

Bioremédiation de pesticide : détection de micro-organismes issus d'un biofiltre et évaluation de leur capacité de biodégradation de pesticides.

Auteur : Denis, Margot

Promoteur(s) : De Clerck, Caroline

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences et technologies de l'environnement, à finalité spécialisée

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/24025>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Bioremédiation de pesticides : détection de micro-organismes issus d'un biofiltre et évaluation de leur capacité de biodégradation de pesticides

MARGOT DENIS

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

ANNEE ACADEMIQUE 2024-2025

PROMOTRICES:
DR. DE CLERCK CAROLINE
DR. DHOMMEE ROXANE

©Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

Bioremédiation de pesticide : détection de micro-organismes issus d'un biofiltre et évaluation de leur capacité de biodégradation de pesticides

MARGOT DENIS

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

ANNEE ACADEMIQUE 2024-2025

PROMOTRICES:
DR. DE CLERCK CAROLINE
DR. DHOMMEE ROXANE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrantes, Caroline De Clerck et Roxanne Dhomée, qui ont cru en moi et en ce projet tout au long de ce TFE. Leur soutien, leurs conseils avisés et leur disponibilité m'ont été d'une aide précieuse.

Je souhaite également remercier Sok Lay et Jimmy, qui m'ont apporté leur aide et qui ont toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions avec patience.

Un immense merci à mes amis : Juliette, Sefien, Marine, Malaika, Michelle et Laurie. Grâce à elles, j'ai vécu cinq années vraiment inoubliables. Elles ont été d'un grand soutien dans les moments difficiles de ce TFE,. Sans elles, les soirées, les cours et la vie au kot n'aurait pas été pareil.

Je voudrais également remercier Estelle et Lou, dont la rencontre a rendu mon Master plus agréable. Les séances de tennis, d'escalade ou simplement nos discussions ont été de véritables moments de plaisir et de légèreté durant ces deux dernières années.

Je remercie aussi ma famille, toujours présente à mes côtés. Merci à ma tantine pour sa relecture attentive de mon travail, ainsi qu'à tous ceux qui m'ont encouragé par leurs messages bienveillants.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Benjamin, qui m'a accompagné tout au long de ces cinq années. Il a été présent dans les moments de joie comme dans les périodes plus compliquées. Il a toujours cru en moi et m'a poussé à donner le meilleur de moi-même.

Enfin, un merci tout particulier à mon frère, pour son écoute et ses conseils, ainsi qu'à mes parents, qui m'ont permis de vivre ces cinq belles années à Gembloux. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu sans relâche.

Abstracts

Microbial degradation is considered one of the most important processes in the fate of pesticides in soils. This biodegradation relies on the activity of specific microorganisms capable of metabolizing or transforming these compounds. However, under real field conditions, the use of such microorganisms remains difficult to implement, as it is still insufficiently studied. In this study, we aimed to isolate and identify microorganisms capable of degrading metamitron and lenacil, two herbicides commonly used in sugar beet cultivation. The strains were obtained through enrichment cultures in minimal medium, where the pesticide served as the sole carbon source. Their degradation capacity was then evaluated under controlled conditions in liquid minimal medium, before proceeding to the kinetic characterization of the selected strains. In total, 31 strains were isolated from five environmental sources. Among them, three strains (8M, 29M, and 30M) showed the ability to completely degrade metamitron and were selected for comprehensive characterization. No strain was selected for lenacil, although some showed partial potential, which could be explored in future work. This study highlights, for the first time in the literature, the degradation of more than 90% of metamitron within 24 hours by a *Rhodococcus* strain. This result opens up new perspectives in the field of bioremediation and represents a first step toward a better understanding of the microbial mechanisms involved in herbicide degradation, as well as the development of biological solutions adapted to real field conditions, such as bioaugmentation.

Résumé

La dégradation microbienne est considérée comme l'un des processus les plus importants dans le devenir des pesticides présents dans les sols. Cette biodégradation repose sur l'activité de microorganismes spécifiques capables de métaboliser ou transformer ces composés. Cependant, dans des conditions réelles de terrain, l'utilisation de ces microorganismes reste complexe à mettre en œuvre, car encore peu étudiée. Dans le cadre de ce travail, nous avons cherché à isoler et identifier des micro-organismes capables de dégrader le métamitron et le lénacil, deux herbicides couramment utilisés dans la culture de la betterave sucrière. Les souches ont été obtenues par cultures d'épuisement en milieu minimal, où le pesticide servait de seule source de carbone. Leurs capacités de dégradation ont ensuite été évaluées en conditions contrôlées, en milieu liquide minimal, avant de passer à la caractérisation cinétique des souches sélectionnées. Au total, 31 souches ont été isolées à partir de cinq sources environnementales. Parmi elles, trois souches (8M, 29M et 30M) ont montré une capacité à dégrader totalement le métamitron et ont été retenues pour une caractérisation complète. Aucune souche n'a été sélectionnée pour le lénacil, bien que certaines aient montré un potentiel partiel à explorer ultérieurement. Ce travail met en évidence, pour la première fois dans la littérature, une dégradation de plus de 90 % du métamitron en 24h par une souche de *Rhodococcus*. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives en matière de bioremédiation et constitue une première étape vers une meilleure compréhension des mécanismes microbiens impliqués dans la dégradation des herbicides, ainsi que vers le développement de solutions biologiques adaptées aux conditions réelles de terrain, telles que la bioaugmentation.

Table des matières

Table des figures	3
Liste des tableaux	5
1. Introduction	6
2. État de l'art.....	8
2.1 Pesticides	8
2.2 Devenir des pesticides dans l'environnement	8
2.2.1 Adsorption/désorption	9
2.2.2 Lixivation et ruissellement	9
2.2.3 Volatilisation.....	9
2.2.4 Dégradation abiotique	10
2.2.5 Dégradation biologique	10
2.3 Les biofiltres	12
2.4 La bioremédiation	14
2.4.1 Solutions appliquées.....	14
2.4.2 Avantages et inconvénients de la bioremédiation.....	15
2.5 Pesticides sélectionnés dans cette étude	16
2.5.1 Métamitron.....	16
2.5.2 Lénacil	19
3. Matériels et méthodes	22
3.1 Sources environnementales de microorganismes sites et procédure d'échantillonnages	22
3.2 Milieux et produits chimiques	24
3.3 Culture d'épuisement, sélection et isolement des souches	25
3.4 Test de la dégradation en milieu liquide par les souches isolées	26
3.5 Suivi journalier et caractérisation de la cinétique de dégradation des pesticides par les souches pures d'intérêt	27
3.6 Identification moléculaire des souches bactériennes	28
3.6.1 Extraction, amplification et identification des souches par séquençage du gène 16S rDNA.....	28
3.6.2 Analyse phylogénétique des souches dégradantes	30
3.7 Analyse statistique et représentation graphique	30
3.8 Schéma récapitulatif des étapes réalisées	30
4. Résultats	32
4.1 Culture d'épuisement et isolement des colonies.....	32
4.2 Dégradation du métamitron et du lénacil par les souches pures.....	34
4.2.1 Métamitron.....	34

4.2.2	Lénacil	35
4.3	Suivi journalier de la dégradation du métamitron par les souches pures sélectionnées	36
4.3.1	Activité de dégradation de la souche 8M	39
4.3.2	Activité de dégradation de la souche 30M	40
4.3.3	Activité de dégradation de la souche 29M	40
4.3.4	Activité de dégradation de la souche <i>Arthrobacter</i> DSM 20389.....	41
4.4	Identification des souches.....	42
4.4.1	Arbre phylogénétique	43
5.	Discussion	45
6.	Conclusions et perspectives	52
7.	Participation de l'étudiant	54
8.	Bibliographies.....	55
	Annexes	65

Table des figures

Figure 1 - Mouvements des pesticides dans l'environnement (Sarker et al., 2024).....	8
Figure 2 - Biobed suédois (Mussali-Galante et al., 2023)	13
Figure 3 - Représentation schématique d'un biofiltre (Pussemier et al, 2004)	13
Figure 4 - Les différentes solutions applicables en bioremédiation (Bokade et al., 2023).....	15
Figure 5 - Molécule du métamitron (EFSA, 2008)	17
Figure 6 - Desamino-metamitron (EFSA, 2008).....	17
Figure 7 - Voie de dégradation biologique du métamitron dans le sol (Wang et al., 2017)....	18
Figure 8 - Voie de dégradation biologique potentielle du métamitron (Fang et al., 2016)	19
Figure 9 - Molécule du lénacil (Zhang et al., 1999)	20
Figure 10 - Chemin de dégradation du lénacil dans l'environnement et les betteraves sucrières (Zhang et al., 1999).....	20
Figure 11 - Localisation des trois biofiltres échantillonnés. 1 : Strée, 2 : Braives, 3 : Gembloux, 4 : Lamain	22
Figure 12 - Biofiltre de Strée	23
Figure 13 - Aire de rinçage de l'exploitation de Strée.....	23
Figure 14 - Etapes des cultures d'épuisement réalisées.....	25
Figure 15 - Schéma récapitulatif des expérimentations réalisées pendant le TFE.....	31
Figure 16 - Suivi de l'abondance des colonies des différentes modalités lors de la phase d'épuisement. (n=1).T0 = jour 0 , T7 = jour 7. RI : première semaine de repiquage, RII : deuxième, RIII : troisième, RIV : quatrième. Gradient de couleur pour les sources environnementales. Foncé : sans pesticide , vif : avec métamitron, pastel : avec lénacil	33
Figure 17 - Quatrième culture d'épuisement : T-Met : contrôle MM + métamitron ; Met : cultures + métamitron. T-Len : contrôle MM + lénacil ; Len : cultures + lenacil. T-Ø : contrôle MM sans pesticide; Ø : cultures sans pesticide.	34
Figure 18 - Graphique de la concentration du métamitron des différentes souches testées au T0 et T14 (n=1)	35
Figure 19 - Graphique de la concentration du lénacil des différentes souches testées au T0 et T14 (n=1).	36
Figure 20 - Observation du changement de couleurs lors du suivi journalier ; A – Jour1 ; B – Jour 9.....	37
Figure 21 - Evaluation de la cinétique de croissance des différentes souches lors du suivi journalier. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3).	38
Figure 22 - Evolution du pH des différentes souches lors du suivi journalier. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3).	38
Figure 23 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche 8M et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps . Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3).	39
Figure 24 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche 30M et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3).	40
Figure 25 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche 29M et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3).	41
Figure 26 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche– ligne continue) pour la souche DSM 20389 et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3).	42

Figure 27 - Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR obtenus pour les souches sélectionnées. E : échelle d'ADN (marqueur de taille) ; – : contrôle négatif	43
Figure 28 - Arbre phylogénétique des souches isolées (8M, 29M, 30M) basé sur les séquences 16S rRNA, enraciné avec <i>Arthrobacter DSM20389</i>	44

Liste des tableaux

Tableau 1 - Exemples de gènes et enzymes dégradantes pour différents pesticides	11
Tableau 2 - Influence des propriétés d'un pesticides sur sa biodégradabilité (Gavrilescu, 2005).....	12
Tableau 3 - Souches dégradantes du métamitron connues dans la littérature	18
Tableau 4 - Caractéristiques des biofiltres des exploitations visitées	23
Tableau 5 - Cycle temps et température pour la réalisation de la PCR.....	29
Tableau 6 - Provenance des différentes souches sélectionnées	35

1. Introduction

À l'échelle mondiale, la population va augmenter de plus de 2 milliards de personnes d'ici 2070 ([Statista, 2025](#)). En Belgique, cette augmentation est estimée à plus d'un million d'habitants sur la même période ([Statbel, 2025](#)). Cette croissance démographique aura pour conséquence une demande alimentaire plus importante, nécessitant une augmentation des productions agricoles tout en limitant les pertes causées par les bioagresseurs (*e.g.* insectes, champignons phytopathogènes) et les adventices.

Pour répondre à ce défi, différentes solutions existent, parmi lesquelles l'usage des pesticides de synthèse, pouvant être définis comme des produits contenant des substances actives issues de la synthèse chimique ([Schiffers, 2012](#)). Ces substances sont largement utilisées pour protéger les cultures contre les bioagresseurs, contribuant ainsi à garantir des rendements agricoles optimaux ([Damalas *et al.*, 2011](#) ; [Pathak *et al.*, 2022](#)). Selon leur cible (*e.g.* adventices, champignons, insectes) ou leur nature chimique, les pesticides se divisent en plusieurs catégories (insecticides, fongicides, herbicides, bactéricides, etc) ([Rani *et al.*, 2021](#)).

Cependant, l'usage intensif des pesticides présente des risques majeurs. Lors de leur application, ils n'agissent pas uniquement sur les cibles visées mais affectent également l'environnement en contaminant l'air, les sols et les ressources en eau ([De Souza *et al.*, 2020](#)). En plus de leurs effets sur l'environnement, ils représentent un danger pour la santé humaine, pouvant pénétrer l'organisme par la peau, l'inhalation ou l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés. Des expositions répétées aux pesticides ont été associées à différentes pathologies, comme des cancers, des troubles respiratoires et des perturbations endocriniennes ([Margni *et al.*, 2002](#) ; [Raffa *et al.*, 2021](#) ; [Rani *et al.*, 2021](#)).

Consciente de ces problématiques, l'Union européenne s'est fixé pour objectif de réduire de 50 % l'usage et les risques des pesticides de synthèse d'ici 2030 ([European Commission, 2025](#)). Plusieurs stratégies alternatives existent pour limiter leur utilisation, notamment :

- Le biocontrôle, qui repose sur l'utilisation d'organismes vivants pour lutter contre les ravageurs ([Mamy *et al.*, 2022](#)).
- Les biopesticides, des substances d'origines naturelles issues de micro-organismes, de plantes ou d'animaux ([Vlaiculescu *et al.*, 2022](#)).
- La rotation des cultures, et autres bonnes pratiques agricoles qui favorisent à la fois l'augmentation des rendements et la réduction des adventices, des maladies et des insectes ravageurs ([Vlaiculescu *et al.*, 2022](#)).

Bien que ces solutions soient moins polluantes, elles ne constituent pas encore des alternatives totalement efficaces aux pesticides de synthèse ([Vlaiculescu *et al.*, 2022](#)).

Afin de concilier la nécessité de préserver les rendements agricoles et celle de limiter les impacts des pesticides, une approche prometteuse repose sur l'utilisation de micro-organismes capables de dégrader ces substances, notamment par bioaugmentation. Cette technique consiste à introduire dans un sol contaminé des souches microbiennes sélectionnées pour leur capacité à métaboliser les pesticides (Bokade *et al.*, 2023). De nombreuses souches d'intérêt ont déjà été identifiées (Verma *et al.*, 2014) (*e.g.* *Cupriavidus necator* minéralisant le 2,4-D (Carles *et al.*, 2021), *Arthrobacter* sp. dégradant l'atrazine ou encore une souche de *Pseudomonas* dégradant le glyphosate (Thieffry *et al.*, 2024)). Cependant, face à la diversité des pesticides de synthèse souvent très persistants dans l'environnement, une multitude de souches dégradantes de pesticides reste à découvrir (Cyconí *et al.*, 2017).

Parmi les sources de pollution de l'environnement liées aux pesticides, le nettoyage des pulvérisateurs constitue une problématique importante. En effet, c'est lors des phases de nettoyage et de remplissage que des pollutions ponctuelles peuvent survenir, entraînant un transfert direct des pesticides vers l'environnement (Mussali-Galante *et al.*, 2023). Une solution pour limiter ces pollutions ponctuelles est l'utilisation de biofiltres, des systèmes constitués de plusieurs unités superposées contenant un substrat à base de paille, de sol arable et de compost. Les eaux de rinçage y traversent successivement ces unités, où les pesticides sont progressivement dégradés par les micro-organismes naturellement présents dans le sol. (Castillo *et al.*, 2008a). Ces biofiltres, exposés de manière répétée aux résidus de pesticides, constituent un milieu sélectif favorisant le développement de certaines souches microbiennes ayant potentiellement des capacités de dégradation importantes.

Dans ce contexte, notre étude vise deux objectifs principaux :

1. Isoler et identifier des souches microbiennes dégradantes, directement à partir des biofiltres, ces environnements favorisant potentiellement le développement de micro-organismes capables de métaboliser les pesticides étudiés.
2. Évaluer la capacité de ces souches à dégrader les pesticides sélectionnés en milieu contrôlé, en analysant leur efficacité et leur vitesse de dégradation afin d'identifier les plus prometteuses pour une application future en bioaugmentation.

2. État de l'art

2.1 Pesticides

Selon la Commission européenne, les pesticides sont des produits servant à protéger les cultures contre différents types de bioagresseurs. Ils sont utilisés principalement dans le secteur de l'agriculture, mais aussi en foresterie et en horticulture. Ils contiennent au moins une substance active (European Commission, 2025).

Il existe différentes classes de pesticides en fonction de la cible visée (Rani *et al.*, 2021). Les herbicides, qui nous intéressent particulièrement dans ce travail, sont des pesticides agissant sur les adventices selon différents modes d'action, tels que la régulation de la croissance, l'inhibition de la germination des graines, l'inhibition de la photosynthèse ou encore l'inhibition de la synthèse des lipides (Rani *et al.*, 2021). En Belgique, les herbicides représentaient en 2023 la principale catégorie de pesticides vendus, totalisant 2 194 544 kilos, soit 45 % des ventes (Phytoweb, 2025).

2.2 Devenir des pesticides dans l'environnement

Les pesticides se retrouvent partout dans l'environnement que ce soit dans les sols, l'eau, l'air et les organismes vivants (Navarro *et al.*, 2007). Cela est dû aux différents processus physiques, chimiques et biologiques qui agissent une fois les pesticides appliqués comme l'immobilisation, le transport et la dégradation (Figure 1) (Gavrilescu, 2005). Ces différents mécanismes sont influencés par les propriétés du sol (physiques, chimiques et biologiques) mais également les caractéristiques des pesticides comme leur solubilité ou leur persistance (Gavrilescu, 2005).

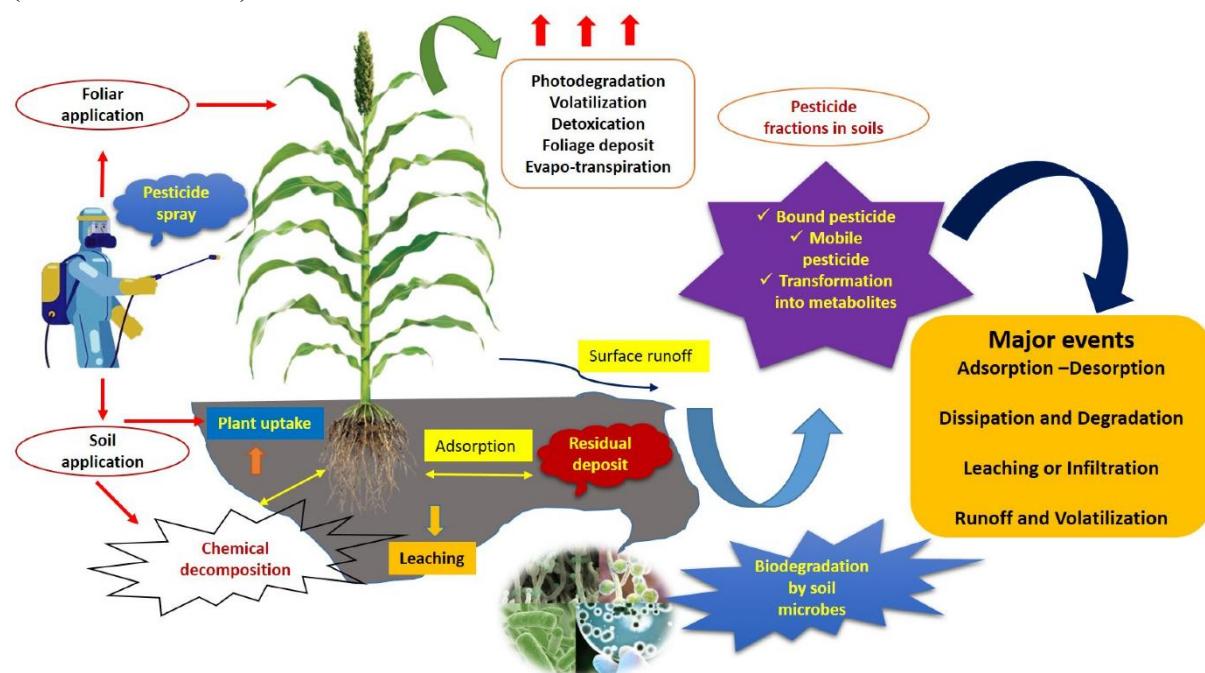


Figure 1 - Mouvements des pesticides dans l'environnement (Sarker *et al.*, 2024)

2.2.1 Adsorption/désorption

L'adsorption est un processus d'immobilisation par lequel des solutés se fixent temporairement à la surface d'un solide en raison d'interactions physiques ou chimiques. Dans le cas des pesticides, cela signifie que les molécules sont retenues sur les particules du sol, comme l'argile ou la matière organique, généralement par attraction électrostatique (Navarro *et al.*, 2007).

Les pesticides hydrophobes ont une plus grande affinité pour les particules du sol et sont donc davantage retenus. Une fois adsorbés, ils peuvent être désorbés progressivement, entraînant un relargage lent dans la solution du sol (Sarker *et al.*, 2024, Navarro *et al.*, 2007). Plusieurs paramètres influencent ce mécanisme, notamment la texture du sol. Une texture plus fine, comme celle d'un sol argileux, réduit la perméabilité, ce qui prolonge le temps de contact entre le pesticide et les particules du sol, tout en augmentant la surface spécifique et donc la surface de contact. L'humidité et la teneur en carbone organique jouent également un rôle dans l'adsorption des pesticides (Gavrilescu, 2005). Enfin, le pH influence également ce processus avec une augmentation de ce phénomène quand celui-ci diminue (Andreu et Picó, 2004).

Pour mesurer la mobilité d'un pesticide dans un sol, le coefficient de sorption normalisé au carbone organique (K_{oc}) est couramment employé comme référence. Il est calculé en divisant la constance de sorption (K_d) par la fraction de carbone organique du sol. Toutefois, l'utilisation de ce paramètre pour prédire la mobilité des pesticides peut être moins fiable dans des sols contenant peu de matières organiques (Wauchope *et al.*, 2002).

2.2.2 Lixiviation et ruissellement

Les mécanismes de transport des pesticides, peuvent être verticaux ou horizontaux. Dans un premier temps, le transport se fait de manière verticale, principalement par lixiviation, un processus où l'eau entraîne les pesticides vers des couches plus profondes du sol, ce qui peut conduire à la contamination des nappes phréatiques (Sarker *et al.*, 2024). Lorsque les précipitations dépassent la capacité d'infiltration du sol, un second processus intervient, déplaçant les pesticides horizontalement *via* le ruissellement. Les particules sont alors transportées depuis les champs vers les eaux de surface menant également à des contaminations (Gavrilescu, 2005).

2.2.3 Volatilisation

La volatilisation est un mode de transfert des pesticides vers l'atmosphère à partir d'un autre compartiment. Ce processus peut entraîner la pollution de vastes zones, car jusqu'à 90 % de la dose pulvérisée peut s'évaporer dans le cas de substances particulièrement volatiles (Bedos *et al.*, 2002). Le potentiel de volatilisation est lié à la pression de vapeur du pesticide et est régi par la loi d'Henry, qui exprime le rapport entre la pression de vapeur et la solubilité.

$$H = \frac{\text{Pression de vapeur}}{\text{Solubilité}}$$

Une valeur élevée indique une volatilisation facilitée (Gavrilescu, 2005).

La volatilisation des pesticides est une voie de transfert qui doit être prise en compte dans l'évaluation des risques des pesticides, car elle constitue une source d'exposition directe pour les travailleurs, les riverains et les résidents (European Food Safety Authority, 2014).

2.2.4 Dégradation abiotique

La dégradation abiotique constitue un autre processus, regroupant deux types principaux. Le premier est la dégradation chimique. Elle apparaît à travers différentes réactions: l'hydrolyse, l'oxydoréduction et l'ionisation, qui ont lieu en fonction du pH (Gavilescu, 2005).

Le second type est la photodégradation. Beaucoup de pesticides absorbent la lumière UV à courte longueur d'onde. Cependant, comme la lumière solaire qui atteint la surface de la Terre contient peu de rayonnement UV de courte longueur d'onde, la photodégradation directe par le soleil est en partie limitée (Burrows *et al.*, 2002). Il existe deux types de photodégradation: la directe et l'indirecte.

Lors de la photolyse directe, le pesticide absorbe directement l'énergie de la lumière UV-visible et subit alors une transformation chimique.

Lors de la photolyse indirecte, ce sont d'autres constituants du milieu (comme l'eau ou les particules du sol) qui absorbent l'énergie lumineuse. L'énergie ou les électrons absorbés sont ensuite transférés à la molécule du pesticide, ce qui conduit à sa dégradation (Konstantinou *et al.*, 2001).

2.2.5 Dégradation biologique

La dégradation biologique est reconnue comme étant le processus de dégradation le plus important (Fenner *et al.*, 2013). Il correspond à la dégradation des pesticides par les micro-organismes (bactéries, champignons...) naturellement présents dans le sol. Ces micro-organismes représentent 60 à 90 % de la biomasse de la planète, une grande partie étant édaphiques. Ils se retrouvent dans toutes les couches du sol, mais de manière hétérogène. Leur densité et leur espèce varient selon les horizons, en lien avec les stratégies écologiques qu'ils adoptent (Dobrovol'skaya *et al.*, 2015). La majorité d'entre eux se trouvent dans les 10 premiers centimètres du sol, où la matière organique leur apporte une source supplémentaire de nutriments (Andreu et Picó, 2004 ; Gavilescu, 2005).

La bioremédiation des sols contaminés par les pesticides consiste à réduire la pollution en utilisant la dégradation biologique. Elle repose sur l'activité métabolique des micro-organismes, qui biodégradent les substances actives en divers métabolites (Sarker *et al.*, 2024). Dans ce processus, les pesticides servent de source de carbone et d'énergie pour la croissance des bactéries (Gangola *et al.*, 2018). Ce mécanisme est efficace, peu coûteux et respectueux de l'environnement.

La transformation enzymatique est la voie la plus importante de dégradation des pesticides dans les sols (Van Eerd *et al.*, 2003). Les champignons et les bactéries produisent des enzymes extra- et intra-cellulaires pour réaliser cette dégradation (Jaiswal *et al.*, 2017). Pour

chaque pesticide, une voie de dégradation spécifique à chaque souche de micro-organisme existe.

Comme l'indique le **tableau 1**, si les gènes impliqués dans la dégradation de certains herbicides sont en partie déjà connus, de nombreux autres restent encore à identifier.

Tableau 1 - Exemples de gènes et enzymes dégradantes pour différents pesticides

Pesticide	Gènes dégradants connus	Enzymes	Souches	Sources
2,4-D	<i>tfdA</i> <i>tfdB</i> <i>tfdC</i>	a-ketoglutarate-dependentdioxygenas phenolhydroxylase 1,2-dichlorocatecholdioxygenase	<i>Cupriavidus necator</i> JMP134	(Kumar <i>et al.</i> , 2016)
Atrazine	<i>atzA</i> , <i>atzB</i> , <i>atzC</i> <i>trzN</i>	hydrolyses successives	<i>Arthrobacter</i> sp. DNS10	(Udiković-Kolić <i>et al.</i> , 2012)
Glyphosate	GOX	Glyphosate oxydoréductase	<i>Ochrobactrum</i> sp. G1 (GU214711.1)	(Zhan <i>et al.</i> , 2018)
Metamitron	/	hydrolase, deaminase, décarboxylase, et dehydrogenase	<i>Rhodococcus</i> sp. MET	(Fang <i>et al.</i> , 2016)

Cependant, l'efficacité de la biodégradation peut être influencée par de nombreuses caractéristiques environnementales comme le pH, la teneur en eau et la température du sol mais aussi les caractéristiques de la molécule à dégrader (Raffa *et al.*, 2021, Aislabie & Lloyd-Jones, 1995).

Il a été montré que le pH exerçait une forte influence sélective sur les communautés microbiennes du sol et affectait la sorption ou encore la mobilité des pesticides dans le sol (Lauber *et al.*, 2009 ; Franco *et al.*, 2009, Kaur *et al.*, 2023).

La teneur en eau dans le sol influence la biodégradation, car elle est essentielle pour l'activité des microorganismes. Plus l'humidité augmente, plus la dégradation augmente (Kaur *et al.*, 2023). Toutefois, si la teneur en eau devient trop importante par exemple, en conditions de saturation, l'effet inverse se produit (Jebellie *et al.*, 1996).

La matière organique du sol agit également sur la biodégradation selon deux effets opposés. Elle peut favoriser l'activité microbienne en augmentant la diversité des espèces, ce qui entraîne une plus grande variété de systèmes capables de dégrader les molécules de pesticides et donc une accélération de leur dégradation. En revanche, la matière organique favorise le processus d'adsorption, pouvant réduire l'accessibilité des pesticides pour la biodégradation (Kaur *et al.*, 2023).

Comme le montre le **tableau 2**, la structure d'un pesticide ainsi que ses propriétés intrinsèques influencent aussi sa biodégradabilité. Par exemple, la présence de groupes polaires tels que OH ou COOH crée des sites d'attaque pour les micro-organismes, ce qui facilite la dégradation (Lushchak *et al.*, 2018). À l'inverse, la substitution par des halogènes ou des groupes alkyles sur les cycles aromatiques augmente la résistance des pesticides à la dégradation (Bollag, 1974). Enfin, une solubilité plus élevée dans l'eau rend les pesticides plus

biodisponibles pour les micro-organismes, facilitant leur dégradation (**Tableau 2**) ([Kaur et al., 2023](#)).

Tableau 2 - Influence des propriétés d'un pesticides sur sa biodégradabilité ([Gavrilescu, 2005](#))

Property	Degradability	
	More easily	Less easily
Solubility in water	Soluble in water	Insoluble in water
Size	Relatively small	Relatively large
Functional group substitutions	Fewer functional groups	Many functional groups
Compound more oxidized	In reduced environment	In oxidized environment
Compound more reduced	In oxidized environment	In reduced environment
Created	biologically	chemically by man
Aliphatics	Aliphatic up to 10 C-chains Straight chains Aromatic compounds with one or two nuclei	High molecular weight alkanes Branched chains Polyaromatic hydrocarbons
Substitution on aromatic rings	-OH, -COOH, -CHO, -CO -OCH ₃ , -CH ₃	-F, -Cl, -NO ₂ -CF ₃ , -SO ₃ H, -NH ₂
Substitutions on organic molecules	Alcohols, aldehydes, acids, esters, amides, amino acids	Alkanes, olefins, ethers, ketones, dicarboxylic acids, nitriles, amines, chloroalkanes
Substitution position	<i>p</i> -Position <i>o</i> - or <i>p</i> -Disubstituted phenols	<i>m</i> - or <i>o</i> -Position <i>m</i> -Disubstituted phenols

2.3 Les biofiltres

Les biofiltres (biobeds en anglais) sont des systèmes originaires de Suède et développés dans les années 1990 ([Mussali-Galante et al., 2023](#)). Au fil du temps, des systèmes basés sur le même principe se sont développés dans d'autres pays. En Belgique il existe le biofiltre en tant que tel ainsi que le phytobac ([Castillo et al., 2008b](#)). Ces systèmes s'adaptent aux pratiques agronomiques, aux conditions climatiques et à la disponibilité des substrats organiques du pays où ils sont développés ([Coppola et al., 2013](#)).

Les biofiltres sont des dispositifs peu coûteux (500 à 1000 euros) qui permettent de traiter des effluents contenant des pesticides et ainsi minimiser les risques de contamination ([Beernaerts et al, 2004](#) ; [Coppola et al., 2013](#) ; [Pigeon et al., 2005](#)). En effet, dans de nombreuses situations, la contamination des eaux survient lors de la manipulation ponctuelle des pesticides pour remplir ou rincer un pulvérisateur ([Spanoghe et al., 2004](#)). Le principe est de faire passer les eaux de rinçage dans une série d'unités dans lesquelles les pesticides seront progressivement dégradés par les micro-organismes naturellement présents ([Castillo et al., 2008a](#)). En Belgique, les premiers essais pilotes de biofiltres ont débuté en 2002 ([Pigeon et al., 2005](#)).

Dans le système originel issu de la Suède, le biobed est formé de trois couches (de haut en bas) (**Figure 2**) : une première couche d'herbe, ensuite, une couche mixte composée de paille (50%), de sol (25%) et de tourbe (25%), et enfin une couche d'argile dans la partie inférieure. L'argile, grâce à sa faible perméabilité, permet d'augmenter le temps de rétention des pesticides dans le biobed, prolongeant ainsi la durée de la bioremédiation. Il faut distinguer les biobeds naturellement imperméables grâce à cette couche d'argile, de ceux où une couche synthétique est ajoutée pour renforcer l'imperméabilité (Castillo *et al.*, 2008b).

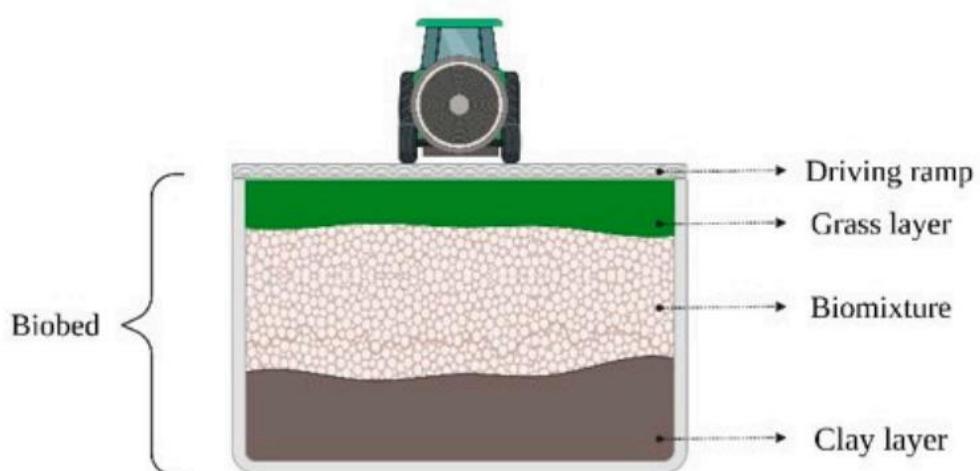


Figure 2 - Biobed suédois (Mussali-Galante *et al.*, 2023)

Le biofiltre en Belgique est composé, comme le montre la **figure 3**, de 2 à 3 unités de 1 m³ superposées, selon la quantité d'effluents à traiter. Ces unités sont installées à proximité d'une aire de rinçage ou de remplissage du pulvérisateur (Pussemier *et al.*, 2004 ; Pigeon *et al.*, 2005). Ces unités contiennent chacune un mélange composé de 50 % de paille hachée, 25 % de sol arable et 25 % de tourbe ou de matériau composté.

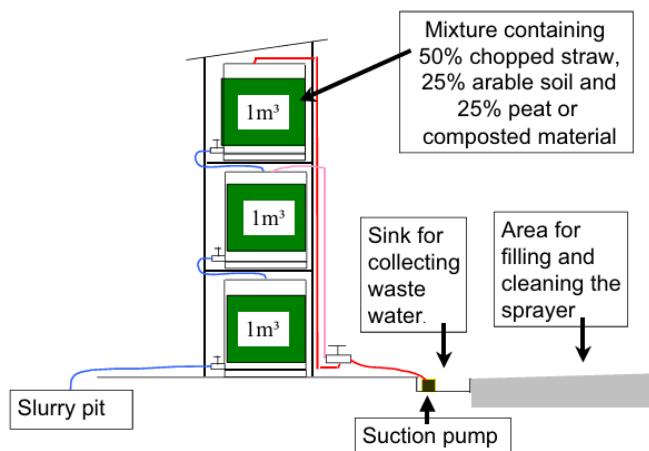


Figure 3 - Représentation schématique d'un biofiltre (Pussemier *et al*, 2004)

L'eau est d'abord stockée dans une citerne, puis, à l'aide d'une pompe, elle est acheminée vers l'unité la plus haute du biofiltre et passe d'une unité à l'autre en environ un jour (Pigeon *et al.*, 2005). Les effluents de ces biofiltres sont soit stockés avec le lisier ou le fumier pour être épandus sur les prairies, soit directement épandus (Beernaerts *et al.*, 2004).

Le substrat du biofiltre est habituellement composé d'un mélange homogène de paille hachée, de sol local et de tourbe ou de compost. Pour maintenir son efficacité, des matériaux frais doivent être ajoutés chaque année pour remplacer la matière perdue ([Castillo et al., 2008b](#)).

La composition de la biomixture est un facteur clé dans l'efficacité de la dégradation des pesticides. Chaque composant joue un rôle spécifique :

- La paille constitue le principal substrat pour l'activité microbienne, ce qui justifie sa présence majoritaire (50 %). En tant que substrat lignocellulosique, elle agit comme un adsorbant pour les pesticides, et constitue un support pour les communautés microbiennes, fournit des nutriments essentiels et stimule la production d'enzymes ligninolytiques (laccases et peroxydases) particulièrement efficaces dans la dégradation des pesticides ([Castillo et al., 2008a](#)).
- Le sol renforce la capacité d'adsorption du mélange, apporte une source importante de matière organique et introduit des micro-organismes capables de dégrader les pesticides endémiques ([Mussali-Galante et al., 2023](#)).
- La tourbe ou le compost jouent un rôle essentiel dans la rétention des pesticides, la régulation de l'humidité et la réduction du pH, un facteur favorable à la dissipation des pesticides ([Mussali-Galante et al., 2023](#)).

Comme le montrent [Pigeon et al., \(2006\)](#), les biofiltres sont des systèmes efficaces permettant de diminuer la quantité de pesticides dans les effluents. La rétention des substances actives atteint plus de 90 % pour la majorité des pesticides étudiés principalement dû à la biomixture. Concernant le substrat, une diminution des résidus y est également observée. Ce processus est attribué à l'activité des micro-organismes.

2.4 La bioremédiation

2.4.1 Solutions appliquées

La bioremédiation à partir de micro-organismes peut être réalisée de différentes manières pour dégrader les pesticides présents dans le sol après leur application (**Figure 4**).

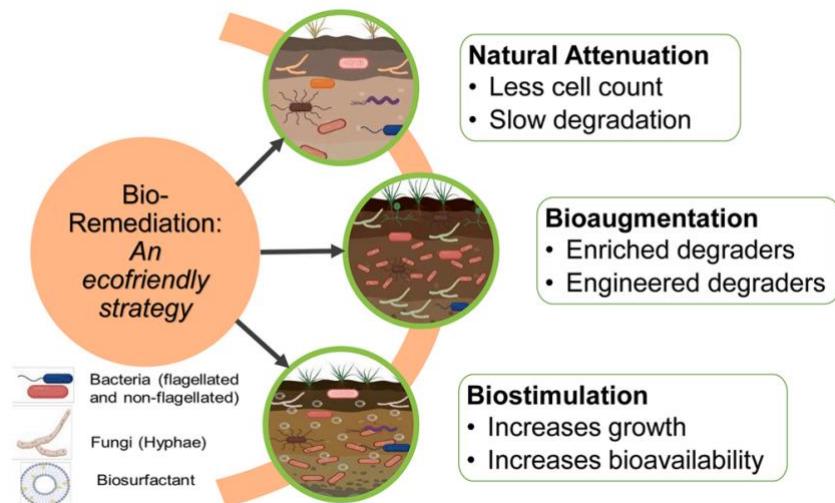


Figure 4 - Les différentes solutions applicables en bioremédiation (Bokade et al., 2023)

Il existe l'atténuation naturelle qui consiste à laisser les microorganismes (présents naturellement dans le sol) dégrader les pesticides sans intervention humaine. La seconde solution est la bio-augmentation dans laquelle des micro-organismes spécifiques sont introduits afin d'augmenter la biodégradation des substances d'intérêt (Scow et al., 2005). La dernière solution est la biostimulation dans laquelle une accélération de la biodégradation a lieu grâce à l'ajout de nutriments pour stimuler les populations endémiques (Bokade et al., 2023).

Cependant, de nombreux facteurs extérieurs peuvent entraîner un échec de la bio-augmentation et de la bio-atténuation, ce qui mène à de grandes différences entre les essais en laboratoire et les applications sur le terrain (Tyagi et al., 2011). Ces stratégies dépendent étroitement des interactions avec la microflore indigène ou les prédateurs microbiens présents dans le sol, qui peuvent limiter la survie et l'activité des micro-organismes introduits (Adams et al., 2015). Par ailleurs, l'hétérogénéité du sol, avec ses variations de pH, d'humidité ou de structure, peut fortement limiter l'efficacité des traitements biologiques. Pour rester performantes, les stratégies de bioremédiation doivent s'adapter aux conditions changeantes de l'environnement (Kuppan et al., 2024).

2.4.2 Avantages et inconvénients de la bioremédiation

La bioremédiation présente plusieurs avantages, notamment le fait qu'elle repose sur des processus biologiques. Elle est également capable de traiter une large gamme de contaminants, transformant des substances dangereuses en composés potentiellement moins nuisibles. Un autre atout majeur est son coût relativement faible. Comme elle est issue de mécanismes naturels, cela la rend moins chère que d'autres méthodes de décontamination (Chawla et al., 2013).

Cependant, la bioremédiation comporte aussi des inconvénients. Tout d'abord, il existe le risque que la dégradation de certaines molécules produise des métabolites plus toxiques que la substance mère, lesquels peuvent ensuite persister dans le sol ou être lixivierés vers les nappes (Chawla et al., 2013). Par ailleurs, c'est un processus long, dont l'efficacité dépend beaucoup des conditions du site. De plus, même si elle fonctionne bien en laboratoire, son application sur le terrain en conditions réelles est compliquée en raison des interactions imprévisibles. Par

exemple, les micro-organismes introduits peuvent ne pas survivre dans le sol où ils sont ensemencés. Enfin, l'impact sur l'écosystème à long terme reste difficile à prédire (Vlaiculescu et al., 2022).

2.5 Pesticides sélectionnés dans cette étude

Dans cette étude, quatre exploitations agricoles équipées de biofiltres ont été visitées et le choix des pesticides analysés a principalement été basé sur ceux utilisés dans ces exploitations. Lorsque les informations étaient disponibles, l'historique des applications de pesticides dans les biofiltres a été pris en compte afin de mieux cibler les substances à étudier et de maximiser les chances de trouver des micro-organismes capables de les dégrader. Les formulations commerciales contenant les substances actives ciblées ont été prélevées directement dans les exploitations agricoles, en fonction des disponibilités sur place. Ces visites ont permis d'identifier neuf pesticides utilisés sur le terrain : Target SC (métamitron), Powertwin (éthofumésate et phenmédiphame), MonsonnTC max Active (foramsulfuron et thiencarbozone-méthyl), Temsa (mésotrione), KomboSC (métamitron), Venzar 500SC (lénacil), Infinito (fluopicolide et propamocarbe-chlorhydrate), Garlon Super (triclopyr et aminopyralide), Kesuro (métamitrone et quinmérac).

Parmi cette liste initiale de neuf pesticides, deux seulement ont été retenus pour les essais, en fonction de plusieurs critères. La sélection a pris en compte la nature des métabolites connus, la persistance des substances dans l'environnement (estimée notamment par le temps de demi-vie, DT₅₀), leur impact potentiel sur la santé, ainsi que leur mobilité (K_{oc}). Le type de culture concerné, ainsi que la fréquence et la proportion d'utilisation des pesticides, ont également été des facteurs déterminants. En effet, un pesticide largement utilisé présente un intérêt particulier pour l'étude des processus de biodégradation. Par exemple, en 2020, la culture de betteraves représentait la troisième culture la plus importante en Belgique (Statistiques, 27 février 2025), orientant ainsi l'étude vers des pesticides couramment appliqués sur ce type de culture. C'est pourquoi, dans cette étude, le lénacil et le métamitron ont été sélectionnés.

2.5.1 Métamitron

Le métamitron (4-amino-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5-one) (**Figure 5**) est un herbicide appartenant à la famille des triazines, utilisé en pré- et post-émergence pour la protection des cultures telles que la betterave sucrière. Il agit comme un inhibiteur de la photosynthèse au niveau du photosystème II en bloquant le transfert d'électrons (Fang et al., 2016 ; Tadmor et al., 2021). En 2023, les ventes de métamitron en Belgique atteignaient 158 586 kg (Phytoweb, 2025), ce qui en fait le 3^{ème} herbicide le plus vendu. En Europe, l'utilisation du métamitron est autorisée jusqu'en 2026, avec une possibilité de renouvellement. À ce jour, il n'est pas classé comme candidat à la substitution (PPDB, 2024).

Le métamitron est considéré comme modérément à hautement mobile dans les sols (K_{oc} = 22.4-392mL/g) avec une persistance basse à modérée. Ce pesticide a un temps de demi-vie

qui varie entre 2,2 et 45,5 jours dans le sol à 20°C dans des conditions de laboratoire (EFSA, 2008).

Ce pesticide est toxique pour l'humain et présente également une écotoxicité importante notamment pour les milieux aquatiques (plantes, invertébrés et algues) (EFSA, 2008). Il est faiblement adsorbé aux particules du sol et à la matière organique, ce qui accroît son risque de lixiviation vers les eaux souterraines et de surfaces (Rosenbom *et al.*, 2015). Toutefois, lorsqu'il n'est pas entraîné vers les eaux souterraines, il est minéralisé (0.6% à 1.6% par jour) par l'action des micro-organismes du sol ainsi que par photodégradation (Wang *et al.*, 2017).

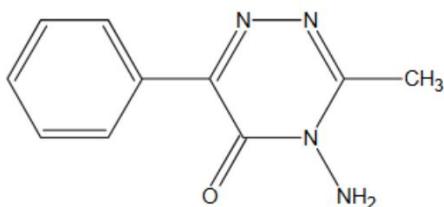


Figure 5 - Molécule du métamitron (EFSA, 2008)

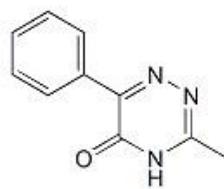


Figure 6 - Desamino-métamitron (EFSA, 2008)

Son principal métabolite est le déamino-métamitron (Figure 6), qui présente une mobilité légèrement inférieure à celle de la molécule mère (66-392mL/g) avec une persistance modérée. Ce métabolite n'est pas toxique pour l'homme mais bien pour l'environnement. Sa demi-vie en laboratoire est comprise entre 22,8 et 45,2 jours (EFSA, 2008). Des études utilisant du métamitron radiomarqué ont démontré que la minéralisation microbienne constitue le principal processus de transformation du composé (Wang *et al.*, 2017).

Deux principales voies de biodégradation du métamitron ont été mises en évidence, chacune étant associée à une souche bactérienne spécifique isolée du sol (Wang *et al.*, 2017). La première, appelée "voie du déamino-métamitron", est réalisée par *Arthrobacter sp. DSM 20389* (Engelhardt *et al.* 1982). La seconde, désignée sous le nom de "voie des *Rhodococcus*", est réalisée par *Rhodococcus sp. 0246b* (Figure 7) (Parekh *et al.*, 1994 ; Engelhardt *et al.*, 1982 ; Wang *et al.*, 2017). Ces bactéries gram-positives du phylum des Actinobacteria dégradent le métamitron grâce à des enzymes spécifiques telles que le métamitron 2,3-dioxygénase, le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-métamitron déshydrogénase, le 2,3-dihydroxymétamitron 1,2-dioxygénase, le métamitron amidohydrolase et le benzoylformate (Daniel Norat et Michael Turnbull, 2008). En outre, une autre souche, *Rhodococcus sp. MET*, a été identifiée et serait capable de métaboliser le métamitron par deux voies de dégradation distinctes (Figure 8) (Fang *et al.*, 2016). Les paramètres comme le pH, la température influencent la dégradation du métamitron comme le montre Fang *et al.*, 2016. En effet, la biodégradation est optimale entre 20 et 30°C et à pH 7. Un récapitulatif des souches connues pour la dégradation de ce pesticide ainsi que leur efficacité en milieu de culture et la source de leur isolement sont repris dans la tableau 3.

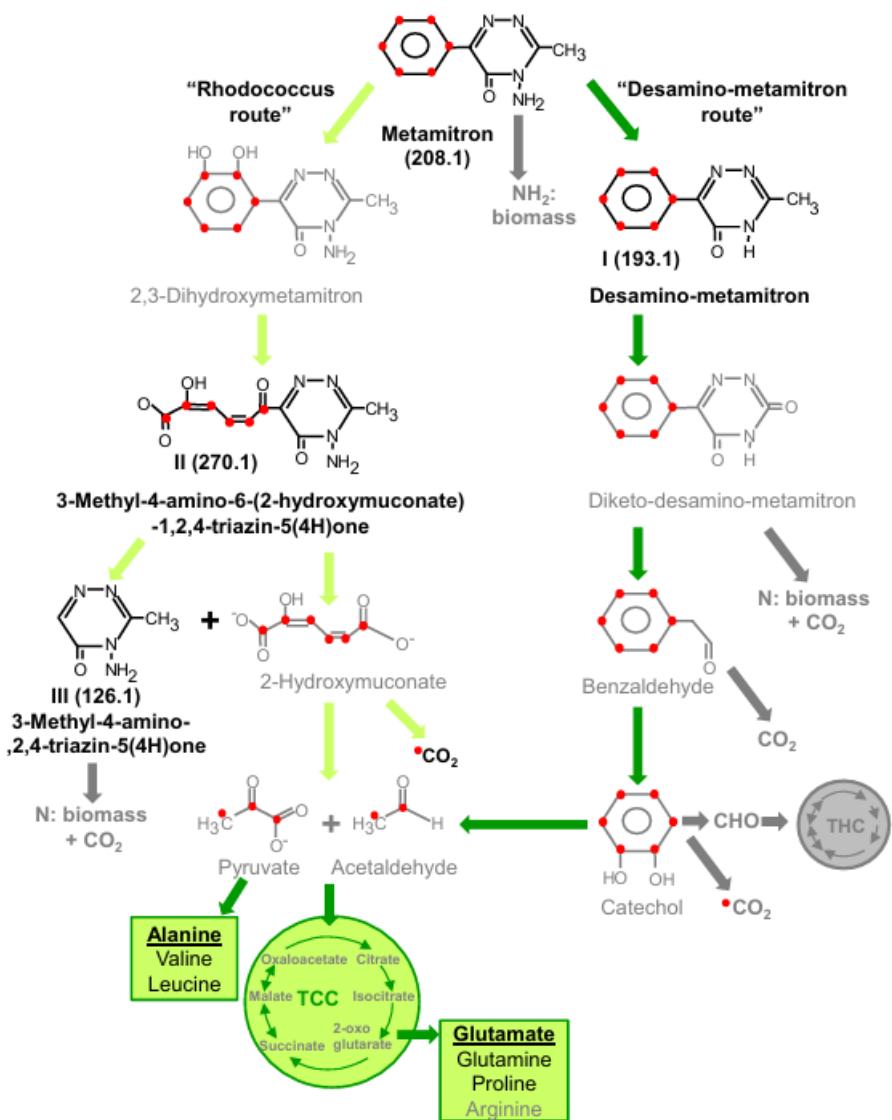


Figure 7 - Voie de dégradation biologique du métamitron dans le sol (Wang et al., 2017)

Tableau 3 - Souches dégradantes du métamitron connues dans la littérature

Souche	Type	Isolé à partir de	Dégredation	Source
<i>Arthrobacter</i> sp. DSM 20389	Bactérie	Sol	100% en 14 jours (80,8mg/L)	Engelhardt et al. (1982)
<i>Rhodococcus</i> sp. 0246b	Bactérie	Sol	100% en 5 jours (20mg/L)	Parekh et al. (1994)
<i>Rhodococcus</i> sp. MET	Bactérie	Boue activée	100% après 12h (10mg/L) 11% après 12h (100mg/L)	Fang et al. (2016)

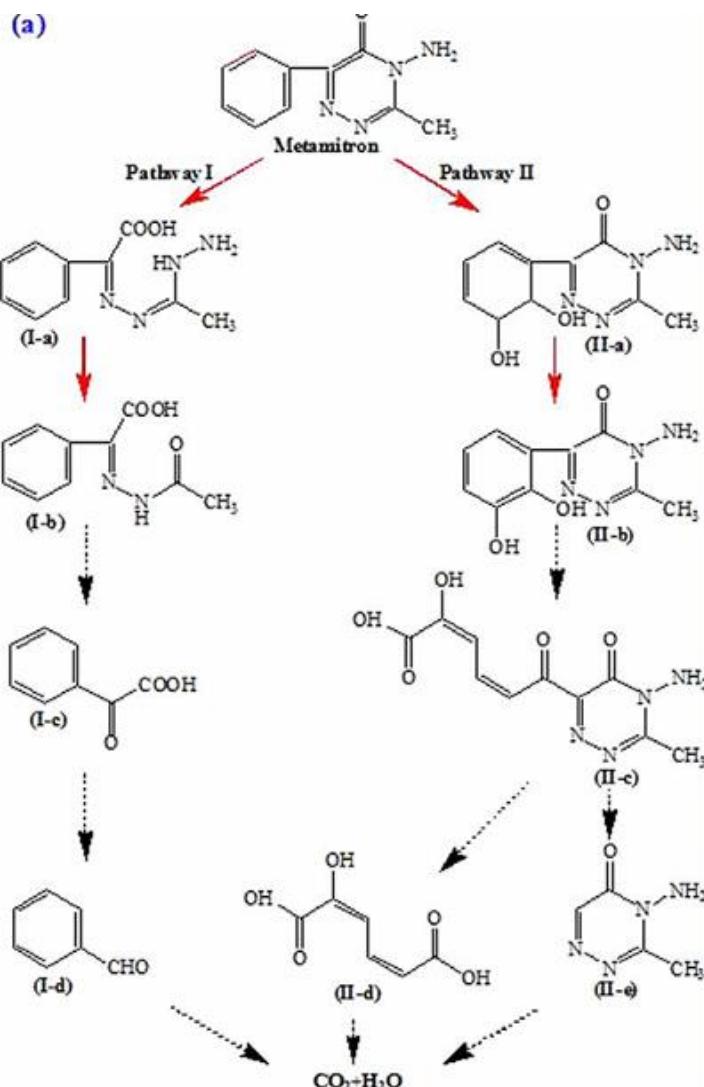


Figure 8 - Voie de dégradation biologique potentielle du métamitron (Fang et al., 2016)

Des recherches récentes suggèrent que ces souches ne sont probablement pas les seules à être impliquées dans la dégradation du métamitron. En effet, des bactéries gram-négatives pourraient jouer un rôle encore plus important dans ce processus. Une expérience en microcosme a révélé que, dans les jours suivant l'ajout de métamitron au sol, la biomasse des bactéries gram-négatives augmentait rapidement, surpassant celle des Actinobacteria. Cependant, après 8 à 16 jours, ces dernières accumulent une quantité significative de ^{13}C , issue de métamitron radiomarqué, suggérant qu'elles interviennent dans une seconde phase de dégradation. Ce phénomène indique que la dégradation du métamitron est un processus complexe impliquant des interactions et des relations de coopération entre dégradeurs primaires et consommateurs secondaires (Wang et al., 2021).

2.5.2 Lénacil

Le lénacil(3-cyclohexyl-1,5,6,7-tetrahydrocyclopenta[d]pyrimidine-2,4-dione) (**Figure 9**) est un herbicide de la famille des uraciles et un inhibiteur du photosystème II (Magnucka et al., 2014, Blein, 1983). Il est principalement utilisé en pré- et post-levée pour contrôler les adventices dans les cultures de betteraves sucrières et d'épinards (Roberts et al., 2007 ;

Kucharski *et al.*, 2011). En Belgique, les ventes de ce pesticide atteignaient 4 531 kg en 2023 (Phytoweb, 2025).

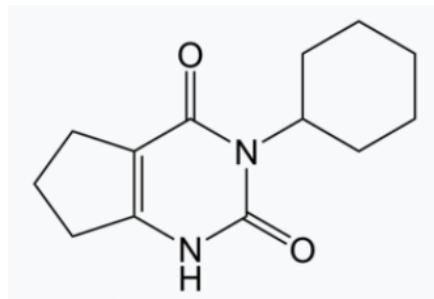


Figure 9 - Molécule du lénacil (Zhang *et al.*, 1999)

Le lénacil présente un DT₅₀ très variable allant de 32 à 125 jours ce qui est une persistance élevée (Kucharski *et al.*, 2011). Il est considéré comme modérément mobile avec un Koc de 75 à 254ml/g (PPDB, 2024). La toxicologie du lénacil est mal décrite dans la littérature ne permettant pas de conclure sur sa dangerosité pour l'homme et les animaux (EFSA, 2024).

Dans le sol, le lénacil présente une faible adsorption sur les particules d'argile, mais une plus grande affinité pour la matière organique augmentant sa persistance (Cuevas *et al.*, 2008). La désorption du lénacil est relativement élevée, ce qui augmente le risque de relargage dans le sol. Sur le plan environnemental, le lénacil subit une biodégradation lente mais significative, avec des phases de dissipation plus rapides lorsque les conditions d'humidité sont élevées. Comme le montre Elzakey *et al.* (2023), des résidus de lénacil ont été retrouvé dans des eaux du sous-sol analysés dans le nord de l'Egypte à une concentration de 0,721µg/L.

La dégradation du lénacil a été décrite par Zhang *et al.*, (1999), indiquant des métabolites différents en fonction du chemin de dégradation (sol, plantes ou irradiation) (Figure 10).

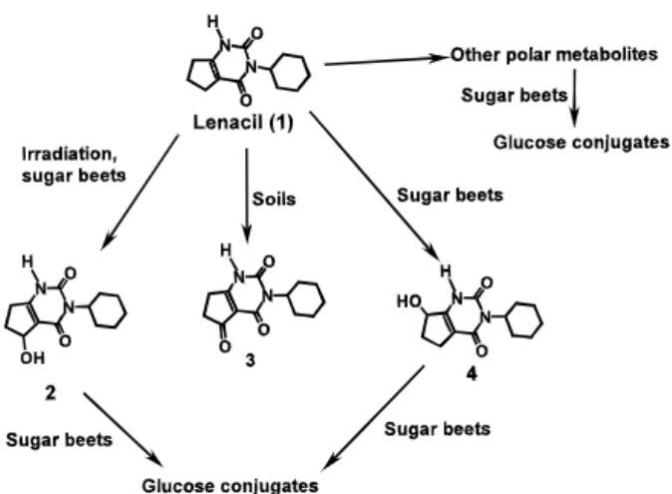


Figure 10 - Chemin de dégradation du lénacil dans l'environnement et les betteraves sucrières (Zhang *et al.*, 1999)

Certaines études montrent qu'une dégradation du lénacil se produit dans les biofiltres installés mais aucune souche ne semble encore avoir été isolée (De Vleeschouwer *et al.*, 2006). L'étude de sa dégradation et de son potentiel de bioremédiation est donc novatrice.

3. Matériels et méthodes

3.1 Sources environnementales de microorganismes : sites et procédure d'échantillonnage

Les différents biofiltres ont été échantillonnés en Belgique, le 19 février 2025 pour les points 1, 2 et 3, tandis que le point 4 a été prélevé le 20 février 2025. Le premier site d'échantillonnage est situé à Strée le deuxième site à à Braives, le troisième site à Gembloux et le quatrième à Lamain. A Lamain, en plus des échantillons prélevés dans le biofiltre, un échantillon d'eau a été prélevé dans la citerne qui récupère les eaux de rinçage avant leur passage dans le biofiltre. La **figure 11** localise les différents sites de prélèvements en Wallonie.

Tous les biofiltres étaient en hivernage au moment de l'échantillonnage, c'est-à-dire qu'aucun ajout de pesticides n'avait eu lieu durant l'hiver, les derniers ajouts datant de la saison précédente.

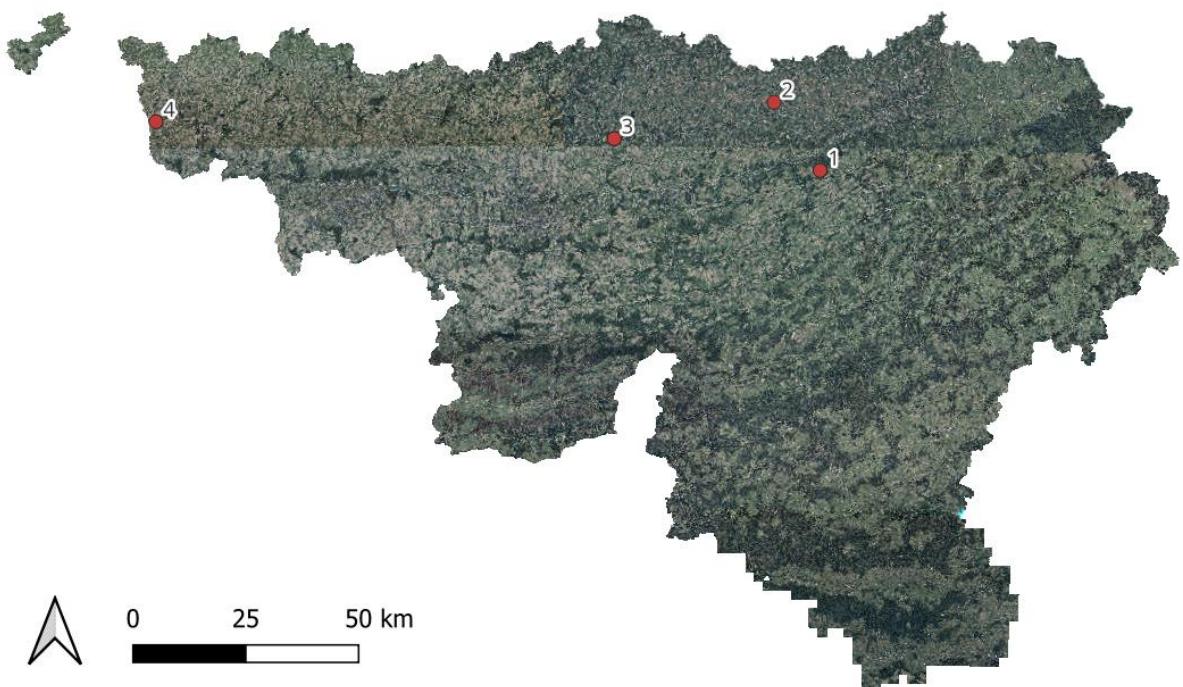


Figure 11 - Localisation des trois biofiltres échantillonnés. 1 : Strée, 2 : Braives, 3 : Gembloux, 4 : Lamain

Les biofiltres 1, 2 et 3 étaient composés de trois unités (de 1000L), tandis que le biofiltre 4 n'en comptait que deux. Pour des raisons de sécurité, les échantillons ont été prélevés uniquement dans les deux unités inférieures quand trois unités étaient présentes. Une tarière et

une pelle ont été utilisées, et nettoyées à l'alcool entre chaque prélèvement. Les échantillons ont été prélevé à quelques centimètres sous la surface car l'accessibilité ne permettait pas d'aller plus profondément. Ils ont été stockés dans des récipients en plastique fermés de 500mL remplis entièrement avant d'être stockés à 4°C et d'être utilisés le 26 février 2025. Pour les cultures d'épuisement, des échantillons de 15 grammes ont été préparés en combinant 7,5 grammes de substrat prélevés dans chacune des deux unités d'un même biofiltre.

Les biofiltres échantillonnés, construits entre le début des années 2000 et il y a une dizaine d'années, sont principalement composés d'un substrat mélangeant paille, sol et compost. Les exploitations échantillonnées possédaient des biofiltres typiques de ceux utilisés en Belgique (**figure 12**), souvent accompagnés d'une aire de rinçage, comme illustré sur la **figure 13**. Leurs caractéristiques et spécificités sont reprises dans le **tableau 4**.

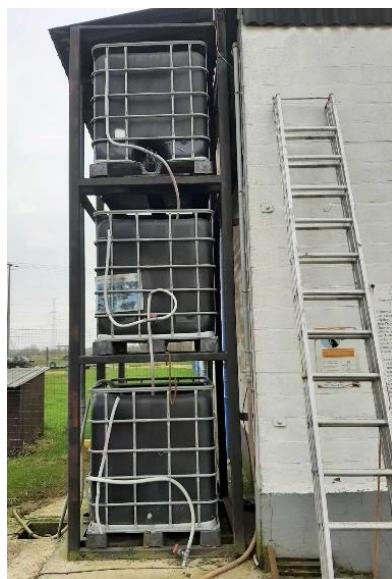


Figure 12 - Biofiltre de Strée



Figure 13 - Aire de rinçage de l'exploitation de Strée

Tableau 4 - Caractéristiques des biofiltres des exploitations visitées

Exploitation	Strée	Braives	Gembloux	Lamain
Cultures	Maïs (0,6 ha), betteraves (1,3 ha)	Céréales, betteraves	Verger (agriculture biologique)	Pommes de terre (70 ha), froment (15ha), épinards (25ha), betteraves (40ha)
Volume du biofiltre	3 x 1000L	3 x 1000L	3 x 1000L	2 x 1000L
Composition substrat	Paille, sol, compost	Paille, sol, compost	Non précisé	Paille, compost, sol
Renouvellement	Renouvelé il y a 2 ans	Renouvelé il y a 2 ans	Non précisé	Renouvelé il y a 2 ans

Fréquence d'apport	Rinçage du pulvérisateur après chaque utilisation	Rinçage lors du changement de culture (ex : céréales → betteraves)	Rinçage après chaque utilisation de cuivre, soufre, bicarbonate, Nimasal (bioinsecticide)	Rinçage élevée en haute saison (au moins 1 fois/semaine)
Liste des pesticides	Kesuro , Centium , Target SC, Temsa, Powertwin, Monsoon	Challenge, Centium, Pixxaro, Omnera, Arundo, Primus, Stomp Aqua, Defi	Sans pesticides de synthèse	Kumbo SC, Venzar 500 SC, Infinito, Garlon Super,

3.2 Milieux et produits chimiques

Le MM (milieu minimum) utilisé pour les différentes cultures est le milieu décrit dans [Dhommée, 2024](#). La préparation de 1 litre de milieu minimum se trouve en **annexe 1**. Pour le milieu minimum solide, le même protocole est appliqué en ajoutant 9 g/L d'agar VWR® dans l'eau avant sa stérilisation.

Un milieu solide Lysogeny Broth (LB) a été utilisé pour la culture et la caractérisation morphologique des souches isolées. Il a été préparé avec 25 g/L de LB Broth (Miller) Sigma®, de l'agar VWR® à 9 g/L et de l'eau distillée, puis autoclavé pendant 20 minutes à 120°C.

L'Agar de Dextrose de Pomme de Terre solide (*potatoes dextrose agar*, PDA) a été utilisé pour la culture et la caractérisation morphologique des champignons isolés. Il a été préparé avec 39 g/L d'Agar de Dextrose de Pomme de Terre (Alliance Bio Expertise) et de l'eau distillée, puis autoclavé pendant 20 minutes à 120°C.

Afin de ne pas endommager le pesticide, celui-ci est ajouté après la stérilisation du milieu lorsque celui-ci était à température ambiante et le volume adéquat de pesticide a été ajoutée pour atteindre la concentration recherchée.

Les formulations commerciales utilisées dans les différents milieux ont été prélevées dans l'exploitation située à Lamain. Le pesticide à base de métamitron est Kombo SC (ADAMA), qui contient 700 g/L (57,9 % p/p), tandis que celui à base de lénacil est Venzar 500 SC (FMC), contenant 500 g/L. Les deux formulations commerciales contiennent également du 1,2-Benzothiazolin-3-one comme composé additionnel et n'ont pas d'autres molécules de pesticides dans leurs compositions.

Les solutions standards de Metamitron PESTANAL® et de Lenacil PESTANAL®, d'une pureté ≥ 98 %, ont été achetées chez Merck.

3.3 Culture d'épuisement, sélection et isolement des souches

L'épuisement des souches dégradantes a été réalisé sur la base du protocole décrit dans le travail de [Guillaume \(2021\)](#), avec quelques ajustements nécessaires pour nos expérimentations. Pour la première inoculation, 15 g de sol frais (mélange composite de 7,5g de chaque unité échantillonnée par exploitation) ont été ajoutés dans un Erlenmeyer stérile contenant 135 mL de MM. L'herbicide (seule source de carbone pour les microorganismes) a été ajouté à une concentration finale de 10 mg/L pour le métamitron et de 1 mg/L pour le lénacil.

Les cinq sources environnementales échantillonnées ont été testées avec le métamitron, tandis que seules les deux sources issues de Lamain (eau + substrat) ont été testées avec le lénacil. Les Erlenmeyers ont ensuite été incubés à 28 °C, dans le noir, avec une agitation à 110 rpm afin d'éviter la sédimentation dans les cultures (**Figure 14**).

Lors de cette étape, plusieurs contrôles abiotiques ont été mis en place afin de valider les conditions expérimentales. Un premier contrôle ($n=1$), sans pesticide ni source environnementale, a été réalisé pour s'assurer que les conditions stériles étaient correctement respectées. Deux autres contrôles ($n=1$) contenaient du pesticide (un avec le métamitron et un avec le lénacil) mais aucune source environnementale, ce qui permettait de vérifier qu'aucune contamination issues des pesticides n'intervenait. Cinq contrôles biotiques ont été effectués (un par source environnementale ($n=1$)), en milieu minimum (MM) sans ajout de pesticide, afin de vérifier que la croissance microbienne observée dans les cultures d'acclimatation était bien induite par la présence du pesticide.

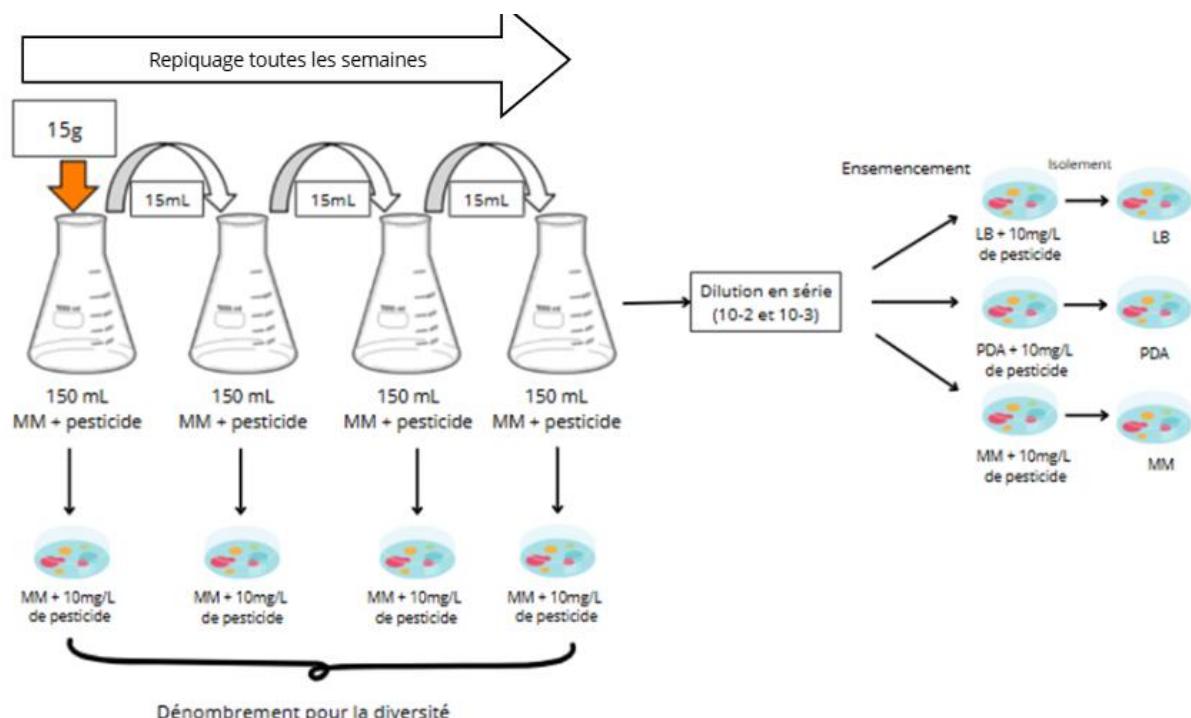


Figure 14 - Etapes des cultures d'épuisement réalisées

Après 7 jours d'incubation, 15 mL de chaque culture ont été repiqués dans 135 mL de MM frais, dans les mêmes conditions d'incubation et à la même concentration de pesticide qu'initialement. Quatre repiquages ont été réalisés successivement de la même manière tous les 7 jours (**Figure 14**).

A chaque repiquage, 100 µL de la culture (diluée de 10^{-2} à 10^{-3} fois) étaient également étalés sur boîte de Pétri contenant du MM solide, et la même concentration de pesticide que le milieu liquide. Ces boîtes ont été incubées pendant 48 heures à 28 °C dans l'obscurité afin d'évaluer l'abondance microbienne.

À la fin du 4^{ème} enrichissement, 1 mL des cultures a été conservé à -80 °C dans une solution à 30% de glycérol pour préserver les souches. Les colonies présentant une forte croissance et des morphologies distinctes ont été isolées avec la méthode des stries sur milieux solides PDA et LB (contenant du pesticide à la même concentration que les cultures liquides), puis incubées 48 heures à 28 °C dans l'obscurité.

3.4 Test de la dégradation en milieu liquide par les souches isolées

Un premier *screening* général (test de présélection) a été réalisé afin d'évaluer le pouvoir de dégradation de l'herbicide par les trente et une souches isolées à la fin du quatrième cycle de culture d'épuisement. L'essai a été conduit en milieu minimum (MM) dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 20 mL de MM supplémenté en herbicide à une concentration de 10 mg/L. Les souches ont été inoculées à une concentration cellulaire similaire (UFC/mL), ajustées en mesurant la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀). Chaque suspension cellulaire a été préparée pour atteindre une DO₆₀₀ de $0,160 \pm 0,02$ avant inoculation. Une seule répétition a été effectuée par souche (n = 1). Pour ce test de dégradation en milieu liquide, un prélèvement a été fait après 0 et 14 jours de culture pour le témoin (sans bactérie) et uniquement après 14 jours dans les cultures inoculées avec les différentes souches.

Les prélèvements ont été centrifugés et le surnageant a été récupéré. Afin d'évaluer la dégradation de l'herbicide, le surnageant a été analysé à l'aide d'un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) Agilent 1260 Series couplé à un détecteur à barrette de diodes (DAD) aux longueurs d'onde de 310 nm pour le métamitron et de 254 nm pour le lénacil. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 100 mm, taille de particule 4 µm) maintenue à 40°C. Le volume d'injection était de 10 µL. La phase mobile A était constituée d'eau contenant 0,1 % d'acide phosphorique (H₃PO₄), tandis que la phase mobile B était constituée d'acetonitrile avec 0,1 % d'acide phosphorique. Le débit de la phase mobile était de 0,8 mL/min. Le gradient d'élution a débuté à 10 % de phase B à 0 min, augmenté jusqu'à 60 % à 10 min, puis à 100 % à 15 min, et a été maintenu à 100 % jusqu'à 20 min. La détection a été effectuée à 254 nm et 310 nm. Le temps de rétention attendu est de 5.91 min pour le métamitron et 9.05 min pour le lénacil et a été déterminé par le passage de la solution standard. La méthode adoptée s'inspire de celles décrites par [Padmavathi et al. \(2016\)](#) pour le métamitron, et par [Silvestri et al. \(1997\)](#) pour le lénacil, et a été adaptée. Le développement et l'optimisation de cette méthode ont été

réalisés en collaboration avec l'équipe de chimie (équipe de Marie-Laure Fauconnier), permettant ainsi la mise en place d'un protocole de dosage.

Pour la préparation de la solution standard du métamitron, 5 mg Metamitron PESTANAL® ont été pesés et dissous dans 20 ml de solvant (méthanol et eau en rapport 50%). Tandis que pour le lénacil, le solvant est composé d'acetonitrile et d'eau en rapport 80%/20%. La solution est ensuite agitée avec un barreau magnétique 2h à température ambiante dans le noir. Ces solutions standards ont été utilisées pour établir les droites de calibration du métamitron et du lénacil (**Annexe 2**). Ces droites permettent de convertir l'aire mesurée lors de l'analyse HPLC en concentration du pesticide ciblé. En revanche, pour l'analyse des métabolites, seule une approximation de l'aire sous la courbe a été utilisée, faute de droites de calibration spécifiques permettant la conversion en concentration.

Une fois l'analyse HPLC faite, les souches ayant une concentration résiduelle inférieure à 1mg/L ont été conservées à -80 °C dans une solution à 30% de glycérol afin d'être utilisées pour la suite des expérimentations.

3.5 Suivi journalier et caractérisation de la cinétique de dégradation des pesticides par les souches pures d'intérêt

Avec les trois souches d'intérêt sélectionnées sur la base de leur taux de dégradation lors du test précédent en milieu liquide, ainsi que de leur capacité à se développer dans différents milieux, la première étape du suivi journalier a consisté à les inoculer de manière homogène, afin de garantir la comparabilité entre les souches et d'assurer la reproductibilité des résultats. Pour cela, une colonie unique a été prélevée par raclage d'une boîte de Petri. La suspension obtenue a été homogénéisée dans 2mL de milieu minimum.

La concentration cellulaire de la suspension a été estimée à l'aide d'une cellule de Bürker. Un volume de 75 µL de suspension a été déposé dans la cellule, puis les bactéries contenues dans dix cases ont été comptées (cinq de chaque côté de la rainure), permettant de calculer la concentration en cellules par millilitre. Cette concentration a ensuite servi pour déterminer le volume d'inoculum à ajouter dans chaque condition expérimentale, à l'aide de la formule présentée ci-dessous :

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Avec :

$$C_1 = \frac{\text{moyenne des cellules comptées} * 25 * 10^4}{\text{Facteur de dilution}}$$

L'objectif était d'atteindre une concentration finale (C2) de 10^{-6} cellules/mL dans le milieu. Chaque volume d'inoculum calculé a été ajouté à 35 mL (V2) de milieu minimum contenant 50 mg/L d'herbicide. Les expériences ont été réalisées en triplicats pour chaque souche.

La souche *Arthrobacter* sp. DSM 20389, reconnue pour sa capacité à dégrader le métamitron ([Engelhardt et al., 1982](#)), a été achetée auprès du Leibniz-Institut DSMZ – *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (Brunswick, Allemagne). Elle a été intégrée à l'étude comme référentiel pour la cinétique de dégradation du métamitron.

En parallèle, un contrôle biotique a été mis en place en inoculant *Escherichia coli* LMG 21756 dans les mêmes conditions. Cette souche, supposée incapable de métaboliser le métamitron, a permis de vérifier que toute dégradation observée n'était pas due à l'unique présence d'un micro-organisme. Enfin, un contrôle abiotique a également été mis en place, dans lequel aucune souche n'a été inoculée afin de voir la proportion de pesticide qui se dégrade de manière abiotique. Toutes les modalités ont été incubées dans une étuve à 28 °C, à 110 rpm, dans l'obscurité.

Un suivi quotidien des cultures a ensuite été réalisé pour évaluer la croissance bactérienne et le devenir de l'herbicide. Trois mesures ont été effectuées chaque jour pendant une semaine, puis tous les deux jours jusqu'au quatorzième jour :

- La densité optique à 600 nm, afin de suivre la croissance cellulaire ;
- Le pH du milieu, pour détecter d'éventuelles modifications liées à l'activité bactérienne, mais aussi pour déterminer si la dégradation n'est pas liée à une hausse du pH. En effet, à pH 9 le métamitron et le lénacil sont instables ce qui favorise une dégradation abiotique ([Fang et al., 2016](#), [Zhang et al., 1999](#))
- Un prélèvement de 1 mL de culture, destiné aux analyses HPLC afin de suivre la cinétique de dégradation du pesticide.

L'échantillon destiné à l'analyse HPLC (partie 3.4) a été centrifugé après prélèvement afin de séparer les cellules du surnageant.

3.6 Identification moléculaire des souches bactériennes

3.6.1 Extraction, amplification et identification des souches par séquençage du gène 16S rDNA

L'identification moléculaire des souches bactériennes a été réalisée par séquençage du gène codant l'ARN ribosomique 16S. L'ADN a été extrait à l'aide du kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), selon le protocole fourni du fabricant. Les culots des cultures, prélevés après 48 heures d'incubation en milieu LB, ont été incubés avec le tampon AP1 et la RNase A pour permettre la lyse cellulaire et l'élimination de l'ARN. Le tampon P3 a ensuite été ajouté pour précipiter les protéines et autres contaminants. L'ADN a été purifié sur colonne, lavé, puis élué dans un tampon approprié.

Une PCR (*Polymerase Chaine Reaction*) a ensuite été effectuée pour amplifier le gène 16S. La PCR a été réalisée à partir d'un volume de 50 µL en suivant les étapes suivantes et contenant :

- 2µL de l'amorce 16S A1 (5'-AGAGTTGATCMTGGCTC AG-3') ([Stouvenakers et al., 2023](#)).
- 2µL de l'amorce 16S B1 (5'-TACGGYTACCTT GTTACGACTT-3') ([Stouvenakers et al., 2023](#)).
- 25µL de GoTaq® G2 Green Master Mix 2X (Promega),
- 21µL d'ADN des souches à identifier

Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur BIO-RAD T100™, avec les conditions thermiques du **tableau 5**.

Tableau 5 - Cycle temps et température pour la réalisation de la PCR

	Cycle	Température	Temps
Dénaturation initiale	1	94°C	2 min
Dénaturation		94°C	1 min
Hybridation	30	52°C	1 min
Élongation		70°C	2 min
Élongation finale	1	72°C	10 min
Refroidissement	∞	12°C	/

La qualité de l'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel a été préparé en dissolvant 1 g d'agarose dans 100 mL de tampon 1X TAE auquel ont été ajoutés 1 µL de GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) pour 10mL de gel.

Ensuite, 10 µL de chaque échantillon d'ADN après PCR ont été déposés dans les puits du gel. Du côté gauche 5 µL de l'échelle de poids moléculaire O'GeneRuler 100 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™) ont été ajoutés. L'électrophorèse a été effectuée pendant 25 minutes avec le PowerPac Basic (BIO-RAD) à 200V et 350 mA.

La migration de l'ADN a été visualisée à l'aide du système Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ avec le logiciel Image Lab™

Une fois la visualisation correcte, les bandes dans le gels ont été découpées afin d'être purifiées à l'aide du Monarch® DNA Gel Extraction Kit, en suivant le protocole renseigné par le fournisseur. Une fois l'ADN purifié, celui-ci a été quantifié à l'aide du fluoromètre Promega Quantus™.

Enfin, le gène 16SA1 rDNA a été séquencé par la technologie Sanger par la société Eurofins Genomics. Les séquences brutes obtenues comprenaient les amores utilisées pour le séquençage. Afin d'obtenir les séquences cibles dépourvues d'amores, un script Python basé sur la bibliothèque BioPython a été utilisé pour détecter et retirer automatiquement ces amores. Les lectures en sens direct (*forward*) et inverse (*reverse*) pour chaque souche ont ensuite été

alignées sur leurs régions chevauchantes afin de générer une séquence consensus du gène 16S ciblé.

Les séquences consensus ont ensuite été comparées aux séquences de la base de données NCBI Nucleotide Collection à l'aide de l'outil BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dans la base de données standard afin d'identifier les souches.

3.6.2 Analyse phylogénétique des souches dégradantes

L'analyse phylogénétique a été réalisée dans l'environnement R (version 4.2.2, R Core Team, 2024) à partir des séquences d'ADN obtenues par séquençage du gène 16S rDNA. Les séquences ont tout d'abord été alignées par la méthode ClustalW, à l'aide du package msa (version 1.30.1). Elles ont ensuite été converties au format DNAStringSet via le package Biostrings, puis transformées en DNABin (package ape) afin de permettre le calcul d'une matrice de distances évolutives, basée sur le modèle de Kimura à deux paramètres (K80). À partir de cette matrice, un arbre phylogénétique a été construit selon la méthode Neighbor-Joining, via la fonction njs() (package ape). L'arbre a été enraciné avec la souche *Arthrobacter* DSM20389 utilisée comme groupe externe (outgroup).

3.7 Analyse statistique et représentation graphique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 4.2.2, R Core Team, 2024), afin de déterminer l'existence de différences significatives entre les modalités à partir des cinétiques de dégradation. La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et l'homogénéité des variances à l'aide du test de Levene. En cas de distribution normale et d'homogénéité des variances, une ANOVA à deux facteurs a été appliquée. Les comparaisons multiples ont été effectuées avec le test post-hoc de Tukey via la fonction emmeans(), en comparant les modalités globalement ainsi qu'à chaque niveau du facteur temps. Si les conditions de normalité n'étaient pas remplies, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé (fonction Krustal.test). Les comparaisons post-hoc ont alors été réalisées par le test de Dunn, avec correction de Bonferroni. Deux approches complémentaires ont été menées :

- une comparaison globale des modalités, indépendamment du facteur temps ;
- une comparaison des modalités à chaque niveau du facteur temps.

La visualisation des résultats a été réalisée dans l'environnement Spyder (version 5) sous Python 3.12.2, à l'aide des bibliothèques matplotlib.pyplot (pour les graphiques) et numpy (pour les traitements numériques).

3.8 Schéma récapitulatif des étapes réalisées

La **figure 15** illustre les différentes étapes du processus, depuis l'échantillonnage des biofiltres jusqu'à l'identification des souches bactériennes capables de dégrader les pesticides. Elle retrace de manière synthétique l'ensemble du protocole expérimental mis en œuvre, incluant l'isolement des micro-organismes, les tests de dégradation pour sélectionner les souches d'intérêt, la caractérisation de leur cinétique de dégradation et les méthodes d'identification de ces souches.

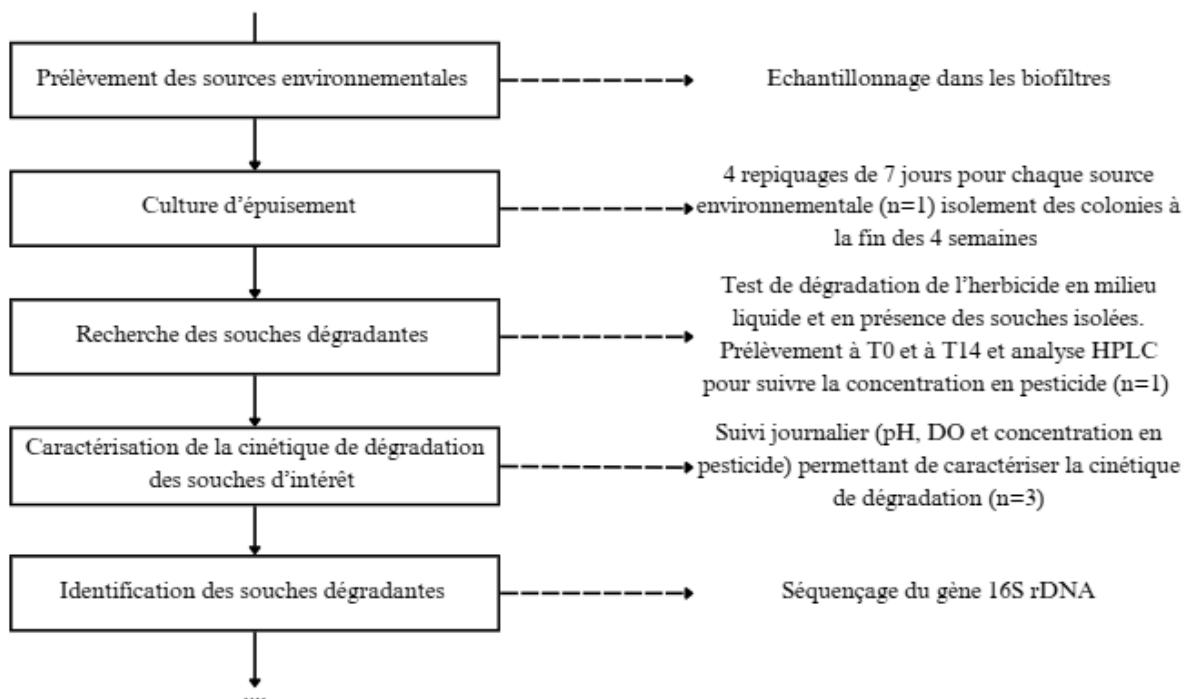


Figure 15 - Schéma récapitulatif des expérimentations réalisées pendant le TFE

4.Résultats

4.1 Culture d'épuisement et isolement des colonies

Des variations dans l'abondance de microorganismes capables de se développer ont été observées entre les différentes cultures d'épuisement. La **figure 16** présente l'abondance des colonies bactériennes (exprimée en UFC/mL) en fonction des repiquages et du temps de culture dans différents milieux de culture, avec ou sans pesticide, et avec diverses sources environnementales. Les résultats sont divisés en trois parties correspondant aux 3 conditions expérimentales (contrôles et les 2 pesticides).

Les contrôles, comprenant le milieu minimal seul ainsi que le MM supplémenté en métamitron, ne montrent aucune croissance microbienne lors des différents repiquages. Cela confirme le respect de la stérilité ainsi que la pureté microbiologique du pesticide commercial utilisé. En revanche, le MM supplémenté en lénacil révèle une présence importante de colonies dans chaque échantillon prélevé.

Dans la partie supérieure de la **figure 16**, représentant la croissance des différentes souches en milieu minimal (MM) sans pesticide, une diminution progressive du nombre de colonies au fil des repiquages semble se dessiner. Toutefois, cette tendance reste uniquement visuelle, car elle n'a pas pu être confirmée de manière statistique à partir des données. Cette tendance peut être visualisée également sur le graphique représentant le MM avec du lénacil. En revanche, dans le graphique central (MM + métamitron), aucune tendance claire ne semble apparaître.

Lors de certains repiquages, certaines cultures ne montrent plus de micro-organismes, tandis qu'au repiquage suivant, leur présence peut réapparaître, comme c'est le cas des cultures avec la source Strée entre les repiquages RII et RIII. Bien que les sources de Lamain proviennent du même dispositif (emplacements différents), leur abondance en micro-organismes est très variable et évolue de manière distincte au cours des repiquages.

Pour les différentes sources environnementales les milieux complémentés avec du métamitron semblent présenter une plus grande abondance microbienne à la fin du quatrième repiquage. Lors de chaque dénombrement, les cultures sans pesticide et avec lénacil semblent souvent présenter une abondance plus faible que les sources avec métamitron.

À la suite de ces quatre cultures successives d'épuisement, 31 colonies présentant des caractéristiques visuelles distinctes, suggérant une origine bactérienne, ont été isolées : 21 souches pour le métamitron et 10 pour le lénacil.

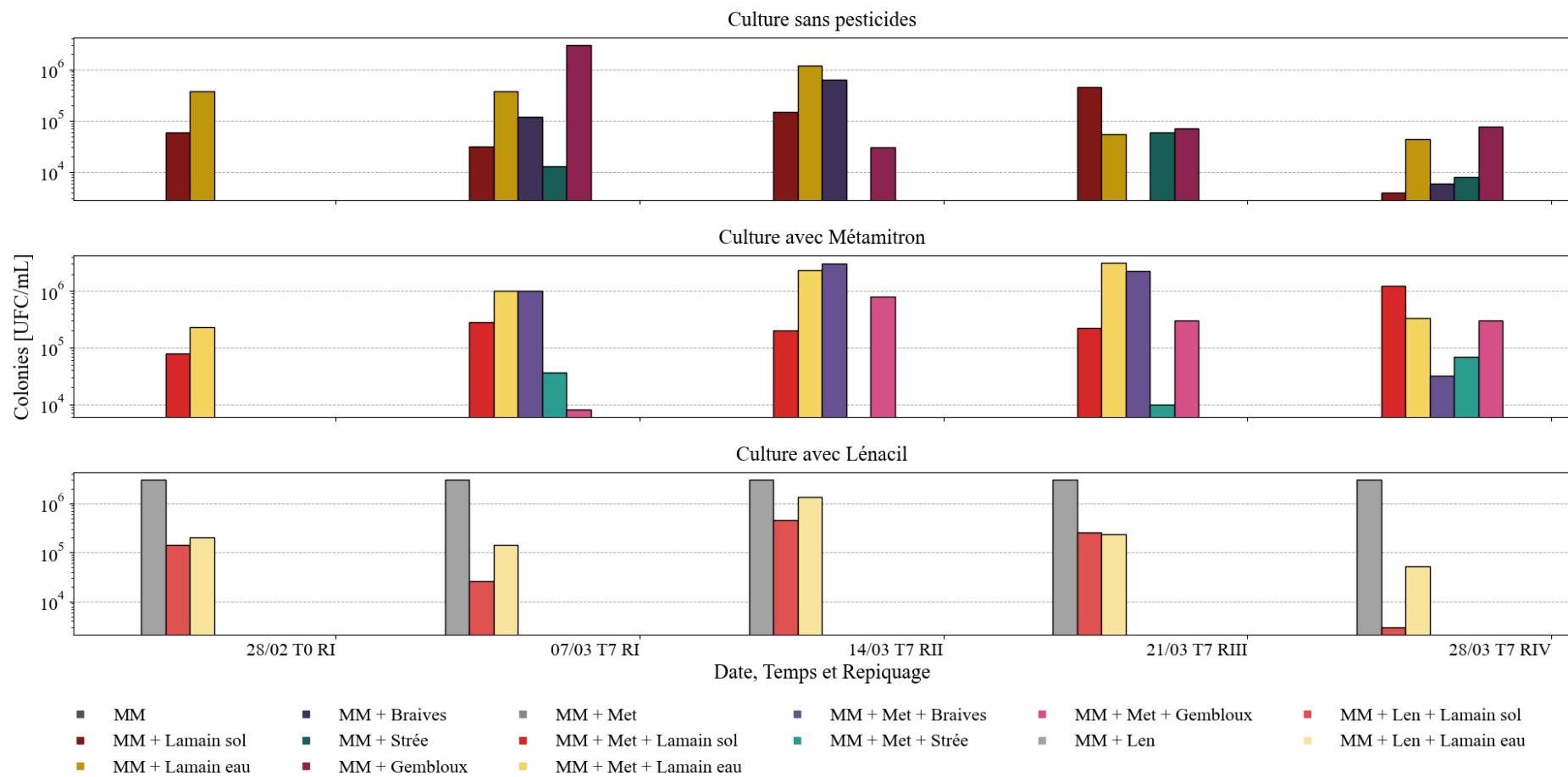


Figure 16 - Suivi de l'abondance des colonies des différentes modalités lors de la phase d'épuisement. ($n=1$). T0 = jour 0 , T7 = jour 7. RI : première semaine de repiquage, RII : deuxième, RIII : troisième, RIV : quatrième. Gradient de couleur pour les sources environnementales.
 Foncé : sans pesticide , vif : avec métamitron, pastel : avec lénacil

A la fin de la quatrième culture d'épuisement, une légère coloration rose est apparue pour les souches cultivées en présence de métamitron, à l'exception de la culture avec le biofiltre de Braives et du témoin qui sont restés incolores (**Figure 17**).

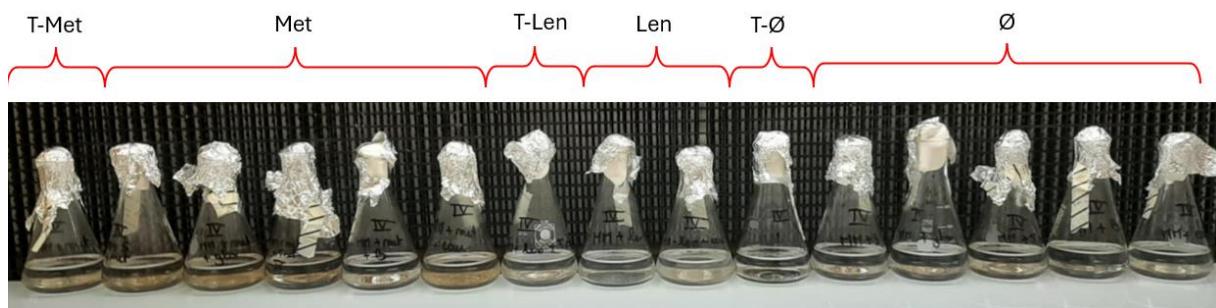


Figure 17 - Quatrième culture d'épuisement : T-Met : contrôle MM + métamitron ; Met : cultures + métamitron. T-Len : contrôle MM + lénacil ; Len : cultures + lenacil. T-Ø : contrôle MM sans pesticide; Ø : cultures sans pesticide.

4.2 Dégradation du métamitron et du lénacil par les souches pures

4.2.1 Métamitron

La **figure 18** présente les concentrations en métamitron mesurées au T0 et T14. En vert, la concentration à T0 et T14 du témoin qui permet d'évaluer la dégradation abiotique, qu'il faut prendre en compte pour l'analyse des résultats. En bleu, la concentration pour les différentes souches testées au T14. Les valeurs numériques indiquées au-dessus de chaque barre représentent les concentrations exactes mesurées au T14. Dans le témoin, la concentration passe de 11,6 mg/L à T0 à 8,7 mg/L à T14, soit une diminution de 2,9 mg/L.

Suite à ce test préliminaire, sept souches ont été sélectionnées pour la suite de l'étude : 7M, 8M, 10M, 13M, 28M, 29M et 30M. Bien que d'autres souches aient également montré une réduction de la concentration en métamitron, les sept cultures retenues se sont distinguées par une dégradation plus importante (concentration résiduelle inférieure à 1mg/L après 14 jours). En particulier, les souches 8M et 29M ont présenté une concentration résiduelle inférieure à la

limite de quantification de l'HPLC, suggérant une dégradation quasi complète de la substance active.

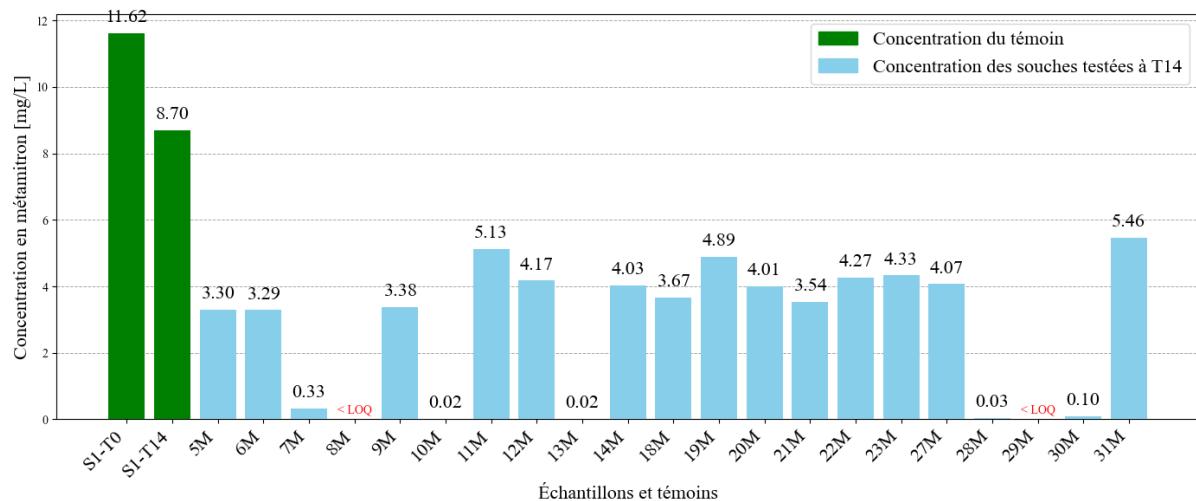


Figure 18 - Graphique de la concentration du métamitron des différentes souches testées au T0 et T14 (n=1)

Le **tableau 6** présente la provenance des différentes souches isolées. Il est à noter que toutes les souches issues du site de Lamain ne proviennent pas directement du biofiltre échantillonné, mais de l'eau prélevée dans la citerne de récupération des eaux de rinçage, en amont du passage par le biofiltre. En revanche, les autres souches sélectionnées proviennent bien de biofiltres.

Tableau 6 - Provenance des différentes souches sélectionnées

Souches	Localisation	Souches	Localisation
7M	Lamain (eau)	28M	Braives
8M	Gembloix	29M	Lamain (eau)
10M	Gembloix	30M	Lamain (eau)
13M	Braives		

Bien que sept souches aient initialement été sélectionnées pour la dégradation du métamitron, seules trois d'entre elles (8M, 29M et 30M) ont été retenues pour les tests finaux. Ce choix repose sur un critère de robustesse : les souches écartées n'ont pas montré de reprise de croissance satisfaisante, que ce soit sur des milieux courants comme LB ou PDA, en phase solide ou liquide, ou après leur conservation en glycérol.

4.2.2 Lénacil

La **figure 19** présente les concentrations en lénacil, selon les mêmes modalités que pour le métamitron : en vert, la concentration initiale du témoin (T0 et T14) et en bleu, les concentrations mesurées pour les différentes souches isolées après la culture d'épuisement. Contrairement au métamitron, aucune perte abiotique n'est observée ici : la concentration dans

le témoin à T14 est même légèrement plus élevée que celle mesurée au temps 0 (0.13mg/L supplémentaire).

Pour le lénacil, aucune souche n'a été conservée pour la suite des expérimentations, bien que les souches 3L et 26L présentent des concentrations inférieures à 4 mg/L à T14, ce qui représente une perte de plus de 1 mg/L par rapport au témoin. Ces concentrations restent toutefois supérieures au seuil de 1 mg/L fixé pour la sélection, justifiant leur exclusion de cette étude. Ces résultats indiquent que ces deux souches pourraient être potentiellement intéressantes pour de futurs essais. À noter que ces deux souches proviennent toutes deux du biofiltre de Lamain.

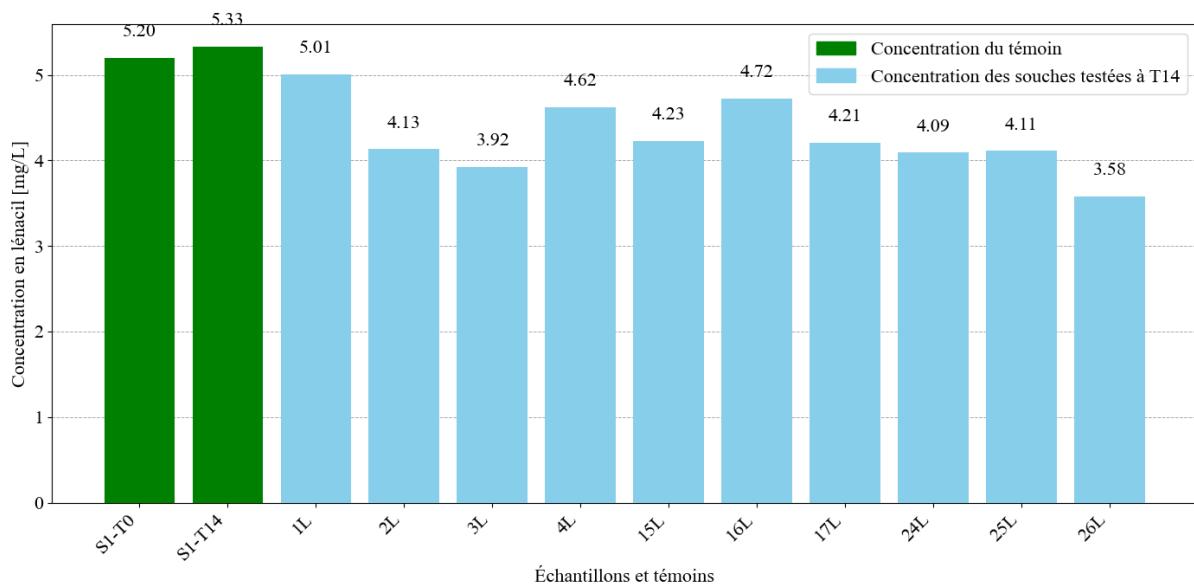


Figure 19 - Graphique de la concentration du lénacil des différentes souches testées au T0 et T14 (n=1).

4.3 Suivi journalier de la dégradation du métamitron par les souches pures sélectionnées

Lors du suivi journalier en triplicat, une coloration rose du milieu (**Figure 20**) est apparue dès le premier jour pour les trois souches sélectionnées (8M, 29M et 30M), alors que le métamitron est initialement incolore. En comparaison, la souche de référence connue comme dégradante (*Arthrobacter* DSM 20389), achetée auprès d'une banque de souches, n'a présenté une coloration qu'à partir du jour 9. Aucune coloration n'a été observée dans les tubes inoculés avec *Escherichia coli* ni dans le témoin abiotique.

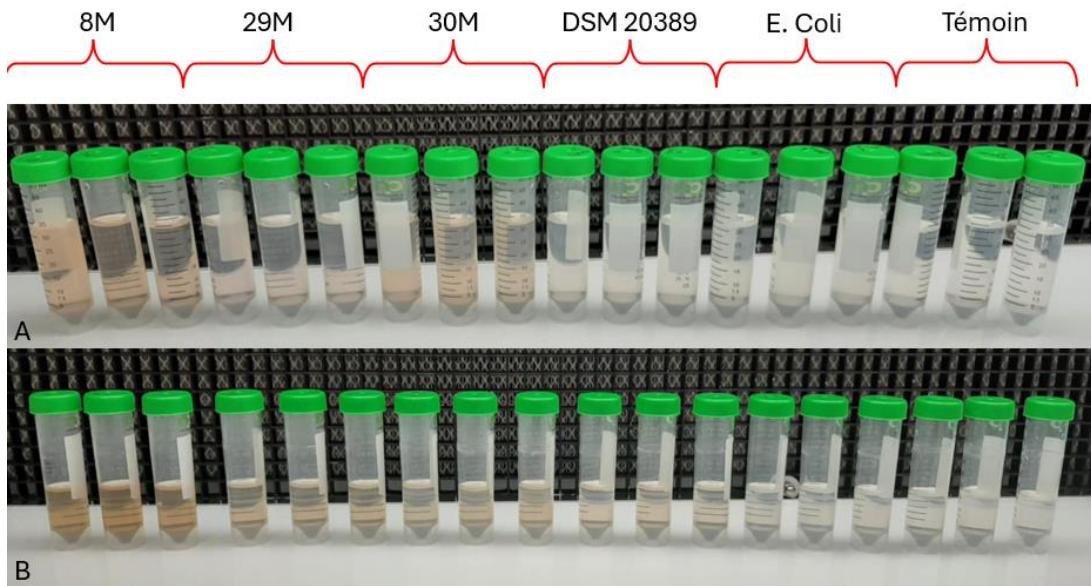


Figure 20 - Observation du changement de couleurs lors du suivi journalier ; A – Jour 1 ; B – Jour 9

La **figure 21** illustre l'évolution de la densité optique des différentes suspensions de souches bactériennes cultivées pendant 14 jours dans des conditions identiques de milieu et de température. Toutes les cultures ont été ensemencées à une concentration initiale équivalente de 10^{-6} cellules/mL. Les dynamiques de croissance varient nettement selon les souches.

Les souches 8M, 29M et 30M présentent une croissance rapide, atteignant un maximum de DO dès le premier jour pour la souche 30M, et au jour 2 pour les souches 8M et 29M, avant de se stabiliser et d'atteindre un plateau. La souche 29M atteint toutefois une densité optique plus faible que les deux autres. À l'inverse, la souche *Arthrobacter* DSM 20389 montre une phase stationnaire prolongée durant les 7 premiers jours, suivie d'une augmentation progressive jusqu'au jour 14. La souche *E. coli* se distingue par une densité optique légèrement décroissante au fil du temps. Le témoin (milieu sans inoculum) a une DO constante, confirmant l'absence de contamination.

Ces résultats mettent en évidence des différences notables dans la croissance bactérienne.

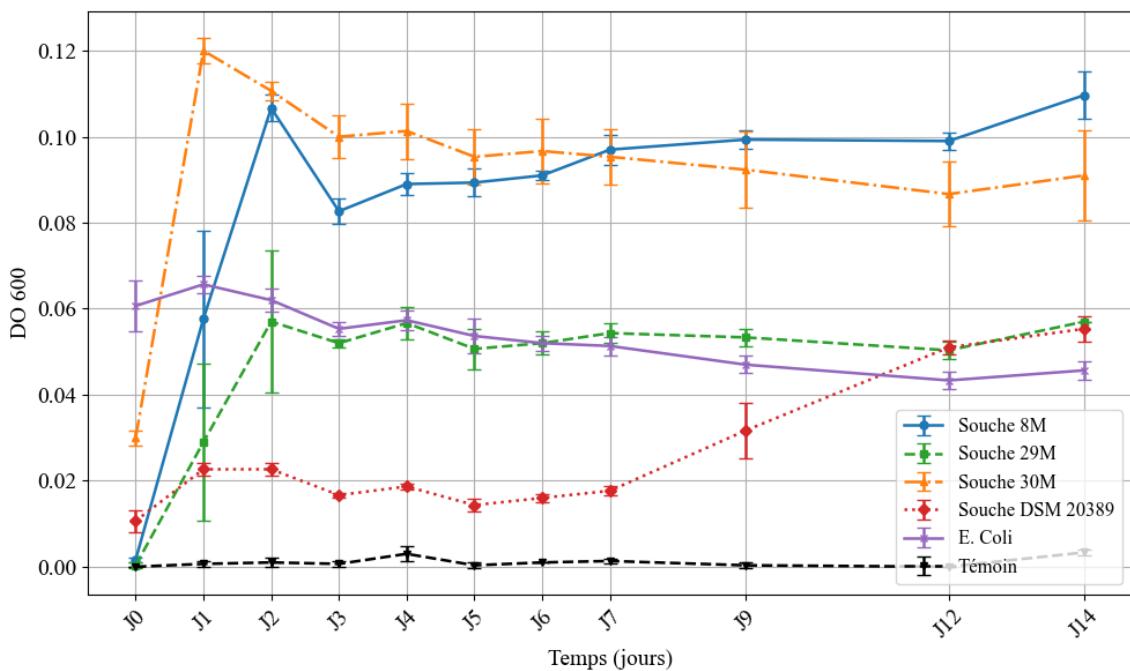


Figure 21 - Evaluation de la cinétique de croissance des différentes souches lors du suivi journalier. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n=3$).

Le pH qui a également été suivi durant les 14 jours d'incubation, est resté globalement stable tout au long de l'expérience (Figure 22). En effet, les variations observées sont minimales, avec un pH maximal de 6,85 et un pH minimal de 6,61.

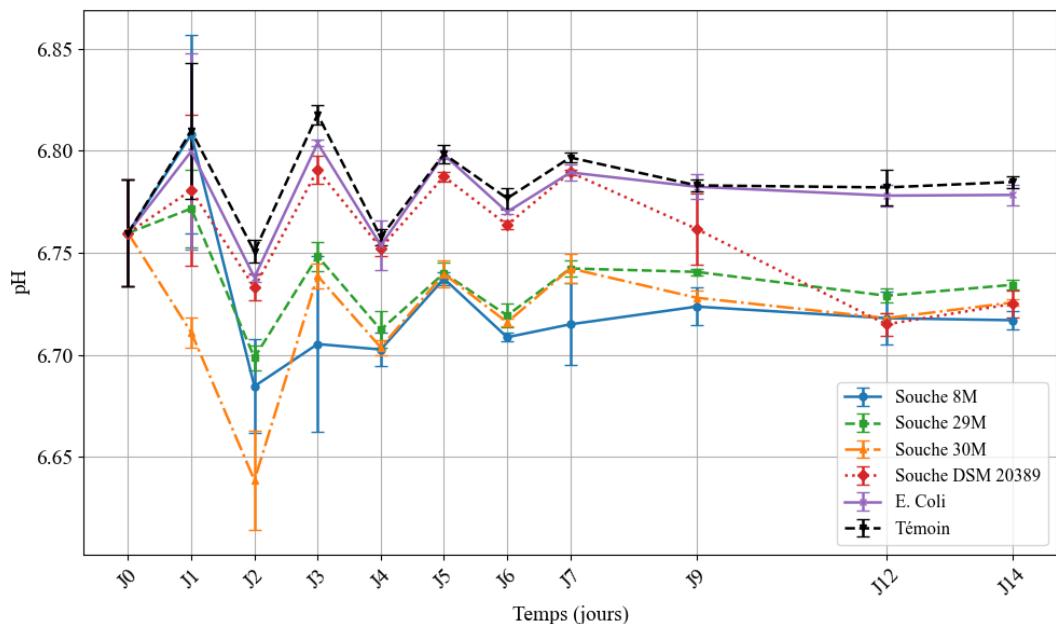


Figure 22 - Evolution du pH des différentes souches lors du suivi journalier. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n=3$).

4.3.1 Activité de dégradation de la souche 8M

La figure 23 présente l'évolution de la concentration en métamitron en présence de la souche 8M (axe Y gauche) ainsi que celle des aires (en mAu) de cinq métabolites sélectionnés (axe Y droit), le tout en fonction du temps. Pour suivre le processus de dégradation, les chromatogrammes obtenus à chaque prélèvement ont été analysés. Parmi les nombreux pics apparus au fil du temps, cinq métabolites ont été retenus pour un suivi spécifique. La sélection s'est basée sur une analyse visuelle privilégiant les pics présentant une intensité élevée ou une variation marquée sur les 14 jours d'expérimentation. Ces métabolites ont été détectés par chromatographie en phase liquide à une longueur d'onde de 310 nm, et identifiés selon leurs temps de rétention respectifs : 1,45 min (métabolite 1), 1,75 min (métabolite 2), 3,15 min (métabolite 3), 2,38 min (métabolite 4) et 2,00 min (métabolite 5).

Avec la souche 8M, la concentration en métamitron, initialement de 52 mg/L, chute rapidement, atteignant moins de 1 mg/L après deux jours. Les modalités *E. coli* et témoin présentent une évolution similaire entre elles, avec une diminution progressive de la concentration jusqu'à environ 35 mg/L au bout de 14 jours.

Le métabolite 1 est très rapidement formé avec un maximum au troisième jour (plus de 4000 mAU) puis sa concentration diminue lentement. Les 4 autres métabolites apparaissent progressivement au cours des 14 jours sans augmentation marquante. Pour les deux témoins (abiotique et biotique), aucun des cinq métabolites sélectionnés ne montre de pic ni d'évolution. Les différences entre la souche et les deux témoins sont statistiquement significatives.

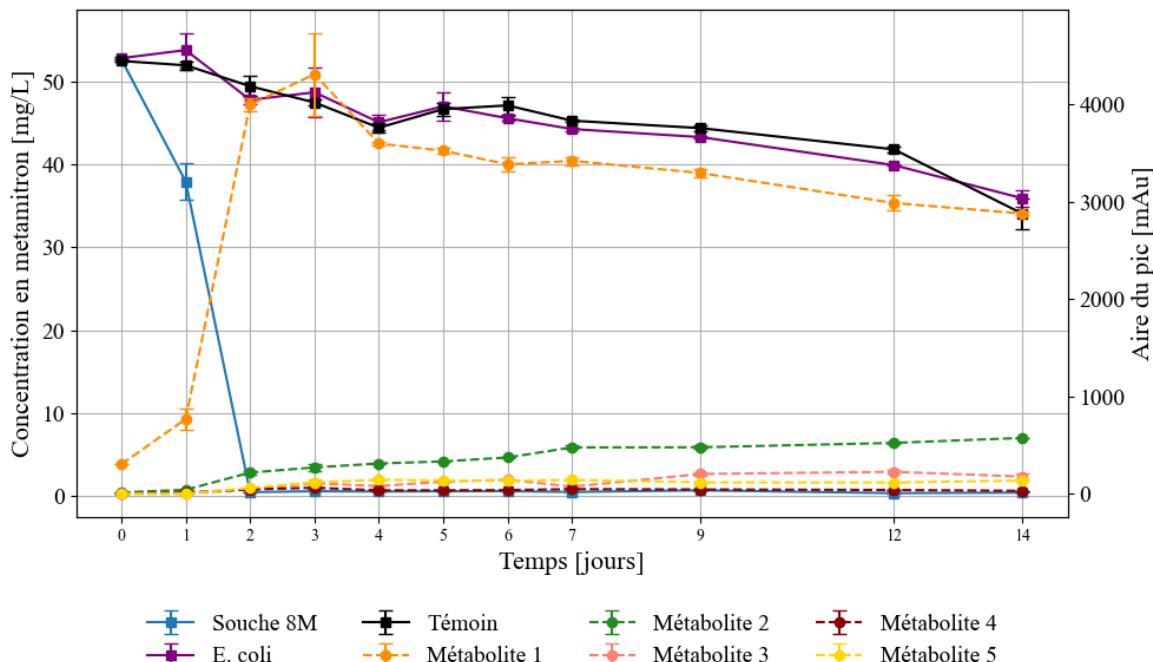


Figure 23 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche 8M et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps . Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n=3$).

4.3.2 Activité de dégradation de la souche 30M

La **figure 24** illustre, comme la figure précédente, l'évolution de la concentration en métamitron et des aires de cinq métabolites en fonction du temps. Dans ce graphique, la souche étudiée est la souche 30M, dont le profil de dégradation est très proche de celui observé pour la souche 8M.

Avec cette souche, la diminution de la concentration en métamitron est encore plus rapide, avec une valeur déjà inférieure à 1 mg/L dès le premier jour. Lors des trois derniers prélèvements, les concentrations mesurées sont même inférieures à la limite de quantification.

L'évolution des métabolites suit une dynamique très similaire à celle observée avec la souche 8M. En effet, comme précédemment, le métabolite 1 présente une forte augmentation dès les premiers jours, atteignant une valeur légèrement supérieure à 4000 mAu. Les autres métabolites montrent également une légère augmentation progressive jusqu'au dernier jour. Les résultats des modalités témoins (abiotique et *E. coli*) dans la figure 24 sont identiques à ceux de la figure précédente.

Les différences entre la souche et les deux témoins sont statistiquement significatives.

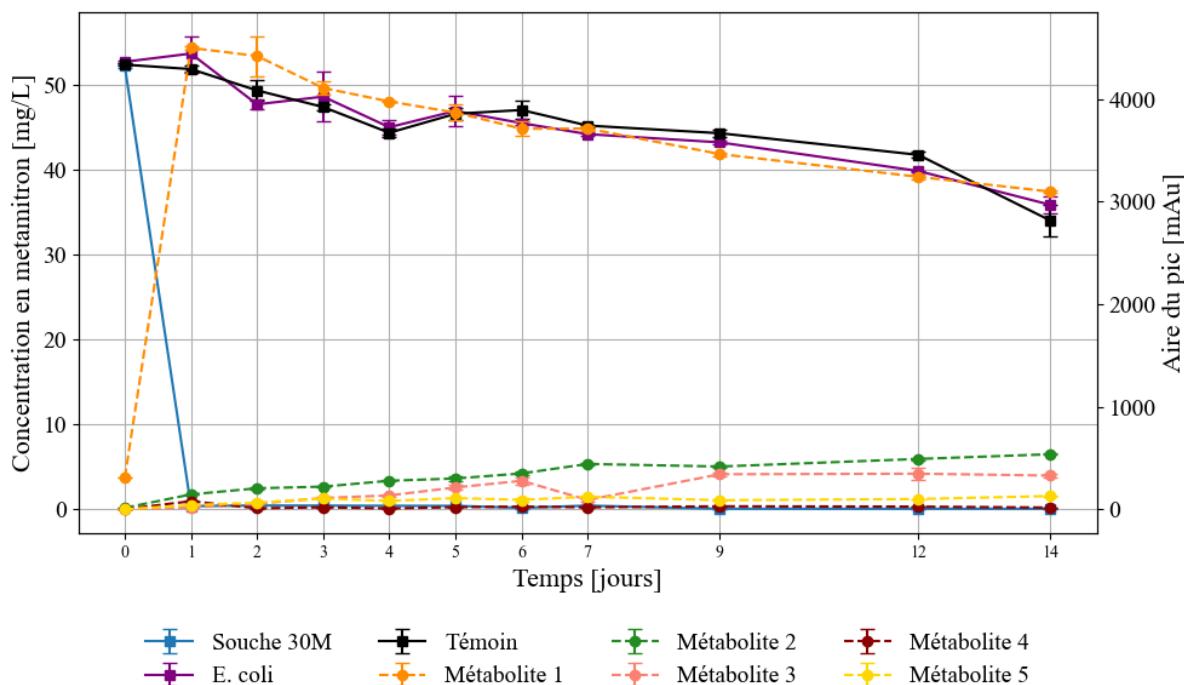


Figure 24 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche 30M et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n=3$).

4.3.3 Activité de dégradation de la souche 29M

La **figure 25** présente le profil de dégradation associé à la souche 29M, qui se distingue légèrement de ceux observés pour les souches 8M et 30M. Une première différence est la

concentration en métamitron qui passe sous le seuil de 1 mg/L au jour 3, et indique donc une dégradation plus lente.

Les différences les plus marquées apparaissent au niveau du profil de métabolisation. Bien que le métabolite 1 reste le plus présent, son aire maximale est légèrement inférieure à celle mesurée pour les autres souches, atteignant environ 3500 mAu. En revanche, les métabolites 2, 4 et 5 présentent des intensités plus élevées que précédemment.

Un comportement particulier est observé pour le métabolite 5, dont l'aire montre un pic au jour 4, suivi d'une diminution, puis d'une remontée au jour 14. Ce profil semble s'opposer à celui du métabolite 4, dont les aires sont plus faibles aux jours 4 et 14.

Le profil du métabolite 3 semble similaire à ceux observés pour les souches précédentes.

Les différences entre la souche et les deux témoins sont statistiquement significatives.

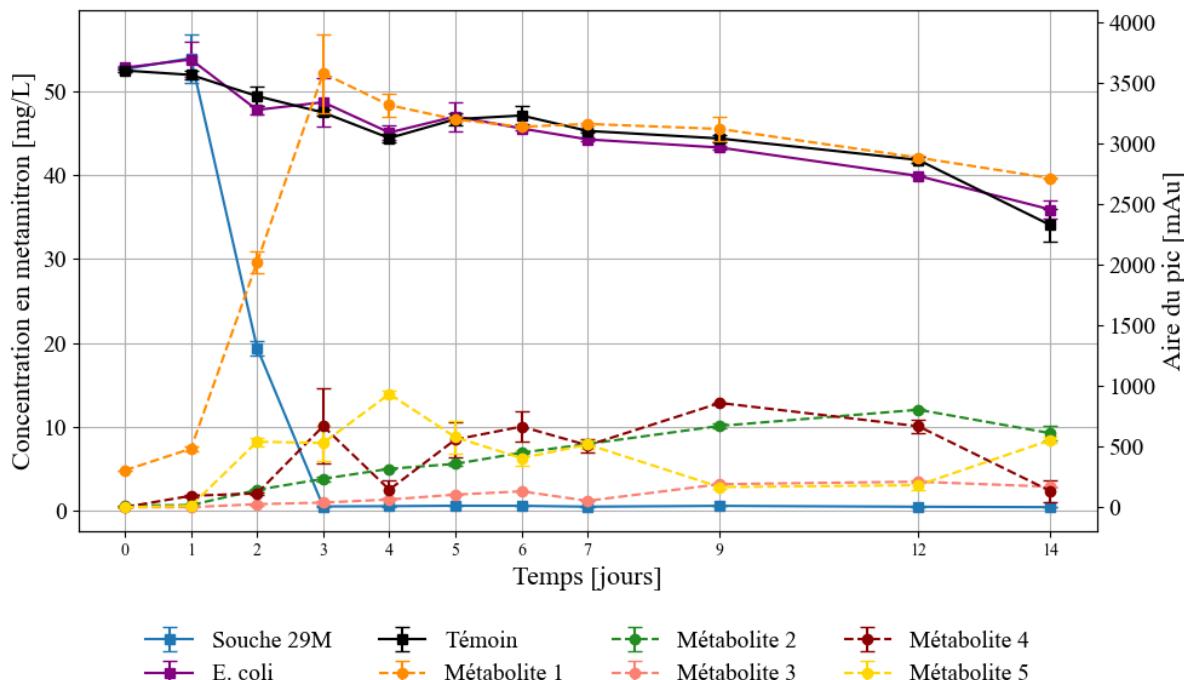


Figure 25 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche 29M et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n=3$).

4.3.4 Activité de dégradation de la souche *Arthrobacter* DSM 20389

La souche de référence, *Arthrobacter* DSM 20389, présente un profil de dégradation très différent des 3 souches précédentes (Figure 26) avec une activité plus tardive. En effet, la concentration reste stable et comparable à celle des cultures avec *Escherichia coli* et au témoin jusqu'au jour 9, avant de chuter pour atteindre environ 1 mg/L au jour 12. Ce qui signifie que sur 3 jours, les souches 8M, 29M et 30M présentent une dégradation quasi totale du métamitron

alors qu'il faut attendre le douzième jour pour que la souche *Arthrobacter* DSM 20389 atteigne un niveau de dégradation similaire. La pente de la courbe de dégradation indique qu'une fois initiée, la dégradation complète par la souche *Arthrobacter* DSM 20389 nécessite environ cinq jours, ce qui est plus long que pour les autres souches étudiées.

Concernant les métabolites, la dynamique est cohérente avec celles observées avec les souches 8M et 30M, avec une augmentation plus marquée du métabolite 1 tandis que les autres montrent une hausse moins importante. Toutefois ces augmentations ne sont visibles qu'à partir du jour 9 ce qui complique la comparaison du profil de métabolisation aux autres souches. L'augmentation du métabolite 1 correspond au jour où la diminution de la concentration en métamitron débute.

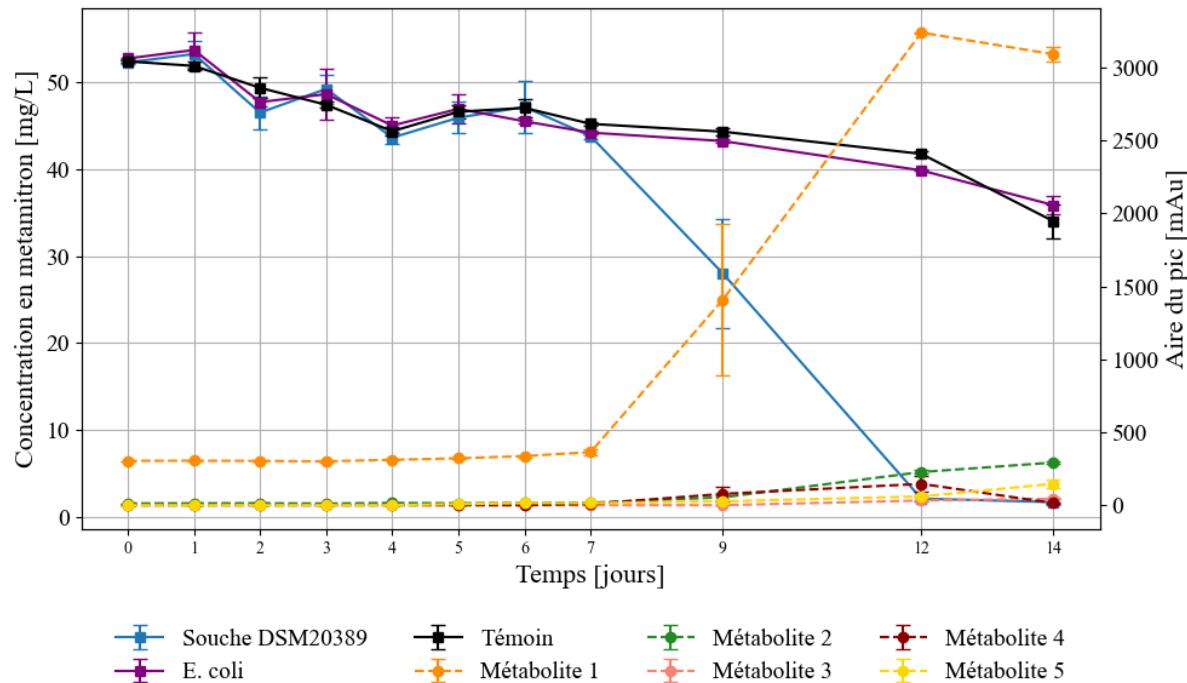


Figure 26 - Evolution de la concentration en métamitron (axe gauche – ligne continue) pour la souche DSM 20389 et évolution de 5 métabolites (axe droit – ligne discontinue) en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n=3$).

4.4 Identification des souches

La PCR amplifiant le gène 16S rADN a été réalisée pour les 3 souches sélectionnées ainsi que pour *Arthrobacter* DSM20389. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 27) révèle, pour l'ensemble des souches, des bandes d'ADN de taille comprise entre 1000 et 1500

paires de bases. Aucun signal n'a été détecté dans le contrôle négatif, ce qui confirme l'absence de contamination.

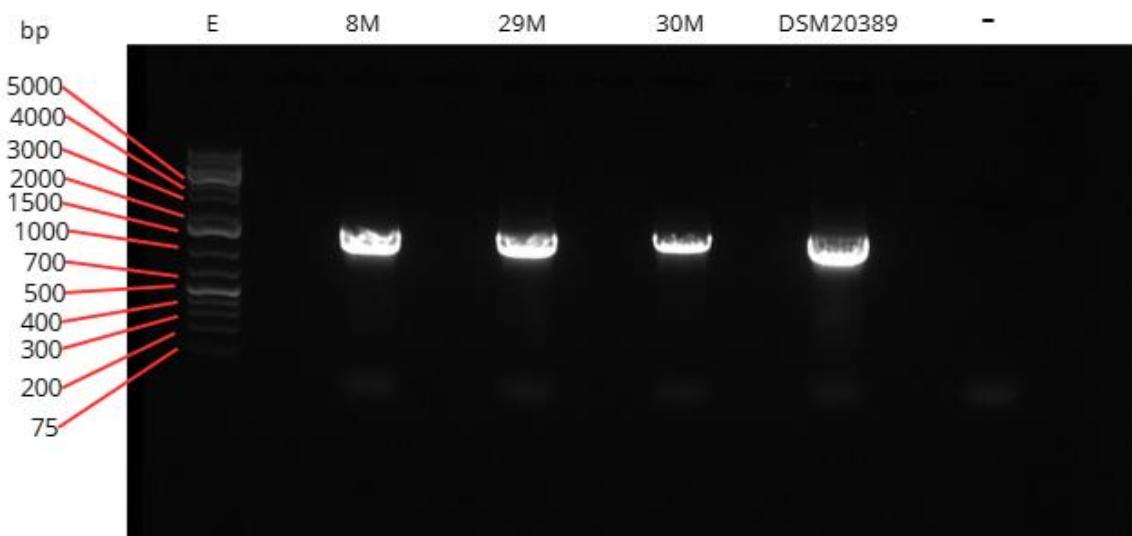


Figure 27 - Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR obtenus pour les souches sélectionnées. E : échelle d'ADN (marqueur de taille) ; – : contrôle négatif.

L'analyse des séquences obtenues par BLAST a permis d'identifier les trois souches comme appartenant au genre *Rhodococcus*, avec des identités supérieures à 99 % et une couverture de séquence de 100 % (**Annexe 3**).

- La souche 8M présente une similarité maximale (99,62 %) avec plusieurs souches de *Rhodococcus*, notamment *R. qingshengii*, *R. erythropolis* et *R. boritolerans*.
- La souche 29M est étroitement apparentée à différentes souches de *Rhodococcus erythropolis* et d'autres *Rhodococcus sp.*, avec une identité de 99,3 %.
- La souche 30M montre la plus grande similarité (99,83 %) avec *Rhodococcus qingshengii*, *Rhodococcus erythropolis*, ainsi qu'un *Actinomycetia bacterium* non identifié.

Enfin, la souche de référence DSMZ a été affiliée au genre *Arthrobacter*, avec des identités comprises entre 99,75 % et 99,83 %. Cette analyse a été réalisée afin de confirmer l'identité de la souche acquise auprès de la banque de souche.

4.4.1 Arbre phylogénétique

Afin de mieux situer les trois souches isolées au sein du genre *Rhodococcus*, un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences 16S rRNA de différentes espèces représentatives, ainsi que d'un *outgroup* (*Arthrobacter* DSM20389). Ce dernier a été choisi

pour enracer l'arbre, étant phylogénétiquement proche de *Rhodococcus* tout en appartenant à un genre distinct.

L'arbre phylogénétique (**Figure 28**) obtenu à partir de l'analyse des séquences 16S rRNA montre clairement la position des différentes souches étudiées par rapport aux espèces de référence du genre *Rhodococcus*. Les souches 8M, 29M et 30M se regroupent dans un même clade avec *Rhodococcus qingshengii* (DQ090961.1) et *Rhodococcus erythropolis* (DQ855406.1), indiquant une forte similarité génétique. Ce clade est distinct mais proche de celui formé par *Rhodococcus ruber* (X80625.1) et *Rhodococcus koreensis* (AF124343.1) suggérant un lien évolutif. Les espèces *R. aetherivorans* et *R. wratislaviensis* forment un groupe à part, tout comme *R. equi*.

La barre d'échelle de 0.05 représente la distance évolutive, soit environ 5 substitutions nucléotidiques pour 100 bases. Cela permet de visualiser le degré de divergence génétique entre les différentes branches.

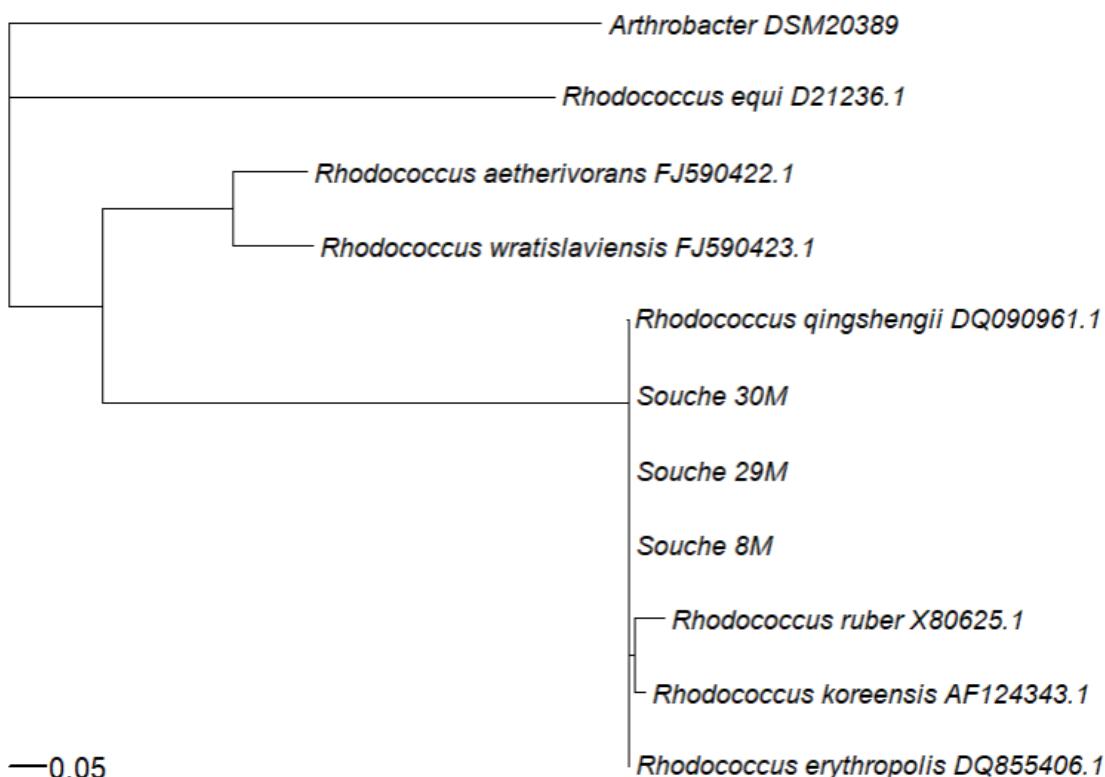


Figure 28 - Arbre phylogénétique des souches isolées (8M, 29M, 30M) basé sur les séquences 16S rRNA, enraciné avec *Arthrobacter DSM20389*.

5. Discussion

Dans cette étude, trois souches identifiées comme appartenant au genre *Rhodococcus* (8M, 29M, 30M) ont démontré un pouvoir de dégradation du métamitron particulièrement élevé, encore jamais observé dans la littérature. En effet, bien que certaines souches soient déjà connues et étudiées pour leur capacité à dégrader ce composé, comme le rapporte [Fang et al. \(2016\)](#), le genre *Rhodococcus sp.* MET montrait une dégradation de 11 % après 12 heures d'incubation à une concentration initiale de 100 mg/L. En comparaison, dans notre étude, la souche la plus efficace, nommée 30M, a permis une dégradation quasi complète (99,2%) du métamitron en moins de 24 heures, pour une concentration initiale de 50 mg/L (**Figure 24**).

La souche *Arthrobacter* DSM20389, déjà reconnue dans la littérature pour sa capacité à dégrader le métamitron ([Engelhardt et al., 1982](#)), avait montré une dégradation de 80,8 mg/L en 14 jours. À ce jour, il s'agit de la seule souche commercialisée connue pour cette activité. Elle a été achetée et testée dans le cadre de cette étude afin de servir de souche de référence. Le taux de dégradation observé est comparable à celui rapporté dans la littérature, bien que la concentration initiale utilisée ici soit de 50 mg/L (**Figure 26**). Cependant, en comparaison, les trois souches isolées à partir des biofiltres se sont révélées significativement plus efficaces (**Figure 23, 24, 25**) avec une dégradation de 100% en maximum 3 jours. À concentration équivalente, elles présentent un taux de dégradation plus rapide que celui observé pour *Arthrobacter* DSM20389 (dans l'ordre 30M > 8M > 29M > *Arthrobacter* DSM20389) ce qui confirme leur fort potentiel pour la biodégradation du métamitron.

La première étape des expérimentations consistait en des cultures d'épuisement, qui ont permis, à la fin du 4^e repiquage, d'isoler 31 souches. Parmi elles, seulement 7 (7M, 8M, 10M, 13M, 28M, 29M et 30M) ont montré des propriétés de dégradation du métamitron intéressantes, malgré la croissance dans le MM avec le pesticide comme seule source de carbone. Pour le lénacil, seules les souches 3L et 26L ont montré un potentiel, mais des tests supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats ; aucune de ces souches n'a donc été sélectionnée pour poursuivre cette étude. Le taux de sélection après cette phase de culture d'épuisement est donc d'environ 30 %, indiquant une efficacité globale de cette méthode de sélection intéressante, sans être infaillible à 100%.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce taux de sélection. Certains microorganismes pourraient survivre dans le MM en utilisant principalement les cellules mortes ou vivantes comme source de carbone ([Turnbull et al., 2001](#)), et non le pesticide. D'autres pourraient utiliser comme source de carbone les métabolites de la substance active, et non cette dernière ([Schuster et al., 2010](#)). Ou encore, des composés présents dans la formule commerciale (par exemple, la 1,2-Benzisothiazolin-3-one) pourraient être préférentiellement utilisés. Une concentration initiale insuffisante en pesticide dans le milieu d'épuisement pourrait également limiter l'efficacité de la sélection. Il est aussi envisageable que les microorganismes dégradants perdent leur capacité à dégrader les pesticides après des sous-cultures répétées, comme le suggèrent ([Parekh et al., 1996](#)). À l'inverse, un phénomène opposé peut survenir, avec des transferts

horizontaux de gènes de dégradation des pesticides au cours des cycles d'épuisement et des sous-cultures (Mandelbaum *et al.*, 1995; Bazhanov *et al.*, 2016). Tous ces phénomènes pourraient expliquer certaines observations de la **Figure 16**, où l'abondance mesurée de certaines sources environnementales est nulle à la fin d'un repiquage, avant de réaugmenter dans les cultures d'épuisement suivantes, reflétant une dynamique complexe d'adaptation microbienne incluant perte temporaire de capacité de dégradation, enrichissement de variants compétents, ou transfert horizontal de gènes.

Lors du test de *screening* ayant permis de sélectionner les 7 souches, ces dernières ont été retenues en raison d'une concentration résiduelle en métamitron inférieure à 1 mg/L après 14 jours d'incubation (**Figure 18**). Pour le témoin, une baisse d'environ 3 mg/L de métamitron a été observée entre le jour 0 et le jour 14. Cette dégradation est probablement liée à des phénomènes abiotiques, en particulier à la photodégradation, qui constitue l'une des principales voies de dégradation du métamitron dans l'environnement (Wang *et al.*, 2017). En effet, le témoin ne contenant aucune souche microbienne et manipulé en condition stérile, une dégradation d'origine biotique peut être exclue. Bien que les incubations aient été réalisées dans l'obscurité, les prélèvements intermédiaires n'étaient pas entièrement protégés de la lumière, ce qui pourrait expliquer cette diminution de concentration.

Toujours lors du test de *screening*, la concentration cible en herbicide était de 10mg/L. Cependant, pour le métamitron, la concentration mesurée par HPLC était de 11,62mg/L (**Figure 18**), ce qui pourrait s'expliquer par des erreurs de pipetages, liées à la viscosité de l'herbicide rendant sa manipulation difficile. A l'inverse, pour le lénacil, la concentration mesurée était bien plus faible que la valeur cible, avec une concentration mesurée de 5,20 mg/L (**Figure 19**). Cette différence pourrait être liée à une concentration réelle différente de celle annoncée dans la formulation commerciale, ou à une dégradation de la matière active due à un mauvais stockage, entraînant ainsi une perte de qualité du produit. En effet, le suivi de l'abondance microbienne (**Figure 16**) montre que le témoin contenant du lénacil, en l'absence de toute source environnementale, présentait une abondance microbienne très élevée à chaque repiquage. Cette observation pourrait appuyer l'hypothèse d'un mauvais stockage ayant favorisé des contaminations. À cela s'ajoutent de légères incertitudes liées à l'analyse par HPLC, comme le montre Padmavathi *et al.* (2016), l'analyse HPLC n'est pas exempte d'erreurs.

Cependant, les tests réalisées ne permettent pas de sélectionner uniquement des micro-organismes facilement cultivables. En effet, à la fin de ce test, 7 souches ont été sélectionnées, mais seulement 3 ont démontré une capacité de croissance sur les différents milieux testés, ce qui a constitué un critère essentiel pour leur sélection en vue d'une utilisation potentielle future en bioaugmentation. L'identification d'un milieu de culture plus adapté aurait toutefois permis d'inclure les souches présentant une croissance plus lente ou plus exigeante, et potentiellement intéressantes du point de vue de la biodégradation. Comme le suggèrent Müller *et al.* (2018), certaines souches bactériennes nécessitent un milieu spécifique pour croître. Ainsi, il est

possible que les souches non retenues dans cette étude n'étaient pas dans un milieu adapté ce qui expliquerait leur difficulté de croissance.

Il est important de s'intéresser à l'origine des souches sélectionnées. Dans cette étude, elles proviennent du biofiltre de Gembloux (8M) et de l'eau de stockage avant le biofiltre de Lamain (29M et 30M). En effet, la souche 8M, issue du biofiltre d'un verger biologique de pommiers, n'a à priori jamais été exposée au métamitron. Cependant, cette exploitation utilise d'autres produits tels que le cuivre, le soufre, le bicarbonate ou le Nimasal, susceptibles d'exercer une pression de sélection sur les communautés microbiennes. L'introduction de sol dans ce biofiltre pourrait également expliquer la présence de micro-organismes capables de dégrader ce pesticide, même sans adaptation spécifique liée à une exposition répétée dans le biofiltre.

[Kiaune et al. \(2011\)](#) soulignent qu'un excès de cuivre peut avoir des effets toxiques sur l'environnement. Ces observations suggèrent que l'utilisation de cuivre dans le verger biologique pourrait avoir contribué à façonner une microflore résistante. Ainsi, même sans exposition directe au métamitron, certaines souches isolées, comme la 8M, pourraient être capables de le dégrader grâce à des mécanismes de résistance croisée ou que certaines enzymes impliquées dans la dégradation d'autres composés soient également actives sur le métamitron. [Liaw et Srinivasan \(1990\)](#) ont en effet montré qu'une souche d'*Erwinia* résistante au cuivre était capable de dégrader des éthers aromatiques, suggérant un lien potentiel entre résistance au cuivre et activité de biodégradation. Ces hypothèses restent néanmoins à confirmer dans le cas de nos souches.

Les souches 29M et 30M, quant à elles, proviennent de Lamain, mais ne sont pas issues du biofiltre. Elles ont été isolées à partir de l'eau de rinçage stockée dans une citerne, avant son passage dans le biofiltre. Cette exploitation, de taille plus importante, présentait une utilisation plus intensive de pesticides, ce qui pourrait avoir conduit à une sélection plus marquée de micro-organismes spécialisés dans ces eaux stagnantes, présentes depuis octobre de l'année précédente. Cette étude montre que la recherche de micro-organismes capables de dégrader les pesticides dans les biofiltres semble efficace. Toutefois, peu d'études ont exploré cette approche, et il reste difficile de conclure que la probabilité d'en isoler est réellement plus élevée dans un biofiltre que dans un sol cultivé. Par ailleurs, l'utilisation de biofiltre tend à se réduire avec les nouvelles technologies et le rinçage sur champs fréquemment pratiqué.

Une observation supplémentaire est l'apparition d'une légère coloration rose lors de la quatrième culture d'épuisement dans les Erlenmeyers enrichis en métamitron, sauf pour celui provenant du biofiltre de Braives ainsi que pour le témoin abiotique (**Figure 17**). Cette coloration n'a été observée dans aucune des souches lors du premier *screening* à 10 mg/L, mais elle réapparaît clairement lors des tests finaux avec un suivi journalier à une concentration de 50 mg/L. Pour les souches 8M, 29M et 30M, cette teinte rosée apparaît dès les premières 24 heures d'incubation et s'intensifie au fil du temps. En revanche, pour la souche de référence *Arthrobacter* DSM 20389, la coloration apparaît à partir du neuvième jour (**Figure 20**). Aucun

changement de couleur n'a été observé dans les Falcons inoculés avec *E. coli*, ni dans le témoin abiotique.

Cette coloration pourrait être liée à l'apparition d'un métabolite issu de la dégradation du métamitron ou d'un composé dérivé d'un additif présent dans la formulation commerciale utilisée. Dans la littérature, aucune information n'a été trouvé concernant un changement de couleur rose associé à la dégradation du métamitron. Toutefois, Guillaume, (2018) avait déjà observé ce phénomène au cours de ses phases d'acclimatation mais aucune des souches isolées n'avait été capable de reproduire cette coloration par la suite.

Il est intéressant de noter que Blecher *et al.* (1979), ont rapporté la formation de métabolites colorés, principalement jaunes, issus de la dégradation du métamitron. Engelhardt *et al.* (1982) ont aussi observé une légère coloration jaune dans les cultures avec *Arthrobacter* DSM 20389 en l'absence de lumière, ce qui suggère que certains produits de dégradation du métamitron peuvent présenter des teintes caractéristiques. Il est donc plausible que la coloration rose observée dans le milieu MM résulte d'un métabolite particulier produit en quantité suffisante dans certaines conditions.

Le graphique de l'évolution de la concentration en métamitron au cours du temps suggère, par une association visuelle, une relation entre la dégradation du métamitron et l'apparition de la coloration rose observée (**Figure 23, 24, 25 et 26**). Ce phénomène n'a peut-être pas été détecté lors du screening en raison d'une production insuffisante du métabolite responsable. A une concentration de 10 mg/L, la quantité générée aurait pu être trop faible pour que la coloration soit perceptible. Cette coloration, si elle est bien liée à la formation d'un métabolite, rendrait très utile l'identification précise du métabolite responsable et de la voie de métabolisation associée, afin de disposer d'un indicateur simple à quantifier pour détecter la dégradation du métamitron.

Lors du suivi journalier, le pH mesuré est resté compris entre 6,50 et 6,85 (**Figure 22**). Cette stabilité dans cette plage neutre confirme que la dégradation du métamitron observée est bien liée à l'activité des micro-organismes inoculés. En effet, selon Fang *et al.* (2016), le métamitron est instable à pH 9, ce qui favorise une dégradation abiotique indépendante de toute activité microbienne. A l'inverse, en conditions plus acides (pH < 5), la dégradation est nettement ralentie et ce, même avec l'inoculation de micro-organismes. Le pH observé ici correspond donc à un environnement optimal pour l'activité enzymatique microbienne. La température, maintenue autour de 28 °C dans l'étuve durant les 14 jours d'expérimentation, s'inscrit également dans la plage favorable à la dégradation biologique du métamitron, généralement située entre 20 et 30 °C (Fang *et al.*, 2016). Ce qui est le cas pour différents herbicides comme la métribuzine ou les chloroacétamides, qui sont tous deux dégradés plus efficacement par des micro-organismes à une température avoisinant 30 °C. (Zhang *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2012)

Dans le témoin abiotique, une diminution progressive jusqu'à 35mg/L de métamitron a été observée, indiquant une dégradation abiotique lente. Ce phénomène, déjà rapporté dans la littérature (Fang *et al.*, 2016 , Wang *et al.*, 2017), pourrait être lié à une hydrolyse ou une

transformation spontanée du composé en solution. Toutefois, cette transformation n'a pas été accompagnée d'une augmentation de la densité optique (**Figure 21**), ni d'un changement visible de couleur, ce qui suggère que les produits formés sont incolores ou présents en quantités trop faibles pour modifier significativement les propriétés optiques du milieu. En revanche, dans les cultures microbiennes, une légère augmentation de la DO600 a été observé en même temps que l'apparition de la coloration rose qui pourrait donc être la raison de cette augmentation. Pour la souche *E.coli* (contrôle biotique) aucune croissance n'a été observée, ce qui est un résultat attendu. En effet, le milieu minimum ne contenait que le pesticide comme unique source de carbone, indiquant que ce composé n'est pas utilisé pour la croissance de cette souche. Cela suggère également que la formulation commerciale du pesticide ne contient pas d'autres sources de carbone facilement mobilisables (**Figure 21**). Enfin, l'ensemble des observations issues du suivi journalier ont été réalisées sur les trois répétitions, ce qui permet de considérer les résultats comme fiables et représentatifs.

Un aspect très important lors des tests de dégradation est l'étude des métabolites produits car certains sont plus toxiques que la substance active ([Chawla et al., 2013](#)). Les voies de dégradation empruntées, ou du moins les profils métaboliques observés, semblent différer entre les souches 8M, 29M et 30M (**Figure 23, 24 et 25**). La souche 29M, en particulier, se distingue par la présence marquée de deux pics principaux pour les métabolites 4 et 5, bien plus intenses que ceux détectés chez les autres souches. Cette analyse laisse penser à des voies de dégradation différentes entre les souches 8M et 30M d'une part, et la 29M d'autre part. Certains métabolites semblent partagés entre les souches, mais à des concentrations variables. De nombreux autres métabolites sont également détectables, mais ceux mentionnés précédemment ressortent comme les plus visibles sur les chromatogrammes.

L'identification de nos souches suggère qu'elles appartiennent au genre *Rhodococcus*. Selon [Wang et al. \(2017\)](#), deux voies principales de dégradation existent. La première, appelée « voie des *Rhodococcus* », implique notamment la formation du 2,3-Dihydroxymétamitron, qui est le premier métabolite à apparaître au cours de cette voie. Cependant, ce métabolite n'a pas été étudié dans la littérature, et sa toxicité pour l'environnement ou la santé reste inconnue. Il serait donc important de confirmer l'identification de ce métabolite et, le cas échéant, d'évaluer son impact ainsi que sa toxicité avant d'utiliser les souches produisant ce métabolite dans des essais futurs tel que de la bioaugmentation.

La seconde voie, appelée « voie du désamino-métamitron », concerne un autre métabolite fréquemment rencontré, le désamino-métamitron, produit dans les sols, par des plantes ou encore des micro-organismes ([Parekh et al., 1994](#) ; [Engelhardt et al., 1982](#)). Ce composé pourrait donc aussi être un produit de notre dégradation, bien qu'il n'ait pas été spécifiquement identifié. Il est reconnu comme étant moins毒 que la substance mère pour la santé humaine, bien qu'il puisse toujours présenter une certaine toxicité pour l'environnement ([EFSA, 2008](#)). Ces deux voies distinctes pourraient expliquer pourquoi nos souches présentent des profils métaboliques différents : chaque souche dégraderait le métamitron selon une voie spécifique, ce qui conduit à la production de métabolites différents.

L'analyse des métabolites produits par la souche *Arthrobacter* DSM 20389 s'avère plus complexe, car la dégradation n'a commencé qu'à partir du neuvième jour dans les conditions expérimentales suivies sur 14 jours. Il devient donc difficile de retracer précisément la voie de dégradation décrite par [Engelhardt et al. \(1982\)](#), notamment en ce qui concerne l'identification et le suivi des métabolites intermédiaires.

Dans une étude antérieure, [Parekh et al. \(1994\)](#) ont rapporté des métabolites avec des temps de rétention de 2,16 min, 2,69 min et 3,21 min, obtenus après inoculation d'un *Rhodococcus* sp. 0246b. Ces temps de rétention pourraient correspondre aux pics observés ici aux métabolites 5, 4 ou 3. Toutefois, les conditions chromatographiques de leur analyse n'étant pas strictement identiques, cette comparaison doit être faite avec prudence. De plus, ces auteurs ne donnent pas d'informations précises sur la nature des métabolites identifiés, ce qui limite les possibilités d'interprétation.

Concernant le témoin abiotique et la culture avec *E. coli*, aucun pic significatif n'a été observé à 310 nm, ce qui suggère une absence de métabolites majoritaires détectables à cette longueur d'onde. Toutefois, cela n'exclut pas la formation de composés issus de la dégradation abiotique pouvant absorber à d'autres longueurs d'onde, non analysées. Étant donné qu'une diminution de la concentration a lieu, la formation de produits de dégradation est probable. Selon [Wang et al. \(2017\)](#), dans le sol, le composé 2-(2-carboxyhydrazin-1-yl)-2-(4-hydroxyphenyl) acetic acid apparaît uniquement lors de la dégradation abiotique et est détecté après 16 jours dans leur essai par chromatographie en phase gazeuse. Il serait donc pertinent d'examiner l'ensemble des pics présents sur le chromatogramme afin d'identifier les produits spécifiques de la dégradation abiotique.

Pour aller plus loin dans l'identification des métabolites et mieux comprendre les voies de dégradation propres à chaque souche, l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS) serait particulièrement pertinente, comme l'ont réalisé [Fang et al. \(2016\)](#), afin de proposer des structures aux composés détectés. Bien que certains métabolites soient suspectés d'être des produits de dégradation, l'absence de standards commerciaux pour ces composés empêche la comparaison précise des temps de rétention, rendant ainsi impossible la confirmation de l'identité des pics obtenue par HPLC.

L'analyse phylogénétique réalisée (**Figure 28**) à partir des séquences 16S rDNA des souches isolées (8M, 29M, 30M) montre que celles-ci sont phylogénétiquement très proches de *Rhodococcus erythropolis*, *R. qingshengii* et *R. koreensis*. Cette forte proximité suggère une origine évolutive commune, ainsi que de possibles similitudes sur le plan métabolique. Plus précisément, les trois souches se situent à proximité de *R. qingshengii* (DQ090961.1), une espèce connue pour sa capacité à dégrader le carbendazim, un fongicide de la famille des benzimidazoles fréquemment détecté comme contaminant environnemental ([Xu et al., 2007](#)). Elles sont également proches de *R. erythropolis* T7-2 (DQ855406), une souche décrite pour sa capacité à dégrader le diesel ([Huang et al., 2008](#)). Au vu de cette proximité phylogénétique, il est possible que les souches étudiées partagent des mécanismes et/ou enzymes similaires de dégradation, notamment à l'égard du métamitron.

Leur proximité avec *Rhodococcus ruber* C208 (X80625.1), une souche capable d'utiliser des plastiques polyoléfiniques comme source de carbone et d'énergie ([Gilan et al., 2013](#)), ainsi qu'avec *R. koreensis* (AF124343.1), isolée à partir d'eaux usées industrielles et capable de dégrader le 2,4-dinitrophenol ([Alvarez, 2019](#)), souligne davantage le potentiel écologique des souches 8M, 29M et 30M dans la dégradation de divers composés issus de la pollution anthropique.

En revanche, d'autres espèces comme *R. wratislaviensis* IFP2016 (FJ590423.1) et *R. aetherivorans* IFP2017 (FJ590422.1), bien qu'appartenant au même genre, sont plus éloignées phylogénétiquement. Ces deux espèces sont connues pour leurs fortes capacités de dégradation : elles ont été isolées au sein d'un consortium capable de dégrader jusqu'à 15 composés pétroliers ([Auffret et al., 2009](#)).

À l'inverse, une espèce comme *R. equi* (D21236.1), nettement plus éloignée dans l'arbre phylogénétique, est principalement connue pour son rôle pathogène chez les équidés ([Takai et al., 2000](#)) et n'a, à ce jour, pas été décrite dans la littérature pour des capacités de biodégradation, ce qui souligne que toutes les espèces du genre *Rhodococcus* ne possèdent pas nécessairement de telles aptitudes métaboliques.

6. Conclusions et perspectives

Cette étude avait pour principaux objectifs d'isoler et d'identifier des souches microbiennes dégradantes directement à partir de biofiltre, ainsi que d'évaluer la capacité de ces souches à dégrader les pesticides sélectionnés en milieu contrôlé, en analysant leur efficacité et leur vitesse de dégradation pour une application future en bioaugmentation.

Au total, 31 souches microbiennes (21 associées au métamitron et 10 au lénacil) ont été isolées à partir des cinq sources environnementales échantillonnées. Ces isolats ont été obtenus après quatre cycles d'enrichissement successifs en milieu minimal contenant le pesticide comme unique source de carbone.

Sur la base d'un test préliminaire de dégradation (comparaison jour 0 / jour 14) ainsi que de leur capacité à se développer sur différents milieux de culture, trois souches ont été sélectionnées : 8M, 29M et 30M qui sont toutes les 3 associées au genre *Rhodococcus*. En effet, après 14 jours d'incubation, moins de 1 mg/L de pesticide restait dans le milieu initialement chargé à 10 mg/L, ce qui indique un fort potentiel de biodégradation. Ces 3 souches se développaient également rapidement sur différents milieux comme LB ou MM.

Le suivi journalier réalisé avec 3 souches (et 3 témoins) à une concentration initiale de 50mg/L de métamitron montre que la souche 30M présente la vitesse de dégradation la plus élevée, suivie par les souches 8M et 29M. *Arthrobacter* DSM20389 montre un délai plus long avant le début de la dégradation.

Les résultats prometteurs obtenus avec les souches dégradant le métamitron ouvrent la voie à la poursuite du projet par des analyses plus approfondies, notamment une caractérisation cinétique complète de la dégradation, avec des intervalles d'échantillonnages plus courts lors des phases de dégradation. Cela permettrait d'affiner la compréhension du processus avec comme résultats intéressants, de déterminer le temps de demi-vie. Ensuite, seules les trois souches les plus robustes ont été conservées pour cette étude après la phase de recherche. Toutefois, les quatre autres souches initialement sélectionnées pour leur capacité de dégradation, mais qui ne se sont pas développées dans les milieux testés, pourraient également présenter un intérêt. Il serait pertinent de poursuivre les investigations en cherchant un milieu de culture adapté à leurs besoins, et ainsi évaluer leur potentiel de dégradation.

Pour le lénacil, bien qu'aucune souche n'ait été sélectionnée pour la suite des expérimentations dans ce travail, certaines ont néanmoins montré une capacité de dégradation, ce qui pourrait être intéressant à explorer dans le cadre de recherches futures.

Une étape importante pour la suite est la recherche des métabolites formés. En effet, bien que certains métabolites connus dans la littérature soient moins toxiques que la substance mère, il est essentiel de connaître les voies de dégradation complètes afin de s'assurer de la nature des produits générés par certaines souches. Comme le montrent les résultats, les métabolites produits peuvent varier, indiquant des voies de dégradation différentes et ce même pour des genres de souches identiques.

À cette fin, des outils analytiques tels que la spectrométrie de masse ou la comparaison avec des standards de métabolites connus seront nécessaires pour confirmer l'identité des composés détectés via HPLC. Par ailleurs, il serait pertinent d'identifier les gènes dégradants ainsi que les enzymes impliquées dans ces processus de dégradation afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents, encore peu connus pour le métamitron et le lénacil. Cette démarche permettrait également d'évaluer si ces enzymes sont capables de dégrader d'autres polluants, ouvrant ainsi la voie à des applications plus larges en bioremédiation.

Une fois les voies métaboliques mieux caractérisées, des essais en microcosmes peuvent être envisagés. Ces tests permettraient d'évaluer les interactions entre les souches sélectionnées et la microflore native du sol, leur impact sur la culture d'intérêt et l'impact de l'inoculation des souches dégradantes sur le temps de résidence des herbicides dans des conditions proches à celles retrouvées sur le terrain.

Enfin, après optimisation des conditions (doses, environnement, compatibilité), des essais à plus grande échelle en conditions réelles (sur le terrain) pourraient être envisagés à plus long terme. Cette étape s'inscrirait dans une stratégie de bioaugmentation, visant à appliquer les souches sélectionnées directement sur le terrain. L'évaluation de l'impact de cette pratique sur la qualité des sols et des eaux pourrait être envisagée. Ce travail ouvre ainsi la voie à une approche durable de bioremédiation, intégrée à des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement.

7. Participation de l'étudiant

L'ensemble du travail expérimental a été réalisé par l'étudiant. Cela inclut l'échantillonnage des biofiltres, la mise en place des cultures d'épuisement, les étapes de *screening*, ainsi que le suivi quotidien des cultures (mesures de densité optique, pH et concentration résiduelle). L'étudiant a également pris part à l'élaboration des protocoles analytiques en collaboration avec l'équipe de chimie, et a assuré les analyses chimiques, microbiologiques, ainsi que le traitement des résultats. Enfin, l'étudiant a rédigé le draft initial du manuscrit et a participé aux corrections en collaboration avec l'équipe encadrante.

8. Bibliographies

Adams G., Tawari-Fufeyin P., Okoro S. & Ehinomen I. , 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3, 28–39. DOI: <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5>.

Aislabie, J., & Lloyd-Jones, G., 1995. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research*, 33(6), 925–942. DOI : <https://doi.org/10.1071/SR9950925>

Alvarez, Héctor M. ed. *Biology of Rhodococcus*. 2nd ed. 2019.

Andreu, V. and Picó, Y., 2004. Determination of pesticides and their degradation products in soil: Critical review and comparison of methods. TrAC- Trends in Analytical Chemistry, 23(10-11):772 789. doi:10.1016/j.trac.2004.07.008.

Auffret M., Labbé D., Thouand G., Greer C.W. & Fayolle-Guichard F., 2009. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by Rhodococcus aetherivorans and Rhodococcus wratislaviensis. *Appl Environ Microbiol* 75(24), 7774–7782, DOI:[10.1128/AEM.01117-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01117-09).

Bazhanov D.P., Li C., Li H., Li J., Zhang X., Chen X. & Yang H., 2016. Occurrence, diversity and community structure of culturable atrazine degraders in industrial and agricultural soils exposed to the herbicide in Shandong Province, P.R. China. *BMC Microbiology* 16(1), 265, DOI:[10.1186/s12866-016-0868-3](https://doi.org/10.1186/s12866-016-0868-3).

Bedos C., Cellier P., Calvet R., Barriuso E. & Gabrielle B., 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphereby volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie* 22(1), 21–33, DOI:[10.1051/agro:2001003](https://doi.org/10.1051/agro:2001003).

Beernaerts, S., De Vleeschouwer, C., Delvaux, A., Debongnie, Ph., & Pussemier, L. , 2004. Prévention de la pollution des eaux par les pesticides en région wallonne. *Centre d'Étude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA)*, SPF Santé Publique.

Blecher R., Koch U., Ballhause B. & Lingens F., 1979. Mikrobieller und abiotischer Abbau des Triazinon-Herbizids Metamitron / Microbial and abiotic degradation of the triazinone herbicide metamitron. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection* 86(2), 93–102.

Blein J.P., 1983. Relation of lenacil metabolism with growth inhibition of Acer pseudoplatanus cell suspension. *Plant Science Letters* 29(2–3), 237–242, DOI:[10.1016/0304-4211\(83\)90148-7](https://doi.org/10.1016/0304-4211(83)90148-7).

Bokade P., Gaur V.K., Tripathi V., Bobate S., Manickam N. & Bajaj A., 2023. Bacterial remediation of pesticide polluted soils: Exploring the feasibility of site restoration. *Journal of Hazardous Materials* **441**, 129906, DOI:[10.1016/j.jhazmat.2022.129906](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129906).

Bollag J.M., 1974. Microbial Transformation of Pesticides. In: Perlman, D. ed. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, 75–130, DOI : [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70570-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70570-7)

Burrows H.D., Canle L M., Santaballa J.A. & Steenken S., 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **67**(2), 71–108, DOI:[10.1016/S1011-1344\(02\)00277-4](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(02)00277-4).

Carles L., Martin-Laurent F., Devers M., Spor A., Rouard N., Beguet J., Besse-Hoggan P. & Batisson I., 2021. Potential of preventive bioremediation to reduce environmental contamination by pesticides in an agricultural context: A case study with the herbicide 2,4-D. *Journal of Hazardous Materials* **416**, 125740, DOI:[10.1016/j.jhazmat.2021.125740](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125740).

Castillo M. Del P. & Torstensson L., 2008a. Biobeds - Biotechnology for Environmental Protection from Pesticide Pollution. In: Annable, M.D., Teodorescu, M., Hlavinek, P., Diels, L. eds. *Methods and Techniques for Cleaning-up Contaminated Sites*. Dordrecht: Springer Netherlands, 145–151.

Castillo M. del P., Torstensson L. & Stenström J., 2008. Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use—A Review. *J. Agric. Food Chem.* **56**(15), 6206–6219, DOI:[10.1021/jf800844x](https://doi.org/10.1021/jf800844x).

Chawla N., Sunita S., Kamlesh K. ,Kumar, R., 2013. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. RESEARCH JOURNAL OF CHEMISTRY AND ENVIRONMENT. 17. 88-105.

Coppola L. & Trevisan M., 2013. Biopurification System between Research and Technology Transfer. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. **3**(8). DOI: [10.4172/2155-6199.1000e118](https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000e118).

Cuevas M.V., Cox L., Calderón M.J., Hermosín M.C. & Fernández J.E., 2008. Chloridazon and lenacil dissipation in a clayey soil of the Guadalquivir river marshes (southwest Spain). *Agriculture, Ecosystems & Environment* **124**(3), 245–251, DOI:[10.1016/j.agee.2007.10.003](https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.10.003).

Cycoń M., Mrozik A. & Piotrowska-Seget Z., 2017. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere* **172**, 52–71, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>.

Damalas C.A. & Eleftherohorinos I.G., 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **8**(5), 1402–1419, DOI:[10.3390/ijerph8051402](https://doi.org/10.3390/ijerph8051402).

Daniel Norat and Michael Turnbull, 2008. Metamitron Degradation Pathway. http://eawag-bbd.ethz.ch/mtm/mtm_map.html.

De Souza R.M., Seibert D., Quesada H.B., de Jesus Bassetti F., Fagundes-Klen M.R. & Bergamasco R., 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Safety and Environmental Protection* **135**, 22–37, DOI:[10.1016/j.psep.2019.12.035](https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.035).

De Vleeschouwer, C., Pigeon, O., Cors, F., Planchon, V., Weickmans, B., Galoux, M., & Meeus, P. , 2006. *Développement de bio-épurateurs destinés à traiter les eaux de rinçage et de nettoyage des pulvérisateurs*. Rapport final, juin 2006.

Dhommée, R., 2024. *La bioaugmentation préventive des sols agricoles : un concept d'utilisation plus "durable" des pesticides pour réduire les contaminations environnementales* [Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne].

Dobrovolskaya T.G., Zvyagintsev D.G., Chernov I.Yu., Golovchenko A.V., Zenova G.M., Lysak L.V., Manucharova N.A., Marfenina O.E., Polyanskaya L.M., Stepanov A.L. & Umarov M.M., 2015. The role of microorganisms in the ecological functions of soils. *Eurasian Soil Sci.* **48**(9), 959–967, DOI: <https://doi.org/10.1134/S1064229315090033> .

EFSA, 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metamitron. *EFSA Journal* **6**(10), 185r, DOI:[10.2903/j.efsa.2008.185r](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.185r).

EFSA, 2024. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance lenacil. *EFSA Journal*, **22**(7), e8860. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8860> .

Elzakey E.M., El-Sabbagh S.M., Eldeen E.E.-S.N., Adss I.A.-A. & Nassar A.M.K., 2023. Bioremediation of chlorpyrifos residues using some indigenous species of bacteria and fungi in wastewater. *Environ. Monit. Assess.* **195**(6), 779, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11341-3> .

Engelhardt G., Ziegler W., Wollnofer P.R., Jarczyk H.J. & Oehlmann L., 1982. Degradation of the triazinone herbicide metamitron by Arthrobacter spec. DSM 20369. *J. Agric. Food Chem.* **30**(2), 278–282, DOI:[10.1021/jf00110a015](https://doi.org/10.1021/jf00110a015).

European Food Safety Authority, 2014. Guidance on the assessment of exposure of operators, workers, residents and bystanders in risk assessment for plant protection products. *EFSA Journal*, **12**(10). DOI: <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2014.3874> .

European Commission, Farm to Fork targets - Progress March-27-2025.
https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/farm-fork-targets-progress_en (consulté le 27/03/2025).

European Commission - Pesticides, March-31-2025.
https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_en, (31/03/2025).

Fang H., Xu T., Cao D., Cheng L. & Yu Y., 2016. Characterization and genome functional analysis of a novel metamitron-degrading strain *Rhodococcus* sp. MET via both triazinone and phenyl rings cleavage. *Sci Rep* **6**(1), 32339, DOI:[10.1038/srep32339](https://doi.org/10.1038/srep32339).

Fenner K., Canonica S., Wackett L.P. & Elsner M., 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science* **341**(6147), 752–758, DOI:[10.1126/science.1236281](https://doi.org/10.1126/science.1236281).

Franco A., Fu W. & Trapp S., 2009. Influence of soil pH on the sorption of ionizable chemicals: modeling advances. *Environ Toxicol Chem* **28**(3), 458–464, DOI:[10.1897/08-178.1](https://doi.org/10.1897/08-178.1).

Gangola S., Sharma A., Bhatt P., Khati P. & Chaudhary P., 2018. Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Sci Rep* **8**(1), 12755, DOI:[10.1038/s41598-018-31082-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-31082-5).

Gavrilescu M., 2005. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng. Life Sci.* **5**(6), 497–526, DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.200520098>.

Gilan I. & Sivan A., 2013. Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* C208. *FEMS Microbiol Lett* **342**(1), 18–23, DOI:[10.1111/1574-6968.12114](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12114).

Guillaume B. & Tech U. de L.G.A.-B., 2021. Evaluation of pesticides degradation by microorganisms in the soil of a new cropping system : Isolation and characterization of pesticide-degrading strains of soil microorganisms.

Huang L., Ma T., Li D., Liang F., Liu R.-L. & Li G., 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin* **56**(10), 1714–1718, DOI:[10.1016/j.marpolbul.2008.07.007](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.07.007).

Jaiswal, D. K., Verma, J. P., and Yadav, J., 2017. Microbe induced degradation of pesticides in agricultural soils. Environmental Science and Engineering (Subseries: Environmental Science), pages 167–189. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45156-5_8.

Jebellie S. j., Prasher ,S.O. & and Clemente R. s., 1996. Role of soil moisture content in reducing environmental pollution from pesticides. *Can. Water Resour. J. Rev. Can. Ressour. Hydr.* **21**(4), 393–402, DOI: <https://doi.org/10.4296/cwrj2104393>.

Kaur R., Singh D., Kumari A., Sharma G., Rajput S., Arora S. & Kaur R., 2023. Pesticide residues degradation strategies in soil and water: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **20**(3), 3537–3560, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03696-2>.

Kiaune L. & Singhasemanon N., 2011. Pesticidal Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity. In: Whitacre, D.M. ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213*. New York, NY: Springer, 1–26.

Konstantinou I.K., Zarkadis A.K. & Albanis T.A., 2001. Photodegradation of Selected Herbicides in Various Natural Waters and Soils under Environmental Conditions. *Journal of Environmental Quality* **30**(1), 121–130, DOI: [10.2134/jeq2001.301121x](https://doi.org/10.2134/jeq2001.301121x).

Kucharski M., Sadowski J., Wujek B. & Trajdos J., 2011. Influence of adjuvants addition on lenacil residues in plant and soil. *Pol. J. Agron.*

Kumar A., Trefault ,Nicole & and Olaniran A.O., 2016. Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. *Critical Reviews in Microbiology* **42**(2), 194–208, DOI: [10.3109/1040841X.2014.917068](https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.917068).

Kuppan N., Padman M., Mahadeva M., Srinivasan S. & Devarajan R., 2024. A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste Management Bulletin* **2**(3), 154–171, DOI: [10.1016/j.wmb.2024.07.005](https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.005).

Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15):5111–5120. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>.

Liaw H.J. & Srinivasan V.R., 1990. Biodegradation of diphenyl ethers by a copper-resistant mutant of *Erwinia* sp. *Journal of Industrial Microbiology* **6**(4), 235–241, DOI: [10.1007/BF01575867](https://doi.org/10.1007/BF01575867).

Liu H.-M., Cao L., Lu P., Ni H., Li Y.-X., Yan X., Hong Q. & Li S.-P., 2012. Biodegradation of butachlor by *Rhodococcus* sp. strain B1 and purification of its hydrolase (ChlH) responsible for N-dealkylation of chloroacetamide herbicides. *J Agric Food Chem* **60**(50), 12238–12244, DOI: [10.1021/jf303936j](https://doi.org/10.1021/jf303936j).

Lushchak V.I., Matviishyn T.M., Husak V.V., Storey J.M. & Storey K.B., 2018. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J.* **17**, 1101–1136, DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>.

Magnucka E.G., Pietr S.J., Kozubek A. & Zarnowski R., 2014. Various effects of the photosystem II – inhibiting herbicides on 5-n-alkylresorcinol accumulation in rye seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.* **116**, 56–62, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.015>.

Mamy L., Pesce S., Sanchez W., Amichot M., Artigas J., Aviron S. et al., 2022. Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques. Rapport de l'expertise scientifique collective (report).

Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., and Wackett, L. P., 1995. Isolation and characterization of a Pseudomonas sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4):1451–1457. DOI : <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1451-1457.1995>.

Margni M., Rossier D., Crettaz P. & Jolliet O., 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **93**(1), 379–392, DOI:[10.1016/S0167-8809\(01\)00336-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00336-X).

Müller, J., Beckers, M., Mußmann, N., Bongaerts, J., & Büchs, J. (2018). Elucidation of auxotrophic deficiencies of *Bacillus pumilus* DSM 18097 to develop a defined minimal medium. *Microbial Cell Factories*, **17**(1), 106. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0956-1>

Mussali-Galante P., Castrejón-Godínez M., Díaz-Soto J., Vargas-Orozco Á., Quiroz H., Tovar-Sánchez E. & Rodriguez A., 2023. Biobeds, a Microbial-Based Remediation System for the Effective Treatment of Pesticide Residues in Agriculture. *Agriculture*. **13**. 1289. DOI: [10.3390/agriculture13071289](https://doi.org/10.3390/agriculture13071289)

Navarro S., Vela N. & Navarro G., 2007. Review. An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Span. J. Agric. Res.* **5**(3), 357–375, DOI: <https://doi.org/10.5424/sjar/2007053-5344>.

Padmavathi, P., Suguna, P., Dhanalakshmi, K., & Naidu, N.V.S., 2016. Validation of the HPLC Method for the Analysis of Metamitron in Bulk and Commercial Dosage Forms. *Journal Name*. e- ISSN 0976 - 3651 Print ISSN 2229 – 7480

Parekh, N., Walker, A., Roberts, S., and Welch, S., 1994. Rapid degradation of the triazinone herbicide metamitron by a Rhodococcus sp. isolated from treated soil. *Journal of Applied Bacteriology*, **77**(5):467 – 475. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04389.x>.

Parekh, N. R., Hartmann, A., and Fournier, J. C., 1996. PCR detection of the mcd gene and evidence of sequence homology between the degradative genes and plasmids from diverse carbofuran-degrading bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**(12):1797–1804. DOI : [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00286-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00286-6).

Pathak V.M., Verma V.K., Rawat B.S., Kaur B., Babu N., Sharma A., Dewali S., Yadav M., Kumari R., Singh S., Mohapatra A., Pandey V., Rana N. & Cunill J.M., 2022. Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Front. Microbiol.* **13**, DOI:[10.3389/fmicb.2022.962619](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619).

Phytoweb | Données de vente, March-14-2025. . <https://phytoweb.be/fr/plan-de-reduction/vigilance/donnees-de-vente>, (14/03/2025).

Pigeon O., de Vleeschouwer C., Cors F., Weickmans B., de Ryckel B., Pussemier L., Debongnie P. & Culot M., 2005. Development of biofilters to treat the pesticides wastes from spraying applications. *Commun Agric Appl Biol Sci* **70**(4), 1003–1012.

Pigeon, O., De Vleeschouwer, C., Cors, F., Weickmans, B., Huyghebaert, B., Planchon, V., Pussemier, L., & Culot, M., 2006. *Biofilters to treat the pesticides wastes from spraying applications: results after 4 years of study*. *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, **71**(2a), 9-19.

PPDB. (2024). *Metamitron* (Ref: BAY DRW 1139). Pesticide Properties DataBase (University of Hertfordshire). Consulté le 26 mars 2025, depuis <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/446.htm>

PPDB. (2024). *Lenacil* (Ref: DPX B634). Pesticide Properties DataBase (University of Hertfordshire). Consulté le 26 mars 2025, depuis <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/417.htm>

Pussemier L., Vleeschouwe C. & Debongnie P., 2004. Self-made biofilters for on-farm clean-up of pesticides wastes. *Outlooks on Pest Management*. DOI: [10.1564/15apl06](https://doi.org/10.1564/15apl06).

Raffa C.M. & Chiampo F., 2021. Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. *Bioengineering (Basel)* **8**(7), 92, DOI:[10.3390/bioengineering8070092](https://doi.org/10.3390/bioengineering8070092).

Rani L., Thapa K., Kanojia N., Sharma N., Singh S., Grewal A.S., Srivastav A.L. & Kaushal J., 2021. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production* **283**, 124657, DOI:[10.1016/j.jclepro.2020.124657](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657).

Roberts T.R., Hutson D.H., Lee P.W., Nicholls P.H. & Plimmer J.R., 2007. *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*, Royal Society of Chemistry, 872.

Rosenbom, A. E., Olsen, P., Plauborg, F., Grant, R., Juhler, R. K., Brüscher, W., and Kjær, J., 2015. Pesticide leaching through sandy and loamy fields- Long-term lessons learnt from the

Danish pesticide leaching assessment programme. Environmental Pollution, 201:75–90. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.002>.

Sarker, A., Kim, D., & Jeong, W.-T., 2024. *Environmental fate and sustainable management of pesticides in soils: A critical review focusing on sustainable agriculture.* Sustainability, **16**(23), 10741. DOI: <https://doi.org/10.3390/su162310741>

Schiffers B. 2012. L'emploi des pesticides dans les cultures: entre tracteurs et détracteurs, *Probio - revue*, 80-93.

Schuster, S., Kreft, J. U., Brenner, N., Wessely, F., Theissen, G., Ruppin, E., and Schroeter, A., 2010. Cooperation and cheating in microbial exoenzyme production- Theoretical analysis for biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, 5(7):751–758. DOI : <https://doi.org/10.1002/BIOT.200900303>.

Scow K.M. & Hicks K.A., 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Curr. Opin. Biotechnol.*, Environmental biotechnology/Systems biology **16**(3), 246–253, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.009>.

Silvestri N., Ciurli A., Gorreri L., Sorice C. & Lorenzi R., 1997. Evaluation of the use of lenacil for weed control in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Adv. Hortic. Sci.* **11**(3), 115–119.

Spanoghe, P., Maes, A. & Steurbaut, W., 2004. Limitation of point source pesticide pollution: results of bioremediation system. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69, 719–732.

Statbel, Perspectives de la population, February-4-2025. <https://statbel.fgov.be/fr/themes/population/perspectives-de-la-population#panel-15> (consulté le 04/02/2025).

Statista, Population mondiale, February-5-2025. <https://fr.statista.com/statistiques/564933/population-mondiale-jusqu-en-2080/> (consulté le 05/02/2025).

Statistiques, February-27-2025. . ABW – L'association des Betteraviers Wallons. <https://betteravierswallons.be/statistiques/>, (27/02/2025).

Stouvenakers G., Massart S. & Jijakli M.H., 2023. First Study Case of Microbial Biocontrol Agents Isolated from Aquaponics Through the Mining of High-Throughput Sequencing Data to Control *Pythium aphanidermatum* on Lettuce. *Microb Ecol* **86**(2), 1107–1119, DOI:[10.1007/s00248-022-02126-1](https://doi.org/10.1007/s00248-022-02126-1).

Tadmor Y., Raz A., Reikin-Barak S., Ambastha V., Shemesh E., Leshem Y., Crane O., Stern R.A., Goldway M., Tchernov D. & Liran O., 2021. Metamitron, a Photosynthetic Electron

Transport Chain Inhibitor, Modulates the Photoprotective Mechanism of Apple Trees. *Plants* **10**(12), 2803, DOI:[10.3390/plants10122803](https://doi.org/10.3390/plants10122803).

Takai S., Hines S.A., Sekizaki T., Nicholson V.M., Alperin D.A., Osaki M., Takamatsu D., Nakamura M., Suzuki K., Ogino N., Kakuda T., Dan H. & Prescott J.F., 2000. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infect Immun* **68**(12), 6840–6847, DOI:[10.1128/IAI.68.12.6840-6847.2000](https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6840-6847.2000).

Thieffry S., Aubert J., Devers-Lamrani M., Martin-Laurent F., Romdhane S., Rouard N., Siol M. & Spor A., 2024. Engineering multi-degrading bacterial communities to bioremediate soils contaminated with pesticides residues. *J Hazard Mater* **471**, 134454, DOI:[10.1016/j.jhazmat.2024.134454](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134454).

Turnbull, G. A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., and Morgan, J. A. W., 2001. Degradation of Substituted Phenylurea Herbicides by *Arthrobacter globiformis* Strain D47 and Characterization of a Plasmid-Associated Hydrolase Gene, *puhA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5):2270 2275. doi:10.1128/AEM.67.5.2270-2275.2001

Tyagi M., da Fonseca M.M.R. & de Carvalho C.C.C.R., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* **22**(2), 231–241, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>.

Udiković-Kolić N., Scott C. & Martin-Laurent F., 2012. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**(5), 1175–1189, DOI:[10.1007/s00253-012-4495-0](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4495-0).

Van Eerd L.L., Hoagland R.E., Zablotowicz R.M. & Hall J.C., 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science* **51**(4), 472–495, DOI:[10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0472:PMIPAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2).

Verma J.P., Jaiswal D.K. & Sagar R., 2014. Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. *Rev Environ Sci Biotechnol* **13**(4), 429–466, DOI:[10.1007/s11157-014-9341-7](https://doi.org/10.1007/s11157-014-9341-7).

Vlaiculescu A. & Varrone C., 2022. Chapter 14 - Sustainable and eco-friendly alternatives to reduce the use of pesticides. In: Singh, P., Singh, S., Sillanpää, M. eds. *Pesticides in the Natural Environment*. Elsevier, 329–364.

Wang, S., Miltner, A., Muskus, A. M., and Nowak, K. M., 2021. Microbial activity and metamitron degrading microbial communities differ between soil and water-sediment systems. *Journal of Hazardous Materials*, 408:124293. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124293>

Wang S., Miltner A. & Nowak K.M., 2017. Identification of degradation routes of metamitron in soil microcosms using ^{13}C -isotope labeling. *Environmental Pollution* **220**, 927–935, DOI:[10.1016/j.envpol.2016.10.078](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.078).

Wauchope R.D., Yeh S., Linders J.B.H.J., Kloskowski R., Tanaka K., Rubin B., Katayama A., Kördel W., Gerstl Z., Lane M. & Unsworth J.B., 2002. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Manag. Sci.* **58**(5), 419–445, DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.489> .

Xu J.-L., He J., Wang Z.-C., Wang K., Li W.-J., Tang S.-K. & Li S.-P., 2007. Rhodococcus qingshengii sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(12), 2754–2757, DOI:[10.1099/ijs.0.65095-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.65095-0).

Zhan H., Feng Y., Fan X. & Chen S., 2018. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**(12), 5033–5043, DOI:[10.1007/s00253-018-9035-0](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0).

Zhang H, Zhang Y, Hou Z, Wu X, Gao H, Sun F, Pan H.,2014. Biodegradation of triazine herbicide metribuzin by the strain Bacillus sp. N1. *J Environ Sci Health B.* 49(2):79-86. DOI : <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.844610> .

Zhang M., Smyser B.P., Shalaby L.M., Boucher C.R., Berg D.S., 1999. Lenacil degradation in the environment and its metabolism in the sugar beets. *J Agric Food Chem.* Sep;47(9):3843-9. DOI : <https://doi.org/10.1021/jf981251i> .

Annexes

Annexe 1 :

Solutions stock (à préparer et stériliser) :

- KH_2PO_4 [100 g/L] : 25 g / 250 mL d'eau distillée
- KNO_3 [100 g/L]: 25 g / 250 mL d'eau distillée
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [100 g/L] : 31,8 g / 250 mL d'eau distillée
- NaCl [10 g/L] : 2,5 g / 250 mL d'eau distillée
- $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [20 g/L] : 5,75 g / 250 mL d'eau distillée
- CaCl_2 [20 g/L] : 5 g / 250 mL d'eau distillée

Solutions complémentaires :

- Solution de sels (125 mL) : contient des oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Mo, Co)
- Solution de vitamines (125 mL) : 2 mg de biotine, 5 mg de thiamine-HCl et filtrer à 0,22 µm pour stériliser
- $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: préparer le jour même (0,0559 g dans 10 mL d'eau stérile) et filtrer à 0,22 µm pour stériliser

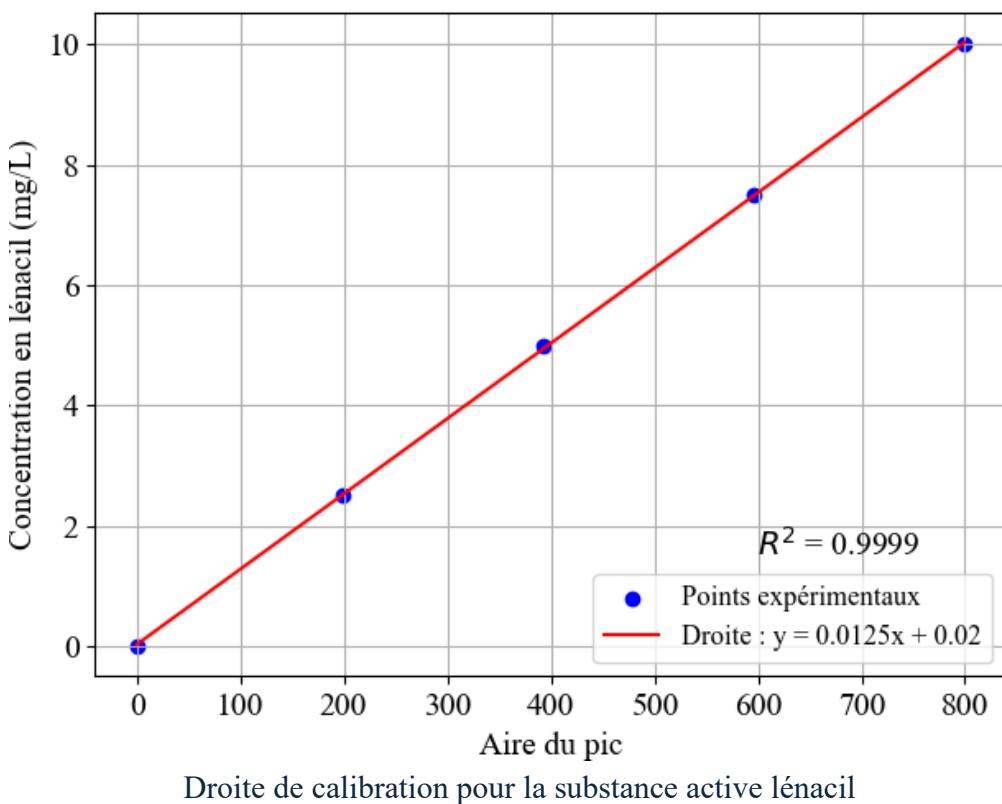
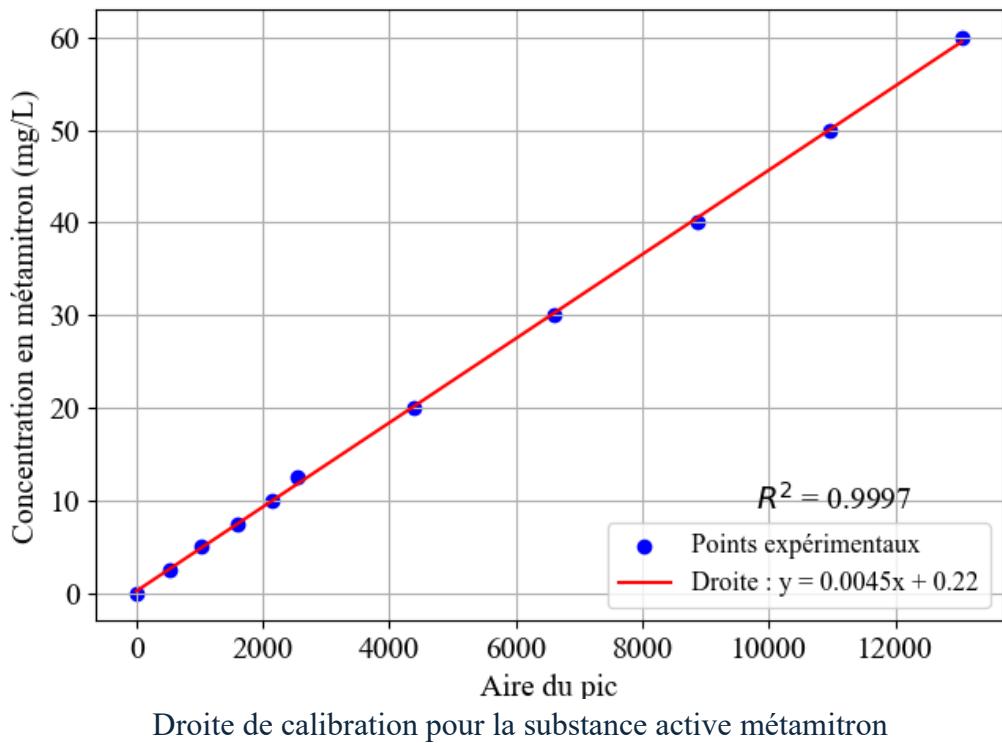
Assemblage du milieu (sous conditions stériles) :

Dans 926 mL d'eau stérile, ajouter :

- 10 mL de chaque solution stock (KH_2PO_4 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 , NaCl)
- 1 mL de solution de sels, vitamines, et CaCl_2
- 1 mL de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fraîchement préparé)

Homogénéiser le tout, puis stocker à 4 °C dans des erlenmeyers stériles fermés.

Annexe 2 :



Annexe 3 :

Affiliation phylogénétique des souches sélectionnées basée sur le séquençage de l'ADNr 16S.
Toutes les valeurs E étaient égales à 0.

Souche	Closest phylogenetic affiliation	Query coverage	identites	Max Score	Accession
8M	Rhodococcus sp. Strain ACtino-53	100%	99.62 %	1938	MH671549.1
	Rhodococcus qingshengii strain VER34	100%	99.62%	1938	CP085042.1
	Rhodococcus erythropolis	100%	99.62 %	1938	AB334770.1
	Rhodococcus erythropolis strain KB1 ²²	100%	99.62%	1938	CP050124.1
	Rhodococcus boritolerans B-G-PYD3	100%	99.62 %	1938	HM629409.1
29M	Rhodococcus sp. Strain YM1	100%	99.3 %	1808	PP907737.1
	Rhodococcus sp. CS1	100%	99.3%	1808	JF521654.1
	Rhodococcus sp. Strain ME2	100%	99.3 %	1808	PP907736.1
	Rhodococcus erythropolis strain XP	100%	99.3%	1808	CP176576.1
	Rhodococcus erythropolis strain BZ4	100%	99.3 %	1808	CP050124.1
	Rhodococcus erythropolis strain R85	100%	99.3%	1808	HQ588862.1
	Rhodococcus sp. Strain CAP-2	100%	99.3 %	1808	CP070870.1
	Rhodococcus sp. DN22	100%	99.3%	1808	MZ314676.1
	Rhodococcus sp. AQ5-07	100%	99.3%	1808	CP133326.1
	Rhodococcus erythropolis strain S13006	100%	99.3%	1808	KF956668.1
	Rhodococcus erythropolis strain CERE8	100%	99.3 %	1808	CP091859.1
30M	Rhodococcus qingshengi SZN34	100%	99.83%	2204	MW391623.1
	Rhodococcus erythropolis SjB-09149	100%	99.83%	2204	HQ179128.1
	Rhodococcus sp strain MAIDO-R22b-7	100%	99.83%	2204	MW632021.1
	Rhodococcus qingshengi strain DA-8	100%	99.83%	2204	OQ096482.1
	Actinomycetia bacterium	100%	99.83%	2204	OP881807.1
	Rhodococcus sp. Strain LW3	100%	99.83%	2204	MW007892.1
	Rhodococcus qingshengi QTP246051	100%	99.83%	2204	PP837106.1
	Rhodococcus globerulus strain DSQ17	100%	99.83%	2204	HM217119.1
	Rhodococcus sp. Strain LW3	100%	99.83%	2202	MW560994.1
	Rhodococcus erythropolis SjB-09149	100%	99.83%	2202	EU326491.1
DSMZ	Arthrobacter sp. WS10	100%	99.75%	2185	JN210902.1
	Arthrobacter sp. strain YL-80	100%	99.75%	2185	OK136197.1
	Arthrobacter sp. TF11	99%	99.83%	2185	KC294102.1