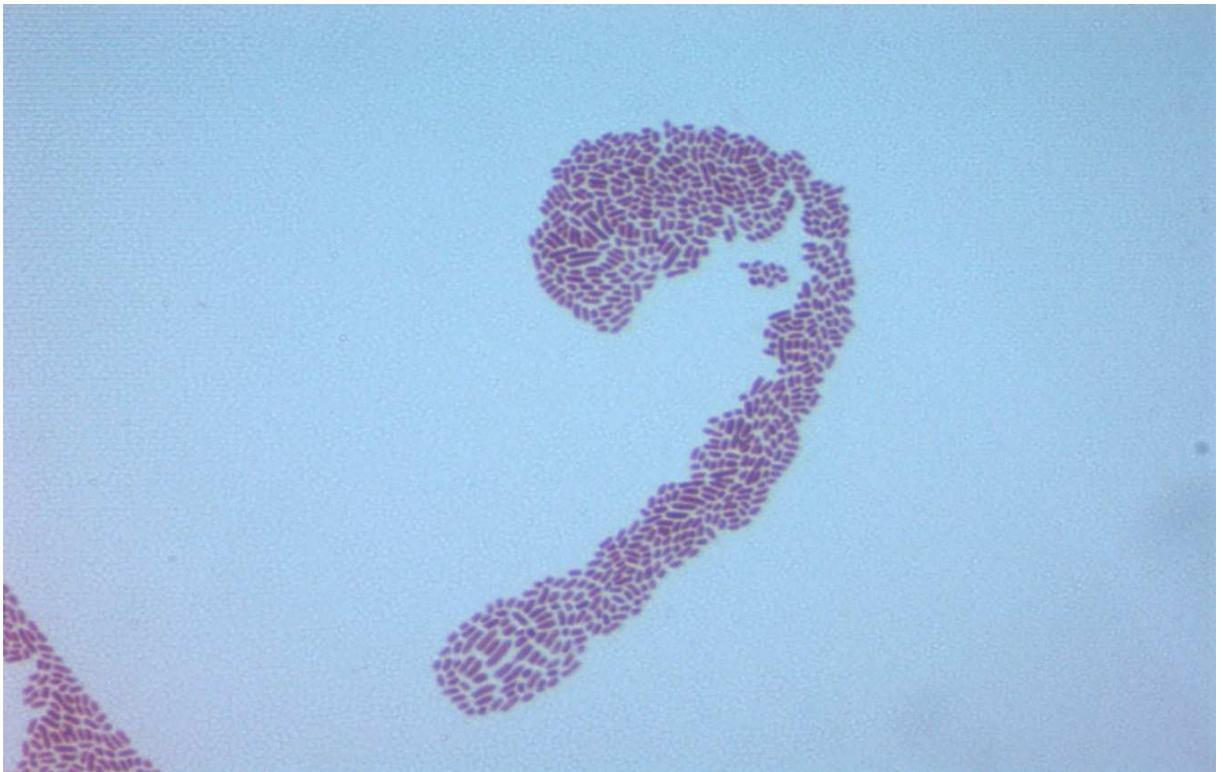


Figure 21. La coloration de Gram de l'isolat **Bisph2**.

c



Figure 22. Microscopie électronique de transmission de **Bisph1** en utilisant un 268D Morgani (Philips) à une tension de fonctionnement de 60 kV. La barre d'échelle représente 1000 nm.

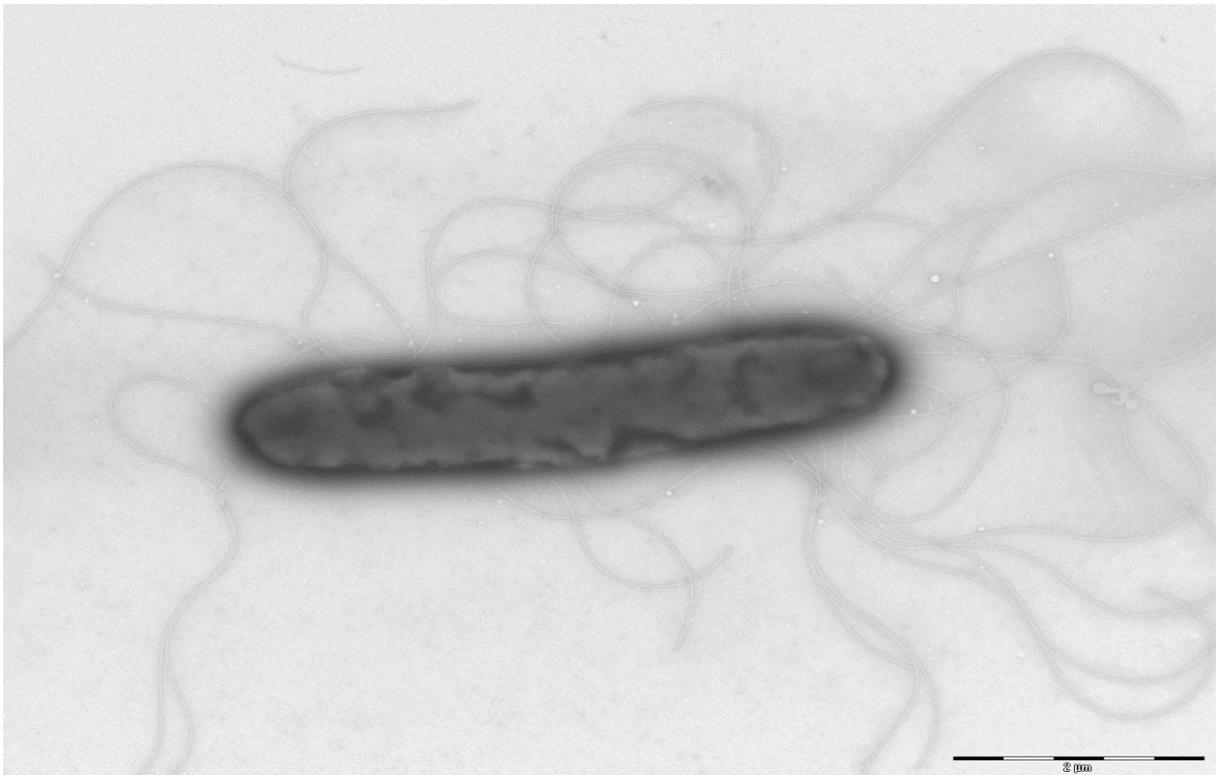


Figure 23. Microscopie électronique de transmission de **Bisph2** en utilisant un 268D Morgani (Philips) à une tension de fonctionnement de 60 kV. La barre d'échelle représente 1000 nm.

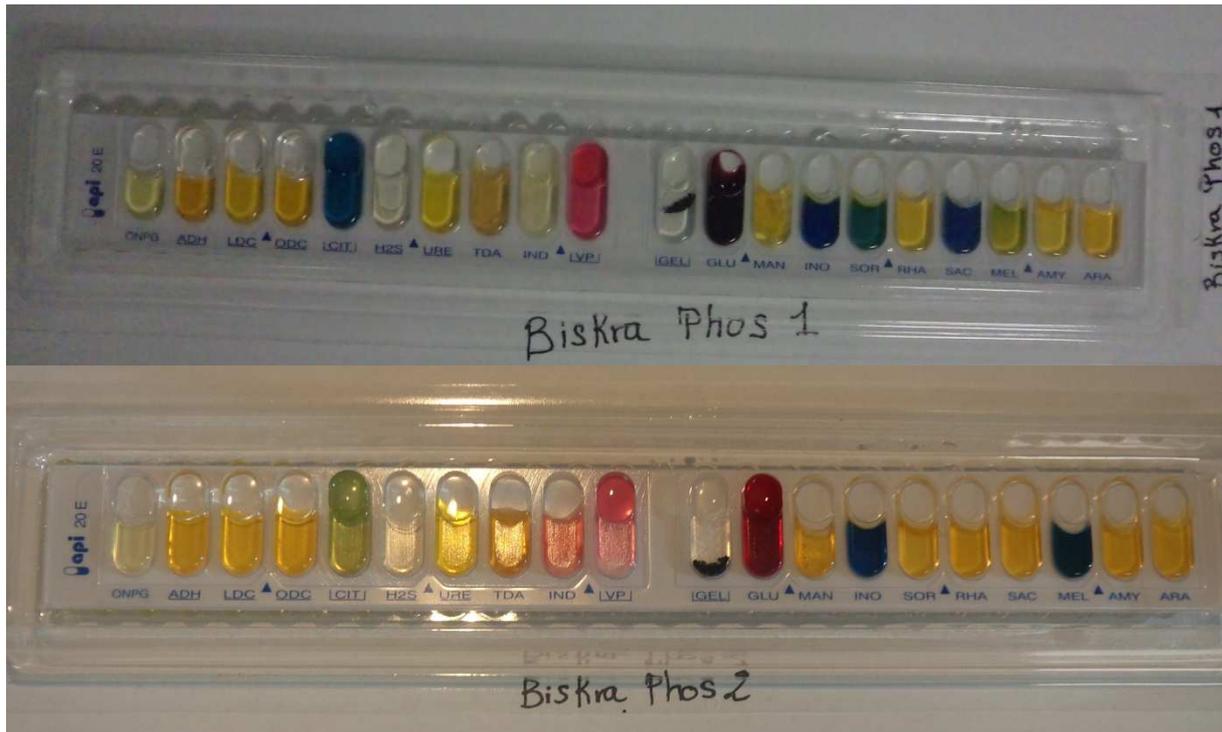


Figure 24. Résultat de la galerie Api 20 E des isolats **Bisph1** en haut et **Bisph2** en bas.

Tableau 5. Test API 20 pour les isolats Bisph1 et Bisph 2

Api 20E	Bisph 1	Bisph 2
β -galactosidase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate	+	-
H ₂ S production	-	-
Urease	-	-
Tryptophan deaminase	-	-
Indole production	-	+
Voges-Proskauer	-	+
Gelatinase	-	-
Glucose	+	+
Mannose	+	+
Inositol	-	-
Sorbitol	+	+
Rhamnose	+	+
Saccharose	-	+
Melibiose	+	-
Amygdalin	+	+
Nitrate production	+	+
Oxydase	-	-
NO ₂	+	+

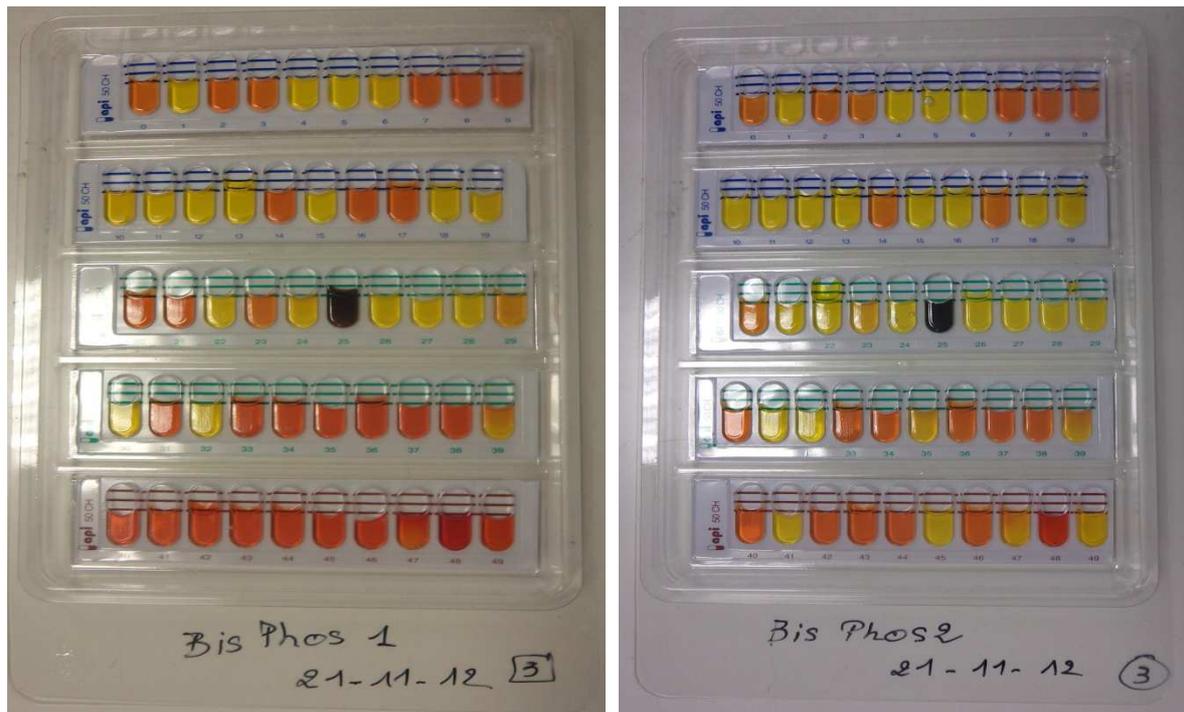


Figure 25. Résultat de la galerie Api 50CH des isolats **Bisph1** à gauche et **Bisph2** à droite.

Tableau 6 . Test API 50 CH pour les isolats Bisph1 et Bisph 2

Numéro de test	API 50 CH	Bisph1	Bisph2
1	Glycérol	+	+
2	Erythritol	-	-
3	D- Arabinose	-	-
4	L- Arabinose	-	+
5	D- Ribose	+	+
6	D-Xylose	-	+
7	L-Xylose	-	-
8	D-Adonitol	-	-
9	Méthyl-βD-Xylopyranoside	-	-
10	D- Galactose	-	+
11	D-Glucose	-	+
12	D-Fructose	-	+
13	D-Mannose	-	+
14	L-Sorbose	-	-
15	L-Rhamnose	+	+
16	Dulcitol	-	+
17	Inositol	-	-
18	D-Mannitol	-	+
19	D-Sorbitol	+	+
20	Méthyl-α-D-Mannopyranoside	-	-
21	Méthyl-α-D-glucopyranoside	-	+
22	N-AcétylGlucosamine	-	+
23	Amygdaline	+	+

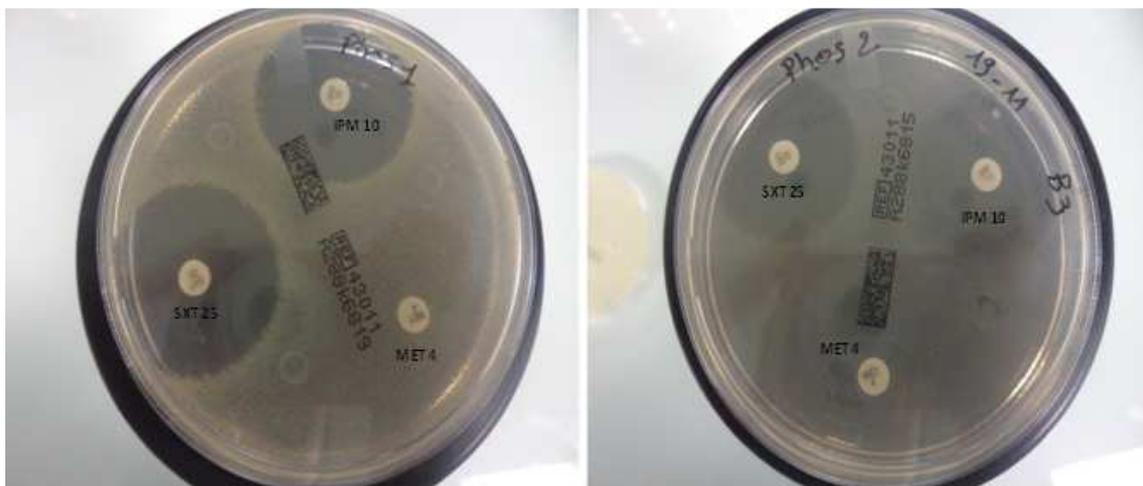
24	Arbutine	+	+
25	Esculine citrate de fer	+	+
26	Salicine	+	+
27	D-Cellobiose	+	+
28	D-Maltose	+	+
29	D-Lactose (origine bovine)	+	+
30	D-Melibiose	+	-
31	D-Saccharose	-	+
32	D-Trehalose	-	+
33	Inuline	-	-
34	D-Mélezitose	-	-
35	D-Raffinose	-	+
36	Amidon	-	-
37	Glycogène	-	-
38	Xylitol	-	-
39	Gentiobiose	-	+
40	D-Turanose	-	-
41	D-Lyxose	-	+
42	D-Tagatose	-	-
43	D-Fucose	-	-
44	L-Fucose	-	-
45	D-Arabitol	-	+
46	L-Arabitol	-	-
47	Potassium Gluconate	-	+
48	Potassium 2-Cétogluconate	-	-
49	Potassium 5-Cétogluconate	-	+



Figure 26. Résultat de la galerie API ZYM des isolats **Bisph1** en haut et **Bisph2** en bas.

Tableau 7. Test API ZYM pour les isolats Bisph1 et Bisph2

API ZYM	Bisph1	Bisph2
Phosphatase alcaline	+	+
Estérase (C4)	-	-
Estérase lipase (C8)	-	-
Lipase (C14)	-	-
Leucine arylamidase	+	+
Valine arylamidase	-	-
Cystine arylamidase	-	-
Trypsine	-	+
α - chymotrypsine	-	-
Phosphatase acide	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
α -galactosidase	-	-
β - galactosidase	+	+
β - glucosidase	-	-
α -glucosidase	+	+
β -glucosidase	-	+
N-acétyl- β - glucosaminidase	-	-
α -mannosidase	-	-
α -flucosidase	-	-



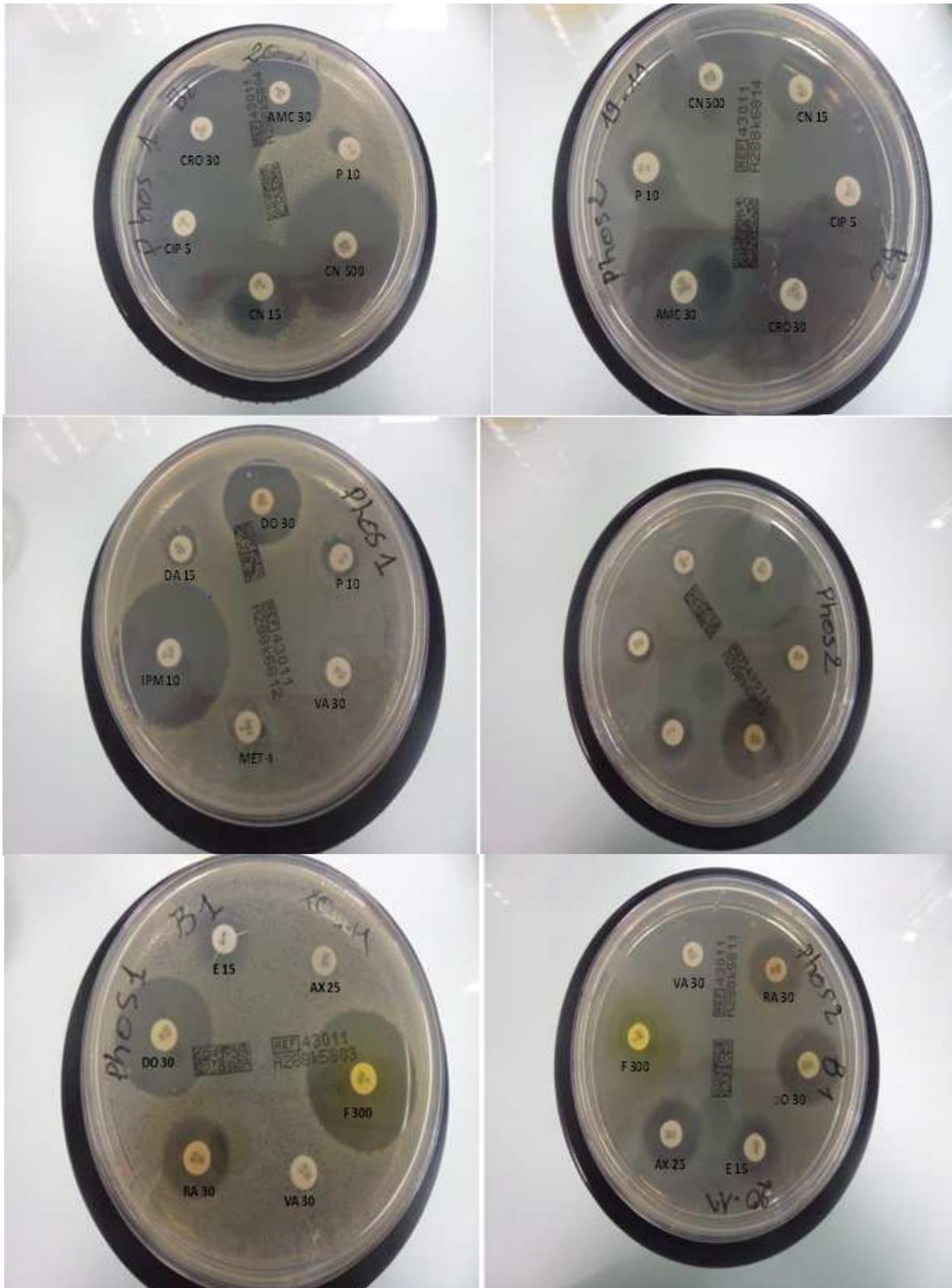


Figure 27. Antibiogrammes des isolats **Bisph1** (à gauche) et **Bisph2** (à droite) sur milieu MH2

Tableau 8. Test de sensibilité aux antibiotiques des deux isolats Bisph1 et Bisoh 2. (S) sensible ; (R) résistant ; (R/S) intermédiaire.

Antibiotique	Bisph 1	Bis ph2
Céfépime	S	S
Ticarcilline+acide clavulanique	S	S
Céftiaxone	S	S
Aztréonam	S	S
Piperacilline+Tazobactam	S	S
Ticarcilline	R	S
Imipènème	S	S
Ertapènème	S	S
Ciprofloxacine	S	S
Gentamicine15	S	S
Gentamicine500	S	S
Amikacine	S	S
Triméthoprim+Sulfamides	S	S
Amoxicilline	R	R
Amoxicilline+ Acide clavulanique	S	S
Nitrofurantoin	S	R
Vancomycine	R	R
Rifampicine	R/S	R/S
Doxycycline	S	R/S
Erythromycine	R	R
Triméthoprim	S	S
Metronidazole	R	R

Les séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats Bisph1 et Bisph2 ont montrées une similarité de 95,8% entre elles et forment des branches distinctes dans l'arbre phylogénétique (**Figure 28**). Les deux isolats présentent une grande similitude de séquence du gène de l'ARNr 16S de 99 % avec *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb|CP001918.1|), de 89,8% avec *Enterobacter dissolvens* strain AGYP1 (GenBank Accession No. gb|HQ336043.1|), et de 98,4% à *Salmonella enterica subsp. Enterica* (GenBank Accession No. gb|CP000857.1|) pour Bisph1 ; de 98% avec *E. asburiae* (GenBank Accession No. gb|JF772103.1|), et de 97% avec *Klebsiella pneumoniae* (GenBank Accession No. gb|EF197996.1|) pour Bisph2.

Malgré les similarités élevées des séquences du gène de l'ARNr 16S entre les deux isolats Bisph1, Bisph2 et les souches données par GenBank, ce résultat reste non discriminatif pour ces deux isolats. La similarité du gène de l'ARNr 16S de la souche *E.cloacae* NRCG9 (GenBank Accession No. gb|JX514420.1|) par exemple est de 99% avec *Klebsiella* sp. (GenBank Accession No. gb|HM461201.1|). La souche *E. cloacae* ACC6 (GenBank Accession No. gb|JX514409.1|) quant elle partage une similarité de 99,9% avec *Pantoea* sp. NJ-32 (GenBank Accession No. gb|AM421978.1|) et avec *E.aerogenes* MDAZTVIIR (GenBank Accession No. gb|JF513188.1|) et *Klebsiella pneumoniae* zg2010 (GenBank Accession No. gb|JX514409.1|). Un autre exemple de la souche *E. oryzae* strain WL4 (GenBank Accession No. gb|JF513182.1|) qui partage une similarité de la séquence de l'ADNr 16S de 99,4% avec *E. radicincitans* strain DSM 16656T (GenBank Accession No. emb|HF569043.1|) et de 99,3% avec *E. aerogenes* strain LSRC (GenBank Accession No. gb|JF772083.1|). Cela confirme que le gène de l'ARNr 16S seul, n'est pas discriminatif du genre dans la famille des Enterobacteriaceae.

L'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S indique que les deux isolats appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, mais sur la base de ces seuls résultats, les deux isolats ne peuvent pas être placés avec certitude à un niveau taxonomique plus fin.

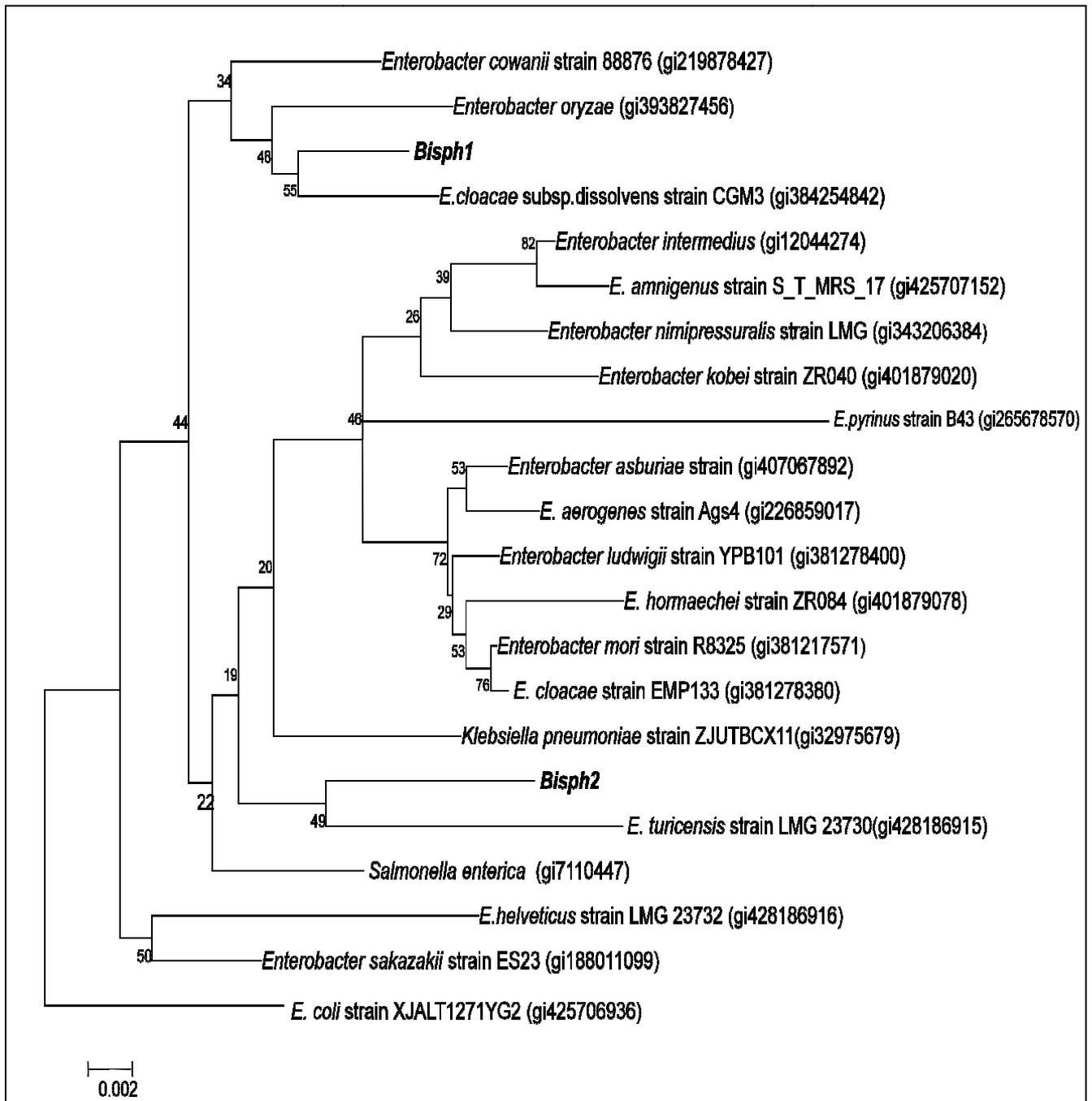


Figure 28. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène de l'ARNr 16S de différentes souches de la famille d'Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées. l'échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Il a été démontré par une étude de Mollet *et al.* (1997) que parmi certains taxons, comme les Enterobacteriaceae, la variation dans les séquences conservées du gène de l'ARNr 16S ne permet pas l'identification des espèces et que les niveaux de divergence entre les séquences du gène *rpoB* de différentes souches d'Enterobacteriaceae sont nettement plus élevés que ceux entre leurs gènes de l'ARNr 16S. La comparaison des séquences partielles du gène *rpoB* était plus sensible que celles du gène de l'ARNr 16S et représente entre 1% à 15,4% plus de variabilité. Comme exemple, les deux espèces *E. coli* et *E. fergusonii* sont impossibles à distinguer sur la base de leurs séquences d'ARNr 16S, mais leurs séquences partielles *rpoB* divergent en 12 positions.

Dans l'ensemble, les résultats des études précédents indiquent que la séquence partielle de *rpoB* permet une identification précise parmi les bactéries entériques. Ce gène présente une moyenne de trois fois plus de divergence entre-espèces que la région la plus variable du gène de l'ARNr 16S. En outre, étant codant pour une protéine, la séquence partielle du gène *rpoB* présente un cadre de lecture non-ambiguë qui permet une vérification facile de l'exactitude de la séquence, cette commande ne peut pas être appliquée à la séquence du gène de l'ARNr 16S. En outre, une interprétation ambiguë du séquençage de l'ARNr 16S peut se produire dans les espèces hébergeant de multiples copies du gène de l'ARNr 16S, tel que démontré entre les différents opérons dans *E. coli* (Cilia *et al.*, 1995). L'existence de plusieurs copies de *rpoB* n'a jamais été rapportée pour les bactéries. En résumé, l'approche basée sur le gène de l'ARNr 16S pour l'identification des bactéries a été soupçonnée (Fox *et al.*, 1992; Martinez- Murcia *et al.*, 1992; Forsman *et al.*, 1994; Roux et Raoult, 1995), l'utilisation de la séquence partielle du gène *rpoB* semble être un complément raisonnable ou un autre outil universel pour l'identification des Enterobacteriaceae.

Comme l'utilité du gène *rpoB* pour l'identification des espèces et la discrimination entre les membres de la famille des Enterobacteriaceae a été démontrée précédemment par plusieurs auteurs (Drancourt *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2004 ; Kampfner *et al.*, 2005 ; Stephan *et al.*, 2007), cette approche a été utilisée pour déterminer la position taxonomique des deux isolats Bisph1 et Bisph2.

Les plus fortes similarités de séquences *rpoB* pour les deux isolats étaient de 93,9% avec *E. cowanii* (GenBank Accession No. emb |AJ566944.1|), 92,6% avec *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (GenBank Accession No. gb |CP003785.1|) pour Bisph1 et

de 96,5% avec *E. oryzae* (GenBank Accession No. gb |EU249553.1|), de 96,3% avec *E.asburiae* (GenBank Accession No. gb |CP003026.1|) pour Bisph2. Les deux isolats présentent 91,9% de similarité de séquences du gène *rpoB* entre eux. L'analyse des séquences du gène *rpoB* a montrée que les deux isolats partagent des similitudes avec les espèces d'*Enterobacter* en-dessous du seuil déterminé (Cut-off *rpoB* = 97,7% (Mollet *et al.*, 1997)), ce qui indique que Bisph1 et Bisph2 peuvent être deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter*. L'analyse phylogénétique du gène *rpoB* regroupe les deux isolats avec d'autres espèces du genre *Enterobacter* comme le montre la **Figure 29**.

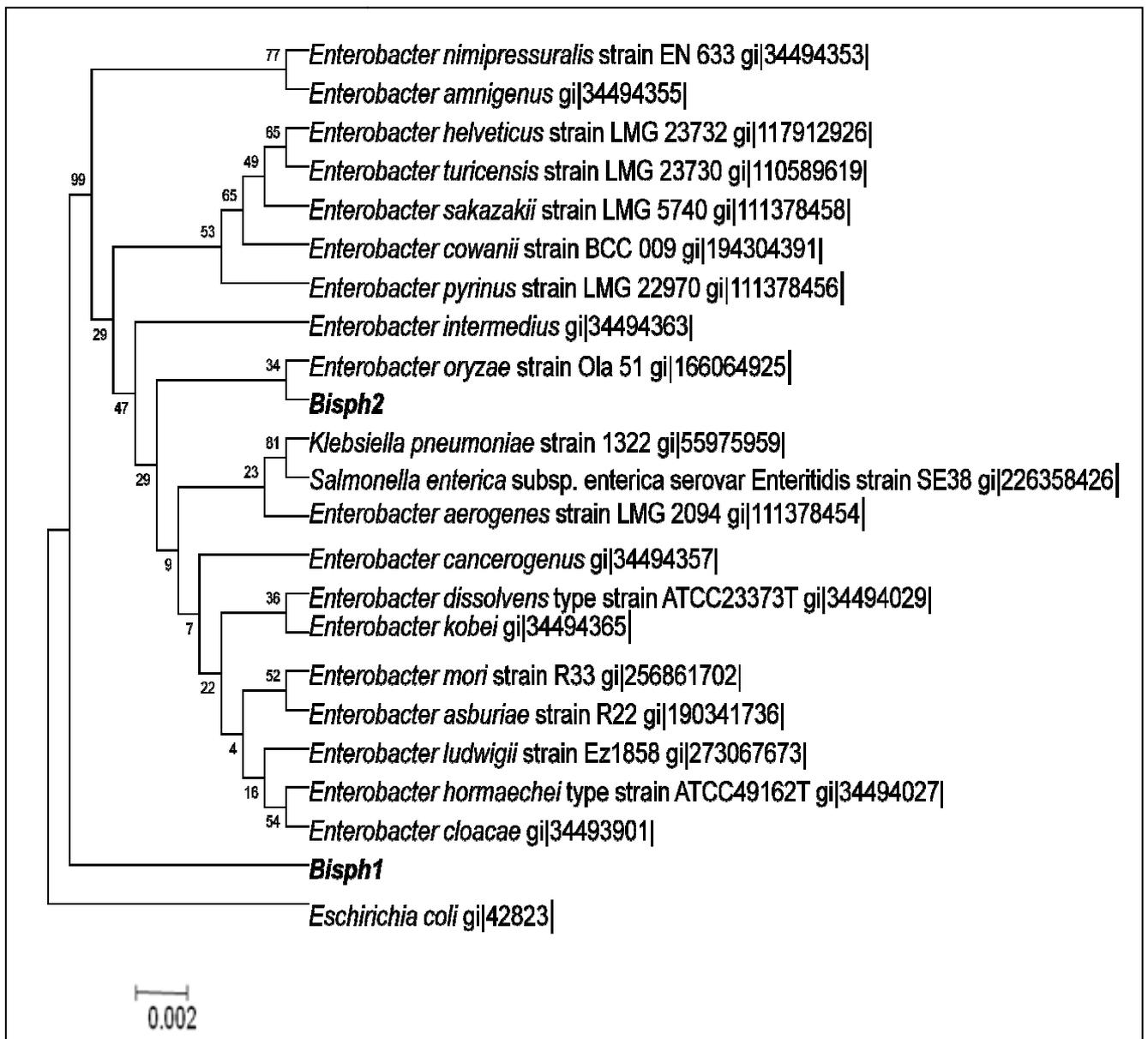


Figure 29. Arbre phylogénétique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène *rpoB* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées.

Trois autres gènes codant pour les protéines *hsp60* (Harada et Ishikawa, 1997; Iversen *et al.*, 2004), *gyrB* (Dauga, 2002), et *dnaJ* (Nhung *et al.*, 2006) ont été séquencés pour décrire les relations phylogénétiques des isolats et Bisph1 et Bisph2 avec d'autres membres du genre *Enterobacter* d'une façon plus profonde.

Les résultats de l'analyse du gène *hsp60* ont montrés que Bisph1 a une similarité de 94,3% et 93,5% avec *E. cowanii* (GenBank Accession No. emb |AJ567896.1|) et *E. cloacae* (GenBank Accession No. emb |FN547032.1|) respectivement, alors que l'isolat Bisph2 partage 94,7% de similitude avec *E. cloacae* (GenBank Accession No. emb |FN547033.1|) et *Salmonella enterica* (GenBank Accession No. gb |CP003416.1|) et 92,6% avec *E. cowanii* (GenBank accession No. emb |AJ567896.1|). Les séquences du gène *hsp60* des isolats Bisph1 et Bisph2 ont montrées une similarité de 94,6% entre elles et forment des branches distinctes dans l'arbre phylogénétique, bien que faiblement soutenu par l'analyse des bootstrap (**Figure 30**).

Les similarités les plus élevées des séquences du gène *gyrB* des deux isolats ont été trouvées avec *E. cloacae* (GenBank No. gb |CP002272.1|) à 90,7% et *S. enterica subsp. salamae* (GenBank No. gb |EU014644.1|) à 90,4% pour l'isolat Bisph1 et avec *E. cloacae* (GenBank No. dbj |AB084016.1|) à 90,9% et *Salmonella enterica subsp. enterica* (GenBank No. gb |EU146982.1|) à 90,7% pour Bisph2. Une similarité de 90,3% a été trouvée entre leurs deux séquences. Les similitudes entre les séquences du gène *gyrB* de toutes les espèces de *Serratia* variaient de 84,8 à 97,3% et la marge de variation à l'intérieur des genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Proteus* était similaire à celle de *Serratia* (Dauga, 2002). Les isolats Bisph1 et Bisph2 présentent des similarités de séquences du gène *gyrB* avec *E. cloacae* et *S. enterica* comprises dans cette marge, ce qui indique que les isolats peuvent être représentatifs de deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter* ou *Salmonella*. L'analyse phylogénétique du gène *gyrB* regroupe les deux isolats avec d'autres espèces du genre *Enterobacter* comme le montre la **Figure 31**.

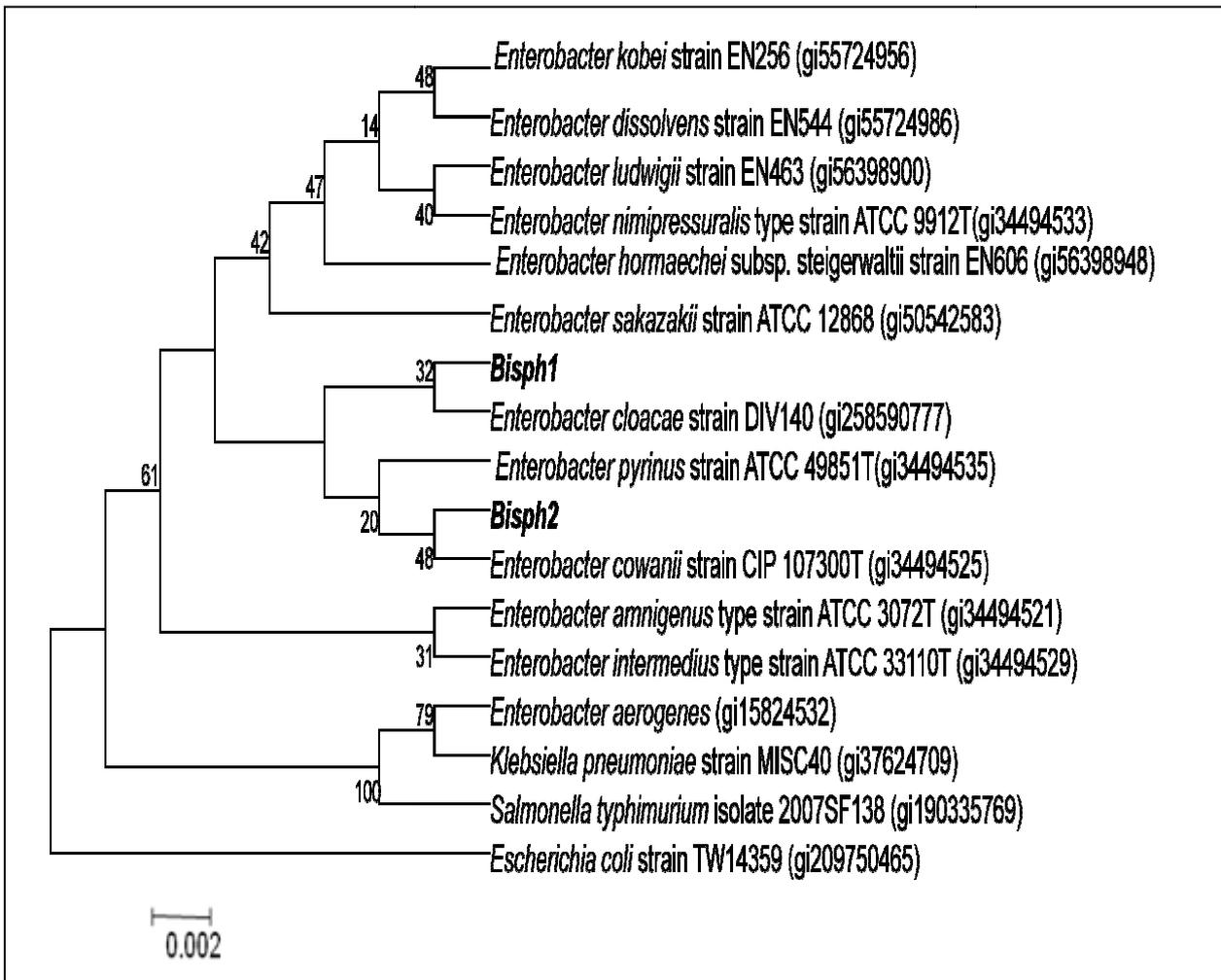


Figure 30. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène *hsp60* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées. L'échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

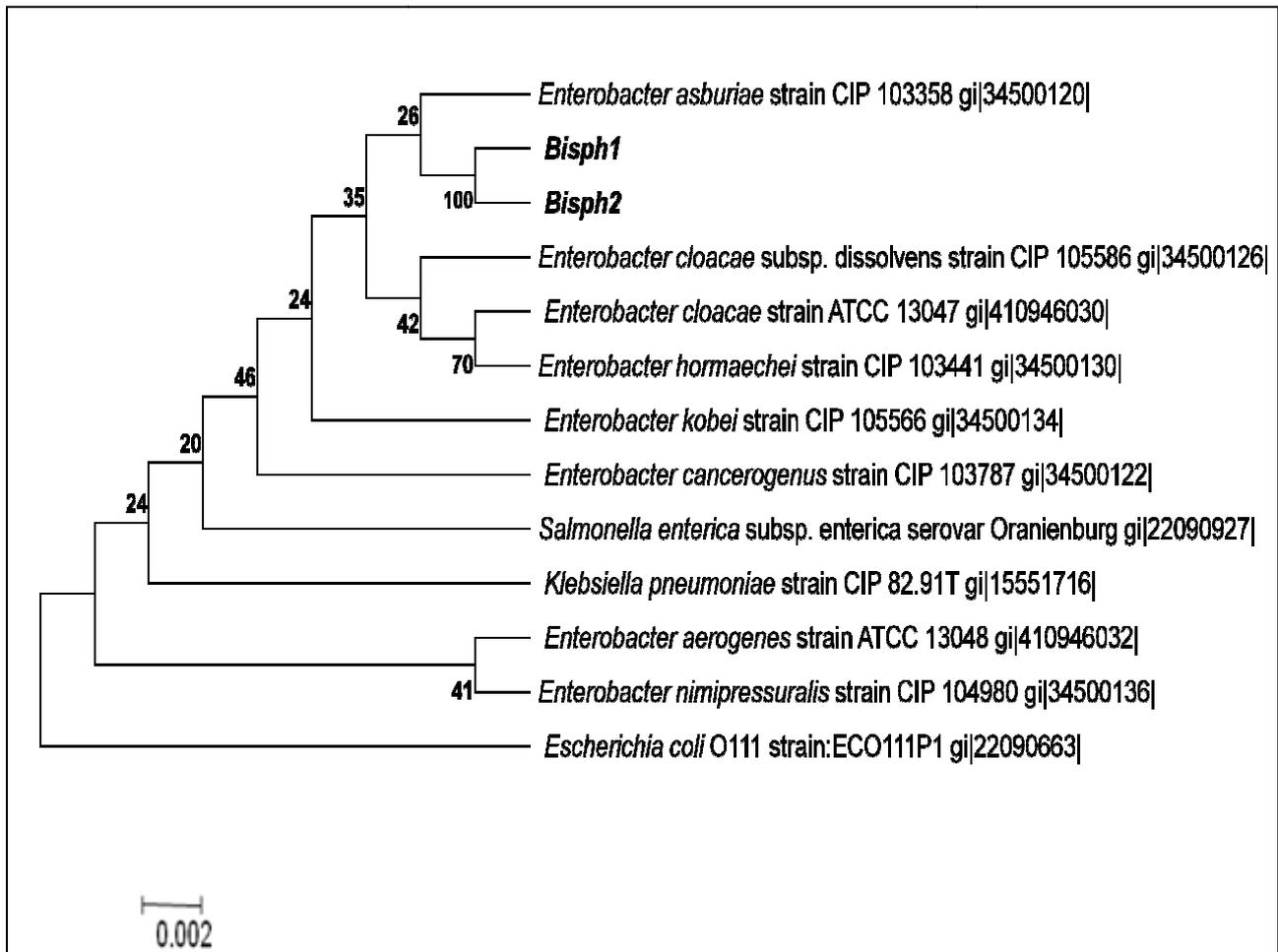


Figure 31. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène *gyrB* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées. L'échelle 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

Le résultat de l'analyse de la séquence du gène *dnaJ* a montré que la souche Bisph1 partage une similitude de 87,7% et avec *E. cloacae* (GenBank Accession No. gb |CP002272.1|) et de 87,1% *S. enterica subsp. diarizonae* (GenBank Accession No. dbj |AB272682.1|), tandis que, Bisph2 partage 89,3% de similitude avec *E. cancerogenus* (GenBank Accession No. dbj |AB272637.1|) et 88,4% avec *E. cloacae subsp. cloacae* (GenBank Accession No. emb |FP929040.1|) et *E. hormaechei* (GenBank Accession No. dbj |AB272641.1|). Les deux isolats ont montrés une similarité de séquences du gène *dnaJ* de 87,2% entre eux.

Selon les études de Nhung *et al.* (2006), le degré de divergence du gène *dnaJ* dans la famille des Enterobacteriaceae est environ six fois supérieure de celui du gène de l'ARNr 16S. Plus encore, une plus grande divergence des séquences du gène *dnaJ* était particulièrement évidente pour les espèces mal différenciés par d'autres analyses

génétiques. L'espèce *E. hormaechei* par exemple a montré une différence de 0,9 % pour la séquence du gène ARNr 16S avec celle de *E. cloacae* (Paradis et al., 2005), mais 11,1% de différence de séquences du gène *dnaJ* a été trouvée entre ces deux espèces. BispH1 et BispH2 ont montré 12,3% et 10,7% de différence de séquences du gène *dnaJ* respectivement, avec les espèces *Enterobacter* cités ci-dessus, cela suggère que ces isolats peuvent être de nouvelles espèces du genre *Enterobacter*, soutenant ainsi les résultats de l'analyse des séquences des gènes *rpoB*, *hsp60* et *gyrB*. De plus, l'analyse phylogénétique des séquences du gène *dnaJ* a également mis en évidence que les deux isolats BispH1 et BispH2 forment des branches séparées qui se regroupent avec les espèces d'*Enterobacter* dans l'arbre phylogénétique (Figure 32).

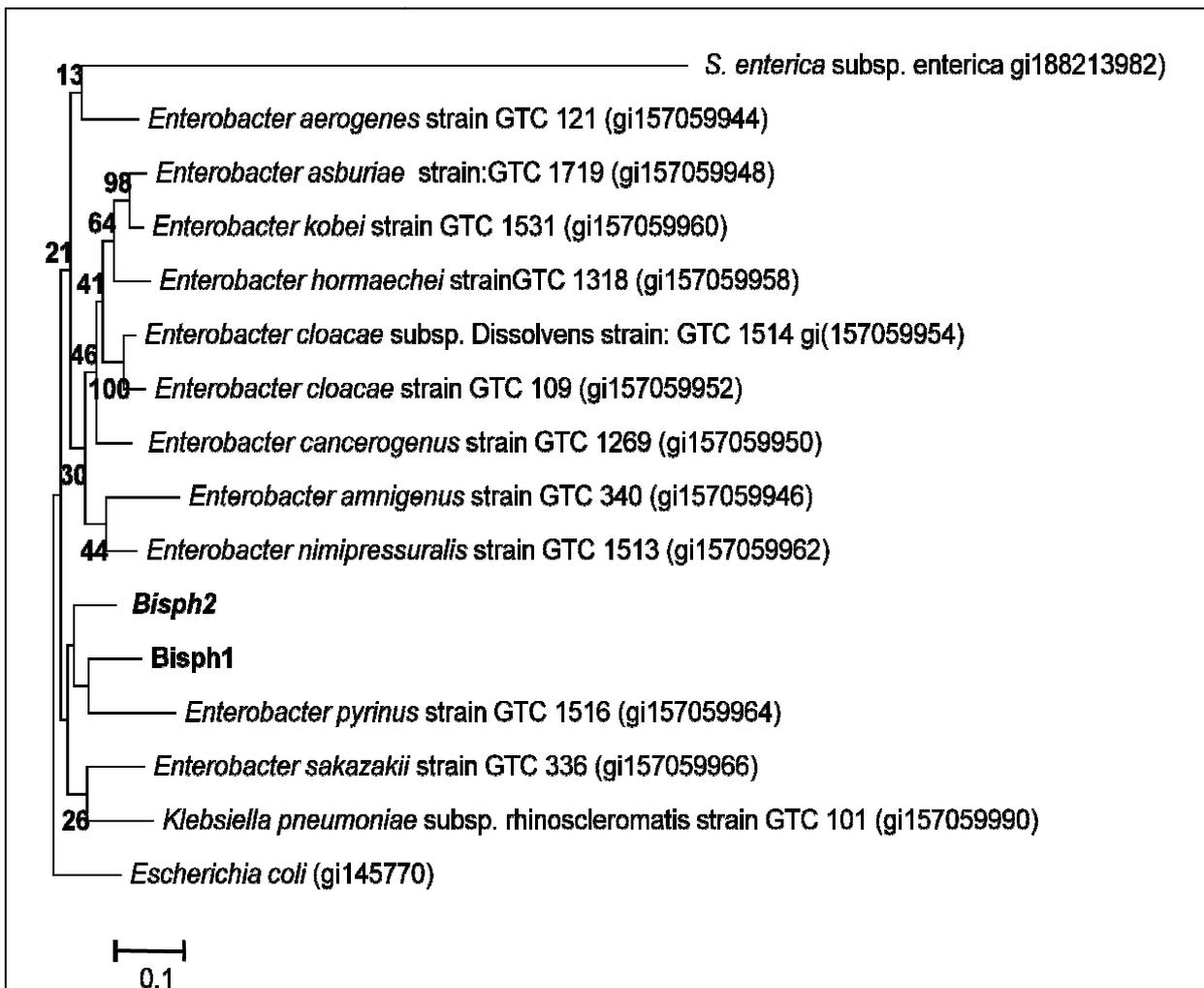


Figure 32. Arbre phylogénétique de type Neighbor-joining basé sur des séquences du gène *dnaJ* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées. L'échelle 0,1 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

L'analyse des séquences multilocus (MLSA) de gènes de l'ARNr 16S, *hsp60*, *rpoB*, *gyrB*, et *dnaJ* montre que les deux souches forment des branches séparées dans l'arbre phylogénétique concaténé du genre, distinctes des l'espèce existants d'*Enterobacter*, comme le montre la **Figure 33**.

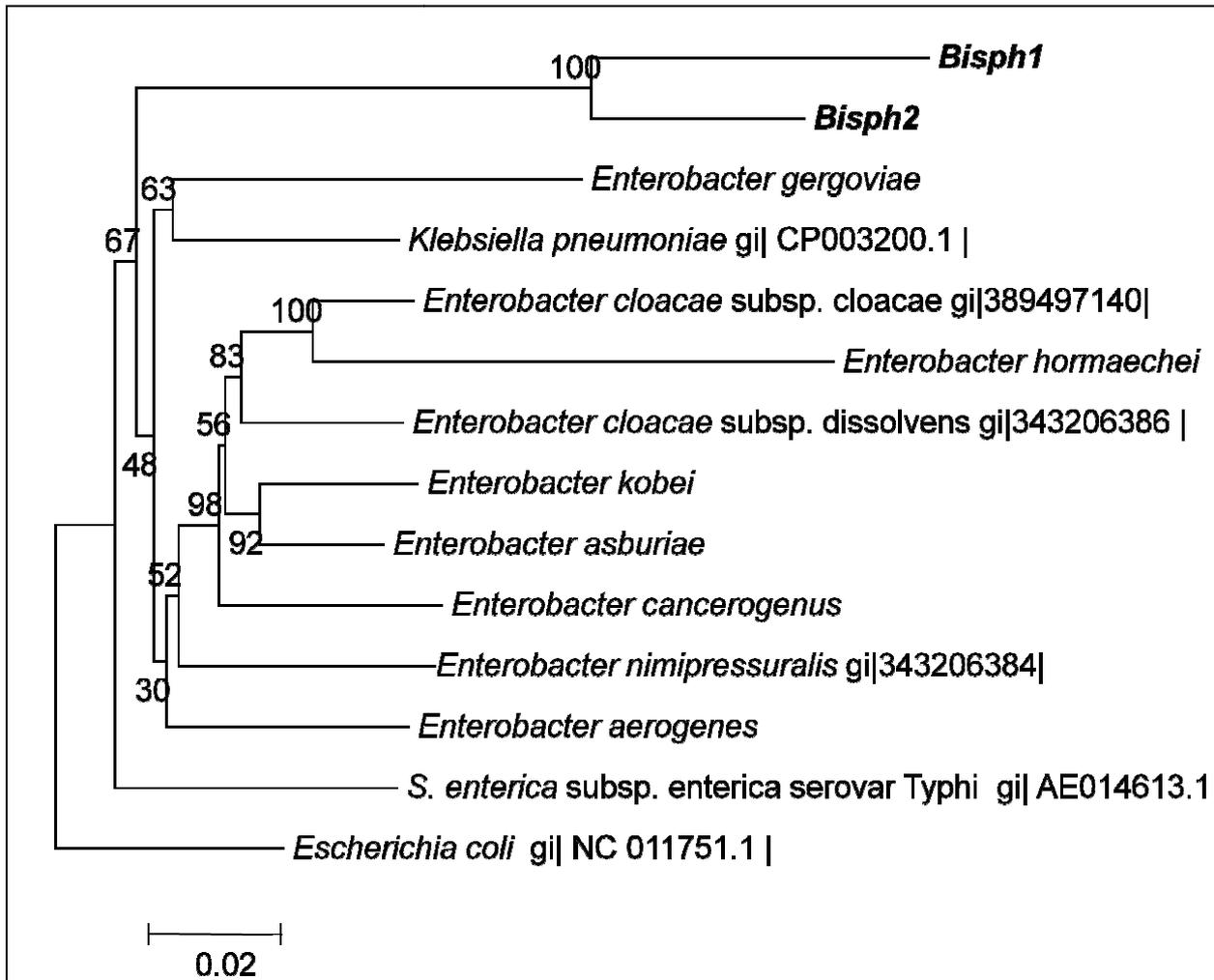


Figure 33. Arbre phylogénique de type Neighbor-joining basé sur la concaténation des gènes de l'ARNr 16S, *hsp60*, *rpoB*, *gyrB*, et *DnaJ* de différentes souches de la famille des Enterobacteriaceae. Pour examiner la validité de l'arbre NJ, 1000 répliques bootstrap ont été utilisées. L'échelle 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide et estime la divergence des séquences.

En s'appuyant sur cette analyse polyphasique, les deux souches Bisph1 et Bisph2 sont proposées comme deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter*, dont les noms *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. sont proposés, respectivement. Les deux nouvelles espèces se distinguent de leurs voisins les plus proches par plusieurs propriétés dont le test négatif de l'ornithine décarboxylase et de l'arginine

déshydrolase, l'incapacité de se développer sur le saccharose pour *Enterobacter biskrae* sp. nov. et le D-xylose, la capacité de se développer sur le dulcitol, le D-arabitol, le 5-cétogluconate, le maonate et la réaction positive pour la production d'indole pour *Enterobacter zibanae* sp. nov. (**Tableau 9**).

Tableau 9. Les caractéristiques phénotypiques qui distinguent les membres du genre *Enterobacter* (Grimont et Grimont, 2005). (+) = 90-100% souches positives en 1- 4 jours ; (-) = 90-100% souches négatives en 4 jours ; d = positive ou négative en 1- 4 jours ; (d) = positives ou négative en 3- 4 jours ; D = test utilisé pour différencier les souches au sein d'un complexe ; ND = aucune information disponible. Le complexe *E. cloacae* comprend : *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. hormachei* et *E. asburiae*.

Caractéristiques	Complexe <i>E. cloacae</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>E. cancerogenus</i>	<i>E. cowanii</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. kobei</i>	<i>E. nimipressuralis</i>	<i>E. pyrinus</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. biskrae</i> sp.nov.	<i>E. zibanae</i> sp.nov.
Mobility	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea hydrolyzed	-	-	-	-	+	d	-	+	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+
Voges-Proskauer	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	(d)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	+	-	-	d	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-
Arginin dihydrolase	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	-	+	d	+	+	+	-	-
Adonitol	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabitol	d	-	-	-	+	-	ND	ND	-	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>meso</i> -Erythritol	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	-
Glycerol	d	-	d	+	+	d	ND	+	-	+	+
<i>myo</i> -Inositol	d	-	-	-	-	d	d	+	(+)	-	-
Lactose	d	d	-	+	d	+	+	-	+	+	+
α -Methylglucoside	+	d	d	-	-	+	+	-	+	+	+
L-Rhamnose	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Sucrose	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
4-Aminobutyrate	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

5-Aminovalerate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Dulcitol	D	-	-	+	-	+	-	-	d	-	+
L-Fucose	D	-	+	-	d	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3-Hydroxybutyrate	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
5-Ketogluconate	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
2-Ketoglutarate	d	-	d	-	d	-	-	d	-	-	-
Lactose	(+)	+	(d)	(+)	(+)	+	+	-	+	+	+
Lactulose	d	d	-	(+)	d	+	-	-	+	-	+
D-Lyxose	D	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Malonate	d	-	(d)	-	d	d	-	-	(d)	+	+
Maltitol	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
D-Melibiose	D	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
1-O-Methyl- α -D-glucoside	+	d	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Palatinose	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
L-Proline	+	d	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Putrescine	D	-	+	-	d	-	-	+	+	-	-
D-Raffinose	d	+	-	+	+	+	d	-	+	+	+
L-Rhamnose	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharate	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
D-Sorbitol	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
D-Tagatose	d	-	-	d	-	-	d	+	-	-	-
<i>meso</i> -Tartrate	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Tricarballylate	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	d	(d)	-	-	-	+	d	-	d	-	-

3.2. Analyse phénotypique des deux nouvelles espèces *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. par le système des plaques phénotypiques (Phenotypic Microarray) (PM) Biolog-Omnilog

Bochner *et al.* (2001) décrivent de nombreux outils qui sont disponibles pour l'analyse du génome des souches bactériennes, ainsi que des exemples de systèmes efficaces d'ingénierie métabolique. L'analyse globale des phénotypes bactériens est une autre approche qui peut fournir des données complémentaires à d'autres analyses de biologie des systèmes.

Ainsi, nous avons utilisé le système des plaques phénotypiques (Phenotypic Microarray) (PM) pour étudier le profil cellulaire phénotypique des deux nouvelles souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. La chimie de cette technologie utilise le colorant tétrazolium violet, pour détecter colorimétriquement la respiration des cellules. La réduction, essentiellement irréversible, de ce colorant a pour résultat la formation d'une couleur pourpre qui s'accumule dans les puits au cours d'une période de quelques heures amplifiant ainsi le signal et intégrant la quantité de la respiration au cours du temps. Cela offre plusieurs avantages majeurs: (1) Le changement de la couleur est facile à suivre, (2) le changement de la couleur est facile à quantifier, (3) le changement de la couleur est très sensible et hautement reproductible. Dans le cadre de cette technologie, l'appareil OmniLog a été développé dans le but de lire et d'enregistrer le changement de couleur dans des essais des PM. Les microplaques sont placées en face d'une caméra CCD de couleur, capable de lire 50 microplaques chaque 15 min et fournit des informations quantitatives et cinétiques sur la réponse des cellules dans les PM. Les données sont stockées directement dans des fichiers informatiques et peuvent être récupérées et comparées à d'autres données à tout moment (Bochner *et al.*, 2001).

La **Figure 34** montre comment la respiration cellulaire peut être couplée à un grand nombre et une grande variété de phénotypes cellulaires. Dans une situation de croissance normale, une séquence coordonnée d'événements se produit. Les cellules transportent les nutriments, les catabolisent et produisent de petits composants moléculaires essentiels, polymérisent ensuite ces derniers en des macromolécules pour créer et assembler des structures cellulaires. Si l'ensemble de ces processus fonctionnent

normalement, la cellule peut se développer, et il y aura un débit physique d'électrons à partir de la source de carbone au NADH situé en bas de la chaîne de transport des électrons de la cellule, et finalement sur le colorant tétrazolium pour produire la couleur pourpre. Si l'un de ces processus fonctionne à un taux inférieur à la normale, il deviendra un "pinchpoint", ce qui conduit à la restriction de ce flux et comme résultat une diminution de la couleur pourpre. La gravité de la restriction se reflète dans le degré de perte de la couleur pourpre, la perte totale de la fonction se traduira par une croissance nulle et aucune couleur. Par conséquent, le dosage colorimétrique de la respiration peut fournir un système universel pour les essais phénotypique (Bochner *et al.*, 2001)

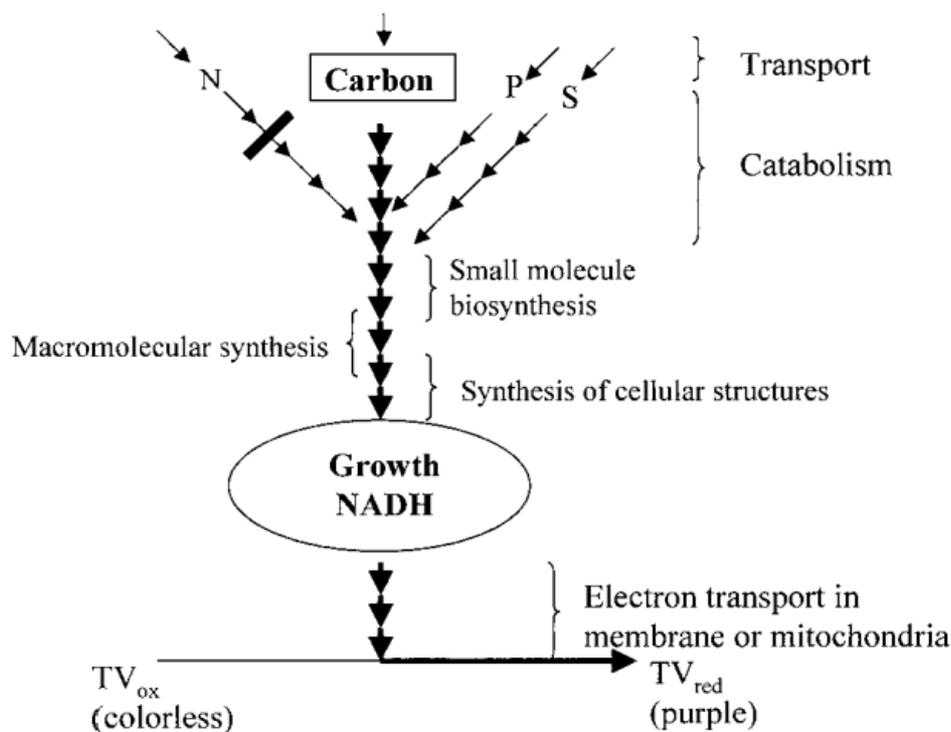


Figure 34. Voie de la respiration couplée à la physiologie cellulaire.

Afin de comprendre la fonction métabolique, la régulation et la vraie diversité des bactéries, il est nécessaire de pouvoir les cultiver. Malgré les nouvelles techniques qui sont constamment mises au point pour augmenter le nombre de bactéries dans la culture (Wu *et al.*, 2009 ; Vartoukian *et al.*, 2010), et les efforts consolidés pour accumuler plus d'informations génomiques sont entrepris, seule une petite fraction (0,1-1%) de microorganismes est cultivée (Curtis *et al.*, 2002). Si de nombreuses espèces continuent à résister à la culture, le dépistage des conditions des milieux de culture peut aider à apporter des micro-colonies ou des organismes à croissance lente en culture à des concentrations

suffisamment élevées pour l'étude. Une approche massive comme la plate-forme Biolog offre un moyen rapide et complète de développement de milieux de cultures personnalisés définis pour améliorer la croissance et résoudre le problème des bactéries viables non cultivables.

L'analyse comprend un ensemble standard de 576 tests pour le carbone, le stress de pH et la sensibilité chimique à une grande variété d'antibiotiques, d'antimétaboliques, des métaux lourds et d'autres inhibiteurs, avec 288 produits chimiques inhibiteurs différents et cela afin de générer un profil de PM de référence pour les deux microorganismes formant ainsi une base pour des comparaisons futures d'autres souches types sauvages et mutantes. La reproductibilité des résultats des PM a été testée pour les deux souches individuellement en utilisant le logiciel Omnilog-PM.

L'analyse des PM1- 2A a donné un aperçu des caractéristiques physiologiques des souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. Les deux souches semblent utiliser un large éventail de sources de carbone organiques et inorganiques comme le montre les **Figures (35, 36, 37 et 38)** et le **Tableau complémentaire 1 (annexe 2)** avec un pouvoir métabolique plus important chez la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. qui s'est montrée capable d'utiliser des composés dont *Enterobacter biskrae* sp. nov. est incapable de les métaboliser tel que: l'acide succinique (PM01, puits A05), l'acide L-aspartique (PM01, puits A07), le dulcitol (PM01, puits A12), le D-xylose (PM01, B08), l'acide L-glutamique (PM01, B12), l'acide D-galactonic-g-lactone (PM01, C02), la tween 20 (PM01, C05), le L-asparagine (PM01, D01), l'acide D-glucosaminique (PM01, D03), le lactulose (PM01,D10), le sucrose (PM01, D11), le mono-methylsuccinate (PM01, G09), le methylpyruvate (PM01,G10), l'acide pyruvique (PM01, H08), l'acide L-galactonique-g-lactone (PM01, H09), la pectin (PM02A, A12), l'amygdalin (PM02A, B04), le D-arabinose (PM02A, B05), le D-arabitol (PM02A, B06), le 2-deoxy-D-ribose(PM02A,B09), le 3-O-b-D-galactopyranosyl-D-arabinose (PM02A,B12), le α -methyl-D-glucoside (PM02A,C06), l'acide 2-hydroxybenzoic (PM02A,E06), l'acide β -hydroxybutyric (PM02A,E08), l'acide 5-keto-D-gluconic (PM02A,E12) et le L-histidine (PM02A,G06).

Alors que la souche *Enterobacter biskrae* sp. nov. peut métaboliser trois composés dont la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. est incapable de les utiliser qui sont: le D-melibiose (PM01,C11), le D-psychose (PM01,H05) et le maltitol (PM02A,C05).

Afin de déterminer empiriquement les conditions de croissance optimale des deux souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov., les données des tests PM1 et 2A peuvent être utiles afin d'obtenir une croissance plus robuste des deux souches. Selon les valeurs données par l'Omnilog, les taux de croissance de la souche *Enterobacter biskrae* sp. nov. atteignent leurs niveaux les plus élevés en présence de D-xylose (PM01, B8) avec une valeur de 379, et en présence de D-ribose (PM01, C4) avec une valeur de 389 (**Figure 35**). Quand à la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov., elle a montré une croissance appréciable en présence de l'acide D-galacturonic (PM01, H10), galactonique - γ -L actone (PM01, H9), acide L-deshydroxyacétone (PM02A, H9), D-xylose (PM01, B8), thymidine (PM01,C12), acid fumarique (PM01, F5) avec une valeur de (381, 376, 369, 369, 367 et 367, respectivement) (**Figure 36**).

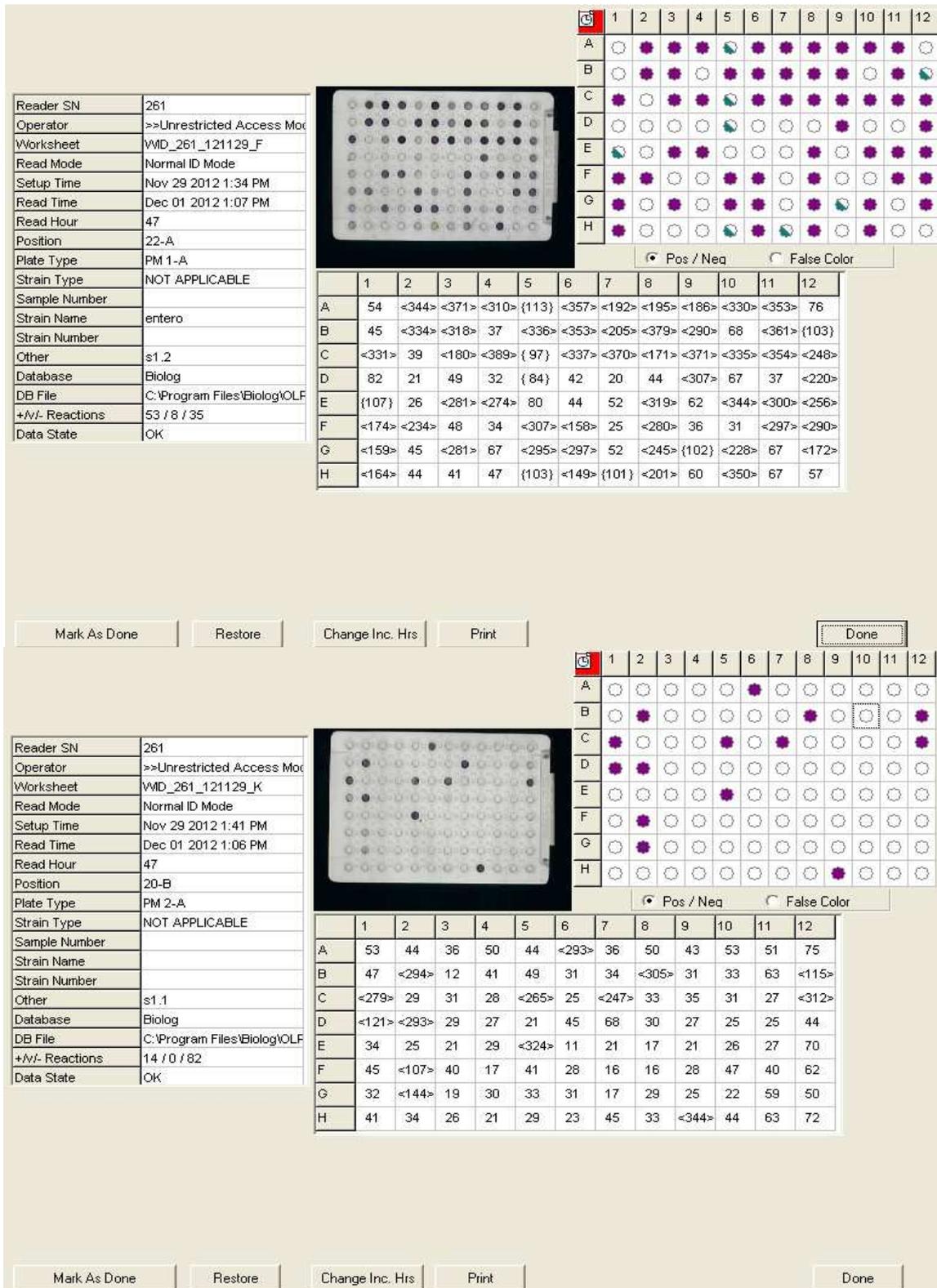


Figure 35. Analyse des PM1 (en haut), PM2A (en bas) de la souche *Enterobacter biskrae* sp. nov. Le tableau à gauche comprend les données relatives à la plaque PM (type de plaque, heure, date et type d'organisme). Le tableau à droite en haut présente la réponse de la souche pour les différentes sources présentes dans chaque puits. Au milieu une photo réelle de la plaque en couleur. Le tableau en bas présente les valeurs données par le logiciel Omnilog concernant le taux de respiration dans chaque puits.

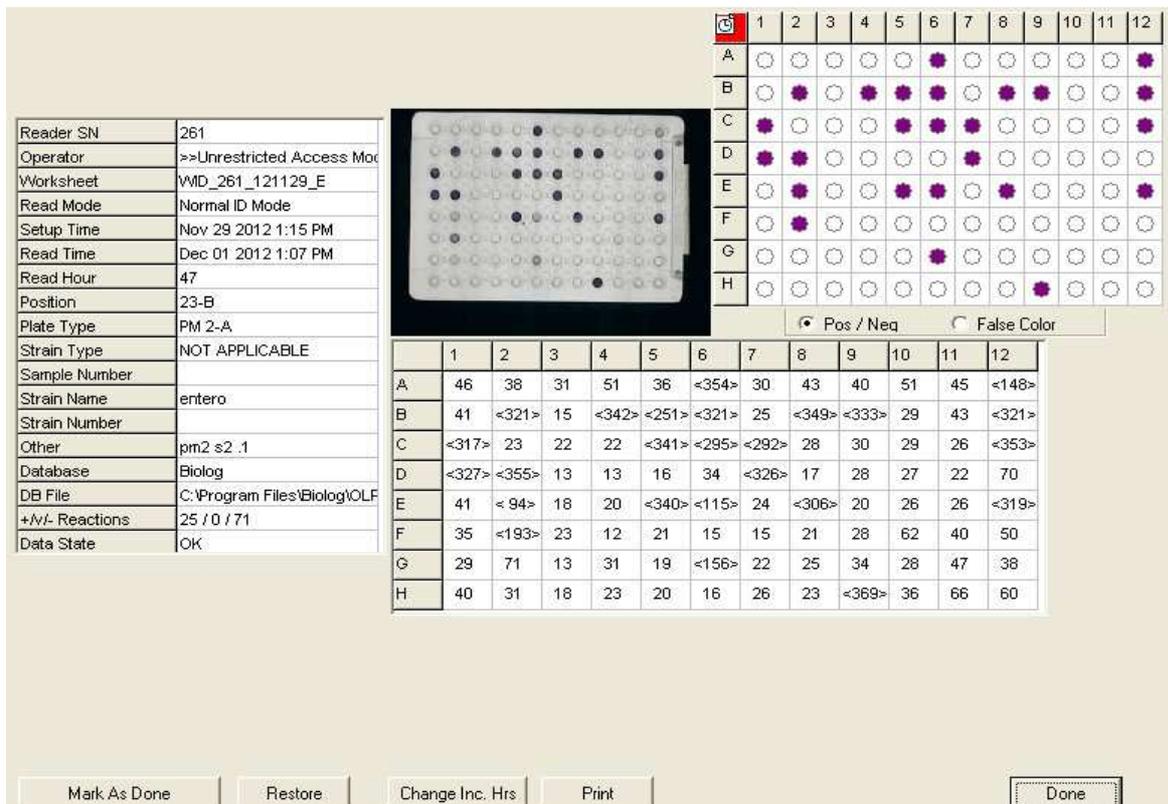
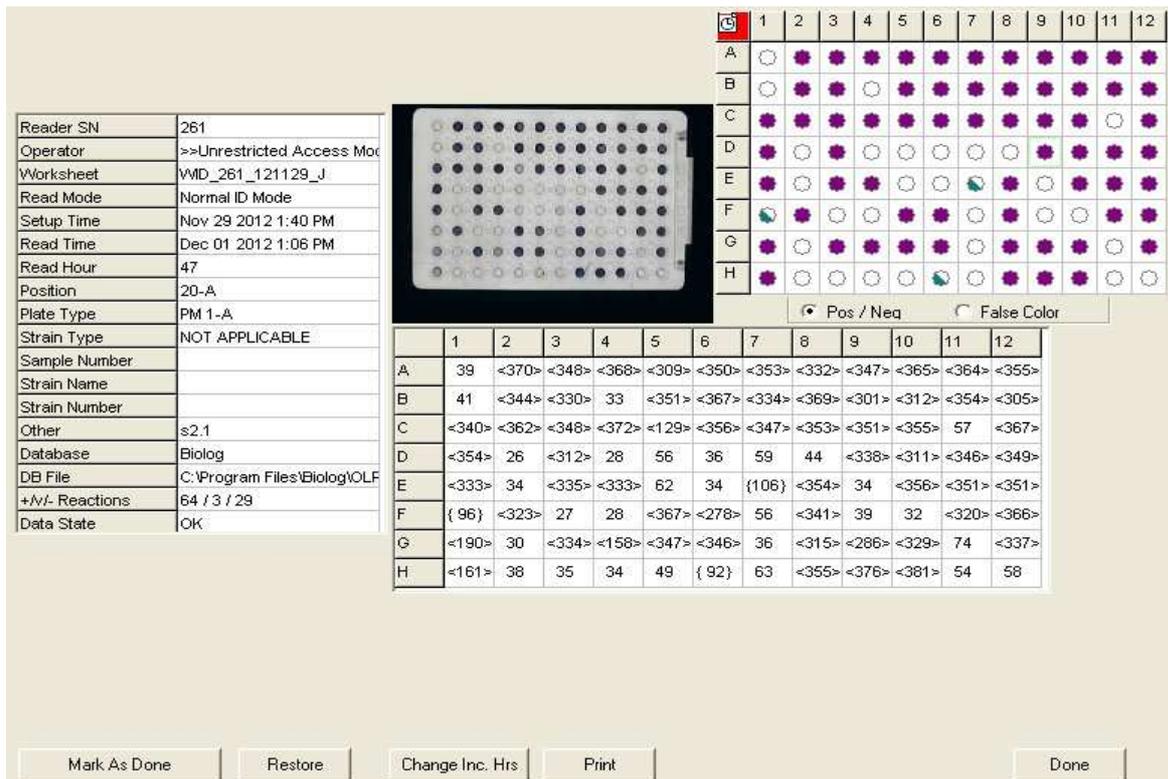


Figure 36. Analyse des PM1 (en haut), PM 2A (en bas) de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov.

Les deux souches sont relativement résistantes aux pH acides, en tolérant un pH d'environ 4,0 et peuvent croître dans des pH alcalin allant jusqu'à 10 (**Tableau complémentaire 2 (Annexe 2) ; Figures 37 et 38**).

Les plaques PM11C-PM16A ont été utilisées car elles fournissent des informations utiles sur les effets des substances toxiques sur les deux souches, et ont ainsi permis de tester la sensibilité des cellules dans des conditions qui pourraient survenir dans l'eau polluée ou le sol. Ces plaques ont donné des informations sur le degré de résistance des souches à divers inhibiteurs, y compris des agents toxiques et des antibiotiques. Lorsque les données des PM ont été analysés, les profils de sensibilité des deux souches étaient presque similaires (**Tableau complémentaire 3 (annexe 2) ; Figures 37et 38**).

Les deux souches étaient résistantes

- aux doses les plus élevées de plusieurs antibiotiques comme l'amikacine (PM11C, A 01 - 04), l'amoxicilline (PM11C, B 01 - 04), la bleomycin (PM11C, C 01 - 04), la capreomycin (PM11C,D 01– 04), l'erythromycine (PM11C, F05–08), la ceftriaxone (PM11C, G01 – 04), la gentamicine (PM11C, G 05 – 08), la carbenicilline (PM12B, A 09– 12) et l'azlocilline (PM13B, B01– 04),

- à certains fongicides comme le 1-hydroxypyridine-2-thione (pyrithione) (PM14A, C 05 – 08), le bromide domiphène (PM15B, D 05 – 08), le dichlofluanide (PM16A, C 01– 04) et le 4-Chloro-3,5-dimethyl-phenol (PM16A, H 05 – 08),

- à certains acides organiques comme l'acide éthylène glycol-bis (b-aminoethyl ether)-NNN`N`-tetraacétique (PM14A, H 01 – 04), l'acide borique, (PM14A, C 01 – 04) et l'acide nalidixique (PM11C, E 09 – 12),

- à d'autres composés toxiques comme le chlorure de benzethonium (PM12B, E 09 – 12), le bromure de dodécyltriméthylammonium (PM12B, H 09 – 12), le métaborate de sodium (PM14A, E 09 – 12), le cyanate de sodium (PM14A,C 09 – 12), le chlorure de cadmium (PM14A, D 01 – 04), le chlorure de sanguinarine (PM14A,A 09 – 12), le nitrite de sodium (PM14A, G 09 – 12), le chlorure de cesium (PM13B, F 01 – 04), le selenite de sodium (PM16A,F 05 – 08), le sulfate d'aluminium (PM16A, F 09 – 12), le chlorure de chromium (III) (PM16A, G 01 – 04) et le chlorure ferrique (PM16A, G05–08).

Cependant, aucune des deux souches n'est résistante à la dose la plus faible de l'antibiotique novobiocine (PM12B, D09– 12), de l'agent chélateur 2,2- dipyridyl (PM13B, B05– 08) et aux anions toxiques l'orthovanadate du sodium (PM14A, H09– 12) et le métavanadate de sodium (PM14A, F09– 12).



Figure 37. Représentations graphiques du métabolisme de la souche *Enterobacter biskrae* sp. nov. et son profil phénotypique de sensibilité. Les tableaux sont des représentations des différentes plaques PM à 96 puits. Au sein de chaque représentation, le temps de la parcelle est sur l'axe des x par rapport à la valeur OmniLog sur l'axe des y. Chaque plaque est identifiée par un numéro de plaque dans la partie supérieure gauche du tableau qui identifie les tests phénotypiques pour chaque tableau. Les plaques sont arrangées selon l'ordre PM1A, PM2A, PM10, PM11, PM12, PM13, PM14, PM15, PM16. PM1 et PM2 pour les tests de carbone, PM10 pour le test de pH. Les puits témoins négatifs pour les essais d'utilisation de substrats métaboliques sont en position A1 de PM1 et 2A. PM11-16 pour les tests de sensibilité chimique. Une carte complète du contenu de chaque puits peut être consultée sur les **Tableaux complémentaires 1, 2 et 3 (annexe 2)**.



Figure 38. Représentations graphiques du métabolisme de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. et son profil phénotypique de sensibilité.

4. Conclusion

Sept souches bactériennes ont été isolées à partir de trois sols différents en utilisant des milieux de culture enrichis par l'herbicide glyphosate. Nous avons ensuite caractérisé les différents isolats en se basant sur une étude polyphasique (génomique et phénotypique) qui nous a permis d'identifier ces isolats comme *P. putida*, *E. colacae*, *R. aquatilis*, *S. marcescens*.

Plusieurs rapports ont mis en évidence l'intérêt des espèces de *Pseudomonas* et d'*Enterobacter* dans la dégradation et l'utilisation des substrats organophosphorés comme le

glyphosate. Un grand nombre d'espèces de *Pseudomonas* qui ont été isolées peuvent dégrader le glyphosate (Moore *et al.*, 1983 ; Jacob *et al.*, 1988 ; Quinn *et al.*, 1989). Cinq espèces de *Pseudomonas* isolées, poussant uniquement sur le glyphosate ont été identifiées (*P. maltophilia*, *P. putida*, *P. aeruginosa* et *Pseudomonas sp.*), leur croissance n'a pas été inhibée en raison de la résistance au EPSPS (Schulz *et al.*, 1985). *Pseudomonas fluorescens* était capable d'utiliser une gamme variée de composés organophosphonés comme sources de carbone, d'azote et de phosphore (Zboinska *et al.*, 1992).

Singh *et al.* (2003c, 2004) ont isolé une espèce d'*Enterobacter* d'un sol Australien, cette souche a montrée une dégradation accrue du chlorpyrifos (un herbicide organophosphoré), où elle l'utilise en tant que source de carbone et de phosphore. De leur part Cook *et al.* (1978) ont isolés plusieurs bactéries à partir de boues d'épuration capables d'utiliser l'acide dialkylthiophosphonique (DETP) (un herbicide organophosphoré), comme seule source de phosphore, l'un de ces organismes, *Pseudomonas acidovorans*, a été capable d'utiliser le DETP comme seule source de soufre. Singh *et al.* (2003c, 2004) ont observé une importante utilisation des insecticides organophosphorés en tant que seule source de phosphore par une *Enterobacter sp.*

En outre, *Bacillus megaterium* (Quinn *et al.*, 1989), *Alcaligenes sp.* (Tolbot *et al.*, 1984), *Flavobacterium sp.* (Balthazor et Hallas, 1986), *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Obojska *et al.*, 2002), *Rhizobium sp.* et *Agrobacterium sp.* (Liu *et al.*, 1991), *Rahnella aquatilis* (Peng *et al.*, 2012) et *Enterobacter cloacae* (Kryuchkova *et al.*, 2013) ont été signalés comme dégradant le glyphosate. Cependant, il n'ya pas de rapport de l'isolement de *Serratia marcescens* comme bactérie dégradant le glyphosate. Ainsi, la souche de *Serratia marcescens* isolée dans cette étude vient enrichir la liste des bactéries dégradant le glyphosate, ce qui suscitera, sûrement, son utilisation dans des études ultérieures.

Deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter* dégradant le glyphosate ont été identifiées et nommées *Enterobacter zibanae sp. nov.* et *Enterobacter biskrae sp. nov.*

Enterobacter biskrae (adj. Biskrae bis.kr'ae de Biskra/Algérie, d'où l'espèce a été isolée pour la première fois). Les cellules sont des bacilles à coloration de Gram négative, aéro-anaérobie facultatives et mobiles par flagelles péritriches. Elles sont de 0,3 µm de large par 1,8µ m de long et se produisent individuellement ou par paires. Après 24 h d'incubation en aérobie à 37°C sur gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, les colonies

sont non hémolytiques, pigmentées en jaune et convexes. La souche *E. biskrae* sp. nov. est catalase oxydase négative, la croissance se produit après 18-24 h à 15-44°C avec un optimum à 37°C sur la gélose Columbia non sélective avec 5% de sang de mouton et la gélose chocolat. Un profil biochimique détaillé de l'espèce est donné dans les **Tableaux complémentaires 1, 2 et 3 (annexe 2)**. Le **Tableau 9** montre des essais utilisés pour différencier *E. biskrae* sp. nov. des autres espèces du genre. Son identification est possible par le test négatif de l'ornithine décarboxylase et l'arginine déshydrolase et par son incapacité de croître sur le saccharose et le D-xylose.

Enterobacter zibanae (Adj. Zibanae zi.ban'ae de Ziban (Oasis de Biskra)/Algérie d'où l'espèce a été isolée pour la première fois). Les cellules sont des bacilles à coloration de Gram négative, aéro-anaérobies facultatives et mobiles par flagelles péritriches. Elles sont de 0.9 µm de large par 2.1 µm de long et se produisent individuellement ou par paires. Après 24h d'incubation en aérobiose à 37°C sur gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, les colonies sont non hémolytiques, non pigmentées et convexes. La souche *E. zibanae* sp. nov. est catalase oxydase négative. La croissance se produit après 18-24 h à 15 - 44°C avec un optimum à 37°C sur la gélose Columbia non sélective avec sang de mouton à 5% et la gélose chocolat. Un profil biochimique détaillé de la souche est donné dans les **Tableaux complémentaires 1, 2 et 3 (annexe 2)**. Le **Tableau 9** montre des essais utilisés pour différencier la souche *E. zibanae* sp. nov. des autres espèces du genre. Son identification est possible par le test négatif à l'ornithine décarboxylase et à l'arginine déshydrolase, positif pour la production d'indole et l'aptitude de croître sur le dulcitol, le D- arabitol, le 5 -céto-gluconate et le maonate.

Chapitre 2

Biodégradation du glyphosate et son effet sur l'activité microbienne du sol

1. Introduction

L'intérêt pour la biodégradation des composés organophosphorés a augmenté au cours des dernières décennies en raison des problèmes environnementaux. L'apparition récente de plantes transgéniques résistantes au glyphosate a donné lieu à une application extensive d'herbicides à base de glyphosate et, par conséquent, à l'extension des sites de pollution. Cependant, dans certaines conditions, ces composés peuvent être clivés par des systèmes enzymatiques microbiens. Les souches dégradant les composés organophosphorés les plus actives possèdent un potentiel élevé de dégradation dans les conditions environnementales, ces organismes peuvent donc être utilisés dans la production de biopréparation pour l'assainissement des territoires contaminés par les organophosphorés avec une grande efficacité et un intérêt écologique.

L'application pratique de microorganismes nécessite une étude détaillée de la régulation de leur activité de dégradation. Les facteurs importants affectant le métabolisme de ces microorganismes sont le type des éléments nutritifs (en particulier la source de carbone) et les conditions de culture conduisant à une plus grande efficacité de la dégradation de la substance toxique, et à une accumulation d'une biomasse active des souches dégradantes. Par l'identification de ces facteurs il sera possible de savoir quels facteurs peuvent être utilisés pour les microorganismes présents dans le sol au cours de la bioremédiation. Auparavant, l'attention des scientifiques a été principalement axée sur le dépistage de microorganismes pour leur capacité à dégrader les organophosphorés. Cependant, les études exhaustives sur la régulation physiologique de ce processus dans les cellules bactériennes sont plutôt rares (Shushkova *et al.*, 2012).

En plus de la biodégradation des xénobiotiques, les effets indésirables causés par l'utilisation de ces composés sur les organismes non cibles sont une préoccupation environnementale. Dans le cas du glyphosate, la perturbation potentielle des communautés microbiennes du sol et leurs processus a suscité de l'intérêt chez les scientifiques en raison du mode d'action de ce composé. Le glyphosate inhibe le 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP), une enzyme intermédiaire dans la synthèse d'acides aminés aromatiques par la voie des acides shikimiques (Franz *et al.*, 1997). La plupart des organismes vivants, à l'exclusion des plantes, n'ont pas cette voie et ne sont donc pas affectés directement par le

glyphosate. Cependant, la voie de l'acide shikimique est omniprésente chez les microorganismes (Bentley, 1990).

Les rapports d'effets nocifs sur les microorganismes dans les études du laboratoire sont nombreux (Quinn *et al.*, 1988; Santos et Flores, 1995). La croissance microbienne dans les milieux artificiels contenant le glyphosate comme seule source de C ou N est rare, et seul un nombre limité d'espèces bactériennes et mycétales sont capables de croître lorsque le glyphosate est fourni comme seule source de P (Liu *et al.*, 1991). Contrairement aux résultats du laboratoire, les études menées sur terrain ont montré soit l'absence d'influence ou une légère stimulation des microorganismes du sol par le glyphosate. L'augmentation du nombre de bactéries et de champignons cultivables (Rueppel *et al.*, 1977), de la respiration du sol (Carlisle et Trevors, 1986 ; Haney *et al.*, 2000), de la minéralisation de l'azote (Haney *et al.*, 2000) et de l'activité enzymatique du sol (Gianfreda *et al.*, 1995) est signalée, tandis que des changements négligeables sur le cycle d'azote (Carlisle et Trevors, 1986 ; Olson et Lindwall, 1991; Muller *et al.*, 1981) et la biomasse microbienne (Wardle et Parkinson, 1990,1992) ont été observés. Les différences entre les études menées en laboratoire et celle menées sur le terrain peuvent être expliquées en partie par les concentrations d'herbicides très élevées utilisées dans de nombreuses études de laboratoire et par la nature chimique de l'herbicide (Wardle, 1995).

La plupart des informations sur l'effet non-cible du glyphosate proviennent des études sur des sols agricoles. La connaissance de la réponse des microorganismes des sols forestiers au glyphosate est limitée, et aucune étude traitant la réponse des microorganismes des sols Sahariens n'a été faite auparavant.

Ainsi l'objectif de ce chapitre est double. Dans un premier temps, nous évaluons la croissance des isolats dans des milieux de culture additionnés de glyphosate, et nous procédons à l'optimisation de certains paramètres abiotiques pour la culture de ces isolats pour une efficacité maximale de la dégradation du glyphosate. Dans un deuxième temps, nous évaluons les effets du glyphosate sur l'activité microbienne représentée par la respiration basale et la diversité du microbiote cultivable dans deux types de sols (sol forestier et sol Saharien) sans antécédents d'application du glyphosate.

2. Matériel et méthodes

2.1. Cinétique de la biodégradation du glyphosate

2.1.1. Préparation des inocula

Les inocula des différents isolats ont été préparés en cultivant les souches dans un bouillon nutritif pendant 3 jours à 30°C, avec agitation à 150 t/m. Les cellules sont, ensuite, récoltées par centrifugation à 4600g pendant 5min, lavées avec 0,9% d'une solution saline stérile, et re-suspendues dans 50 ml d'une solution saline fraîche (Anwar *et al.*, 2009) pour atteindre une suspension cellulaire de 0,5 McFarland, avec une densité optique de 0,18 à 625 nm.

2.1.2. Suivi de l'évolution de la biomasse des différents isolats

La cinétique de dégradation du glyphosate a été suivie par la mesure de la croissance des isolats cultivés sur milieu liquide contenant le glyphosate en tant que seule source de carbone ou de phosphore. Ces expériences ont été réalisées en duplicata dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu MMM1 ou MMM2 stériles additionnés de 1g/l de glyphosate. Un aliquote de 2 ml de chaque inoculum a été utilisé pour inoculer chaque erlenmeyer. Les milieux sont incubés à 30°C dans l'obscurité pendant 7 jours sur un agitateur réglé à 150 t/m. 2 ml du milieu de culture sont prélevés à partir de chaque erlenmeyer à un intervalle de 24 h jusqu'à 168 h et testés pour la croissance bactérienne en mesurant la densité optique à 625 nm.

2.2. Optimisation des conditions de culture des deux souches représentatives de la dégradation du glyphosate

Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du MMM2 supplémenté par une quantité appropriée du glyphosate. Les erlenmeyers sont incubés à une température appropriée dans l'obscurité pendant 7 jours et agités à 150 t/m. La croissance bactérienne a été suivie par prélèvement d'un échantillon de 2ml de la culture après toutes les 24 h jusqu'à 168 h d'incubation, et la densité optique a été mesurée à 625 nm.

2.2.1. Effet des nutriments

Les milieux minimaux contenant 1 g/l de glyphosate sont additionnés de différentes substances nutritives (extrait de levure, glutamate et glycérol) à raison de 0,1% P/V, et ont été inoculés avec 2 ml des suspensions des souches bactériennes les plus performantes et incubés à l'obscurité à 30°C dans des conditions d'agitation de 150 t/m. Deux contrôles sans aucun nutriment ont été maintenus dans des conditions similaires. Des échantillons de 2 ml ont été prélevés toutes les 24 h jusqu'à 168h et analysés pour la croissance bactérienne par mesure de leur densité optique à 625 nm.

2.2.2. Effet de la température

Les milieux minimaux contenant 1 g/l de glyphosate avec le substrat qui donne le meilleur résultat de croissance (0,1%, P/V) ont été inoculés avec 2 ml des suspensions des souches les plus performantes et incubés à des températures différentes (30, 37 et 40°C) dans des conditions d'agitation de 150 tpm. Deux contrôles sans inoculation ont été maintenus dans des conditions similaires. Des échantillons de 2 ml ont été prélevés à des intervalles de temps réguliers (24 h) jusqu'à 168 h et analysés pour la croissance bactérienne par mesure de leur densité optique à 625 nm.

2.2.3. Effet du pH

Les milieux minimaux contenant 1 g/l de glyphosate avec le substrat qui donne le meilleur résultat de croissance (0,1%, P/V) ont été ajustés à des pH initiaux différents (5,0 ; 6,0 ; 7,0 ; 8,0 ; 9,0 et 10,0) à l'aide d'une solution acide d'HCl à 2N ou basique de NaOH à 2N. Les erlenmyers ont été inoculés avec 2 ml des suspensions des souches les plus performantes et incubés à la température optimale de croissance de chaque souche, dans des conditions d'agitation de 150 t/m. Deux contrôles, sans inoculation, ont été maintenus dans des conditions similaires. Des échantillons de 2 ml ont été prélevés à des intervalles de temps réguliers (24 h) jusqu'à 168 h et analysés pour la croissance bactérienne par mesure de leur densité optique à 625 nm.

2.2.4. Effet de la concentration initiale du glyphosate

Les milieux minimaux supplémentés par le substrat qui donne le meilleur résultat de croissance (0,1%, P/V) avec différentes concentrations de glyphosate (1, 3, 5, 7, 9, 12 et 15g/l) ont été ajusté au pH de croissance optimale et inoculés avec 2ml des suspensions des souches les plus performantes et incubés à la température optimale de croissance de chaque souche, sous agitation de 150 t/m. Deux contrôles sans inoculation ont été maintenus dans des conditions similaires. Des échantillons ont été prélevés toutes les 24 h jusqu'à 168 h et analysés pour la croissance bactérienne par mesure de leur densité optique à 625 nm.

2.3. Effet du glyphosate sur l'activité microbienne du sol

2.3.1. Les sols d'étude

Les sols retenus pour cette étude sont le sol forestier de la forêt de Chaaberrssas de l'Université Constantine 1 et le sol Saharien de la région de Biskra.

2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons

Les analyses de la granulométrie, de la matière organique et du taux de calcaire total ont été réalisés par le laboratoire de Chimie des Sols de l'Agence Nationale des Ressources Hydrauliques de la zone industrielle Palma de Constantine.

La mesure du pH_{eau} a été réalisée dans le laboratoire de génie microbiologique et application de Chaâberrsas. Sa détermination est basée sur la norme internationale NF ISO 10390 (1994) avec un rapport m/V de 1/5. Ainsi 3g de sol sont introduits dans un tube à centrifuger de 50 ml et 15 ml d'eau ultra pure sont ajoutés. Le tube est ensuite agité vigoureusement (vortex), puis agité pendant 5 minutes à 300 tr/min. le pH est mesuré après 2 heures de décantation. Les mesures de pH_{eau} sont réalisées en duplicata pour chaque lot de terre.

2.3.3. Traitement des sols

Le traitement des sols a été réalisé selon le protocole de Araujo *et al.* (2005). Une quantité de Roundup suffisante pour donner une concentration finale de glyphosate de 2,16 mg/kg a été ajoutée à 500 g de chaque sol.

2.3.4. Analyse microbiologique du sol

2.3.4.1. Dénombrement des microorganismes

Les bactéries aérobies totales, les champignons et les actinomycètes ont été dénombrées après 0 et 30 jours d'incubation pour les contrôles sans traitement et après 30 jours pour les échantillons traités par le glyphosate. Une quantité de 5 g de chaque sol est introduit dans un erlenmeyer contenant 25 ml d'eau physiologique stérile et agitée pendant 10 min sur un agitateur orbital. Après décantation (10 min), 5 ml du surnageant est transféré dans 25 ml d'eau physiologique stérile fraîche pour en faire la dilution 10^{-2} . De la même manière, les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} sont préparées en cascade.

Pour dénombrer les bactéries aérobies totales, 0,1ml de chaque dilution était ensemencé en duplicata sur le milieu PCA (annexe 1). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 48h. Le même volume est ensemencé pour le dénombrement des actinomycètes en duplicata sur le milieu Olson (annexe 1) et incubé à 30°C pendant 21 jours, et pour les champignons sur le milieu Sabouraud (annexe 1) et incubé à 30°C pendant 7 jours.

2.3.4.2. La respiration basale du sol (SBR)

La respiration basale ($\text{CO}_2\text{-C } \mu\text{g g}^{-1} \text{ sol}$) a été déterminée pour les sols traités et les contrôles à 2, 4, 8, 16, 24 et 30 jours d'incubation pour évaluer l'état physiologique des communautés microbiennes du sol, selon le protocole décrit par Anderson et Domsch, 1990. Une quantité de 20 g de chaque échantillon a été pesée dans un flacon en verre (500 ml). Les flacons ont été fermés avec un bouchon hermétique (**Figure 48**). Le CO_2 produit par la respiration est capturé dans 2 ml de NaOH 0,1M introduits dans un petit bécher et placé dans le fond du flacon. L'expérience est réalisée en triplicata. Deux blancs sans sol sont préparés pour évaluer la quantité de CO_2 piégée sans activité respiratoire. Les flacons sont incubés 24h à 22°C.

Le NaOH est transféré dans un bécher qui est utilisé comme récipient de titration. Un volume de 4 ml de la solution BaCl₂ (0,05 M) est ajouté pour précipiter le carbonate sous forme de BaCO₃. Quelques gouttes de phénolphtaléine sont ajoutées comme un indicateur. Puis, le NaOH restant est amené à pH 8,3 en ajoutant lentement du HCl 0,05 M sous agitation magnétique jusqu'à disparition de la couleur.

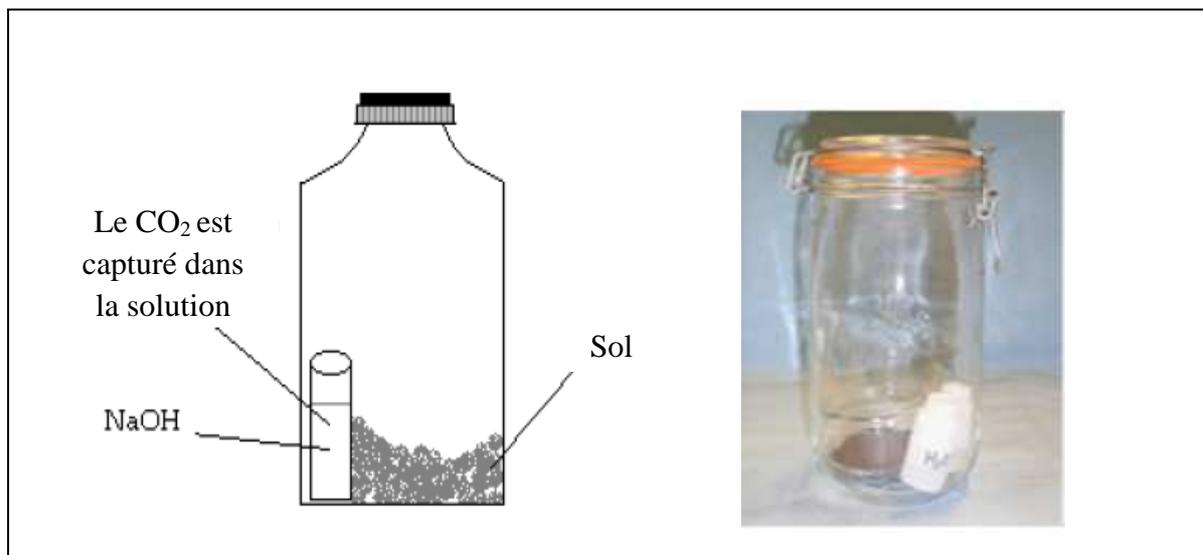


Figure 48. Dispositif de l'expérience de la respiration basale

Pour calculer la respiration basale (SBR) : quantité de CO₂-C µg/g de sol produite par heure l'équation suivante est utilisée :

$$SBR = \frac{Mc \times (Vb - Vs) \times 0,05}{S \times T \times 2} \times 10^3$$

Où Mc est la masse molaire du carbone (Mc = 12,01) ; Vb et Vs est le volume en ml de 0,05 M de HCl consommé dans la titration des blanc (moyenne) et de l'échantillon (moyenne du triplicata), respectivement ; S est la quantité du sol en gramme ; T est le temps d'incubation en heure. 2 est un facteur qui correspond a la consommation de deux molécules de OH⁻ par un CO₂ précipité.

3. Résultat et discussion

3.1. Suivre de l'évolution de la biomasse des différentes souches en présence du glyphosate comme seule source de carbone ou de phosphore

Parmi les cinq isolats bactériens cultivés dans le milieu contenant du glyphosate comme seule source de phosphore et testés pour la croissance en mesurant leur turbidimétrie à 625 nm, *P. pudida* a présenté le niveau de croissance le plus élevé (moyenne des DO = 0,129) suggérant un usage intensif du glyphosate, celui-ci est suivi par *Enterobacter zibanae* sp. nov., *E. cloacae*, *E. biskrae* sp. nov. puis *Rahnella* sp. (moyennes des DO = 0,126 ; 0,100 ; 0,092 ; 0,084, respectivement) (**Figure 39 a**).

Quant aux isolats cultivés dans le milieu contenant le glyphosate comme seule source de carbone, *Serratia marscecens* (moyenne des DO = 0,053) et *E. cloacae* (moyenne des DO = 0,045) n'ont pas montré une croissance appréciable comme le montre la **Figure 39 b**.

Les différences observées dans la croissance des isolats dans les milieux sont représentatives des différences de tolérance à l'herbicide entre les microorganismes testés.

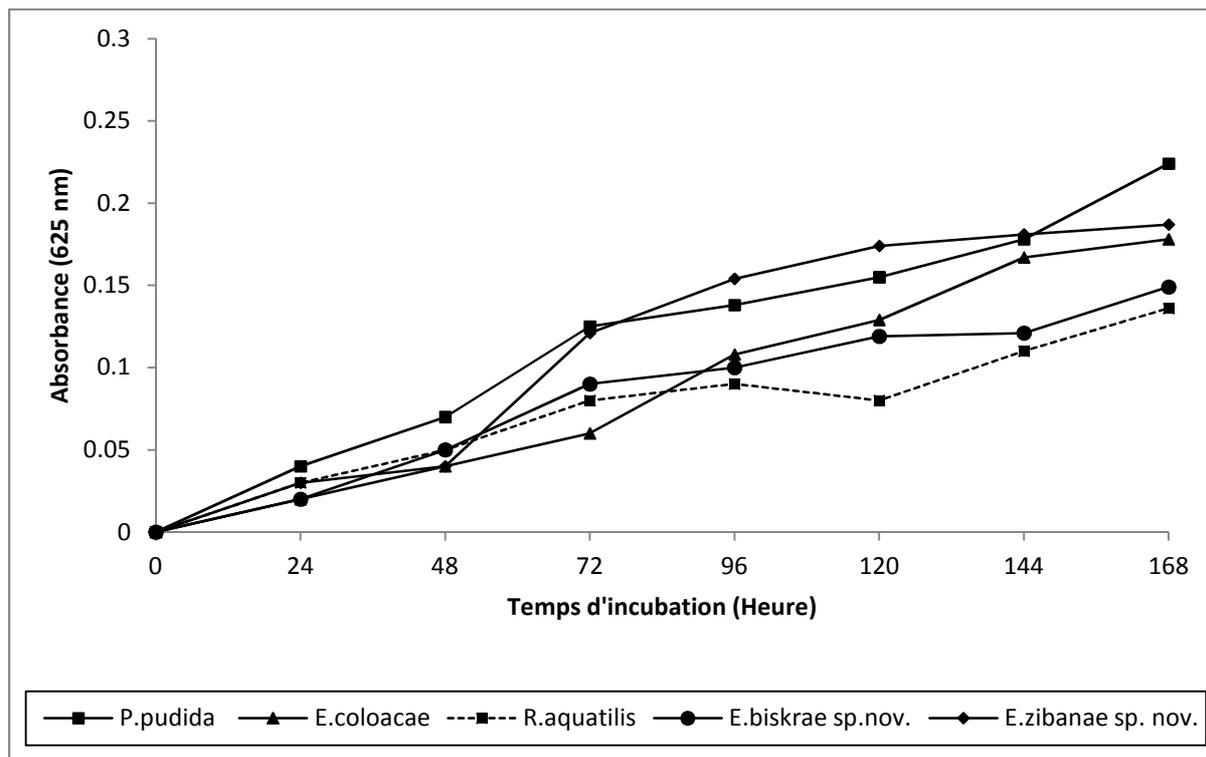


Figure 39a. Cinétique de croissance de *P.pudida*, *E. cloacae*, *R.aquatilis*, *E. biskrae* sp. nov. et *E. zibanae* sp. nov. en présence de glyphosate comme seule source de phosphore.

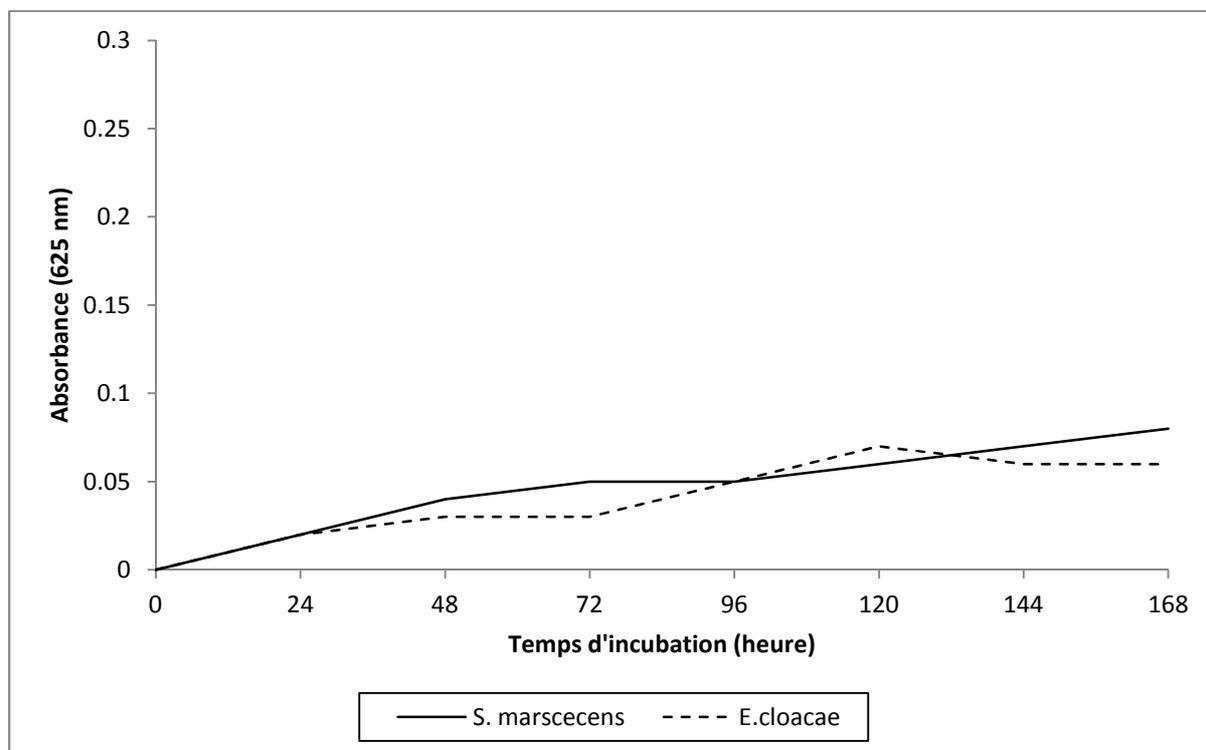


Figure 39b. Cinétique de croissance d'*E. cloacae* and *S. marscecens* en présence de glyphosate comme seule source de carbone.

3.2. Effet des facteurs abiotiques sur l'utilisation du glyphosate par les deux souches représentatives *Pseudomonas putida* et *Enterobacter zibanae* sp. nov.

Les deux souches *P. putida* et *Enterobacter zibanae* sp. nov. ont été sélectionnées dans cette étude par ce qu'elles ont montré une croissance importante dans le milieu de culture contenant le glyphosate comme seule source de phosphore (**Figure 39 a**). Les cinétiques de croissance de *P. putida* et *E. zibanae* sp. nov. ont été suivies dans le temps à 620 nm, en utilisant le MMM2 enrichi avec le glyphosate comme seule source de phosphore, en variant les conditions abiotiques du milieu.

Les **Figures (40, 41)** montrent l'effet de certains nutriments (extrait de levure glutamate et glycérol) sur la croissance bactérienne. En présence de glutamate, la croissance de la souche *P. putida* augmente régulièrement après 24 h d'incubation et atteint un maximum de croissance avec un DO = 0.250, après 168 h d'incubation. Alors qu'en présence de glycérol et d'extrait de levure, la croissance atteint un maximum de (DO = 0.245 et 0.206) après 168 h d'incubation, respectivement (**Figure 40**). Par conséquent, le glutamate a été choisi comme source de carbone pour les études ultérieures de la souche *P. putida*. Quant à la souche *E. zibanae* sp. nov. la croissance la plus importante a été atteinte dans le milieu supplémenté d'extrait de levure (DO maximale = 0,231) (**Figure 41**). Par conséquent, l'extrait de levure a été sélectionné pour des études ultérieures pour cette souche. Kumar et Philip (2006) ont rapporté que l'addition d'un auxiliaire de carbone au système ayant des composés xénobiotiques augmente le potentiel de biodégradation des cultures bactériennes, souvent en raison de l'augmentation de l'activité métabolique des microorganismes impliqués. Tel que rapporté par Mallick *et al.* (1999) et Guha *et al.* (1997) le co-métabolisme semble se produire fréquemment dans la nature.

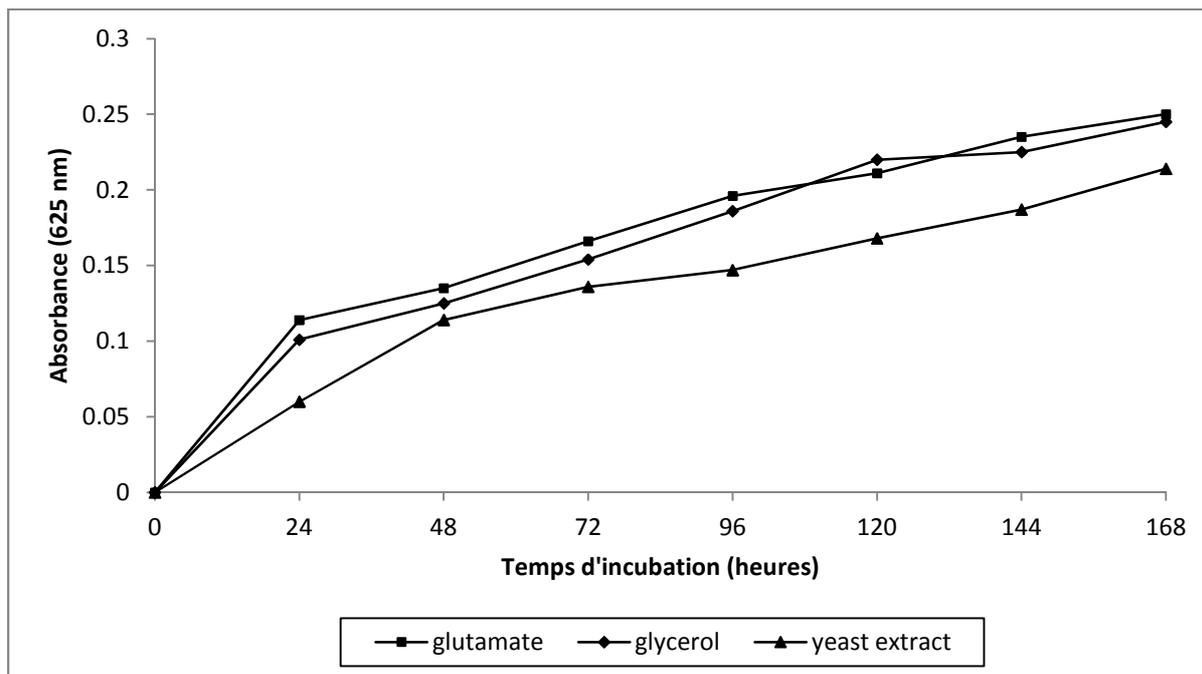


Figure 40. Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas putida* en présence du glyphosate comme seule source de phosphore avec différents nutriments.

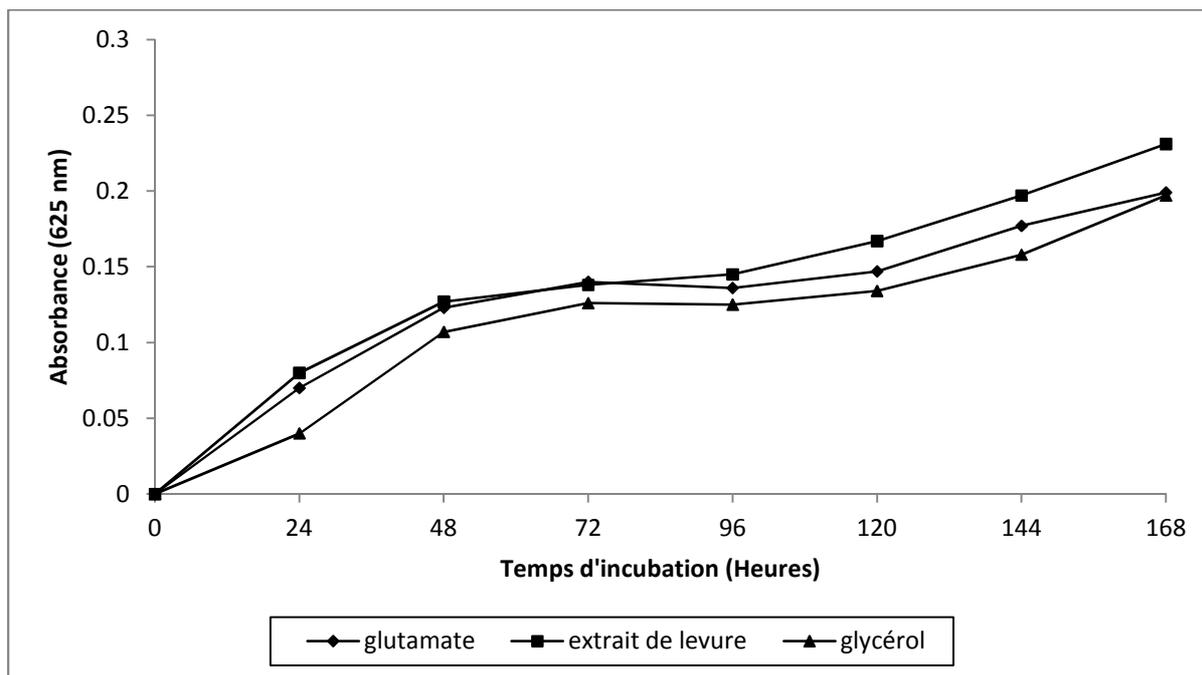


Figure 41. Cinétique de croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. en présence du glyphosate comme seule source de phosphore avec différents nutriments.

Les **Figures (42 et 43)** montrent l'évolution de la croissance bactérienne à différentes températures (30°C, 37°C et 40°C). Une augmentation significative de la croissance de la souche *P. putida* a été observée à 30°C, où la croissance de la souche

atteint son pic (DO = 0.248) après 168 h d'incubation. Une croissance moins importante a été obtenue à 37°C. À 40°C la souche a montré une croissance plus lente et faible et atteint sa croissance maximale (DO = 0.07) après 168 h d'incubation (**Figure 42**). Par conséquent, la température 30°C a été choisie pour les études ultérieures pour *P. putida*. Ce résultat peut être attribué au fait que, à basse température, la croissance de la souche est accentuée ainsi que la réaction catalysée par l'enzyme dégradant le glyphosate. Cela indique que la souche est psychrophile de nature. Quant à la souche *E. zibanae* sp. nov. les pic de croissance à 30°C et à 37°C atteints presque le même niveau (DO = 0,168 - 0,166, respectivement) avec un léger avancement de la croissance à 37°C, cependant la croissance de la souche a été moins significative et ralentie à 40°C et atteint un maximum de DO de 0,128 après 168h d'incubation (**Figure 43**). Pour cette souche la température 37°C a été choisie pour les études suivantes. Moorman (1994) a déclaré que dans la gamme de températures normalement rencontrées dans les sols, le taux de dégradation des pesticides augmente généralement avec la température. Walker *et al.* (1992) considère que la température du sol est le facteur environnemental le plus important qui influe sur la vitesse de dégradation des pesticides dans les sols. Il a été rapporté que la température d'incubation n'affecte pas seulement la vitesse de dégradation des pesticides mais également la croissance des souches bactériennes.

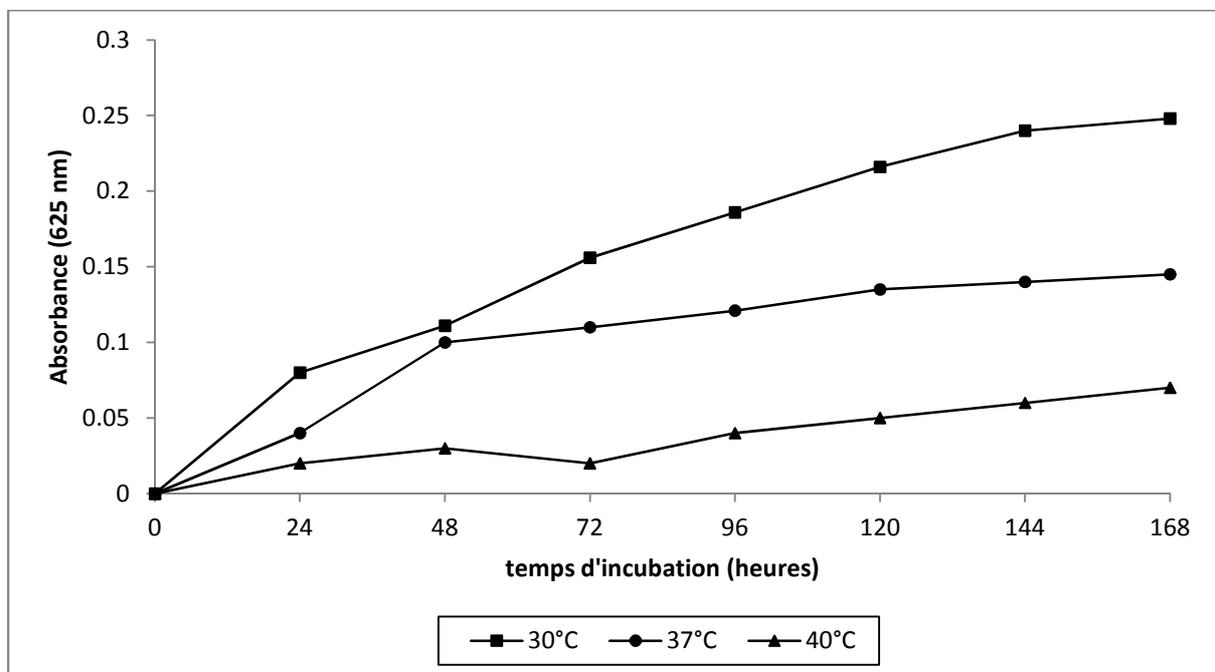


Figure 42. Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas putida* en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et de glutamate (0,1% P/V) à des températures différentes.

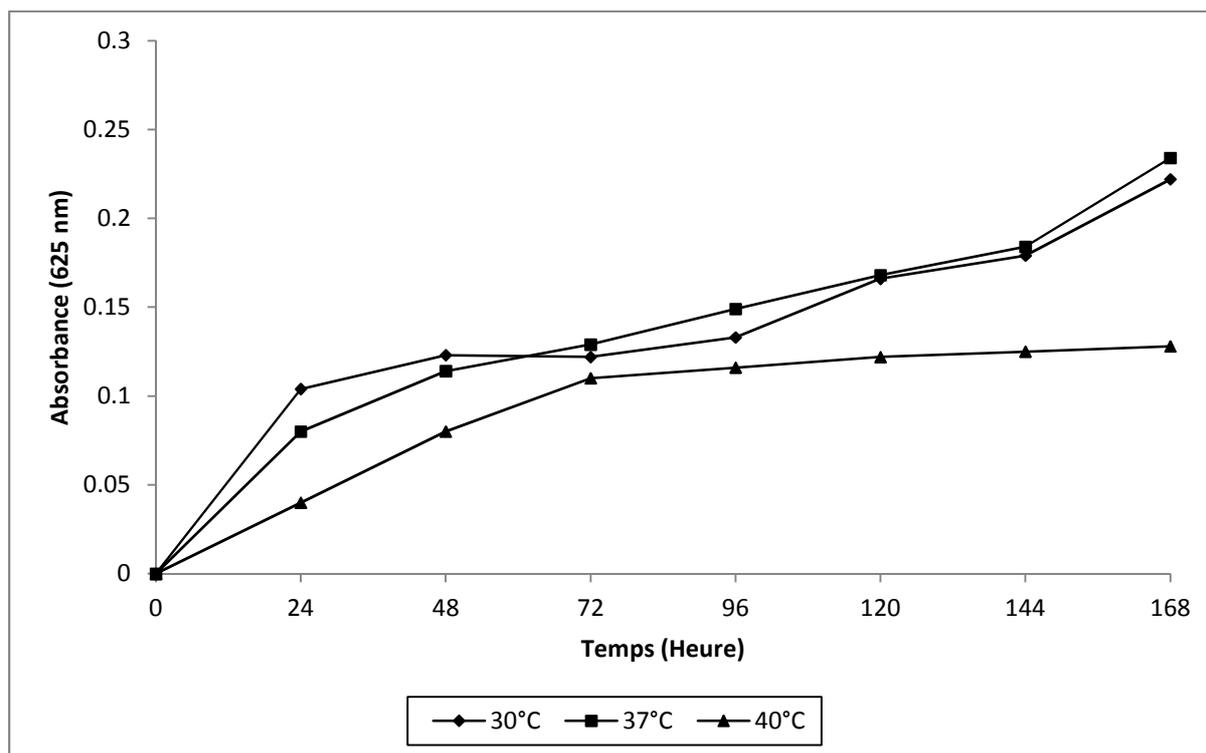


Figure 43. Cinétique de croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et d'extrait de levure (0,1% P/V) à des températures différentes.

L'effet du pH sur la croissance des souches *P. putida*. et *E. zibanae* sp. nov. est illustré dans les **Figures (44 et 45)**. En générale la croissance des deux souches est plus importante dans les pH alcalins allant de 7 à 10 durant les 168 heures d'incubation. Lorsque le pH initial est inférieur à 7, la croissance des deux souches diminue progressivement avec la diminution du pH. Á pH 9 la croissance bactérienne atteint un maximum de (DO = 0.261) après 168 h d'incubation pour *P. putida* et de (DO = 0,244) pour *E. zibanae* sp. nov. Un pH légèrement alcalin est favorable à la dégradation du glyphosate probablement en raison de la biodisponibilité accrue et la diminution de la toxicité du glyphosate, et l'activité métabolique optimale des cellules bactériennes. Singh *et al.* (2003a, b) rapportent que dans les sols à pH élevé un nombre de copies élevé de gènes *opd* (organophosphate degrading) est trouvé, ce qui suggère que l'activité des enzymes dégradants les composés organophosphorés est plus importante aux pH alcalins.

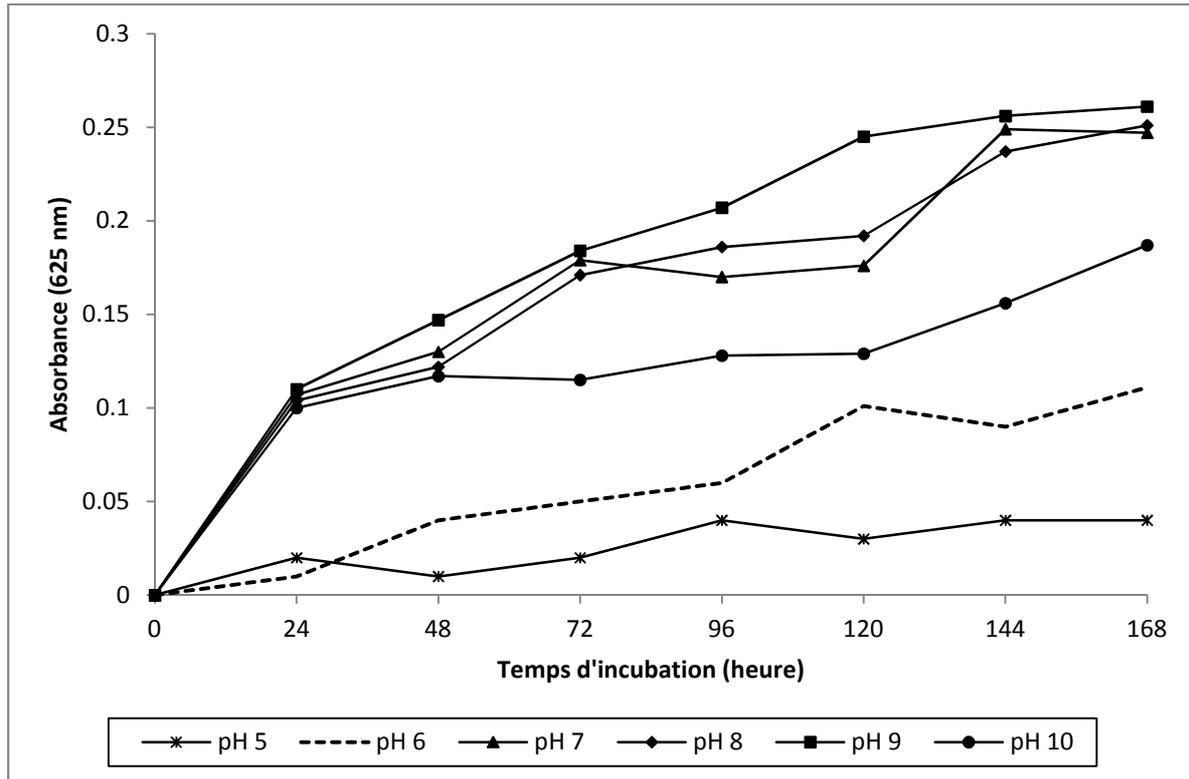


Figure 44. Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas putida* en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et de glutamate (0,1% P/V), à 30°C, à différents pH.

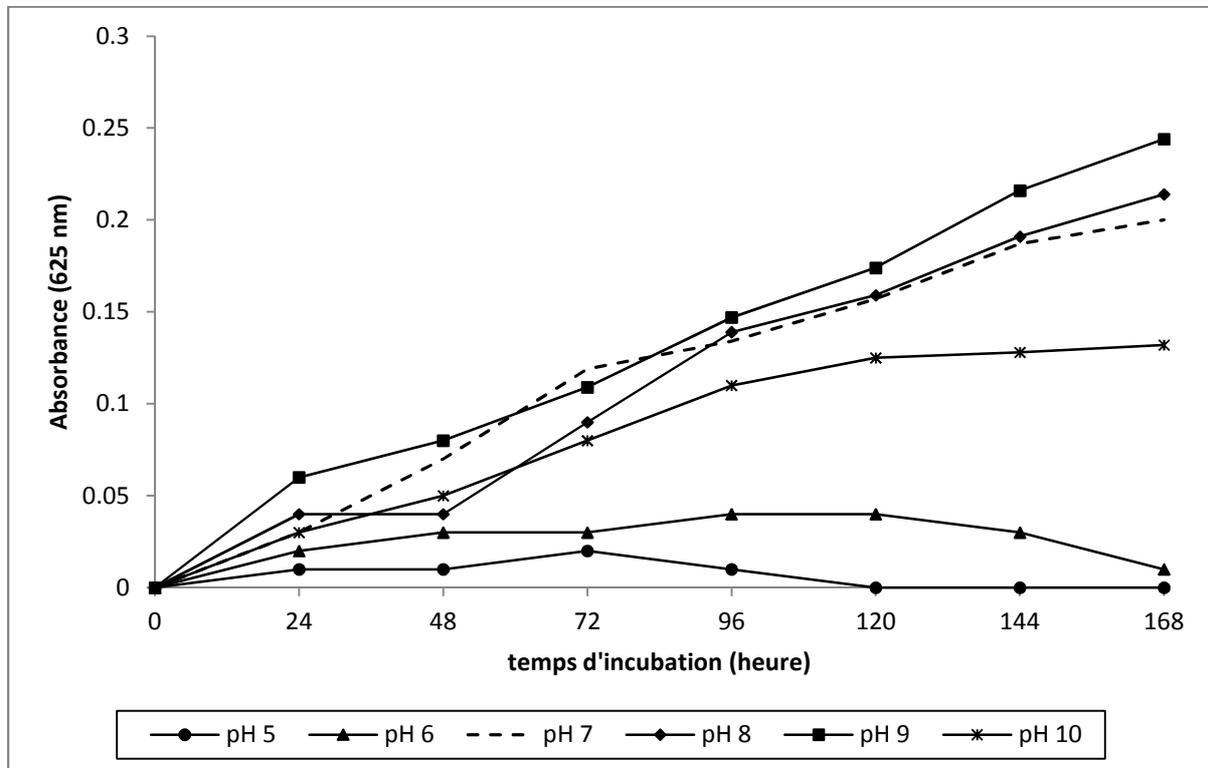


Figure 45. Cinétique de croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov. en présence de glyphosate comme seule source de phosphore et d'extrait de levure (0,1% p/v) à 30°C, à différents pH.

Les cinétiques de croissance à différentes concentrations initiales de glyphosate sont représentées sur les **Figures (46 et 47)**. Pour les deux souches, une augmentation de la croissance microbienne a été observée jusqu'à une concentration initiale de glyphosate de 3g/l. Comme la concentration de glyphosate augmente, il ya une diminution de la croissance des souches. Les fortes concentrations de glyphosate ont sévèrement inhibées la croissance bactérienne. La croissance la plus importante a été observée à 1g/l pour les deux souches, qui est la plus faible concentration testée du glyphosate. Après 168 h d'incubation, la croissance de *P. putida*. et *E. zibanae* sp. nov. dans le milieu contenant 1g/l de glyphosate a augmenté de manière significative et atteint un maximum de DO de 0.265 et de 0,249, respectivement. Cependant, aucune inhibition de la croissance n'a été observée lorsque la concentration initiale du glyphosate a augmenté de plus 1g/l, ce qui indique que les deux souches peuvent tolérer jusqu' à 9 g/l de glyphosate.

La diminution de la densité cellulaire à des concentrations élevées de glyphosate peut être attribuée à la toxicité et le stress du glyphosate sur les souches. Cela peut aussi s'expliquer par le fait qu'à des concentrations élevées du glyphosate, les enzymes cataboliques appropriées peuvent être réprimées. Une autre explication possible est que les souches peuvent avoir besoin d'une longue période d'adaptation pour induire la voie de dégradation nécessaire (Tang et You, 2011). Un résultat similaire a été trouvé par Moneke *et al.* (2010), lors de l'essai de différentes concentrations initiales de glyphosate sur *Acetobacter* sp. et *P. fluorescens*.

La tolérance à des concentrations élevées de pesticides est essentielle, car les concentrations sur les sites contaminés peuvent être supérieures aux doses d'utilisation recommandées pour ces produits.

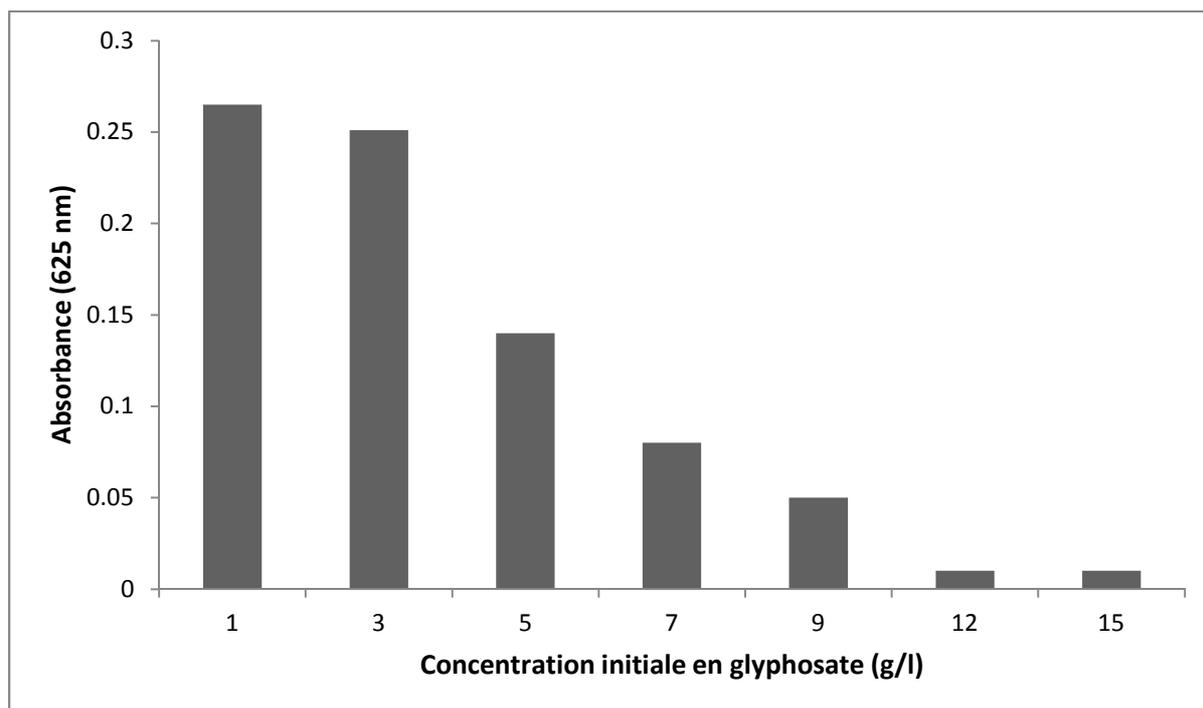


Figure 46. Effet de différentes concentrations de glyphosate sur la croissance de la souche *Pseudomonas putida*.

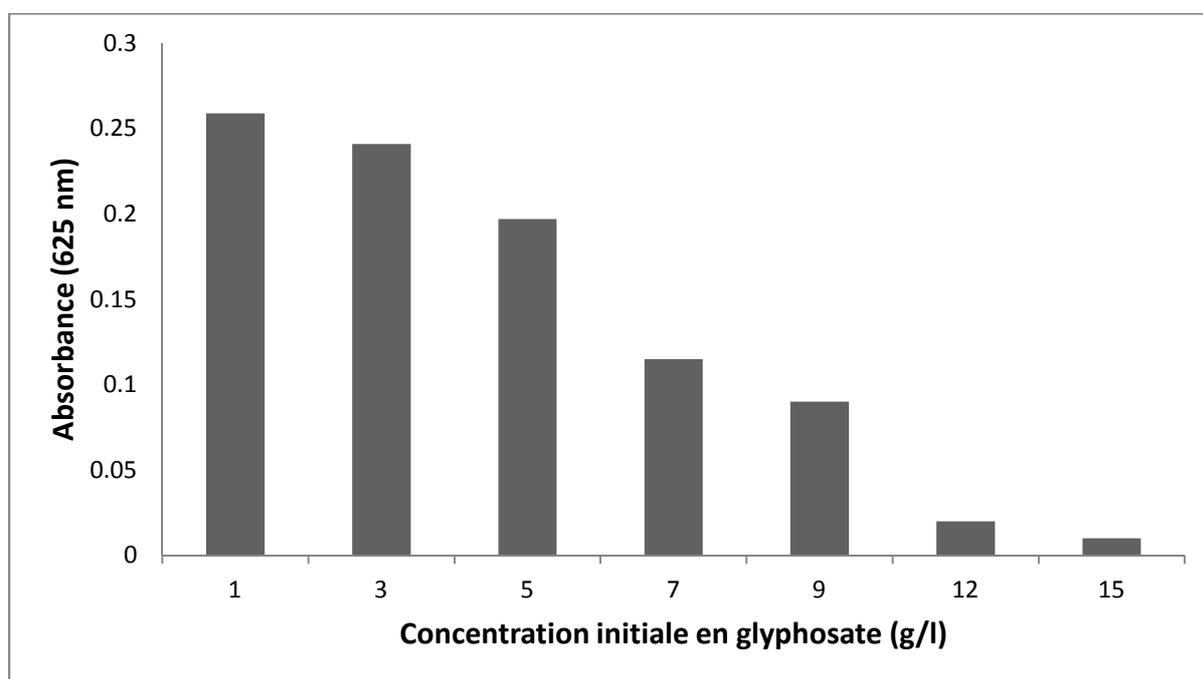


Figure 47. Effet de différentes concentrations de glyphosate sur la croissance de la souche *Enterobacter zibanae* sp. nov.

3.3. Effet du glyphosate sur la l'activité microbienne du sol

Les communautés microbiennes sont à la base des processus importants de l'écosystème (comme le recyclage des nutriments, la transformation des polluants et les échanges gazeux avec l'atmosphère). Les facteurs influençant le fonctionnement de ces processus peuvent affectés la santé du sol.

Pour évaluer les risques écologiques causés par les polluants, il est non seulement suffisant d'évalué leur biodégradation par les bactéries isolées du sol, mais il est nécessaire d'observer également les processus microbiens. L'investigation biologique des sols (telles que la respiration du sol, la biomasse, l'activité enzymatique, le dénombrement microbien) peut donner des informations sur la présence de microorganismes viables ainsi que sur l'intensité, le type et la durée des effets des polluants sur l'activité métabolique des sols, et sont donc bien adaptés pour mesurer l'impact de la pollution sur la santé des sols (Schinner *et al.*, 1996 ; van Beelen et Doelman, 1997). Les méthodes biologiques utilisés pour décrire les activités microbiennes dans le cadre de la bioremédiation sont principalement basées sur la respiration, la biomasse microbienne, le dénombrement microbien et l'activité enzymatique du sol (Song et Bartha, 1990 ; Janke *et al.*, 1992).

3.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols (Tableau 10)

Le sol forestier est un sol argilo-limoneux riche en matière organique. Alors que le sol Saharien a une texture sableuse avec une faible teneur en matière organique. Le pH_{eau} est légèrement alcalin pour les deux sols.

Tableau 10. Caractéristiques physico-chimique des sols forestier et Saharien

Paramètres étudiés		Type de sol	
		<i>Sol forestier</i>	<i>Sol Saharien</i>
Granulométrie (%)	Argile	39	0,38
	Limon fin	25	1,21
	Limon grossier	17	1,04
	Sable fin	10	52,15
	Sable grossier	09	45,22
pH _{eau}		7,3	7,6
Calcaire total (%)		36,10	34,27
Matière organique (%)		10,12	1,07

3.3.2. Effet du glyphosate sur les microorganismes cultivables du sol

Le nombre de microorganismes au début et à la fin de l'incubation dans les deux sols est indiqué dans le **Tableau 11**.

Tableau 11. Type et nombre de microorganismes détectés dans le sol Saharien et forestier avant et après incubation pendant 30 jours avec et sans ajout de glyphosate.

Micro-organismes et type de sol	Unité formant colonie par gramme de sol		
	Jour 0	Jour 30	
	Sol sans glyphosate ajouté	Sol sans glyphosate ajouté (contrôle)	Sol supplémenté par 2,16 mg /kg de glyphosate
Bactéries			
Sol forestier	$1,90 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$
Sol Saharien	$0,7 \times 10^3$	$3,24 \times 10^3$	$6,17 \times 10^3$
Champignons			
Sol forestier	$2,60 \times 10^3$	$4,41 \times 10^3$	$5,01 \times 10^3$
Sol Saharien	$1,03 \times 10^3$	$2,51 \times 10^3$	$0,07 \times 10^5$
Actinomycètes			
Sol forestier	$0,27 \times 10^4$	$2,12 \times 10^4$	$2,07 \times 10^4$
Sol Saharien	$0,41 \times 10^3$	$2,06 \times 10^3$	$4,31 \times 10^3$

Pour le sol forestier, aucun changement significatif dans la composition de la communauté microbienne n'a été observé entre le contrôle et l'échantillon traité par le glyphosate après 30 jours d'incubation. Ces résultats sont conformes avec ceux de Stratton et Stewart (1992) qui n'ont observé aucun effet négatif ou positif en ce qui concerne le nombre des microorganismes d'un sol traité au glyphosate. L'absence d'effet négatif sur le microbiote peut s'expliquer par le fait que le glyphosate n'est probablement pas toxique pour toutes les espèces microbiennes, au contraire, il pourrait exercer un effet relatif en diminuant l'abondance des espèces sensibles due à la réponse au stress et en même temps il fait augmenté l'abondance de celles qui sont adaptées, par l'utilisation des ressources libérées les espèces sensibles (Zabaloy *et al.*, 2008).

Dans le cas du sol Saharien, les populations bactériennes, actinomycétales et mycétales sont environ deux fois plus importantes dans l'échantillon traité par le glyphosate. Cette constatation est en accord avec les résultats de Gimsing *et al.* (2004) et Ratcliff *et al.* (2006) qui rapportent une augmentation de microorganismes cultivables du sol dénombrés après addition du glyphosate. Ceci peut être expliqué par le fait que le glyphosate ajouté au sol est

une source de nutriments et d'énergie enrichissant le sol Saharien naturellement pauvre en matière organique (**Tableau 10**), où il est immédiatement métabolisé conduisant à la stimulation de l'activité fonctionnelle et la diversité de la population microbienne hétérotrophe.

L'augmentation la plus importante pour le sol Saharien est observée pour les champignons. Selon Wardle et Parkinson (1990), le glyphosate peut influencer le nombre de champignons directement et indirectement, en agissant sur l'interaction des champignons avec les autres microorganismes. Des recherches ont révélé que les interactions antagonistes entre les espèces de champignons ont été éliminées par le glyphosate ce qui suggère que l'herbicide influence la structure globale de la communauté des champignons du sol (Wardle et Parkinson, 1992). Une étude menée par Krzysko-Lupicka et Sudol, 2008 a montré que l'exposition à long terme des microorganismes du sol au glyphosate conduit à une communauté fongique dominée par *Fusarium* spp. De même, Means (2004) a détecté une importante augmentation dans le sol de la population des *Fusarium* dans les deux semaines qui suivent l'application du glyphosate.

3.4. Effet du glyphosate sur la respiration microbienne

Le montant cumulé de dioxyde de carbone libéré par les échantillons du sol Saharien sans glyphosate (les contrôles) à la fin de la période d'incubation (jour 30) était de 0,15 $\mu\text{g/g}$ sol tandis que la quantité de dioxyde de carbone libérée par les échantillons qui avaient reçu un supplément de glyphosate était de 0,30 $\mu\text{g/g}$ sol (**Figure 49**).

La grande quantité de dioxyde de carbone libérée du sol Saharien en présence de glyphosate corrobore les résultats du dénombrement et suggère que le microbiote de ce sol est capable d'utiliser le glyphosate comme une source de nutriment, ce résultat est en accord avec le résultat de Wardle et Parkinson (1990) qui suggèrent que la production de dioxyde de carbone est liée à la décomposition de glyphosate dans le sol. Cela indique que le glyphosate n'a pas d'effet toxique sur les microorganismes du sol. Des résultats comparables ont également été observés par Haney *et al.* (2000) et Weaver *et al.* (2007).

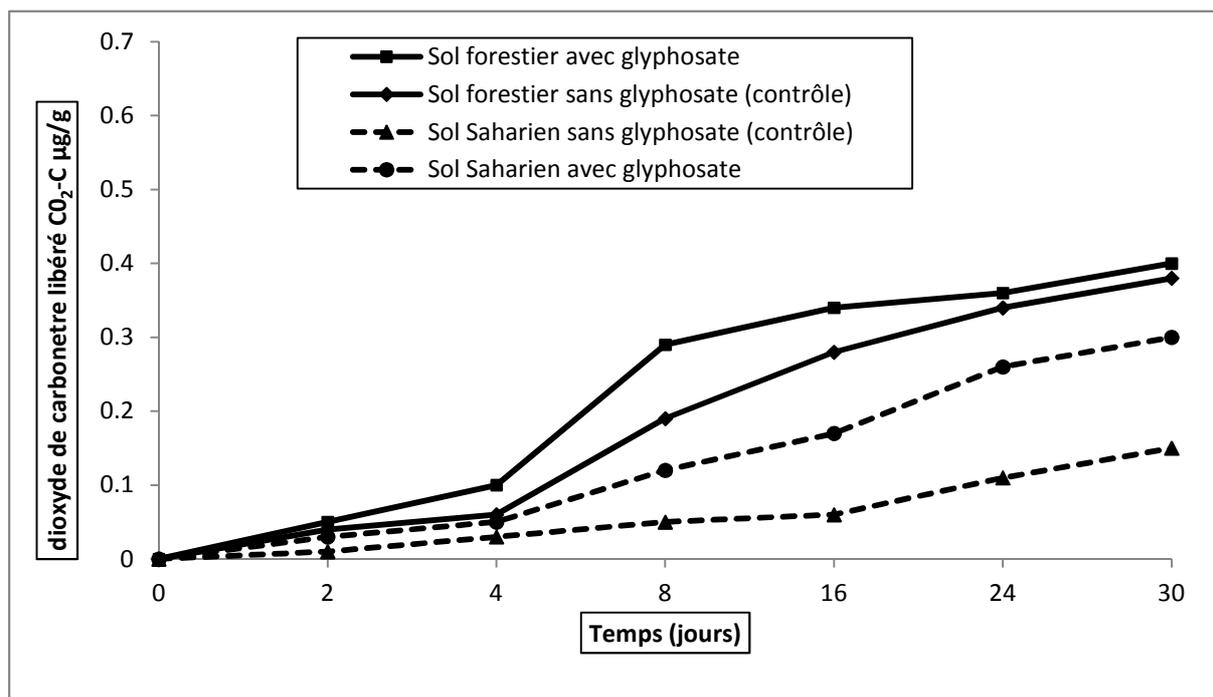


Figure 49. Evolution de dioxyde de carbone des deux sols forestiers et Saharien avec et sans traitement par le glyphosate

Pour le sol forestier, une augmentation rapide du CO₂ libéré dans les échantillons traités par le glyphosate par rapport aux contrôles a été observée à partir du 4^{ème} jour d'incubation. Après le 16^{ème} jour, le taux de CO₂ libéré diminue et atteint un niveau proche de celui observé pour le contrôle (**Figure 49**). Cela peut être dû à l'adsorption du glyphosate aux particules du sol ce qui le rend indisponible pour les microorganismes. En effet, le glyphosate est une molécule polaire connue pour sa grande adsorption aux oxydes de Fe et Al ainsi qu'aux molécules d'argile (McBride and Kung 1989 ; Piccolo *et al.*, 1994 ; Morillo *et al.*, 1997). Et comme le sol forestier est un sol argileux-limono (**Tableau 10**), le taux élevé d'argile peut causer l'indisponibilité de l'herbicide.

La contradiction apparente entre l'absence d'effet du glyphosate sur la composition de la communauté microbienne cultivable et l'augmentation de la respiration du 4^{ème} au 16^{ème} jour d'incubation, pourrait s'expliquer par la domination d'une communauté microbienne prête à utiliser les substrats issus de la destruction cométabolique du glyphosate dans la respiration, plutôt que dans l'assimilation.

Malgré la forte augmentation de la respiration du sol Saharien, l'intensité de la minéralisation du sol forestier était plus importante que celle du sol Saharien aussi bien pour les échantillons traités par le glyphosate que pour les contrôles (**Figure 49**), cela indique que

le sol forestier présente une activité microbienne plus importante et cela est probablement dû à la différence en matière organique entre les deux sols, où elle est plus élevée dans le sol forestier.

4. Conclusion

L'utilisation de microorganismes dans la bioremédiation nécessite une compréhension de tous les aspects physiologiques, microbiologiques, écologiques, biochimiques et moléculaires impliqués dans la transformation des polluants. L'optimisation des paramètres de ce processus basés sur la compréhension des effets des facteurs abiotiques sur la capacité des microorganismes est importante lors de la conception des stratégies de la bioremédiation (Iranzo *et al.*, 2001). Toutes les souches isolées et identifiées des différents sols étudiés (*P. putida*, *E. colacae*, *R. aquatilis*, *S. marcescens*, *E. zibanae* sp. nov et *E. biskrae* sp. nov.) utilisent le glyphosate. L'originalité de ce travail réside dans le fait qu'à partir de sols non traités de telles souches ont pu être isolées et que les résultats d'identification ont mis en évidence d'une part, la présence d'une souche capable de dégrader le glyphosate appartenant à l'espèce *Serratia marcescens* jamais décrite dans la dégradation des herbicides et d'autre part, la détection de deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter*. Par conséquent, ces isolats ou leurs enzymes peuvent être potentiellement utiles dans les sols contaminés par cet herbicide et peuvent conduire au développement, éventuellement, d'une technologie de bioremédiation dans un avenir proche.

L'étude des effets des facteurs abiotiques sur la dégradation du glyphosate et la croissance bactérienne a été faite pour optimiser les facteurs importants qui affectent d'une manière considérable la dégradation du glyphosate et la croissance bactérienne, ainsi que l'interaction de ces facteurs. Les deux souches *P. putida* et *Enterobacter zibanae* sp. nov. ont été sélectionnées dans cette étude parce qu'elles ont montré une croissance importante dans le milieu de culture contenant le glyphosate comme seule source de phosphore. Ainsi, cette étude fournit une information importante sur l'optimisation des paramètres critiques de conditions de culture pour améliorer la dégradation du glyphosate par les deux souches *P. putida* et *Enterobacter zibanae* sp. nov.

Cette étude présente aussi un rapport des effets secondaires du glyphosate sur le sol Saharien. Nous avons pu confirmer certains effets secondaires du glyphosate à court terme (30 jours) sur la respiration microbienne et la composition de la communauté microbienne de deux sols différents. Contrairement au sol forestier, l'activité microbienne du sol Saharien a été nettement activée en présence du glyphosate, non seulement par l'augmentation du nombre des microorganismes cultivables, mais aussi par l'augmentation de la respiration basale du sol. Ces effets indiquent que l'impact global du glyphosate sur l'écosystème du sol dépend des propriétés physico-chimiques de cet écosystème. Il est clair à la fois de nos résultats et ceux des autres chercheurs que le glyphosate peut ne pas avoir d'effet sur l'activité microbienne, comme il peut stimuler certaines variables microbiologiques dans le sol.

Conclusion générale

Le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé au niveau mondial. Il figure parmi les produits à l'origine d'une contamination des ressources naturelles. Suite aux difficultés analytiques, les travaux sur cet herbicide sont restreints à des études de laboratoire. La décontamination biologique des terres polluées par un herbicide est basée principalement sur l'isolement de souches à capacité bioremédiatrice vis-à-vis de l'herbicide. L'optimisation de la biodégradation repose sur l'étude des facteurs abiotiques de la culture microbienne. Alors que l'évaluation des risques écologiques d'un herbicide nécessite le suivi de l'évolution de l'activité et de la biomasse microbienne d'un sol contaminé. L'objectif de notre travail a donc visé l'analyse de ces axes. Pour cela, des expérimentations ont été effectuées sur trois sols différents non traités par aucun herbicide (deux de Constantine et un de Biskra) à l'échelle du laboratoire en conditions contrôlées.

La bioremédiation est un moyen pas cher et écologique pour éliminer les composés phytosanitaires de l'environnement. L'utilisation de microorganismes dans la décontamination des sites pollués par les organophosphorés est considérée comme une approche respectueuse de l'environnement. En 1973, la première bactérie dégradant ces pesticides a été isolée à partir d'un échantillon de sol provenant des Philippines et a été identifiée comme *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 (Sethunathan et Yoshida, 1973). Depuis lors, plusieurs bactéries, quelques champignons et cyanobactéries qui peuvent utiliser des composés organophosphorés comme source de carbone, d'azote ou de phosphore, ont été isolés. Des études récentes sur les bactéries dégradant le glyphosate ont visées la sélection, et l'isolement de souches bactériennes pures avec des grandes capacités de désintoxication pour des usages potentiels dans l'industrie de la biotechnologie, tels que, par exemple, la suppression de glyphosate des cours d'eau ou encore le développement de cultures de plantes résistantes au glyphosate en se basant sur les gènes encodant les enzymes dégradant cet herbicide.

Sept souches bactériennes ont été isolées à partir des trois sols étudiés en utilisant des milieux de culture enrichis par l'herbicide glyphosate. Les isolats ont été caractérisés par une étude polyphasique (génotypique et phénotypique) qui a permis d'identifier ces isolats comme *P. putida*, *E. colacae*, *R. aquatilis*, *S. marcescens*. Deux isolats ont été identifiés comme deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter* nommés *Enterobacter zibanae* sp. nov. et *Enterobacter biskrae* sp. nov. Les deux souches *P. putida* et *Enterobacter zibanae* sp. nov. ont montré une croissance importante dans le milieu minimal additionné de glyphosate comme seule source de phosphore, pour cette raison elles ont été choisies pour une étude

d'optimisation des conditions de culture pour une dégradation plus efficace du glyphosate. Le meilleur résultat de croissance des deux souches a été obtenu après culture dans un milieu minimal contenant 1 g/l de glyphosate sur un agitateur rotatif à 150 t/m durant 168 heures d'incubation, supplémenté de glutamate (0,1%, p/v) à pH initial 9,0 à 30°C pour *P. putida* et d'extrait de levure (0,1%, p/v) à pH initial 9,0 à 37°C pour *Enterobacter zibanae* sp. nov. La croissance microbienne au cours de l'étude a été suivie par mesure de la densité optique à 620 nm. Une croissance significative a été observée à des concentrations faibles de glyphosate (1–3 g/l). La croissance diminue avec l'augmentation de la concentration. Toutefois, aucune inhibition de la croissance n'a été observée à des concentrations élevées (> 3 g/l), ce qui suggère que les deux souches peuvent tolérer jusqu'à 15 g/l de glyphosate. Ces résultats montrent que ces souches peuvent être utilisées dans la bioremédiation des environnements contaminés par le glyphosate.

Les effets indésirables causés par l'utilisation des composés xénobiotiques sur les organismes non cibles sont une préoccupation environnementale. Dans le cas du glyphosate, la perturbation potentielle des communautés microbiennes du sol et leurs processus a suscité l'intérêt en raison de son mode d'action. Le glyphosate inhibe le 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP), une enzyme intermédiaire dans la synthèse d'acides aminés aromatiques par la voie des acides shikimiques (Franz *et al.*, 1997). La plupart des organismes vivants, à l'exclusion des plantes, n'ont pas cette voie et ne sont donc pas affectés directement par le glyphosate. Cependant, la voie de l'acide shikimique est omniprésente chez les microorganismes (Bentley, 1990).

Les effets secondaires du glyphosate sur la respiration microbienne et la composition de la communauté microbienne du sol forestier et du sol Saharien ont été évalués à court terme (30 jours). Contrairement au sol forestier, l'activité microbienne du sol Saharien a été nettement activée en présence du glyphosate, non seulement par l'augmentation du nombre des microorganismes cultivables, mais aussi par l'augmentation de la respiration basale du sol. Ces effets indiquent que l'impact global du glyphosate sur l'écosystème du sol dépend des propriétés physico-chimiques de cet écosystème.

Contrairement aux résultats de l'isolement au laboratoire où seulement sept souches bactériennes étaient capables de croître lorsque le glyphosate est fourni comme seule source de P ou de C, l'étude menée directement sur le sol montre une stimulation des

microorganismes du sol Saharien par le glyphosate et une absence d'influence sur la microflore du sol forestier.

Des études approfondies sont encore nécessaires pour évaluer des mécanismes possibles de la biodégradation du glyphosate par les différentes souches isolées, ainsi que les produits de dégradation de l'herbicide par les méthodes de chimie analytique comme l'HPLC ou la chromatographie.

En outre, des études sur ces isolats doivent être faites dans des milieux naturels, car les microorganismes qui sont capables de dégrader les polluants organiques dans la culture *in vitro* peuvent parfois ne pas fonctionner quand ils sont inoculés dans les milieux naturels. Enfin d'autres recherches sur l'effet du glyphosate sur l'activité microbienne du sol seront nécessaires pour déterminer si les résultats à l'échelle du laboratoire peuvent être extrapolés sur les grands systèmes tels que les systèmes à effet de serre et sur les terrains cultivés.

Références bibliographiques

ACTA. (2002). Index phytosanitaire, Association De Coordination Technique Agricole, 194 rue de Bercy, 75595 Paris.

ACTA. (2006). Index phytosanitaire, Association De Coordination Technique Agricole, 194 rue de Bercy, 75595 Paris.

Adam, A., Marzuki, A., Abdul Rahman, H. et Abdul Aziz, M. (1997). The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. *Veterinary & Human Toxicology* 39: 147- 151.

Adhya, T.K., Barik, S. et Sethunathan, N. (1981). Hydrolysis of selected organophosphorus insecticides by two bacterial isolates from flooded soil. *Journal of Applied Bacteriology*. 50: 167–172.

Ahrens, J.F.(1979). Update on chemical controof brush and weeds in christmas tree Plantings. *American Christmas Tree Journal*. 2: 28-31.

Ait-Sai, L. (1993). Modélisation stochastique du transfert des pesticides dans les sols et les eaux souterraines. Application à la vulnérabilité des puits. Thèse (docteur d'INRS Eau du Québec). Chapitre 3 (25-26).

Alexander, M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211. 9: 132-138.

Alibhai, M.F. et Stallings, W.C. (2001). Closing down on glyphosate inhibition with a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 2944-2946

Al-jaff, D.M.A., Cook, G.T., Stephen, N.H., Atchison, T.C. et Duncan, et H.J. (1982). The effects of glyphosate on frond fegeneration, bud development and survival, andStorage Rhizome Starch Content in Bracken. *Annals of Applied Biology*. 101: 323-329.

Alm, A.A. (1981). Glyphosate and 2,4-D application over red pine seedlings with hand-held equipment. St-Paul, School of Forestry, University of Minnesota, Minnesota Forestry Research Notes No 276.

Amand, J. et Jacobsen, O.S. (2001). Sorption and degradation of glyphosate and dichlobenil in fractured clay. *BCPC Symposium Preceedings n° 78: Pesticide Behaviour in Soil and Water*. 55: 205-210.

Anderson, T.H. et Domsch, K.H. (1990). Application of eco-physiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology & Biochemistry* 22 : 251-255.

Anhalt, J.P et Fenselau, C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 47:219–225.

Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q.M., Khalid, Z.M. et Iqbal, S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinolby *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*. 168: 400–405.

- Araujo, A.S.F., Monteiro, R.T.R. et Abarkeli, R.B. (2005). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*. 52 : 799–804.
- Azevedo, J.L. et Araujo, W.L. (2003). Genetically modified crops: environmental and human health concerns. *Mutation Research*. 544: 223–233.
- Balthazor, T.M. et Hallas, L.E. (1986). Glyphosate Degrading Microorganisms from Industrial Activated Sludge. *Applied Environmental Microbiology*. 51: 432- 434.
- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T. et Hain, T. (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spectrometry. *Applied Environmental Microbiology*. 74:5402–5407.
- Barik, S., Wahid, P.A., Ramakrishnan, C. et Sethunathan, N. (1979). A change in degradation pathway of parathion in natural ecosystems. *Journal of Environmental Quality*. 7: 346–351.
- Barrett, K.A. et Mc Bride, M.B. (2006). Trace element mobilisation in soils by glyphosate. *Soil Science Society of America Journal*. 70: 1882- 1888.
- Barriuso, E. et Calvet, R. (1992). Soil Type and Herbicides Adsorption. *Environmental Analytical Chemistry*. 46: 117-128.
- Beigel, C., Charnay, M-P. et Barriuso, E. (1999). Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology Biochemistry*. 31: 525-534.
- Bending, G.D., Friloux, M. Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*. 212: 59–63.
- Benoit, P. (1994). Rôle de la nature des matières organiques dans la stabilisation des résidus de polluants organiques dans les sols. Thèse (docteur de l’institut National Agronomique Paris-Grignon). Chapitre 1 (p 209).
- Bentley, R. (1990). The Shikimate pathway- a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 25: 307–384.
- Bhadbhade, B.J., Dhakephalkar, P.K., Sarnik, S.S. et Kanekar, P.P. (2002a) Plasmid-associated biodegradation of an organophosphorus pesticide, monocrotophos, by *Pseudomonas mendocina*. *Biotechnological Letter*. 24: 647–650.
- Bhadbhade, B.J., Sarnik, S.S. et Kanekar, P.P. (2002b). Biomineralization of an organophosphorus pesticide, monocrotophos, by soil bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 224–234.
- Bochner, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 33: 191 –205.
- Bochner, B. R., Gadzinski, P. et Panomitros, E. (2001). Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research*. 11: 1246-1255.

- Bollag, J.M. (1983). Cross-coupling of humus constituents and xenobiotic substances, pp. 127-141. In *Aquatic and terrestrial humic materials*. Russel, F.C. et Gjessing, E.T. Eds., Ann Arbor Science Publishers.
- Bollag, J.M. et Loll, M.J. (1983). Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia* 39: 1221-1231.
- Bollag, J.M. et Lui, S.Y. (1990). Biological transformation processes of pesticides, pp. 169-203. In *Pesticides in soil environment : processes, impacts, and modelling*. Cheng, H.H. Ed., Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Bumpus, J.A., Kakkar, S.N. et Coleman, R.D. (1993). Fungal degradation of organophosphorus insecticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 39/40: 715–726.
- Burchill, S., Hayes, M.H.B. et Greenland, D.J. (1981). Adsorption of organic molecules, pp. 221-401. In *the chemistry of soil processes*. Greenland, D.J., Hayes, M.H.B. Eds., John Wiley et Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J. et Powers, R.F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 1777–1789.
- Buyanosky, G.A., Kremer, R.J., Gajda, A.M. et Kazemi, H.V. (1995). Effect of corn plants and rhizosphere populations on pesticide degradation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 55: 689-696.
- Calvet, R. (1989). Adsorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*. 38: 45-177.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, P., Benoit, P., Charnay, M.P. et Coquet, P. (2005). *Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales*, France agricole, Paris.
- Calvet, R., Terce, M. et Arvieu, J.C. (1980). Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants. I- Description du phénomène d'adsorption. *Annales Agronomiques*. 31: 33-62.
- Camara, J.E. et Hays, F.A. (2007). Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 1633–1638.
- Campbell, R. (1977). Roundup^{MD} potential in canadian forestry. Roundup^{MD} forestry Seminar, Seattle, Washington, Monsanto Co.p. 6-7.
- Carlisle, S.M. et Trevors, J.T. (1988). Glyphosate in the Environment. *Water, Air and Soil Pollution*. 39: 409-420.
- Carlisle, S.M. et Trevors, J.T. (1986). Effect of the herbicide glyphosate on nitrification, denitrification, and acetylene reduction in soil. *Water, Air and Soil Pollution*. 29: 189–203
- Carlisle, S.M. et Trevors, J.T. (1988). Glyphosate in the environment. *Water, Air, Soil Pollution*. 39: 409–420.

- Carluer, N. (1998). Limitation du transfert par ruissellement vers les eaux superficielles de deux herbicides (isoproturon et fliflufénicanil). Méthodologie analytique et étude de l'efficacité des bandes enherbées. Thèse (Docteur de l'Université Joseph-Fourier Grenoble).
- Carsel, R.F. (1989). Hydrolytic processes affecting the movement of organic chemicals in soils, pp. 439-447. In Reaction and movement of organic chemicals in soils. Sawhney, B.L. et Brown, K. Eds., Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, USA.
- Chafik, N. (2002). Contribution à l'étude du comportement de l'herbicide triflurosulfuron méthyle dans le sol et dans les milieux aquatiques : étude de la photodégradation en milieux aqueux. Préparation et étude de nouvelles formulations à libération contrôlée. Thèse (docteur de l'université HASSAN II Maroc). Chapitre 2 (p 10-31).
- Charnay, N.P., Tarabelli, L., Beigel, C. et Barriuso, E. (2000). Modifications of soil microbial activity and triticonazole biodegradation by pesticide formulation additives. *Journal of Environmental Quality*. 29: 1618-1624.
- Chaudry, G.R., Ali, A.N. et Wheeler, W.B. (1988). Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 288-293.
- Chaussod, R., Nicolardot, B. et Catroux, G. (1986). Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol*. 2 : 201-211.
- Cheah, U., Kirkwood, R. et Lum, K. (1998). Degradation of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 1217-1223.
- Chenu, C. et Stotzky, G. (2002). Interaction between microorganisms and soil particles: an overview, pp. 3-41. In Interactions between soil particles and microorganisms, Huang, P.M., Bollag, J.M. et Senesi, M. Eds., Vol. 8, IUPAD Series on analytical and physical chemistry of environmental systems. John Wiley et Sons, Ltd, Chichester, England.
- Choquette, L. (1987). Toxicité du glyphosate sur les composantes vivantes du milieu (revue de la littérature), Québec, gouvernement du Québec, ministère de l'Énergie et des Ressources, Direction de la conservation, Service des études environnementales, 64 p.
- Cilia, V., Lafay, B. et Christen, R. (1995). Sequence heterogeneities exist among the 16S RNAr sequences of the seven operons in *E.coli* strain PK3 that can affect phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 451-461.
- Cole, D.J. (1985). Mode of action of glyphosate-a literature analysis, pp. 48-74. In Grossbard, E., Atkinson, D. Eds., *The Herbicide Glyphosate*. Butterworths, London.
- Conway, G.C., Smole, S.C., Sarracino, D.A., Arbeit, R.D. et Leopold, P.E. (2001). Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3:103-112.
- Cook, A.M., Daughton, C.G. et Alexander, M. (1978). Phosphonate utilization by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 133: 85-90.

- Coulibaly, H. (2005). Le SCV (Semis direct sous Couverture Végétale), un élément stratégique de gestion durable des terres agricoles : une expérience française comme base de réflexion pour le Mali. Mémoire (DEPA. France). Chapitre 2 (p13-20).
- Csrjsei, A.J. et Johnson, E.J. (1972). Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 18: 45-49.
- CTQ (Centre de Toxicologie du Québec). (1988). Étude de l'exposition professionnelle des travailleurs forestiers exposés au glyphosate : rapport final, Sainte-Foy, Centre hospitalier de l'Université Laval pour gouvernement du Québec, ministère de l'Énergie et des Ressources, Direction de la conservation, Service des études environnementales, 79 p., annexes.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. et Scannell, J.W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:10494-10499.
- Dalton, H. et Stirling, J.M. (1988). Microbial release and degradation of catechol and chlorophenols of London. *Biological Science*. 297: 481-496.
- Dauga, C. (2002). Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 531-547.
- Daughton, C.G. et Hsieh, D.P. (1977). Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. *Applied Environmental Microbiology*. 34: 175-184.
- De Jong, H., De Jonge, L.W., Jacobsen, O.H., Yamaguchi, T. et Moldrup, P. (2001). Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. *Soil Science*. 166 : 230-238.
- De Jonge, H. et De Jonge, L.W. (1999). Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere*. 39: 753-763.
- Dec, J., Bollag, J.M., Huang, P.M. et Senesi, M. (2002). Impact of interactions between microorganisms and soil colloids on the transformation of organic pollutants, pp. 323-379. In *Interactions between soil particles and microorganisms*. Huang, P.M., Bollag, J.M. et Senesi, M. Eds., Vol. 8, IUPAD Series on analytical and physical chemistry of environmental systems. John Wiley et Sons, Ltd, Chichester, England.
- Desaint, S., Arrault, S., Siblot, S. et Fournier, J.C. (2003). Genetic transfer of *mcd* gene in soil. *Journal of Applied Microbiology*. 95:102-108.
- Desbordes, A. (2000). La pollution des eaux souterraines en Picardie. Mémoire. Maîtrise B6, Faculté des Sciences, Amiens, 50 p. +annexes.
- Devault, D. (2007). Approche spatio-temporelle de la contamination par les herbicides de prélevée du biotope de la Garonne Moyenne. Thèse (Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse). Chapitre 1 (p 15).
- Devez, A. (2004). Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Thèse (docteur de L'ENGREF, Centre de Montpellier). Chapitre 1 (p 2-4).

- Devillers, J., Farret, R., Girardin, P., Rivière, J.L. et Soulas, G. (2005). Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides, Lavoisier, Paris.
- Doliner, L.H. (1991). Emploi avant récolte du glyphosate (Roundup MD), Document de travail, Agriculture Canada, Direction des pesticides. 107 p.
- Dragun, J., Kuffner, A.C. et Schneider, R.W. (1984). Groundwater contamination. 1. Transport and transformation of organic chemicals. *Chemical Engineering*. 91: 65–70.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. et Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 51: 925–932.
- Eberbach, P. (1998). Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) in four soils. *Pesticide Science*. 52: 229–240.
- Eberbach, P.L. et Douglas, L.A. (1991). Method for the determination of glyphosate and Aminomethyl phosphonic acid in soil using Electron Capture Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 39: 1776-17801.
- Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J. et Gordon, D.B. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. 49:295–300.
- EPA (1995). Review of chlorpyrifos poisoning data. US EPA 1–46.
- EPA (2004) <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets>.
- Ernst, W.R., Morash, R. Freedman, W. Fletcher, K. Julien, G. et Hennigar, P. (1987). Measurement of the environmental effects associated with forestry use of Roundup^{MD}. *Environmental Protection*. 45: 8- 87.
- Ertli, T., Marton, A. et Földényi, R. (2004). Effect of pH and the role of organic matter in the adsorption of isoproturon on soils. *Chemosphere*. 57 : 771-779.
- Evans, D.D. et Batty, M.J. (1986). Effects of high dietary concentrations of glyphosate (Roundup^{MD}) on a Species of Bird, Marsupial and Rodent Indigenous to Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 5: 399-401.
- Everett, K.D. et Dickerson, H.W. (2003). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Tetrahymena thermophila* tolerate glyphosate but not commercial herbicidal formulation. . *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 70: 731- 738.
- Fdil, F. (2004). Etude de la dégradation des herbicides chlorophénoxyalcanoïques par des procédés photochimique et électrochimique. Applications environnementales. Thèse (Docteur de l'Université de Marne-La-Vallée). Chapitre 1 (p 8-25).
- Fenselau, C. et Demirev, P.A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 20:157–171.

- Flogeac, K. (2004). Etude de la capacité de rétention de produits phytosanitaire par deux solides modèles des sols. Influence de la présence des cations métalliques. Thèse (docteur de l'université de Reims Champagne-Ardenne). Chapitre 1 (p10-20).
- Folmar, L.C., Sanders, H.O. et A.M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulation to fish and aquatic invertebrates. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 8: 269-278.
- Forlani, G., Mangiagalli, A., Nielsen, E. et Suardi, C.M., (1999). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. Soil Biology & Biochemistry. 31: 991-997.
- Forsman, M., Sandstrom, G. et Sjostedt, A. (1994). Analysis of the 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strain and utilization for determination of strain by PCR. International Journal of Systematic Bacteriology. 44: 38- 46.
- Fournier, J.C. (1996a). Accelerated biodegradation of pesticides, pp 146-152. In pesticides, soil microbiology and soil quality. Anderson et al., Eds., Meeting at Beaune, France. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Bruxelles, Belgique.
- Fournier, J.C. (1996b). Microbial aspects of soil pesticide degradation in surface soil, pp. 78-87. In Pesticides, Soil microbiology and soil quality. Anderson et al., Eds., Meeting at Beaune, France. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Bruxelles, Belgique.
- Fournier, J.C., Soulas, G. et Parekh, N.R. (1997). Modeling of biodegradation of pesticides in the soil, pp. 85-117. In Soil écotoxicologie. Tarradellas, J., Bitton, G. et Rossel, D. Eds., Lewis Publishers Boca Raton, USA.
- Fox, G.C., Wisotzkey, J.D. et Jurtschuk, P. (1992). How close is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic Bacteriology. 42 : 166-170.
- Franz, J.E., Mao, M.K. et Sikorski, J.A. (1997). Glyphosate, A Unique Global Herbicide, American Chemical Society, Washington, DC, 653 pp
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M. et Balkwill, D.L. (2004). Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, washington state. Applied Environmental Microbiology. 70: 4230-4241.
- Freng, J.C et Thompson, D.G. (1990). Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed.2. Persistence in foliage and soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38: 1118-1125.
- Furukawa, K. (2003). 'Super bugs' for bioremediation. Trends Biotechnology. 21: 187-190.
- Gaillardon, P. et Sabar, M. (1994). Changes in the concentration of isoproturon and its degradation products in soil and soil solution during incubation at two temperatures. Weed Research. 34: 243-251.
- Gariido, F.A., Martinez, V.J.L., Lopez, T. et Cortes, A.S. (2004). Martinez Salvador I. Journal of Chromatography. 1048 : 199-206.

- Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*. 5: 497-526.
- Gendrault-Derveaux, S. (2004). Etude d'un traitement combiné bio-physico-chimique pour la décontamination des eaux polluées en atrazine. Thèse (docteur d'INSA de l'université de Lyon). Chapitre 1(p 9-30).
- Gerritse, R.G., Beltran, J. et Hernandez, F. (1996). Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soils of Gnangara-Mound, Western Australia. *Australian Journal of Soil Research*. 34: 599-607.
- Getenga, Z. M. et Kengara, F. O. (2004). Mineralization of glyphosate in compost-amended soil under controlled conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 72: 266-275.
- Ghassemi M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R. et Takata, A. (1981). Environmental fates and impacts of major forest use pesticides, Washington, D.C., US Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, p. A169-A194.
- Gianfreda, L., Sannino, F. et Violane, A. (1995). Pesticide effects on the activity of free, immobilized and soil invertase. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 1201-1208.
- Giesy, J.P., Dobson, S. et Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 167: 35-120.
- Gil, Y. et Sinfort, C. (2005). Emission of pesticides to air during sprayer application : A bibliographic review. *Atmospheric Environment*. 39: 5183-5193.
- Gimsing, A.L., Borggard, O.K. et Sestoff, P. (2004). Modelling the Kinetics of the Competitive Adsorption and Desorption of Glyphosate and Gibbsite and in Soils. *Environmental Science and Technology*. 38: 1718-1722.
- Glass, R.I. (1987). Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35: 497-500.
- Goldsborough, L.G. et Brown, D.J. (1988). Effect of Glyphosate (Roundup MD formulation) on Periphytic Algal Photosynthesis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 41: 253-260.
- Gouy, V. et Gril, J.J. (2003). Diagnostic de la diffuse par les produits phytosanitaires et solutions correctives. Communication. Groupe Français des Pesticides (GFP) : Transfert des produits phytosanitaires, diagnostic de pollution et solutions correctives. Lyon, France 15-17 mai 2001. Cemagref Editions, BP 22- 92162 Antony Cedex, France.
- Greaves, M.P., Poole, N.J., Domsch, K.H., Jagnow, G. et Verstraete, W. (1980). Dans Grossbard, E., 1985.
- Grimont, P.A.D. et Grimont, F. (2005). Genus XII. Enterobacter, p. 667-668. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R. et Staley, J.T. Eds., Second Edition, Volume two, The Proteobacteria, Part B, Springer, New York, ,

- Grossbard, E. (1985). «Effects of Glyphosate on the Microflora: With Reference to the Decomposition of Treated Vegetation and Interactions With Some Plant Pathogens», p. 159-185. In *The Herbicide Glyphosate*. Grossbard, E. et Atkinson, D. Eds., Butterworths and Co. (Publishers) Ltd, Toronto.
- Grunewald, K., Schmidt, W., Unger, C. et Hanschmann, G. (2001). Behavior of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soils and water of reservoir Radeburg II catchment (Saxony/Germany). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 164: 65 – 70.
- Guha, A., Kumari, B. et Roy, M.K. (1997). Possible involvement of plasmid in degradation of malathion and chlorpyrifos by *Micrococcus* sp. *Folia Microbiologica (Praha)*. 42:574–576.
- Guimont, S. (2005). Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. Thèse (docteur de l'INPL). Chapitre 1 (p 6-14).
- Hagblom, M.M. et Bossert, I.D. (2003). Dehalogenation microbial processes and environmental applications. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Hance, R.J. (1976). Adsorption of glyphosate by soils. *Pesticides Science*. 7: 363-366.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M. et Zuberer, D.A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*. 48: 89–93.
- Harada, H. et Ishikawa, H. (1997). Phylogenetical relationship based on *groE* genes among phenotypically related *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Erwinia* species. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 43: 355– 361.
- Hasset, I.J. et Banwart, W.L. (1989). The sorption of non polar organics by soils and sediments, pp. 31-45. In *reactions and Movement of Organic Chemical in Soils*, Sawhney, B.L. et Brown, K. Eds., Vol. 22, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- Hayatsu, M., Hirano, M. et Tokuda, S. (2000). Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF1000. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1737–1740.
- Heinonen-Tanski, H. (1989). The effect of temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 21: 313–317.
- Hensley, D.L., Beuerman, D.S.N. et Carpenter, P.L. (1978). The inactivation of glyphosate by various soils and metal salts. *Weed Research*. 18: 287- 291.
- Horne, I., Sutherland, T.D., Harcourt, R.L., Russell, R.J. et Oakeshott, J.G. (2002a). Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 3371–3376.
- Horne, I., Sutherland, T.D., Oakeshott, J.G. et Russell, R.J. (2002b). Cloning and expression of the phosphotriesterase gene *hocA* from *Pseudomonas monteilli* C11. *Microbiology*. 148: 2687–2695.
- Horwarth, R.S. (1972). Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriological Reviews*. 36: 146-155.

- Hutber, G.N., Rogers, L.J. et Smith, A.J. (1979). Influence of Pesticides on the Growth of Cyanobacteria. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*. 19: 397- 402.
- Iranzo, M. Sain-Pardo, I., Boluda, R., Sanchez, J. et Mormeneo, S. (2001). The use of microorganisms in environmental remediation. *Annals of Microbiology*. 51: 135–143.
- Iversen, C., Waddington, M., On, L. S. et Forsythe, S. (2004). Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 5368–5370.
- Jacob, G.S., Gabrow, J.R., Hallas, L.E., Kimack, N.M., Kishore, G.M. et Schaefer, J. (1988). Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 2953-2958.
- Janke, S. Schamber, H. et Kunze, C. (1992). Beeinflussung der bodenbiologischen Aktivität durch Heizöl Angew. Botanik. 66: 42–45
- Kampfer, P., Ruppel, S. et Remus, R. (2005). *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*. 28:213–221.
- Karalliedde, L. et Senanayake, N. (1999). Organophosphorus insecticide poisoning. *International Federation of Clinical Chemistry*. 11: 4–9.
- Kearney, P.C. et Kellog, T. (1985). Microbial estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soil. *Chemosphere*. 10: 833-846.
- Kersanté, A., Binet, F. et Munier-Lamy, C. (2001). Rôle des lombriciens sur l'évolution et le transfert d'une molécules herbicide, l'atrazine, en sol limono-argileux, pp. 351-352. In *Produits phytosanitaires : Analyse, résidus, métabolites, écotoxicologie, modes d'actions, transferts*. 30^e Congrès du Groupe Français des pesticides. Couderchet, M., Eullafroy, P. et Vernet, G. Eds., Presses Universitaires de Reims.
- Kertesz, M.A., Cook, A.M. et Leisinger, T. (1994). Microbialmetabolism of sulfur and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiology Review*. 15: 195–215.
- Kishore, G.M. et Jacob, G.S. (1987). Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. *Journal of Biological Chemistry*. 262: 12164–12168.
- Klimek, M., Lejck, B., Kafarski, P. et Forlani, G. (2001). Metaboilism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate- utilising strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Management Science*. 57: 815–821.
- Kolpin, D.W., Barbash, J.E. et Gilliom, R.J. (1998). Occurrence of pesticides in shallow groundwater of the United States: Initial results from the National Water-Quality Assesement Program. *Environmental Science & Technology*. 32: 558-566.
- Kryuchkova, Y.V., Burygin, G.L., Gogoleva, N.E., Gogolev, Y.V., Chernyshova, M.P., Makarov, O.E., Fedorov, E.E. et Turkovskaya, O.V. (2013). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological research*. March 2013, 0944-5013.

- Krzysko-Lupicka, T. et Orlik, A. (1997). The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere*. 34: 2601–2605.
- Krzysko-Lupicka, T. et Sudol, T. (2008). Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere*. 71: 1386–1391.
- Kumar, M. et Philip, L. (2006). Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 41:81–96.
- Kumar, S., Mukerji, G. et Lal, R. (1999). Molecular aspects of pesticides degradation by micro-organisms. *Critical Review of Microbiology*. 22: 1-26.
- Lehr, S., Glassgen, W.E., Sandermann, H.J., Beese, F. et Scheunert, I. (1996). metabolism of isoproturon in soils originatin from different agricultural management systems and in cultures of isolated bacteria. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 65 : 231-243.
- Lerbs, W., Stock, M. et Parthier, B. (1990). Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes* sp. strain GL. *Archives of Microbiology*.153: 146–150.
- Li, X., Zhang, D., Chen, F., Ma, J., Dong, Y. et Zhang, L. (2004). *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 54 :2131–2136.
- Lipok, J., Dombrowska, L., Wieczorek, P. et Kafarski, P. (2003). The ability of fungi isolated from stored carrot seeds to degrade organophosphonate herbicides. *Pesticide in Air, Plant, Soil and water System* (Del Re, A.A.M., Capri, E., Padovani, L. et Trevisan, M., eds), Proceeding of the XII Symposium Pesticide Chemistry, Piacenza, Italy.
- Lipthay, J.R., Barkay, T. et Sorensen, S.J. (2001). Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil horizontal transfer of of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase FEMS. *Microbiology Ecology*. 35: 75-84.
- Liu, C.M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C. et Cannon, F.C. (1991). Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. *Applied Environmental Microbiology*. 57: 1799-1800.
- Lund-hoie, K.(1983).The influence of temperature on the phytotoxic effect of glyphosate on norway spruce. *Crop Protection*. 2: 409-416.
- MAFF/HSE (1995). Annual report of the working party on pesticide residue. HMSO.
- Malik, J., Barry, G. et Kishore, G. (1989). The herbicide glyphosate. *Biofactors*. 2: 17–25.
- Mallick, B.K., Banerji, A., Shakil, N.A. et Sethunathan, N.N. (1999). Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure culture and in soil. *Bulletin of Environmental Contamination*. 62:48-55.
- Mamy, L. (2004). Comparaison des impacts environnementaux des herbicides à large spectre et des herbicides sélectifs : caractérisation de leur devenir dans le sol et modélisation. Thèse (docteur de l’Institut National Agronomique de Paris-Grignon). Chapitre 2 (p 41-85).

- Mamy, L. et Barriuso, E. (2005). Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*. 61: 844–855
- Mann, R.M. et Bidwell, J.R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations for four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.36: 193- 199.
- Mansour, M., Schramm, K.W. et Kettrup, A. (1999). Determination of transformation products of agrochemicals in water and soil. *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics*. 1: 395-403.
- Maqueda, C., Morillo, E., Undabeytia, T. et Martin, F. (1998). Sorption of glyphosate and Cu (II) on natural humic acid complex: mutual influences. *Chemosphere*. 37: 1063-1072.
- Martinez-Murca, A.J., Benloch, S. et Collins, M.D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S rDNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42 : 412-421.
- McBride, M. et Kung, K. H. (1989). Complexation of glyphosate and related ligands with iron (III). *Soil Science Society of America Journal*. 53: 1673–1688.
- McConnell, J.S. et Hossner, L.R. (1985). pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.33: 1075-1078.
- McConnell, R., Pacheco, F, Wahlberg, K., Klein, W., Malespin, O., Magnotti, R., Akerblom, M. et Murray, D. (1999). Subclinical health effects of environmental pesticide contamination in a developing country: cholinesterase depression in children. *Environmental Research*. 81: 87–91.
- Means, N.E. (2004). Effects of glyphosate and foliar amendments on soil microorganisms in soybean. Doctoral Dissertation. University of Missouri, Columbia, 131 pp.
- Miles, C. J. et Moye, H. A. (1988). Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36: 486–491.
- Miller, G.G., Hebert, V.R. et Miller, W.W. (1989). Effect of sunlight on organic contaminants at the atmosphere soil interface, pp. 99-111. In *Reactions and Movement of Organic Chemical in Soils*. Sawhney, B.L. et Brown, K. Eds., Vol. 22, American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- Mitchell, D.G., Chapman, P.M. et Long, T.J. (1987). Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 39: 1028- 1035.
- Mollet, C., Drancourt, M. et Raoult, D. (1997). rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology*. 26: 1005–1011.
- Moneke, A.N., Okpala, G.N. et Anyanwu, C.U. (2010). Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *African Journal of Biotechnology*. 9:4067-4074.

- Moore, I.K., Braymer, H.D. et Larson, A.D. (1983). Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilises the phosphonate herbicide glyphosate. *Applied Environmental Microbiology*. 46: 316–320.
- Moorman, T.B. (1994). Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological and management effects. *Advances in Soil Sciences*. 33:21–165.
- Morillo, E., Undabeytia, C., Maqueda, C. et Ramos, A. (2000). Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. *Chemosphere*. 40: 103–107.
- Morillo, E., Undabeytia, T. et Maqueda, C. (1997). Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu(II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environmental Science and Technology*. 31: 3588-3592.
- Mortland, M.M. (1970). Clay organic complexes and interactions, pp 75-120. In *advances in agronomy*. Brady, N.C. Ed., vol. 22, Academic Press, New York, USA.
- Moshier, L.J. et Penner, D. (1978). Factors influencing microbial degradation of 14 C glyphosate to 14 C CO₂ in soil. *Weed Science*. 26: 686–691.
- Mouchet, J. (1994). Le DDT en santé publique, pp. 257-262. In *La lutte antivectorielle. Santé : Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones, Vol.4, La Lutte Antivectorielle: Atelier, Genève (CHE)*.
- Mudd, P.J., Hance, R.J. et Wright, S.J.L. (1983). the persistence and metabolism of isoproturon in soil. *Weed Research*. 23:239-246.
- Mulbry, W.W. (1992). The aryldialkylphosphatase-encoding gene *adpB* from *Nocardia* sp. strain B-1: cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Gene*. 121: 149–153.
- Mulbry, W.W. (2000). Characterization of a novel organophosphorus hydrolase from *Nocardioides simplex* NRRL B-24074. *Microbiological Research*. 154: 285–288.
- Mulchandani, A., Kaneva, I. et Chen, W. (1999). Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*. 63: 216–223.
- Muller, M.M., Rosenberg, C., Siltanen, H. et Wartiovaara, T. (1981). Fate of glyphosate and its influence on nitrogen-cycling in two Finnish agricultural soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 27: 724–730.
- National Consumer Council (1998). *Farm Policies and Our Food: The Need for Change*. PD 11/B2/98. London.
- Nelson, M.L., Yaron, B. et Nye, P.H. (1982). Biologically induced hydrolysis of parathion in soil: kinetics and modelling. *Soil Biology and Biochemistry*. 14: 223–228.
- Nemeth-Konda, L., Fuleky, G., Morovjan, G. et Cookan, P. (2002). Sorption behavior of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil. *Chemosphere*. 48: 542-552.
- NF ISO 10390 - Qualité du sol - Dosage de du pH du sol.

- Nhung, P.H., Kiyofumi Ohkusu, K., Mishima, N., Noda, M., Shah, M.M., Sun, X., Hayashi, M. et Ezaki, T. (2007). Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58: 153–161
- Nicholls, P.H. et Evans, A.A. (1991). Sorption of ionisable organic compounds by field soil. Part 2: cation, bases and zwitterions. *Pesticide Science*. 33: 331-345.
- Nomura, N. S. et Hilton, H. W. (1977). The absorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. *Weed Research*. 17:113-121.
- Obojska, A., Ternana, N.G., Lejczak, B., Kafarski, P. et McMullan, P. (2002). Organophosphate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 2081–2084.
- Ohshiro, K., Kakuta, T., Sakai, T., Hidenori, H., Hoshino, T. et Uchiyama, T. (1996). Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacterial isolated from turf green soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82: 299–305.
- Olson, B.M. et Lindwall, C.W. (1991). Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effects of 2,4- D and glyphosate. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 1071–1075.
- Omar, S.A. (1998). Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation*. 9: 327–336.
- Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Be' langer, S.D., Martel, E.A., Boudreau, D.K., Picard, F.J., Ouellette, M., Roy, P.H. et Bergeron, M.G. (2005). Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase b-subunit. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 55:2013–2025.
- Peng, R.H., Tian, Y.S., Xiong, A.S., Zhao, W., Fu, X.Y., Han, H.J., Chen, C., Jin, X.F. et Yao, Q.H. (2012). A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Rahnella aquatilis* with significantly reduced glyphosate sensitivity. *Biochemistry*. 35: 4199-210.
- Perkovich, B.S., Anderson, T.A., Kruger, E.L. et Coats, J.R. (1996). Enhanced mineralization of C¹⁴ atrazine in *Kochia scoparia* rhizospheric soil from a pesticide contaminated site. *Pesticide Science*. 46: 391-396.
- Pesticide Manuel. (1995). 10th. Ed. C. Tomlin, Ed., Crop Protection Publication, British Crop Protection Council, The Royal Society of Chemistry, London, UK.
- Piccolo, A. et Celano, G. (1994). Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13 : 1737-1741.
- Piccolo, A., Celano, G. et Conte, P. (1996). Adsorption of glyphosate by humic substances. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44: 2442-2446.
- Piccolo, A., Celano, G., Arlenzo, M. et Mirabella, A. (1994). Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *Journal of Environmental Science and Health B*. 29: 1105–1115.

- Pike, R. et Amrhein, N. (1988). Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilises the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 2868–2870.
- Pipke, R., Schulz, A. et Amrhein, N. (1987). Uptake of Glyphosate by an *Arthrobacter* sp. *Applied Environmental Microbiology*. 53: 974-978.
- Post. (1998) Organophosphate (Post note 12). Parliamentary Office of science and Technology, London, UK.
- Pothuluri, J.V., Chung, Y.C. et Xiong, Y. (1998). Biotransformation of 6-nitrochrysene. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 3106–3109.
- Pothuluri, J.V., Heflich, R.H., Fu, P.P. et Cerniglia, C.E. (1992). Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 937–941.
- Puitti, S., Hallet, S., Rousseaux, S., Philippot, L., Soulas, G. et Martin-Laurent, F. (2002). Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils*. 36: 434-441.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M. et Dick, R.E. (1988). Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29: 511–516.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M. et Dick, R.E. (1989). Carbon-phosphorus bond cleavage by gram-positive and gram-negative soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 283–287.
- Quiquampoix, H. (2000). Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extra cellular enzyme activity in soil, pp. 171-206. In *Soil biochemistry*. Bollag, J.M. et Stotsky, Eds., Vol. 10, Marcel Dekker, Inc New York, USA.
- Quiquampoix, H., Abadie, M.H., Baron, F., Leprince, P.T., Matumoto-Pinto, k., Ratcliffe, R.G. et Staunton, S. (1995). Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces, pp. 321-333. In *Proteins at interfaces II*. Horbett, T.A. et Brash, J.L. Eds., American Chemical Society, Symposium series, Washington, DC.
- Quiquampoix, H., Staunton, S., Baron, M.H. et Ratcliffe, R.G. (1993). Interpretation of the pH dependence of proteins adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extra cellular enzyme activity in soil. *Colloids surfaces A. Physiochemico Engineering Aspects*. 75: 85-93.
- Rangaswamy, V. et Venkateswaralu, K. (1992). Degradation of selected insecticides by bacteria isolated from soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 49: 797–804.
- Rani, N.L. et Lalitha-kumari, D. (1994). Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology*. 4: 1000–1004.
- Ratcliff, A.W., Busse M.D. et Shestak, C.J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*. 31:114–124.

- Reddy, K.N., Hoagland, R.E. et Zablutowicz, R.M. (2000). Effect of glyphosate on growth, chlorophyll content and nodulation in glyphosate-resistant soybean (*Glycine max*) varieties. *Journal of New Seeds*. 2: 37–52.
- Remde, A. et Traunspurger, W. (1994). A method to assess the toxicity of pollutants on anaerobic microbial degradation activity in sediments. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 9: 293-298.
- Rosenberg, A. et Alexander, M. (1979). Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. *Applied Environmental Microbiology*. 37: 886–891.
- Roslychy, E.B. (1982). Glyphosate and the response of the soil microbiota. *Soil Biology and Biochemistry*. 14: 87-92.
- Rouse, J.D., Sabatini, D.A., Suflita, J.M. et Harwall, J.H. (1994). Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Critical Review of Environmental Science and Technology*. 24: 325-370.
- Roux, V. et Raoult, D. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Research in Microbiology*. 146: 385-396.
- Ruepple, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J. et Marvel, J.T. (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 25:517-528.
- Ryzhov, V., Hathout, Y. et Fenselau, C. (2000). Rapid characterization of spores of *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry. *Applied Environmental Microbiology*. 66:3828–3834.
- Sanchez-Camazano, M., Arienzo, M., Sanchez-Martin, M.J. et Crisanto, T. (1995). Effect of different surfactants on the mobility of selected non-ionic pesticides in soil. *Chemosphere*. 31: 3793-3801.
- Santos, A. et Flores, M. (1995). Effects of Glyphosate on Nitrogen Fixation of Free-Living Heterotrophic Bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 20: 349- 352.
- Schepens, G.R. (1978). Glyphosate : A potent herbicide and brushkiller which solves most problems in forestry. *Proceedings, Roundup^{MD} Seminar, Madrid*, p. 152-169.
- Schiavon, M. (1988). Studies of leaching of atrazine, of its chlorinated derivatives, and hydroxyatrazine from soil using ¹⁴C ring-labeled compounds under outdoor conditions. *Ecotox. Environmental Safety*. 15 : 46-54.
- Schiavon, M., Jacquin, F. et Goussault, C. (1978). Blocage de molécules s-triaziniques par la matière organiques. *IAEA-SM*. 78: 327-332.
- Schieweck, A., Delius, W., Siwinski, N., Vogtenath, W., Genning, C. et Salthammer, T. (2007). Occurrence of organic and inorganic biocides in the museum environment. *Atmospheric Environment*. 41: 3266-3275.
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. et Margesin, R. (1996). *Methods in Soil Biology*. Springer, Heidelberg.

Schwarzenbach, R.P., Gschend, P.M et Imboden, D.M. (2003). Environmental organic chemistry. John Wiley et Sons, New York, Chichester, Toronto, Singapore.

Semple, K.T. Reid, B.J. et Fermor, T.R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*.112: 269-283.

Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La, S.B., Fournier, P.E., Rolain, J.M. et Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinic Infection Disease*. 49: 543-551.

Serdar, C.M., Gibson, D.T., Munnecke, D.M. et Lancaster, J.H. (1982). Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 246–249.

Servizi, J.A., Gordon, R.W. et Martens, D.W. (1987). Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia* and trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 39: 15-22.

Sethunathan, N. et Yoshida, T. (1973). A Flavobacterium that degrades diazinon and parathion. *Canadian Journal of Microbiology*. 19: 873–875.

Sharmila, M., Ramanand, K. et Sethunathan, N. (1989). Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 1105–1110.

Sheals, J., Sjobergs, S. et Persson, P. (2002). Adsorption of glyphosate on goethite: Molecular characterization of surface complexes. *Environmental Science and Technology*. 36: 3090- 3095.

Shinabarger, D. L. et Braymer. H. D. (1986). Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. *Journal of Bacteriology*. 168:702-707.

Shushkova, T.V., Ermakova, I.T., Sviridov, A.V., Leontievsky, A.A. (2012). Biodegradation of glyphosate by soil bacteria: Optimization of cultivation and the method for active biomass storage. *Microbiology*. 81: 44-50.

Siddaramappa, R., Rajaram, K.P. et Sethunathan, N.N. (1973). Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Applied Microbiology*. 26: 846–849.

Singh, B.K. et Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Review*. 30: 428–471

Singh, B.K., Kuhad, R.C., Singh, A., Lal, R. et Tripathi, K.K. (1999). Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*.19: 197–225.

Singh, B.K., Walker, A. et Grayston, J. (2003a). Degradation of chlorpyrifos and its effects on the soil biota. Pesticide in Air, Plant, Soil and Water System. In: Del Re AAM, Capri E, Padovani L, Trevisan M (Eds), *Proceeding of the XII Symposium Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy.

- Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W. et Wright, D.J. (2003b). Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. *Applied Environmental Microbiology*. 69:7035–7043.
- Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W. et Wright, D.J. (2003c). Effect of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5198–5206.
- Singh, BK., Walker, A., Morgan, J.A.W. et Wright, D.J. (2004). Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in the bioremediation of contaminated soils. *Applied Environmental Microbiology*.70: 4855–4863.
- Singh, S. et Singh, D.K. (2003). Utilization of monocrotophos as phosphorus source by *Pseudomonas aeruginosa* F10B and *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* SBL 11. *Canadian Journal of Microbiology*. 49: 101–109.
- Smith, E. A. et Oehme, F.W. (1992). The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Veterinary & Human Toxicology*. 34: 531-345.
- Sogorb, M. A., Vilanova, E. et Carrera, V. (2004). Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicology Letter*. 151: 219–233
- Solomon, K.R. et Thompson, D.G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B*. 6: 289- 324.
- Somara, S. et Siddavattam, D. (1995). Plasmid mediated organophosphate pesticide degradation by *Flavobacterium balustinum*. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 627–631.
- Song, H.G. et Bartha, R. (1990). Effects of jet fuel on the microbial community of soil. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 646–651
- Sprankle, P., Meggitt, W.F. et Penner, D. (1975a). Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science*. 23: 224–228.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F. et Penner, D. (1975b). Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*. 23: 229–234.
- Stenrod, M., Charnay, M.P. Benoit, P., Eklo, O.M. et Barriuso, E. (2003). Degradation of glyphosate in sandy soils as affected by temperature and soil characteristics. Les 2 èmes Rencontres de l'INRA, 4 Avril 2004. 1-2.
- Stephan, R., Van Trappen, S., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., De Vos, P. et Lehner, A. (2007). *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 57:820–826.
- Stotzky, G. (1986). Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion and ecology of microbes and viruses, pp. 305-428. In *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*. Huang, P.M. et Schnitzer, M. Eds., Vol. 17, Soil Science Society of America, Madison, USA.

- Stratton, G.W. et Stewart, K.E. (1992). Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 17: 223–236.
- Subramaniam, V. et Hoggard, P.E. (1988). Metal complexes of glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36: 1326–1329.
- Sullivan, D.S., Sullivan, T.P. et Bisalputra, T. (1981). Effects of Roundup MD herbicide on ciatom populations in the aquatic environment of coastal forest. *Environmental Contamination and Toxicology*. 26: 91-96.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., et Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Tang, M. et You, M. (2011). Isolation, identification and characterization of a novel triazophos-degrading *Bacillus* sp. (TAP-1). *Microbial Research*. 167:299–305.
- Thiollet-Scholtus, M. (2004). Construction d'un indicateur de qualité des eaux de surface vis-à-vis des produits phytosanitaires à l'échelle du bassin versant viticole. Thèse (docteur de l'INPL). Chapitre 1 (p 13-20).
- Tissut, M., Philippe, Delval, P., Mamarot, J. et Ravanel, P. (2006). Plantes, herbicides et désherbage. *Acta*, 635pp.
- Tixier, C., Sancelme, M., Ait-Aissa, S., Widehem, P., Bonnemoy, F., Cuer, A., Truffaut, N. et Veschamber, H. (2002). Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthobacter* sp. N2 : structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere*. 46: 519-526.
- Tolbot, H.W., Johnson, L.M. et Munneck, D.M. (1984). Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. isolated from environmental sources. *Current Microbiology*. 10: 255–259.
- Tooby, T.E. (1985). Fate and biological consequences of Glyphosate in the aquatic environment, pp. 206-217. In *The Herbicide Glyphosate*. Grossbard, E. et Atkinson, D. Eds., Butterworths and Co. (Publishers) Ltd, Toronto.
- Torstensson, N. T. L. et Hamisepp, A. (1977). Detoxification of glyphosate in soil. *Weed Research*. 17: 209-212.
- Trotter, D.M., Wong, M.P. et Kent, R.A. (1990). Recommandations sur la qualité de l'eau pour le glyphosate au Canada, Ottawa, Environnement Canada, Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Étude n°170, série scientifique, 36 p.
- Tsui, M.T.K. et Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 52: 1189–1197
- Tweedy, B.G., Loeppky, C. et Ross, A. (1970). Metobromuron: acetylation of the aniline moiety as a detoxification mechanism. *Science*. 168: 482-483.
- UIPP « Union des Industrie de la Protection des Plantes ». (2007). <http://www.uipp.org/repere/chiffre.php>

- USDA (US Department of Agriculture). (1988). Vegetation management in the appalachian mountains, Draft Environmental Impact Statement, Appendices: Volume II, Forest Service, Southern Region, Management Bulletin, R8-MB24.
- USDA (US Department of Agriculture). (1989). Vegetation management in the Ozark/Ouachita mountains, Draft Environmental Impact Statement, Appendices, Volume II, Forest Service, Southern Region, Management Bulletin R8-MB23.
- Van Beelen, P.V. et Doelman, P. (1997). Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere*. 34: 455–499
- Van der Mee, J.R., De Vos, W.M., Harayma, S. et Zehnder, J.B.A. (1992). Molecular mechanism of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology Review*. 56 : 670-694.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lykleme, J., Norde, W. et Zehnder, A.J.B. (1990). Influences of interfaces on microbial activity. *Microbiological Review*. 54: 75-87.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M. et Wade, W.G. (2010). Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 309:1-7.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Marcos, M.L.F. et Alvarez, E. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment*. 271: 135- 144.
- Vitousek, P.M. et Howarth, R.W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur. *Biogeochemistry*. 13: 87-115.
- Wacket, L.P., Shames, S.L., Venditti, C.P. et Walsh, C.T. (1987). Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *Journal of Bacteriology*. 169: 710–717.
- Walker, A., Moon, Y.H. et Welch, S.J. (1992). Influence of temperature, soil moisture and soil characteristics on the persistence of alachlor. *Pesticide Science*. 35:109–116.
- Wardle, D.A. (1995). Impacts of disturbance on detritus food webs in agroecosystems of contrasting tillage and weed management practices. *Advances in Ecological Research*. 26: 105–185.
- Wardle, D.A. et Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil*. 122: 21–28.
- Wardle, D.A. et Parkinson, D. (1992). The influence of the herbicide glyphosate on interspecific interactions between four fungal species. *Mycology Research*. 96: 180–186.
- Weaver, M.A., Krutz, L.J., Zablotowicz, R.M. et Reddy, K.N. (2007). Effect of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Management Science*. 63: 388–393.
- Weber, J.B. et Miller, C.T. (1989). Organic chemical movement over and through soil, pp. 305- 335. In *Reactions and Movement of Organic Chemical in Soils*. Sawhney, B.L. et Brown, K. Eds., Vol. 22, Soil Society of America, Madison, USA.

- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, et D.J. Lane. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173:697-703.
- Welker, W.V. et Rieher, D. (1983). Control of spatterdock as influenced by time of glyphosate treatment. *Journal of Aquatic Plant Management*. 21:104-105.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. et Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 6578-6583.
- Williams, G.M., Kroes, R. et Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31: 117-165.
- Wiren-Lehr, S., Komoba, D. et Glabgen, W.E. (1997). Mineralization of [14 C] glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems. *Pesticide Science*. 51: 436-442.
- Worthing, C.R. et Hance, R.J. (2000). *Electronic Pesticid Manual*. Eleventh edition, British Crop Protection Council, (London).
- Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N.N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M. et Tindall, B.J. (2009). A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*. 462:1056-1060.
- Yates, W.E., Akesson, N.B. et Bayer, D.E. (1978). Drift of glyphosate sprays applied with aerial and ground equipment. *Weed Science*. 26: 597-604.
- Yu, Y. et Zhou, Q.X. (2004) Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils. *Chemosphere*. 58: 811-816.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L. et Gomez, M.A. (2008). An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied and Soil Ecology*. 40: 1-12.
- Zboinska, E., Lejczak, B. et Kafarski, P. (1992). Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2993-2999.
- Zhongli, C., Shunpeng, L. et Guoping, F. (2001). Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 4922-4925.
- Zhou, D.M., Wang, Y.J., Cang, L., Hao, X.Z. et Luo, X.S. (2004). Adsorption and desorption of cadmium and glyphosate on two soils different characteristics. *Chemosphere*. 57: 1237-1244.

Annexes

Annexe 1 : Produits et milieux de cultures

1. L'herbicide glyphosate

Le glyphosate a été acheté sous sa forme commerciale liquide Roundup® (Monsanto) dans un magasin de produits agricoles situé à la commune d'El-Khroub, Constantine. L'herbicide est conditionné dans un flacon de 1l contenant 450 g de glyphosate, sous forme de sel d'isopropylamine.

2. Milieu Plat Count Agar (PCA)

Pour la culture des bactéries dégradant le glyphosate. Sa composition en grammes par litre d'eau distillée, pH (7,0- 7,2) est: Peptone (5), Extrait de levure (2,5), Glucose (1), Agar (15).

3. Milieu minéral minimum 1 (MMM1)

Pour l'isolement des bactéries utilisant le glyphosate comme seule source de carbone et d'énergie. Sa composition en grammes par litre d'eau distillée, pH (7,0- 7,2) est: KH_2PO_4 (1,5), Na_2HPO_4 (0,6), NaCl (0,5), NH_4SO_4 (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (,2), CaCl_2 (0,01) et $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001)

4. Milieu minéral minimum 2 (MMM2)

Pour l'isolement des bactéries utilisant le glyphosate comme seule source de phosphore. Sa composition en grammes par litre d'eau distillée, pH (7,0 to 7,2): Tampon tris (12), Glucose (10), NaCl (0,5), KCl (0,5) NH_4SO_4 (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2) CaCl_2 (0,01) et $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001).

5. Gélose Columbia au sang

Pour la culture et la purification des colonies, le milieu est additionné de 5% de sang de mouton, c'est un milieu prêt à emploi commercialisé par Biomérieux, France. Sa composition en grammes par litre d'eau distillée, pH (7,0- 7,2): Polypeptone (17), Peptone pancréatique de cœur (3), Extrait autolytique de levure (3), Amidon de maïs (1), Chlorure de sodium (5), Colistine (10), Acide nalidixique (15), Agar agar bactériologique (14).

6. Milieu Muller-Hinton 2 (MH2)

Le milieu MH2 est utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme standard des différents isolats, c'est un milieu prêt à emploi commercialisé par Biomérieux, France. Sa composition en grammes par litre d'eau distillée pH (7,4) est : Peptone de caséine (17,5), Amidon de maïs (1,5), Agar (17), Infusion de viande de bœuf (300 ml).

7. Milieu Sabouraud

Pour le dénombrement des champignons. Sa composition par gramme par litre d'eau distillée pH (7,0-7,2) est: Peptone (10), Glucose (40), Agar (15).

8. Milieu Olson

Pour le dénombrement des actinomycètes. Sa composition par gramme par litre d'eau distillée pH (7,0, 7,2): Sodium Caseinate (2), Asparagine (0,1), Sodium Propionate (4), K_2HPO_4 (0,5), $MgSO_4$ (0,1), $FeSO_4$ (0.001), Agar (15), glycérol après stérilisation (5mL).

Annexe 2 : Tableaux complémentaires

Tableau complémentaire 1. Réactions biochimiques des souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. dans les MicroPlaques™ PM1, PM2A du Biolog après 48 heures. (+) croissance ; (-) pas de croissance.

Plate	Location	Chemical	Nature of substrate	<i>E. biskrae</i> sp.nov.	<i>E. zibanae</i> sp.nov.
PM01	A02	L-Arabinose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	A03	N-Acetyl-D-Glucosamine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	A04	D-Saccharic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	A05	Succinic acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	A06	D-Galactose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	A07	L-Aspartic acid	C-Source, amino acid	-	+
PM01	A08	L-Proline	C-Source, amino acid	+	+
PM01	A09	D-Alanine	C-Source, amino acid	+	+
PM01	A10	D-Trehalose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	A11	D-Mannose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	A12	Dulcitol	C-Source, carbohydrate	-	+
PM01	B01	D-Serine	C-Source, amino acid	-	-
PM01	B02	D-Sorbitol	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	B03	Glycerol	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	B04	L-Fucose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM01	B05	D-Glucuronic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	B06	D-Gluconic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	B07	DL- α -Glycerol Phosphate	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	B08	D-Xylose	C-Source, carbohydrate	-	+
PM01	B09	L-Lactic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	B10	Formic acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	B11	D-Mannitol	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	B12	L-Glutamic acid	C-Source, amino acid	-	+
PM01	C01	D-Glucose-6-Phosphate	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	C02	D-Galactonic acid-g-Lactone	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	C03	DL-Malic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	C04	D-Ribose	C-Source, carbohydrate	+	+

PM01	C05	Tween 20	C-Source, fatty acid	-	+
PM01	C06	L-Rhamnose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	C07	D-Fructose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	C08	Acetic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	C09	a-D-Glucose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	C10	Maltose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	C11	D-Melibiose	C-Source, carbohydrate	+	-
PM01	C12	Thymidine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	D01	L-Asparagine	C-Source, amino acid	-	+
PM01	D02	D-Aspartic acid	C-Source, amino acid	-	-
PM01	D03	D-Glucosaminic acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	D04	1,2-Propanediol	C-Source, alcohol	-	-
PM01	D05	Tween 40	C-Source, fatty acid	-	-
PM01	D06	a-Ketoglutaric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	D07	a-Ketobutyric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	D08	a-Methyl-D-Galactoside	C-Source, carbohydrate	-	-
PM01	D09	a-D-Lactose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	D10	Lactulose	C-Source, carbohydrate	-	+
PM01	D11	Sucrose	C-Source, carbohydrate	-	+
PM01	D12	Uridine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	E01	L-Glutamine	C-Source, amino acid	+	+
PM01	E02	m-Tartaric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	E03	D-Glucose-1-Phosphate	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	E04	D-Fructose-6-Phosphate	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	E05	Tween 80	C-Source, fatty acid	-	-
PM01	E06	a-Hydroxyglutaric acid-g-Lactone	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	E07	a-Hydroxybutyric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	E08	b-Methyl-D-Glucoside	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	E09	Adonitol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM01	E10	Maltotriose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	E11	2'-Deoxyadenosine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	E12	Adenosine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	F01	Gly-Asp	C-Source, amino acid	+	+
PM01	F02	Citric acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	F03	m-Inositol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM01	F04	D-Threonine	C-Source, amino acid	-	-
PM01	F05	Fumaric acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	F06	Bromosuccinic acid	C-Source, carboxylic	+	+

			acid		
PM01	F07	Propionic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	F08	Mucic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	F09	Glycolic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	F10	Glyoxylic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	F11	D-Cellobiose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	F12	Inosine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	G01	Gly-Glu	C-Source, amino acid	+	+
PM01	G02	Tricarballic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	G03	L-Serine	C-Source, amino acid	+	+
PM01	G04	L-Threonine	C-Source, amino acid	+	+
PM01	G05	L-Alanine	C-Source, amino acid	+	+
PM01	G06	Ala-Gly	C-Source, amino acid	+	+
PM01	G07	Acetoacetic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	G08	N-Acetyl-D-Mannosamine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM01	G09	Mono-Methylsuccinate	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	G10	Methylpyruvate	C-Source, ester	-	+
PM01	G11	D-Malic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	G12	L-Malic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	H01	Gly-Pro	C-Source, amino acid	+	+
PM01	H02	p-Hydroxyphenyl Acetic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	H03	m-Hydroxyphenyl Acetic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM01	H04	Tyramine	C-Source, amine	-	-
PM01	H05	D-Psicose	C-Source, carbohydrate	+	-
PM01	H06	L-Lyxose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM01	H07	Glucuronamide	C-Source, amide	-	-
PM01	H08	Pyruvic acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	H09	L-Galactonic acid-g-Lactone	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM01	H10	D-Galacturonic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM01	H11	Phenylethylamine	C-Source, amine	-	-
PM01	H12	2-Aminoethanol	C-Source, alcohol	-	-
PM02A	A02	Chondroitin Sulfate C	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A03	α-Cyclodextrin	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A04	β-Cyclodextrin	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A05	γ-Cyclodextrin	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A06	Dextrin	C-Source, polymer	+	+

PM02A	A07	Gelatin	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A08	Glycogen	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A09	Inulin	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A10	Laminarin	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A11	Mannan	C-Source, polymer	-	-
PM02A	A12	Pectin	C-Source, polymer	-	+
PM02A	B01	N-Acetyl-D-Galactosamine	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	B02	N-Acetyl-Neuraminic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM02A	B03	b-D-Allose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	B04	Amygdalin	C-Source, carbohydrate	-	+
PM02A	B05	D-Arabinose	C-Source, carbohydrate	-	+
PM02A	B06	D-Arabitol	C-Source, carbohydrate	-	+
PM02A	B07	L-Arabitol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	B08	Arbutin	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	B09	2-Deoxy-D-Ribose	C-Source, carbohydrate	-	+
PM02A	B10	i-Erythritol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	B11	D-Fucose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	B12	3-O-b-D-Galactopyranosyl-D-Arabinose	C-Source, carbohydrate	-	+
PM02A	C01	Gentiobiose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	C02	L-Glucose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	C03	D-Lactitol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	C04	D-Melezitose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	C05	Maltitol	C-Source, carbohydrate	+	-
PM02A	C06	a-Methyl-D-Glucoside	C-Source, carbohydrate	-	+
PM02A	C07	b-Methyl-D-Galactoside	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	C08	3-Methylglucose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	C09	b-Methyl-D-Glucuronic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	C10	a-Methyl-D-Mannoside	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	C11	b-Methyl-D-Xyloside	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	C12	Palatinose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	D01	D-Raffinose	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	D02	Salicin	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	D03	Sedoheptulosan	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D04	L-Sorbose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D05	Stachyose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D06	D-Tagatose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D07	Turanose	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D08	Xylitol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D09	N-Acetyl-D-Glucosaminitol	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	D10	g-Amino-N-Butyric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-

PM02A	D11	d-Amino Valeric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	D12	Butyric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E01	Capric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E02	Caproic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM02A	E03	Citraconic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E04	Citramalic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E05	D-Glucosamine	C-Source, carbohydrate	+	+
PM02A	E06	2-Hydroxybenzoic acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM02A	E07	4-Hydroxybenzoic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E08	b-Hydroxybutyric acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM02A	E09	g-Hydroxybutyric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E10	a-Keto-Valeric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E11	Itaconic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	E12	5-Keto-D-Gluconic acid	C-Source, carboxylic acid	-	+
PM02A	F01	D-Lactic acid Methyl Ester	C-Source, ester	-	-
PM02A	F02	Malonic acid	C-Source, carboxylic acid	+	+
PM02A	F03	Melibionic acid	C-Source, carbohydrate	-	-
PM02A	F04	Oxalic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F05	Oxalomalic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F06	Quinic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F07	D-Ribono-1,4-Lactone	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F08	Sebacic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F09	Sorbic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F10	Succinamic acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F11	D-Tartaric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	F12	L-Tartaric acid	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	G01	Acetamide	C-Source, amide	-	-
PM02A	G02	L-Alaninamide	C-Source, amide	+	+
PM02A	G03	N-Acetyl-L-Glutamic acid	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G04	L-Arginine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G05	Glycine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G06	L-Histidine	C-Source, amino acid	-	+

PM02A	G07	L-Homoserine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G08	Hydroxy-L-Proline	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G09	L-Isoleucine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G10	L-Leucine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G11	L-Lysine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	G12	L-Methionine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	H01	L-Ornithine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	H02	L-Phenylalanine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	H03	L-Pyroglutamic acid	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	H04	L-Valine	C-Source, amino acid	-	-
PM02A	H05	D,L-Carnitine	C-Source, carboxylic acid	-	-
PM02A	H06	sec-Butylamine	C-Source, amine	-	-
PM02A	H07	D,L-Octopamine	C-Source, amine	-	-
PM02A	H08	Putrescine	C-Source, amine	-	-
PM02A	H09	Dihydroxyacetone	C-Source, alcohol	+	+
PM02A	H10	2,3-Butanediol	C-Source, alcohol	-	-
PM02A	H11	2,3-Butanedione	C-Source, alcohol	-	-
PM02A	H12	3-Hydroxy-2-butanone	C-Source, alcohol	-	-

Tableau complémentaire 2. Tests de pH des souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. dans la MicroPlaque™ PM10 du Biolog. (+) croissance; (-) pas de croissance.

Plate	Location	Chemical	Nature of substrate	<i>E. biskrae</i> sp.nov.	<i>E. zibanae</i> sp.nov.
PM10	A01	pH 3.5	pH, growth at 3.5	-	-
PM10	A02	pH 4	pH, growth at 4	-	+
PM10	A03	pH 4.5	pH, growth at 4.5	+	+
PM10	A04	pH 5	pH, growth at 5	+	+
PM10	A05	pH 5.5	pH, growth at 5.5	+	+
PM10	A06	pH 6	pH, growth at 6	+	+
PM10	A07	pH 7	pH, growth at 7	+	+
PM10	A08	pH 8	pH, growth at 8	+	+
PM10	A09	pH 8.5	pH, growth at 8.5	+	+
PM10	A10	pH 9	pH, growth at 9	+	+
PM10	A11	pH 9.5	pH, growth at 9.5	+	+
PM10	A12	pH 10	pH, growth at 10	+	+
PM10	B01	pH 4.5	pH, decarboxylase control	+	+
PM10	B02	pH 4.5 + L-Alanine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	B03	pH 4.5 + L-Arginine	pH, decarboxylase	-	-
PM10	B04	pH 4.5 + L-Asparagine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	B05	pH 4.5 + L-Aspartic acid	pH, decarboxylase	+	-

PM10	B06	pH 4.5 + L-Glutamic acid	pH, decarboxylase	-	+
PM10	B07	pH 4.5 + L-Glutamine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	B08	pH 4.5 + Glycine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	B09	pH 4.5 + L-Histidine	pH, decarboxylase	-	-
PM10	B10	pH 4.5 + L-Isoleucine	pH, decarboxylase	-	-
PM10	B11	pH 4.5 + L-Leucine	pH, decarboxylase	-	-
PM10	B12	pH 4.5 + L-Lysine	pH, decarboxylase	-	+
PM10	C01	pH 4.5 + L-Methionine	pH, decarboxylase	+	+
PM10	C02	pH 4.5 + L-Phenylalanine	pH, decarboxylase	+	+
PM10	C03	pH 4.5 + L-Proline	pH, decarboxylase	+	+
PM10	C04	pH 4.5 + L-Serine	pH, decarboxylase	+	+
PM10	C05	pH 4.5 + L-Threonine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	C06	pH 4.5 + L-Tryptophan	pH, decarboxylase	-	+
PM10	C07	pH 4.5 + L-Citrulline	pH, decarboxylase	+	+
PM10	C08	pH 4.5 + L-Valine	pH, decarboxylase	+	+
PM10	C09	pH 4.5 + Hydroxy-L-Proline ⁶	pH, decarboxylase	+	-
PM10	C10	pH 4.5 + L-Ornithine	pH, decarboxylase	-	-
PM10	C11	pH 4.5 + L-Homoarginine	pH, decarboxylase	-	-
PM10	C12	pH 4.5 + L-Homoserine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	D01	pH 4.5 + Anthranilic acid	pH, decarboxylase	-	-
PM10	D02	pH 4.5 + L-Norleucine	pH, decarboxylase	-	+
PM10	D03	pH 4.5 + L-Norvaline	pH, decarboxylase	+	+
PM10	D04	pH 4.5 + α -Amino-N-Butyric acid	pH, decarboxylase	+	-
PM10	D05	pH 4.5 + p-Aminobenzoate	pH, decarboxylase	-	+
PM10	D06	pH 4.5 + L-Cysteic acid	pH, decarboxylase	+	+
PM10	D07	pH 4.5 + D-Lysine	pH, decarboxylase	+	+
PM10	D08	pH 4.5 + 5-Hydroxy-L-Lysine	pH, decarboxylase	+	-
PM10	D09	pH 4.5 + 5-Hydroxy-L-Tryptophan	pH, decarboxylase	-	+
PM10	D10	pH 4.5 + DL-Diamino- α,ϵ -Pimelic acid	pH, decarboxylase	+	-
PM10	D11	pH 4.5 + Trimethylamine-N-Oxide	pH, decarboxylase	-	+
PM10	D12	pH 4.5 + Urea	pH, decarboxylase	+	+
PM10	E01	pH 9.5	pH, deaminase control	+	+
PM10	E02	pH 9.5 + L-Alanine	pH, deaminase	+	+
PM10	E03	pH 9.5 + L-Arginine	pH, deaminase	-	+
PM10	E04	pH 9.5 + L-Asparagine	pH, deaminase	-	+
PM10	E05	pH 9.5 + L-Aspartic acid	pH, deaminase	+	+
PM10	E06	pH 9.5 + L-Glutamic acid	pH, deaminase	+	+
PM10	E07	pH 9.5 + L-Glutamine	pH, deaminase	+	+
PM10	E08	pH 9.5 + Glycine	pH, deaminase	+	+
PM10	E09	pH 9.5 + L-Histidine	pH, deaminase	-	+
PM10	E10	pH 9.5 + L-Isoleucine	pH, deaminase	-	+
PM10	E11	pH 9.5 + L-Leucine	pH, deaminase	-	+
PM10	E12	pH 9.5 + L-Lysine	pH, deaminase	+	+
PM10	F01	pH 9.5 + L-Methionine	pH, deaminase	-	+
PM10	F02	pH 9.5 + L-Phenylalanine	pH, deaminase	-	+
PM10	F03	pH 9.5 + L-Proline	pH, deaminase	+	+

PM10	F04	pH 9.5 + L-Serine	pH, deaminase	-	+
PM10	F05	pH 9.5 + L-Threonine	pH, deaminase	-	-
PM10	F06	pH 9.5 + L-Tryptophan	pH, deaminase	-	-
PM10	F07	pH 9.5 + L-Tyrosine	pH, deaminase	+	+
PM10	F08	pH 9.5 + L-Valine	pH, deaminase	-	+
PM10	F09	pH 9.5 + Hydroxy-L-Proline	pH, deaminase	+	+
PM10	F10	pH 9.5 + L-Ornithine	pH, deaminase	-	-
PM10	F11	pH 9.5 + L-Homoarginine	pH, deaminase	-	-
PM10	F12	pH 9.5 + L-Homoserine	pH, deaminase	-	+
PM10	G01	pH 9.5 + Anthranilic acid	pH, deaminase	+	-
PM10	G02	pH 9.5 + L-Norleucine	pH, deaminase	-	+
PM10	G03	pH 9.5 + L-Norvaline	pH, deaminase	-	-
PM10	G04	pH 9.5 + Agmatine	pH, deaminase	-	-
PM10	G05	pH 9.5 + Cadaverine	pH, deaminase	-	+
PM10	G06	pH 9.5 + Putrescine	pH, deaminase	-	+
PM10	G07	pH 9.5 + Histamine	pH, deaminase	-	-
PM10	G08	pH 9.5 + b-Phenylethylamine	pH, deaminase	-	-
PM10	G09	pH 9.5 + Tyramine	pH, deaminase	-	+
PM10	G10	pH 9.5 + Creatine	pH, deaminase	+	+
PM10	G11	pH 9.5 + Trimethylamine-N-Oxide	pH, deaminase	+	+
PM10	G12	pH 9.5 + Urea	pH, deaminase	+	+
PM10	H01	X-Caprylate	caprylate esterase	+	+
PM10	H02	X-a-D-Glucoside	a-D-glucosidase	+	+
PM10	H03	X-b-D-Glucoside	b-D-glucosidase	+	+
PM10	H04	X-a-D-Galactoside	a-D-galactosidase	+	+
PM10	H05	X-b-D-Galactoside	b-D-galactosidase	+	+
PM10	H06	X-a-D-Glucuronide	a-D-glucuronidase	+	+
PM10	H07	X-b-D-Glucuronide	b-D-glucuronidase	+	+
PM10	H08	X-b-D-Glucosaminide	b-D-glucosaminidase	+	+
PM10	H09	X-b-D-Galactosaminide	b-D-galactosaminidase	+	+
PM10	H10	X-a-D-Mannoside	a-D-mannosidase	+	+
PM10	H11	X-PO4	aryl phosphatase	+	+
PM10	H12	X-SO4	aryl sulfatase	+	+

Tableau complémentaire 3. Tests de sensibilité des deux souches *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. dans les MicroPlaques™ PM11C- PM16A du Biolog. ‘R’ résistante à toutes les concentrations, ‘R1’ résistante à la plus faible concentration 1 seulement, ‘R2’ résistante aux concentrations 1 et 2 seulement, ‘R3’ résistante aux concentrations 1, 2 et 3 seulement, ‘S’ sensible à toutes les concentrations.

Plate	Location	Chemical	Antimicrobial mechanism	<i>E.biskrae</i> sp.nov.	<i>E.zibanae</i> sp.nov.
PM11C	A 01 - 04	Amikacin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R
PM11C	A 05 - 08	Chlortetracycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R	R
PM11C	A 09 - 12	Lincomycin	protein synthesis, 50S ribosomal subunit, lincosamide	R	R3
PM11C	B 01 - 04	Amoxicillin	wall, lactam	R	R
PM11C	B 05 - 08	Cloxacillin	wall, lactam	R2	R2
PM11C	B 09 - 12	Lomefloxacin	DNA topoisomerase	R3	R3
PM11C	C 01 - 04	Bleomycin	DNA damage, oxidation	R	R
PM11C	C 05 - 08	Colistin	membrane, cyclic peptide	R	R2
PM11C	C 09 - 12	Minocycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R2	R2
PM11C	D 01 - 04	Capreomycin	protein synthesis	R	R
PM11C	D 05 - 08	Demeclocycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R3	R3
PM11C	D 09 - 12	Nafcillin	wall, lactam	R2	R3
PM11C	E 01 - 04	Cefazolin	wall, cephalosporin	R	R3
PM11C	E 05 - 08	Enoxacin	DNA topoisomerase	R3	R2
PM11C	E 09 - 12	Nalidixic acid	DNA topoisomerase	R1	R2
PM11C	F 01 - 04	Chloramphenicol	protein synthesis, amphenicol	R2	R2
PM11C	F 05 - 08	Erythromycin	protein synthesis, 50S ribosomal subunit, macrolide	R	R
PM11C	F 09 - 12	Neomycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R
PM11C	G 01 - 04	Ceftriaxone	wall, cephalosporin	R	R
PM11C	G 05 - 08	Gentamicin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R
PM11C	G 09 - 12	Potassium tellurite	toxic anion	R2	R3
PM11C	H 01 - 04	Cephalothin	wall, cephalosporin	R3	R2
PM11C	H 05 - 08	Kanamycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R
PM11C	H 09 - 12	Ofloxacin	DNA topoisomerase	R	R3
PM12B	A 01 - 04	Penicillin G	wall, lactam	R	R3
PM12B	A 05 - 08	Tetracycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R3	R
PM12B	A 09 - 12	Carbenicillin	wall, lactam	R	R
PM12B	B 01 - 04	Oxacillin	wall, lactam	R1	R2

PM12B	B 05 - 08	Penimepicycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R3	R3
PM12B	B 09 - 12	Polymyxin B	membrane, cyclic peptide	R	R3
PM12B	C 01 - 04	Paromomycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R3	R3
PM12B	C 05 - 08	Vancomycin	wall	R	R3
PM12B	C 09 - 12	DL-Serine hydroxamate	tRNA synthetase	R3	R3
PM12B	D 01 - 04	Sisomicin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R2	R
PM12B	D 05 - 08	Sulfamethazine	folate antagonist, PABA analog	R3	R
PM12B	D 09 - 12	Novobiocin	DNA topoisomerase	S	S
PM12B	E 01 - 04	2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridine	folate antagonist, vibriostatic agent	R2	R
PM12B	E 05 - 08	Sulfadiazine	folate antagonist, PABA analog	R2	R
PM12B	E 09 - 12	Benzethonium Chloride	membrane, detergent, cationic	R3	R3
PM12B	F 01 - 04	Tobramycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R2	R3
PM12B	F 05 - 08	Sulfathiazole	folate antagonist, PABA analog	R2	R
PM12B	F 09 - 12	5-Fluoroorotic acid	nucleic acid analog, pyrimidine	R	R
PM12B	G 01 - 04	Spectinomycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R
PM12B	G 05 - 08	Sulfamethoxazole	folate antagonist, PABA analog	R2	R
PM12B	G 09 - 12	L-Aspartic-b-hydroxamate	tRNA synthetase	R1	R
PM12B	H 01 - 04	Spiramycin	protein synthesis, 50S ribosomal subunit, macrolide	R	R
PM12B	H 05 - 08	Rifampicin	RNA polymerase	R	R
PM12B	H 09 - 12	Dodecyltrimethyl ammonium bromide	membrane, detergent, cationic	R3	R3
PM13B	A 01 - 04	Ampicillin, Sodium salt	DNA intercalator, inhibits RNA synthesis	R	R
PM13B	A 05 - 08	Dequalinium chloride	ion channel inhibitor, K ⁺	R	R
PM13B	A 09 - 12	Nickel chloride	toxic cation	R3	R3
PM13B	B 01 - 04	Azlocillin	wall, lactam	R	R
PM13B	B 05 - 08	2,2'-Dipyridyl	chelator, lipophilic	S	S
PM13B	B 09 - 12	Oxolinic acid	DNA topoisomerase	R2	R2
PM13B	C 01 - 04	6-Mercaptopurine monohydrate	nucleic acid analog, purine	R3	R3
PM13B	C 05 - 08	Doxycycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R2	R2
PM13B	C 09 - 12	Potassium chromate	toxic anion	R3	R2
PM13B	D 01 - 04	Cefuroxime	wall, cephalosporin	R3	R3
PM13B	D 05 - 08	5-Fluorouracil	nucleic acid analog, pyrimidine	R	R
PM13B	D 09 - 12	Rolitetracycline	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, tetracycline	R	R
PM13B	E 01 - 04	Cytosine-1-beta-D-arabinofuranoside	nucleic acid analog, pyrimidine	R	R
PM13B	E 05 - 08	Geneticin disulfate (G418)	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R
PM13B	E 09 - 12	Ruthenium red	respiration, mitochondrial Ca ⁺⁺	R	R

			porter		
PM13B	F 01 - 04	Cesium chloride	toxic cation	R	R
PM13B	F 05 - 08	Glycine HCl	wall	R	R
PM13B	F 09 - 12	Thallium (I) acetate	toxic cation	R3	R3
PM13B	G 01 - 04	Cobalt (II) chloride	toxic cation	R2	R2
PM13B	G 05 - 08	Manganese chloride	toxic cation	R3	R3
PM13B	G 09 - 12	Trifluoperazine	membrane, phenothiazine, efflux pump inhibitor, anti-psychotic	R	R
PM13B	H 01 - 04	Cupric chloride	toxic cation	R3	R3
PM13B	H 05 - 08	Moxalactam	wall, lactam	R2	R2
PM13B	H 09 - 12	Tylosin	protein synthesis, 50S ribosomal subunit, macrolide	R	R
PM14A	A 01 - 04	Acriflavine	DNA intercalator, inhibits RNA synthesis	R	R
PM14A	A 05 - 08	Furaltadone	nitro compound, oxidizing agent, DNA damage	R	R
PM14A	A 09 - 12	Sanguinarine chloride	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ and Mg ⁺⁺	R2	R2
PM14A	B 01 - 04	9-Aminoacridine	DNA intercalator, inhibits RNA synthesis	R3	R
PM14A	B 05 - 08	Fusaric acid	chelator, lipophilic	R2	R
PM14A	B 09 - 12	Sodium Arsenate	toxic anion, PO ₄ analog	R	R
PM14A	C 01 - 04	Boric acid	toxic anion	R2	S
PM14A	C 05 - 08	1-Hydroxypyridine-2-thione (pyrithione)	biofilm inhibitor, chelator, anti-fungal	R3	R3
PM14A	C 09 - 12	Sodium Cyanate	toxic anion	R3	R3
PM14A	D 01 - 04	Cadmium chloride	toxic cation	S	R2
PM14A	D 05 - 08	Iodoacetic acid	oxidizes sulfhydryls	R3	R3
PM14A	D 09 - 12	Sodium Dichromate	toxic anion, SO ₄ analog	R3	R3
PM14A	E 01 - 04	Cefoxitin	wall, cephalosporin	R3	R
PM14A	E 05 - 08	Nitrofurantoin	nitro compound, oxidizing agent, DNA damage	R	R
PM14A	E 09 - 12	Sodium metaborate	toxic anion	R2	R3
PM14A	F 01 - 04	Chloramphenicol	protein synthesis, amphenicol	R3	R2
PM14A	F 05 - 08	Piperacillin	wall, lactam	R	R
PM14A	F 09 - 12	Sodium metavanadate	toxic anion, PO ₄ analog	S	S
PM14A	G 01 - 04	Chelerythrine chloride	protein kinase C inhibitor	R	R
PM14A	G 05 - 08	Carbenicillin	wall, lactam	R	R
PM14A	G 09 - 12	Sodium Nitrite	toxic anion	R3	R3
PM14A	H 01 - 04	Ethylene Glycol-bis(b-Aminoethyl ether)-NNN`N`-Tetracetic Acid	chelator, Ca ⁺⁺	R	R
PM14A	H 05 - 08	Promethazine	membrane, phenothiazine, efflux pump inhibitor, anti-psychotic	R3	R2
PM14A	H 09 - 12	Sodium orthovanadate	toxic anion, PO ₄ analog	S	S
PM15B	A 01 - 04	Procaine	wall, cephalosporin	R3	R3
PM15B	A 05 - 08	Guanidine hydrochloride	membrane, chaotropic agent	R2	R2
PM15B	A 09 - 12	Cefmetazole	wall, cephalosporin	R	R
PM15B	B 01 - 04	D-Cycloserine	wall	R	R

PM15B	B 05 - 08	EDTA	chelator, hydrophilic	R3	R
PM15B	B 09 - 12	5,7-Dichloro-8-hydroxyquinaldine	chelator, lipophilic	R3	R
PM15B	C 01 - 04	5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline	chelator, lipophilic	R3	R3
PM15B	C 05 - 08	Fusidic acid, sodium salt	protein synthesis, elongation factor	R2	R3
PM15B	C 09 - 12	1,10-Phenanthroline Monohydrate	chelator, lipophilic	R2	R2
PM15B	D 01 - 04	Phleomycin	DNA damage, oxidation	R	R
PM15B	D 05 - 08	Domiphen bromide	membrane, detergent, cationic, fungicide	R3	R3
PM15B	D 09 - 12	Nordihydroguaiaretic acid	lipoxygenase, fungicide	R	R
PM15B	E 01 - 04	Alexidine	membrane, electron transport, biguanide	R3	R3
PM15B	E 05 - 08	5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone (Nitrofurazone)	nitro compound, oxidizing agent, DNA damage	R	R
PM15B	E 09 - 12	Methyl viologen	oxidizing agent	R	R
PM15B	F 01 - 04	3,4-Dimethoxybenzyl alcohol	oxidizing agent, free radical-peroxidase substrate	R2	R2
PM15B	F 05 - 08	Oleandomycin, phosphate salt	protein synthesis, 50S ribosomal subunit, macrolide	R	R
PM15B	F 09 - 12	Puromycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, premature chain termination	R3	R3
PM15B	G 01 - 04	Carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)	respiration, ionophore, H ⁺	R	R2
PM15B	G 05 - 08	Sodium Azide	respiration, uncoupler	R1	R1
PM15B	G 09 - 12	Menadione, sodium bisulfite	respiration, uncoupler	R3	R3
PM15B	H 01 - 04	2-Nitroimidazole	nitro compound, oxidizing agent, ribonucleotide DP reductase inhibitor	R2	R2
PM15B	H 05 - 08	Hydroxyurea	ribonucleotide DP reductase inhibitor, antifolate (inhibits thymine and methionine synthesis)	R3	R3
PM15B	H 09 - 12	Zinc chloride	toxic cation	R3	R3
PM16A	A 01 - 04	Cefotaxime	wall, cephalosporin	R	S
PM16A	A 05 - 08	Phosphomycin	wall	R	R
PM16A	A 09 - 12	5-Chloro-7-iodo-8-hydroxy-quinoline	chelator, lipophilic	R2	R2
PM16A	B 01 - 04	Norfloxacin	DNA topoisomerase	R	R
PM16A	B 05 - 08	Sulfanilamide	folate antagonist, PABA analog	R	R
PM16A	B 09 - 12	Trimethoprim	folate antagonist, dihydrofolate reductase inhibitor	R2	R2
PM16A	C 01 - 04	Dichlofluanid	fungicide, phenylsulphamide	R	R
PM16A	C 05 - 08	Protamine sulfate	membrane, nonspecific binding	R2	R2
PM16A	C 09 - 12	Cetylpyridinium chloride	membrane, detergent, cationic	R3	R3
PM16A	D 01 - 04	Chlorodinitrobenzene	oxidizes sulfhydryls, depletes glutathione	R	R

PM16A	D 05 - 08	Diamide	oxidizes sulfhydryls, depletes glutathione	R	R
PM16A	D 09 - 12	Cinoxacin	DNA topoisomerase	R2	R2
PM16A	E 01 - 04	Streptomycin	protein synthesis, 30S ribosomal subunit, aminoglycoside	R	R3
PM16A	E 05 - 08	5-Azacytidine	DNA methylation, methyltransferase inhibitor	R	R
PM16A	E 09 - 12	Rifamycin SV	RNA polymerase	R	R
PM16A	F 01 - 04	Potassium tellurite	toxic anion	R2	R3
PM16A	F 05 - 08	Sodium Selenite	toxic anion	R	R
PM16A	F 09 - 12	Aluminum sulfate	toxic cation	R	R
PM16A	G 01 - 04	Chromium (III) chloride	toxic cation	R	R
PM16A	G 05 - 08	Ferric chloride	toxic cation	R	R
PM16A	G 09 - 12	L-Glutamic acid g-monohydroxamate	tRNA synthetase	R	R
PM16A	H 01 - 04	Glycine hydroxamate	tRNA synthetase	R2	R2
PM16A	H 05 - 08	4-Chloro-3,5-dimethyl-phenol	fungicide	R	R
PM16A	H 09 - 12	Sorbic acid	respiration, ionophore, H+	R	R

الغليفسوات (فوسفونو مثيل غليسين) هو من مبيدات الأعشاب الأكثر استخداما في العالم. بسبب سميته لأنواع غير المستهدفة في التربة، فإن العثور على الكائنات الدقيقة المحللة للغليفسوات له أهمية كبيرة. نجاح هذه المهمة يعتمد على عزل بكتيريا لديها القدرة على تحليل الغليفسوات. تم عزل سلالات بكتيرية من ثلاثة أنواع مختلفة من التربة (تربة صحراوية من بسكرة وتربة زراعية وأخرى غابية من قسنطينة) وكانت قادرة على النمو في وسط يحتوي على الغليفسوات كمصدر وحيد للكربون أو الفوسفور. لتحديد مختلف السلالات، اعتمدنا في ذلك على تحليل الجين DNA 16 S ، MALDI TOF و الخصائص البيوكيميائية. نتيجة MLDI TOF و التحليل المشترك لجين DNA 16 S مع الجين *rpoB* لكل من Bisph1 و Bisph2 ، كشفت أن هذين السلالتين تنتميان إلى جنس الأمعائية (*Enterobacter*). وقد أظهر تحليل تسلسل (MLSA) Multilocus للجينات DNA 16 S ، *hsp60* ، *rpoB* ، *gyrB* و *DnaJ* أن Bisph1 Bisph2 تشكلان مجموعة منفردة في شجرة النشوء والتطور لجنس الأمعائية (*Enterobacter*). على أساس الصفات الظاهرية وتحليل البيانات الجزيئية، نقترح أن السلالتين Bisph1 و Bisph2 تمثلان نوعين جديدين من جنس الأمعائية، حيث تم اقتراح الاسمين *Enterobacter zibanae* sp. nov., *Enterobacter biskrae* sp. nov. لهذين السلالتين. أظهرت السلالتين *Pseudomonas putida* et *Enterobacter zibanae* sp. nov مستويات عالية من النمو في وجود الغليفسوات كمصدر وحيد للفوسفور ، لذلك استخدمت للدراسات أخرى تهدف الى تحسين الظروف اللاحوية للوسط من أجل تحليل أمثل للغليفسوات. كانت أفضل نتيجة لنمو للسلالتين في وسط يحتوي على 1 غ/لتر من الغليفسوات خلال سرعة دوران قدرها 150 دورة / الدقيقة لمدة 168 ساعة من الحضانة ، في وجود الغلوتامات في درجة الحموضة الأولية 9 و 30 درجة مئوية بالنسبة ل *Enterobacter zibanae* و في وجود خلاصة الخميرة في درجة الحموضة 9.0 عند 37 درجة مئوية بالنسبة ل *Enterobacter zibanae* sp. nov. بالنسبة لكلا السلالتين لم يلاحظ أي إعاقة للنمو في التراكيز العالية من الغليفسوات (أكبر من 9 غ / لتر). تظهر هذه النتائج أن هاتين السلالتين قد تملكان إمكانات و يمكن استخدامها في المعالجة البيولوجية في البيئات الملوثة بالغليفسوات . تم تقييم الآثار الجانبية للغليفسوات على التنفس الميكروبي وتكوين المجتمع الميكروبي القابل للزراعة في التربة الغابية والصحراوية خلال فترة قصيرة الأجل (30 يوما). خلافا للتربة الغابية، تم تفعيل النشاط الميكروبي في التربة الصحراوية بشكل كبير في وجود الغليفسوات ، ليس فقط من خلال زيادة عدد الكائنات الحية الدقيقة ، ولكن أيضا عن طريق زيادة التنفس الميكروبي للتربة. وتشير هذه النتائج إلى أن الغليفسوات ليس له آثار سلبية على النشاط الميكروبي و يمكن من تحسين نوعية التربة.

الكلمات المفتاحية : الغليفسوات، التربة، البكتيريات المحللة، التحلل البيولوجي، تحسين ظروف الوسط الزراعي، الآثار الجانبية، النشاط الميكروبي.

Glyphosate (N-phosphonomethylglycine) is the most commonly used herbicide worldwide. Because of concern regarding its toxicity, finding glyphosate-degrading microorganisms in soil is of interest. The success of this will depend on isolating bacteria with the ability to grow in presence of glyphosate. Seven bacterial strains were isolated from different untreated soils of Algeria, the strains were able to grow in a medium containing glyphosate as sole carbon or phosphorus source by enrichment cultures of these soils. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, MALDI-TOF MS and biochemical properties. Five isolates were identified to the following species : *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae*, *Rahnella aquatilis*, *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae*. The result of the MALDI TOF and the combined analysis of the gene sequences of the 16S rRNA with the *rpoB* gene allowed to approximate to the genus *Enterobacter*, the remaining two isolates designated Bisph1 Bisph2 and using glyphosate as the only phosphorus source. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *hsp60*, *rpoB*, *gyrB* and *DnaJ* genes has shown that Bisph1 and Bisph2 form a distinct group in the phylogenetic tree of the genus *Enterobacter*. On the basis of the phenotypic characteristics and molecular analyses data we propose that strains Bisph1 and Bisph2 represent two novel species of the genus *Enterobacter*, for which the names *Enterobacter biskrae* sp. nov. and *Enterobacter zibanae* sp. nov. are proposed. This observation adds to the list of glyphosate-degrading bacteria. *Pseudomonas putida* and *Enterobacter zibanae* sp. nov. showed high levels of growth in the presence of glyphosate as sole phosphorus source , they have been used for studies of optimization of abiotic parameters for an efficient degradation of glyphosate. The best result of growth was on 1g/L of glyphosate in minimal medium at 150 rpm within 168 h, supplemented with glutamate with initial pH 9.0 at 30°C for *P. putida* and with east extract with an initial pH 9.0 at 37°C for *E. zibanae* sp. nov. The two isolates were able to tolerate up to 9 g/L of glyphosate. These results show that the bacterial strains may possess potential to be used in bioremediation of glyphosate-contaminated environments. The impact of glyphosate treatments on microbial community structure and function in vitro of two Algerian soils with different physicochemical properties (a forest soil and Saharan soil) were evaluated in the short term (30 days). Glyphosate was applied at a rate of 2.16 mg kg⁻¹ of soil and microbial activity was assessed by soil basal respiration and microbial enumeration. Glyphosate addition to the forest soil had no effects on culturable microbial community and basal respiration. Unlike the forest soil, Saharan soil had a strong response in microbial activity and a marked increase in total culturable microorganisms. These initial findings suggest that glyphosate have no negative effects on microbial activity and it can improve soil quality.

Key words: Glyphosate, soil, degrading bacteria, biodegradation, optimization, cultivation conditions, impact of glyphosate, microbial activity.

Nom : BENSLAMA	Diplôme : Doctorat 3^{ème} cycle LMD
Prénom : Ouided	Date de soutenance : 26/05/2014

Titre : Isolement et caractérisation des bactéries capables de dégrader l'herbicide Glyphosate et optimisation des conditions de culture pour une dégradation plus efficace

Résumé

Le glyphosate (N-phosphonométhylglycine) est l'herbicide le plus couramment utilisé dans le monde entier et en Algérie. Connaître les bactéries capables de le dégrader est d'un grand intérêt. Ainsi, dans cette étude, sept souches bactériennes ont été isolées, par des cultures d'enrichissement, à partir de trois sols différents non traités (sol saharien de Biskra, sol agricole et sol forestier de Constantine), les souches étaient capables de croître dans un milieu contenant du glyphosate comme seule source de carbone ou de phosphore. L'identification des souches était basée sur les caractéristiques morphologiques, les caractéristiques biochimiques, l'analyse du gène de l'ARNr 16S et le MALDI TOF. Cinq isolats ont été identifiées aux espèces suivantes : *Pseudomonas putida*, *Enterobacter cloacae*, *Rahnella aquatili*, *Enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens*. Le résultat du MALDI TOF et l'analyse combinée des séquences du gène de l'ARNr 16S avec le gène *rpoB* ont permis de rapprocher au genre *Enterobacter* les deux isolats restants, désignées par Bisph1 et Bisph2, utilisant le glyphosate comme seule source de phosphore. L'analyse des séquences multilocus (MLSA) des gènes, *hsp60*, *rpoB*, *gyrB* et *DnaJ* a montrée que Bisph1 et Bisph2 forme un groupe distinct dans l'arbre phylogénétique du genre *Enterobacter*. Sur la base des caractéristiques phénotypiques et l'analyse des données moléculaires, les deux souches Bisph1 et Bisph2 représentent deux nouvelles espèces du genre *Enterobacter*, dont les noms *Enterobacter biskrae* sp. nov. et *Enterobacter zibanae* sp. nov. sont proposés.

Pseudomonas putida et *Enterobacter zibanae* sp. nov. ont montré des niveaux de croissance élevés en présence du glyphosate comme seule source de phosphore, elles ont donc été utilisées pour des études de l'optimisation des paramètres abiotiques pour une dégradation efficace du glyphosate. Le meilleur résultat de croissance des deux souches était dans un milieu minimal contenant 1g/l de glyphosate à 150 t/m durant 168 heures d'incubation, supplémenté de glutamate (0,1%, p/v) à pH initial 9,0 à 30°C pour *P. putida* et d'extrait de levure (0,1%, p/v) à pH initial 9,0 à 37°C pour *E. zibanae* sp. nov. La croissance des deux souches diminue avec l'augmentation de la concentration du glyphosate. Toutefois, aucune inhibition de la croissance n'a été observée à des concentrations élevées (> 9 g/l), ce qui suggère que les deux souches peuvent tolérer jusqu'à 15 g/l de glyphosate.

Les effets du glyphosate sur la respiration microbienne et la composition de la communauté microbienne cultivable des deux sols (forestier et Saharien) ont été évalués à court terme (30 jours). Le glyphosate n'a aucun effet (positif ou négatif) sur le nombre de microorganismes du sol forestier traité. Contrairement au sol forestier, l'activité microbienne du sol Saharien a été nettement activée en présence du glyphosate, non seulement par l'augmentation du nombre des microorganismes, mais aussi par l'augmentation de la respiration basale du sol.

Mots clés : Glyphosate, sol, bactéries dégradantes, biodégradation, optimisation, conditions de culture, effets secondaires, activité microbienne