

Biodégradation anaérobie d'un pyréthrénoïde et d'insecticides organophosphorés par des cultures bactériennes mixtes non définies

Paul W. SAVADOGO*, C. A. T. OUATTARA*,
A. S. OUATTARA*, A. S. TRAORÉ*

Résumé

La biodégradation de certains pesticides utilisés en agriculture au Burkina Faso a été testée en anaérobiose. Le Decis (deltaméthrine), le Sumithion (fénitrothion) et l'Ultracide (métidathion) ont été les principaux substrats. Des mesures spectrophotométriques et du taux d'abaissement de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) ont permis d'apprécier la biodégradation de ces pesticides. Après 3 mois d'acclimatation, 46,50 % de Decis et 56,50 % de Sumithion sont dégradés par des consortia de bactéries. Les taux d'abaissement de la DCO sont de 57,92 %, 42,30 % et 53,06 % respectivement pour le Decis, l'Ultracide et le Sumithion. Une amélioration du rendement d'épuration a été observée au cours de l'acclimatation. Des bactéries dénitrifiantes, des bactéries sulfato-réductrices et des bactéries méthanogènes interviendraient dans la dégradation anaérobie de ces pesticides.

Mots clés : Biodégradation, Decis, Ultracide, Sumithion, acclimatation, anaérobiose.

Anaerobic biodegradation of a pyrethroid and organophosphorus insecticides by no defined mixed bacterial cultures

Abstract

The biodegradation of some pesticides used in the agriculture of Burkina Faso was tested in anaerobic conditions. Decis (deltamethrin), Sumithion (fenitrothion) and Ultracide (metidathion) were the main substrates. Spectrophotometric and Chemical Oxygen Demand (COD) measures, permit to estimate the biodegradation of those pesticides. After 3 months of acclimation, 46,50% of Decis and 56,50% of Sumithion were degraded by acclimated bacterial consortia. The decrease of the COD was 57,92%, 42,3%, and 53,06%, respectively for Decis, Ultracide and Sumithion. The improvement of the purification yield was observed during the acclimation. Denitrifying, sulfate-reducing and methanogenic bacteria were presumed to be involved in anaerobic degradation of those pesticides.

Key words: Biodegradation, Decis, Ultracide, Sumithion, acclimation, anaerobic.

* Laboratoire de biotechnologie et de technologie alimentaire
Faculté des sciences et techniques, université de Ouagadougou
03 B.P. 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso
Fax : 33 73 73 / 30 72 42.

Introduction

Afin de lutter contre les nuisibles des végétaux et accroître le rendement agricole, les pesticides sont de plus en plus utilisés par les paysans du Burkina Faso. Cependant l'usage courant de ces pesticides présente plusieurs inconvénients pour l'Homme, les animaux et les microorganismes utiles. En effet plusieurs auteurs ont démontré que les pesticides peuvent être toxiques aussi bien pour les plantes que pour les micro-organismes utiles à l'Homme (RENNER et HOPFER, 1987 ; HUYNT, 1990 ; RAMADE, 1992). Certains herbicides, notamment les dérivés de l'acide phénoxyacétique, sont capables de mimer l'action des auxines végétales, inhibant ainsi la photosynthèse et bloquant le cycle de Calvin chez certaines plantes. On sait également que les pesticides dérivés de l'urée sont très toxiques pour le phytoplancton. Plusieurs cas d'intoxication des microorganismes du sol due à l'application des pesticides ont été relevés (GINETTE, 1977 ; LIEBERMAN et ALEXANDER, 1981 ; BEAN et SOUTHALL, 1983 ; RENNER et HOPFER, 1987 ; HUYNT, 1990 ; RAMADE, 1992).

Une pollution particulièrement dangereuse peut survenir par infiltration dans le sol de pesticides peu volatils et plus denses que l'eau, susceptibles de former des zones d'accumulation, d'où ils peuvent contaminer pendant de longues durées la nappe phréatique et les eaux de boisson. Les communautés microbiennes réagissent aux stress et aux produits toxiques en changeant leurs activités métaboliques, ce qui se traduit par la sélection de souches tolérantes ou biodégradantes des polluants introduits dans l'environnement (ALICE *et al.*, 1984 ; BARKAY et PRITCHARD, 1988 ; BECHARD *et al.*, 1990). La détoxification des écosystèmes contaminés par les pesticides peut se faire de manière abiotique (transformation photochimique, volatilisation, complexation,...) ou par biodégradation. Dans la recherche des moyens pour l'élimination des résidus de pesticides, l'utilisation des microorganismes constitue un moyen sûr, peu coûteux et même quelques fois unique. En effet l'équipement enzymatique des microorganismes leur permet de métaboliser directement un xénobiotique comme s'il s'agissait du substrat normal. L'attaque de ce xénobiotique peut s'opérer jusqu'à un stade avancé et aboutir à sa minéralisation complète. Les travaux de certains chercheurs ont clairement démontré l'importance des microorganismes dans la transformation des composés organiques dans l'environnement anaérobie (SLEAT et ROBINSON, 1984 ; OUATTARA, 1994). Plusieurs travaux tendent à démontrer que les microorganismes anaérobies offriraient une meilleure aptitude à la dégradation que les microorganismes aérobies (JAMES et LETTINGA, 1990). La dégradation anaérobie peut aboutir à la production de méthane utilisable comme source d'énergie. L'acclimatation de certaines souches bactériennes leur permet d'acquérir des propriétés nouvelles, rendant ainsi possible la dégradation des molécules qui leur étaient résistantes au départ. C'est ainsi qu'on note une augmentation de la vitesse de dégradation d'un pesticide appliqué de manière répétée dans un champ (BARKAY et PRITCHARD, 1988). L'isolement des bactéries aptes à la dégradation rapide des pesticides peut contribuer à résoudre le problème de la pollution de l'environnement par les pesticides. En effet les souches performantes peuvent être utilisées dans les champs préalablement traités par les pesticides afin d'en éliminer les résidus. Ces mêmes souches peuvent être utilisées pour la décontamination des fûts ayant contenus des pesticides.

Le présent travail rapporte les résultats de tests de biodégradation anaérobie de quelques insecticides très utilisés par les agriculteurs burkinabé.

Matériels et méthodes

Source de microorganismes

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

Les substrats

Les échantillons de pesticides ont été fournis par la direction de protection des végétaux et du conditionnement (DPVC) sise à Ouagadougou. Des suspensions de ces pesticides ont été réalisées en effectuant une dilution au 1 / 10^e dans de l'eau distillée, conditionnées dans des flacons de 20 ml en absence d'oxygène, enveloppées de papier aluminium et conservées à + 4 °C. Des études préliminaires ont porté sur six pesticides parmi les plus utilisés au Burkina Faso. Ces pesticides étaient composés de quatre organophosphorés [le Malathion (malathion), le Sumithion (Fénitrothion), l'Ultracide (Métidathion) et le Pyridaphenthion (pyridaphenthion)], d'un carbamate [le Sevimol (carbaryl)] et d'un pyréthri-noïde de synthèse [le Decis (Deltaméthrine)]. A la suite des études préliminaires trois pesticides ont été retenus pour l'étude de biodégradation. Il s'agit du Decis, de L'Ultracide et du Sumithion.

Les conditions de culture

Les techniques standards de préparation de milieu de cultures et de culture de microorganismes en anaérobiose tels que décrits par HUNGATE (1969) ou MACY *et al.* (1972) ont été utilisées lors de nos études. Le milieu de culture utilisé est un mélange d'une solution minérale (solution A) et d'une solution réductrice (solution B) (TRAORÉ *et al.*, 1983).

Solution A : K₂PHO₄, 0,35 g ; KH₂PO₄, 0,25 g ; NaCl, 0,5 g ; Casitone, 0,1 g ; Extrait de levure, 0,1 g ; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g ; solution d'oligo-élément (WIDDEL *et al.*, 1983), 1 ml ; solution de rézasurine 0,1 %, 1 ml ; H₂O distillée désaérée, qsp 1000 ml.

Solution B : Na₂, H₂O, 2,5 g ; chlorhydrate de cystéine, 1,25 g ; NaHCO₃, 4g ; H₂O distillée désaérée, qsp 1000 ml. Les solutions A et B sont préparées anaérobiquement sous courant d'azote, puis stérilisées à 115 ° C pendant 35 mn. Le milieu de croissance complet est constitué d'un mélange de A et B de sorte que B représente 2 % (V / V). Le pH du milieu complet avant inoculation est compris entre 7,2 et 7,3.

Les cultures en condition méthanogénique sont réalisées dans des flacons de 500 ml contenant 400 ml du milieu complet précédemment décrit. Il est ajouté 20 mM de nitrate de sodium (NaNO₃) dans la solution A lors des analyses en condition dénitrifiante. Les tests en condition sulfidogénique sont réalisés avec le milieu de culture pour bactéries sulfato-

réductrices (TRAORÉ et JACQ, 1991) auquel on ajoute 20 mM de sulfate disodique (Na_2SO_4). Le lactate de sodium est remplacé par le substrat pesticide afin d'avoir le pesticide comme seule source de carbone. Le milieu de culture pour bactéries sulfato-réductrices a la composition suivante : Solution C: K_2HPO_4 , 0,35g ; KH_2PO_4 , 0,25g. Na_2SO_4 , 6,84 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,00g ; NaCl , 0,5 g ; NH_4Cl , 2,00 g ; extrait de levure, 0,10 g ; solution d'oligo-éléments (WIDDEL *et al.*, 1983), 1 ml ; solution de rézasurine (0,1 %), 1 ml ; eau distillée désaérée, qsp 1000 ml. La solution B (réductrice) et le milieu complet sont préparés comme précédemment décrit. L'acclimatation des souches est réalisée en laissant séjourner l'inoculum en présence d'un pesticide donné à 37 ° C. Des transferts successifs dans des milieux neufs sont effectués après chaque mois d'acclimatation. Des flacons inoculés sans substrat (pesticide) ont servi de blanc pour éliminer les effets éventuels dus aux autres constituants du milieu de culture. Des flacons non inoculés, mais contenant le substrat pesticide ont servi à la mise en évidence de la dégradation abiotique des pesticides. L'inoculation est faite en injectant 10 % (V / V) de l'inoculum dans le milieu de culture, à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille.

Etude de la morphologie et des structures bactériennes

La morphologie et les structures bactériennes ont été étudiées par observation au microscope optique en contraste de phase. Les observations ont été effectuées à l'état frais (grossissement x400) et après colorations [coloration de Gram, coloration des spores et coloration des flagelles (grossissement x1000)].

Méthodes analytiques

La dégradation des pesticides

L'évolution de la concentration des pesticides a été suivie par mesure de la DO. Des échantillons de milieu de culture contenant le pesticide sont prélevés et soumis à une centrifugation à 10 000 tours / mn pendant 20 mn à l'aide d'une centrifugeuse Eppendorf 5415C ; ceci dans le but d'éliminer les microorganismes et les débris. Les longueurs d'ondes retenues pour le dosage des pesticides sont les suivantes : 320 nm pour le Decis, 325 nm pour l'Ultracide et 322 nm pour le Sumithion. Chaque résultat représente la moyenne de 3 mesures. La baisse de la DO, traduisant la disparition des pesticides est estimée par rapport à un témoin non inoculé, contenant la même concentration initiale en pesticide que l'échantillon étudié et soumis aux mêmes conditions d'analyses.

La demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO a été déterminée suivant la norme AFNOR NFT 90-101, (1985) dont le principe est basé sur la réduction du bichromate de potassium en excès lors de la dégradation de la matière organique en milieu acide, à chaud et en présence de catalyseur. Les taux d'abaissement de la DCO sont mesurés après chaque mois d'acclimatation et sont calculés selon la formule suivante. Ce qui permet d'apprécier le taux d'épuration des milieux de culture.

$$\Delta\text{DCO} = \frac{\text{DCO}_{\text{initiale}} - \text{DCO}_{\text{finale}}}{\text{DCO}_{\text{initiale}}} \times 100$$

La production de gaz

La production d'azote et de méthane ont été suivie par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'appareil utilisé est un chromatographe GIRDEL série 30, type 30-C-TP n° 900 équipé d'un enregistreur potentiométrique SERVOTRACE type PL n° 9349 et doté de colonne ALLTECH CAT n° 8700. les conditions opératoires étaient: température de l'injecteur et du détecteur, 100 °C ; température du four, 60 °C; gaz vecteur (argon) au flux de 30ml / mn ; courant filament, 50mA ; volume injecté, 0,5ml. La production de méthane nous a servi d'indicateur de biodégradabilité des pesticides testés.

Le dosage des sulfures

Elle a été réalisée selon la méthode décrite par CORD-RUWISCH (1985). On injecte rapidement 0,1 ml de la culture dans 4 ml de réactif (HCl 50mM-CuSO₄ 5mM). Après homogénéisation, l'intensité de la coloration brune due au sulfate de cuivre formé est mesurée à 480 nm au spectrophotomètre (Cam Spec M302).

Résultats

Le test de la biodégradabilité des pesticides par la mesure de la production de méthane dans les flacons a donné les résultats représentés par la figure 1. En tenant compte de la production de méthane nous constatons que les pesticides facilement biodégradables sont: le Sevimol, le malathion et le Pyridaphenthion. La production de méthane y est plus importante, et on n'observe pas de phase de latence. Le Decis et le Sumithion ont une biodégradabilité moindre se traduisant par une production de méthane moins importante et une phase de latence de 2 jours. L'Ultracide semble peu biodégradable à cette concentration (10mg / l). A la suite de ces résultats, les composés les plus difficilement biodégradables (Decis, Sumithion l'Ultracide) ont été retenus pour une acclimatation des souches afin d'améliorer la biodégradabilité de ces pesticides.

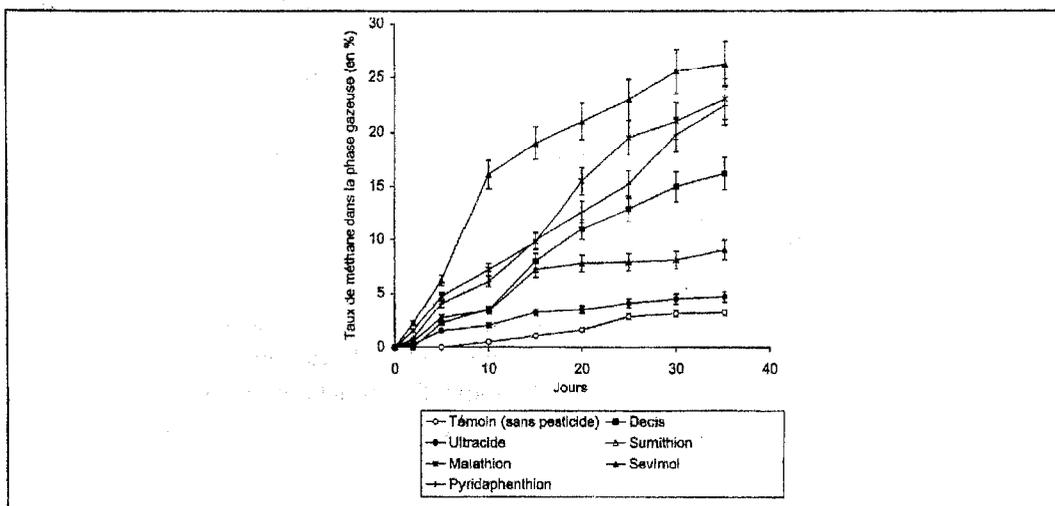


Figure 1. Production de méthane en présence des différents pesticides à la concentration de 10 mg / l et de l'inoculum non acclimaté.

Morphologies et structures des bactéries constituant les consortia

Les observations effectuées avant l'acclimatation montrent que notre inoculum était constitué de plusieurs types de bactéries incluant des coques à Gram⁺ (mobiles ou immobiles), des bâtonnets de taille et de coloration de Gram variable ainsi que des vibrio très mobiles. Après acclimatation, ces formes persistaient. Les formes majoritaires dans le milieu Decis et le milieu Sumithion sont les bâtonnets courts à Gram⁻ et les vibrio. Au niveau de l'Ultracide on note la présence de coques à Gram⁺ en plus des bâtonnets courts à Gram⁻ et des vibrio. Nous avons observé de nombreuses spores dans tous les milieux, indiquant la capacité d'une ou de plusieurs souches de notre consortium à sporuler.

Estimation de la disparition des pesticides dans les flacons

Après 3 mois d'acclimatation, la baisse de la DO en présence de l'inoculum après 30 jours d'incubation est de 64 % avec le Decis et de 56,60 % avec le Sumithion (figure 2). Ces résultats ont montré une dégradation due aux effets abiotiques (volatilisation, photodécomposition, etc.) qui est de 17,50 % pour le Decis et de 0,10 % pour le Sumithion. En soustrayant la dégradation abiotique de la dégradation totale, il apparaît que la biodégradation du Decis est de 46,5 % tandis que celle du Sumithion est de 56,50 %. Ces valeurs montrent qu'il y a une biodégradation anaérobie de ces pesticides. En présence d'Ultracide nous avons enregistré une augmentation de la DO au cours du temps, ce qui ne nous permet pas d'évaluer la biodégradation par la méthode spectrophotométrique. Mais l'observation au microscope des milieux à Ultracide montre que des bactéries vivantes y sont présentes.

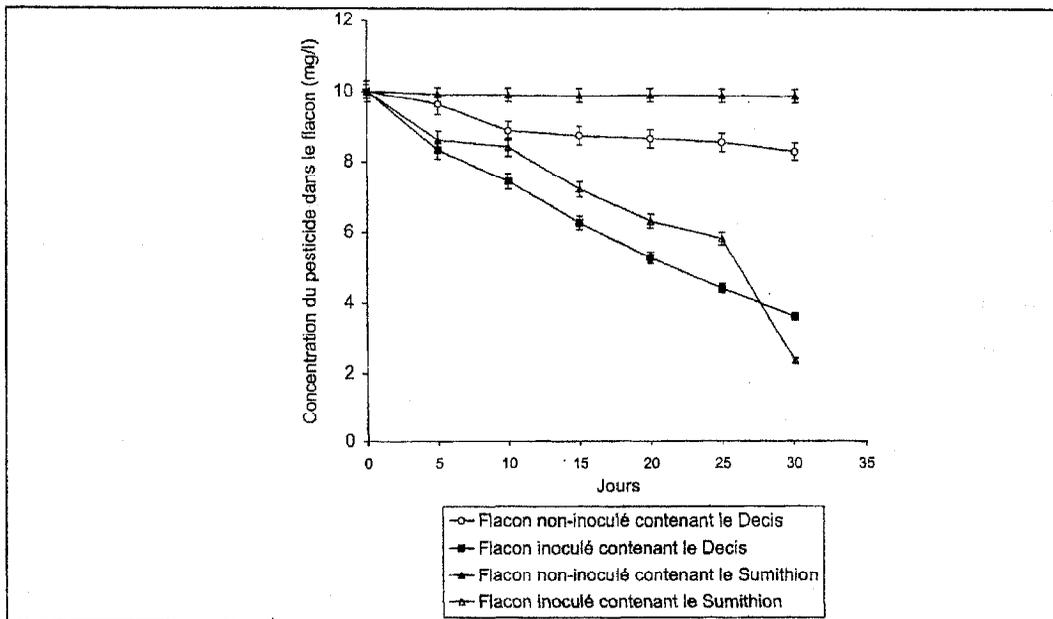


Figure 2. Suivi de la dégradation du Decis et du Sumithion en présence du consortium ayant subi 3 mois d'acclimatation.

Variation de la DCO (demande chimique en oxygène)

Les taux d'épuration obtenus après 1 mois d'acclimatation et présentés dans le tableau I ne permettent pas d'apprécier la biodégradation des pesticides testés, dans la mesure où l'inoculum (prélevé directement dans une station d'épuration) contient d'autres substances carbonées pouvant servir de substrat pour les bactéries. L'abaissement de la DCO indique cependant une dégradation de la matière organique contenue dans les flacons. Les résultats après 2 et 3 mois d'acclimatation montrent qu'après 3 mois d'acclimatation les taux d'abaissement moyens de la DCO sont respectivement de 57,89 % pour le Decis, 42,30 % pour l'Ultracide et 53,04% pour le Sumithion (tableau I). Par rapport à l'inoculum n'ayant subi que 2 mois d'acclimatation on observe une amélioration de ces taux de 2,63% pour le Decis, de 7,90 % pour le Sumithion et de 3,20 % pour l'Ultracide.

Tableau I. Taux d'abaissement moyen de la DCO après 1, 2 et 3 mois d'acclimatation du consortium

	Après 1 mois			Après 2 mois			Après 3 mois		
	DCO _i (mg / l)	DCO _f (mg / l)	Δ DCO* (%)	DCO _i (mg / l)	DCO _f (mg / l)	Δ DCO* (%)	DCO _i (mg / l)	DCO _f (mg / l)	Δ DCO* (%)
Decis	15 400	7 000	54,55	11 400	4 900	56,99	11 400	4 800	57,89
Ultracide	15 700	7 700	50,96	11 000	6 700	39,10	10 400	6 000	42,30
Sumithion	16 000	8 200	48,75	11 848	6 500	45,10	11 500	5 400	53,04

*Moyenne de 3 mesures avec des écartypes variant entre 0,71 et 0,86

DCO_i : DCO initiale

DCO_f : DCO finale

Δ DCO : Taux d'abaissement moyen de la DCO

Biodégradation dans diverses conditions anaérobies

Avec les consortia ayant subi 3 mois d'acclimatation, une production importante d'azote a été observée dans les milieux contenant les pesticides en présence du nitrate (figure 3). La production d'azote est très faible les 5 premiers jours, puis elle augmente de manière importante jusqu'au 25^e jour. Cela se traduit par l'existence d'une phase de latence relativement courte pour tous les composés testés.

En présence de sulfate dans le milieu de culture, une production importante de sulfures a été observée avec les consortia ayant subi 3 mois d'acclimatation. Cette production de sulfures débute après une phase de latence de 2 jours (figure 4). Elle est très forte entre le 10^e et le 25^e jour. Après le 25^e jour on note une décroissance de la production de sulfures. Les phases de latence observées sont plus courtes que celles notées en conditions dénitrifiantes.

En absence de tout donneur exogène d'électrons et en présence de 20mg/l de substrat, une importante production de méthane a été observée (figure 5). Les temps de latence varient de 3 à 4 jours. L'activité méthanogénique augmente au cours du temps. On note cependant un ralentissement de la production de méthane après le 20^e jour pour le Sumithion et l'Ultracide.

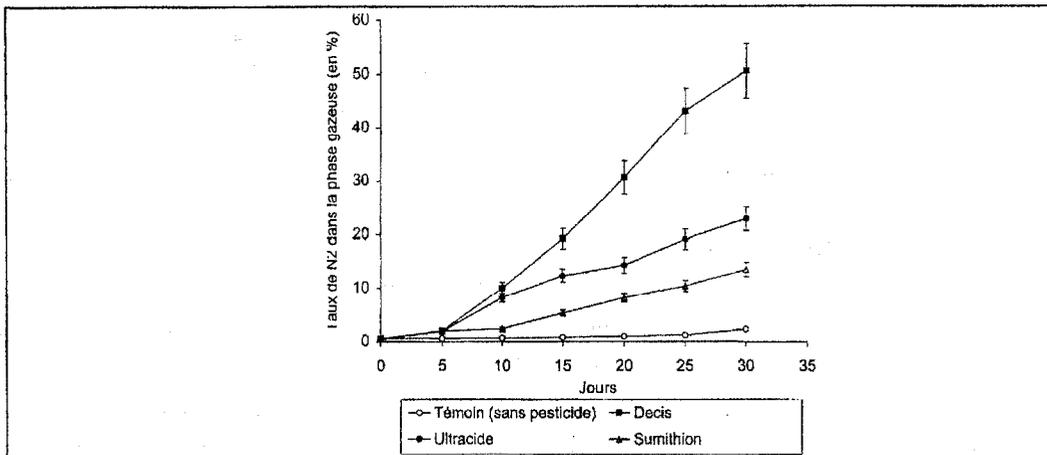


Figure 3. Production d'azote (N₂) dans les flacons en présence des pesticides à la concentration initiale d 10 mg / l et du consortium ayant subi 3 mois d'acclimation.

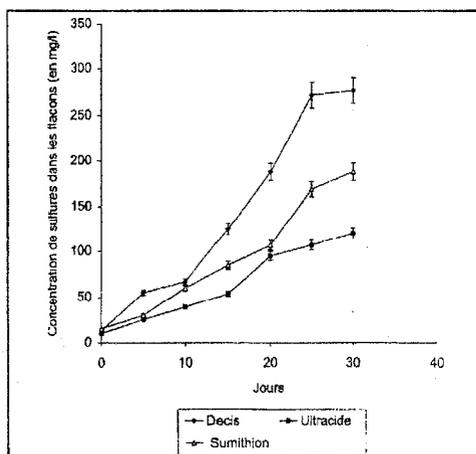


Figure 4. Production de sulfures dans les flacons en présence des pesticides à la concentration initiale d 10 mg / l et du consortium ayant subi 3 mois d'acclimation.

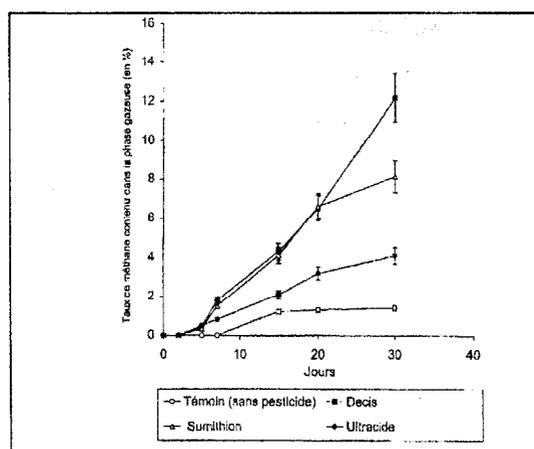


Figure 5. Production de méthane (CH₄) dans les flacons en présence des pesticides à la concentration initiale d 10 mg / l et du consortium ayant subi 3 mois d'acclimation.

Discussion

Bien que les taux d'épuration indiqués par l'abaissement de la DCO soient moyens, nous constatons que l'acclimation augmente la capacité biodégradable des microorganismes. Ces résultats sont similaires à ceux de OUATTARA (1994). Nos résultats peuvent s'expliquer par les hypothèses suivantes : une induction d'enzymes spécifiques à ces pesticides, une mutation génétique conduisant à de nouvelles capacités physiologiques ou une sélection de bactéries spécifiques tolérant et/ou dégradant ces pesticides. Ce type de sélection a lieu dans la nature et constitue un moyen de lutte des communautés microbiennes face à la pollution de leur environnement (BARKAY et PRITCHARD, 1988). Les résultats (figure 3) indiquent que tous les pesticides testés peuvent être biodégradés en conditions dénitrifiantes.

Selon nos résultats, en présence de nitrates le Decis serait le plus facilement biodégradable, suivi par l'Ultracide et le Sumithion. Le catabolisme des pesticides en présence de nitrate est couramment observé chez certaines bactéries du sol tel que les *Pseudomonas* et les *Bacillus*. Les bactéries dénitrifiantes interviennent activement dans la nature et leur action peut être bénéfique lorsque l'environnement est pollué par des déchets azotés (EDWARD et McCARTY, 1983). La production importante de sulfures montre que les pesticides testés peuvent être métabolisés en conditions sulfato-réductrices. Dans ces conditions de cultures, le Decis serait le plus facilement catabolisable, suivi du Sumithion et de l'Ultracide. Il est montré que les bactéries sulfato-réductrices peuvent oxyder des composés cycliques ou réaliser la déshalogénéation de certains pesticides (BERRY *et al.*, 1987).

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

Conclusion

Nos travaux montrent qu'une biodégradation des pesticides testés (Decis, Ultracide, et Sumithion) est possible en présence ou en absence d'accepteur d'électrons exogènes. Une période d'acclimatation est cependant nécessaire. Le Decis est le plus facilement biodégradable quelles que soient les conditions de culture. Les phases de latence les plus brèves sont observées en conditions sulfato-réductrices. Les taux de biodégradation observés varient entre 45 à 57% après 30 jours d'incubation avec le consortium ayant subi 3 mois d'acclimatation. Cependant les taux de biodégradation obtenus avec les consortia de microorganismes en condition anaérobie peuvent être améliorés. Les pesticides tout comme les xénobiotiques et les autres molécules difficilement biodégradables peuvent être éliminés par l'utilisation de souches bactériennes performantes.

Des études en cours visent l'isolement et la caractérisation des souches intervenant dans la biodégradation des pesticides testés. Ces études permettront également de rechercher les métabolites afin de comprendre les mécanismes biochimiques de ces transformations. □

Références bibliographiques

- AFNOR, 1985. Analyse des eaux naturelles, édition MASSON, Paris, France, 545p
- ALICE C.M., CHARLES H. D., GUPTA R.C, RAVINDER K. P. and JAMES .D., 1984. Microbial transformation of primaquine by *Candida tropicalis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47 (3) :537-539.
- BARKAY T. and PRITCHARD H., 1988. Adaptation of pollutant stress, *Microbiol. Sci.*,5 (6): 165-169.
- BEAN G.A. and SOUTHALL A., 1983. Effect of pyridazinone herbicides on growth an *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. microbiol.*,46(2): 503-505
- BECHARD G., BISSAILLON J.G., BEAUDET R., and SYLVESTRE M., 1990. Degradation of phenol by a bacteria consortium under methanogenic conditions, *J. microbiol.*, 36 : 573-578.
- BERRY D.F., FRANCIS A. J., BOLLAG J.M., 1987. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.*, 51: 43-59.
- CORD-RUWISCH, R., 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfato-reducing bacteria *J. Microbiol. Methods*, 4: 33-36.

- EDWARD J.B. and McCARTY P.L., 1983.** Transformations of halogenated organic compounds under denitrification conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(4): 1295-1299.
- GINETTE S.S., 1977.** Incidences agrobiologiques des traitements fongicides des céréales, *Soil Biol. Biochem.*, 9: 243-245.
- HUNGATE, R. E., 1969.** A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes, "in" *Methods in Microbiol.* 13: 117-132.
- HUYNT T. H., 1990.** Effet des pesticides sur les zooécénoses de gastéropodes du caucasiens, thèse, université de Paris-sud (Orsay), 180 p.
- JAMES A. F. and LETTINGA G., 1990.** The role of phenolic and humic compounds in granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 544-550.
- MACY, J. M., SNELLEN, J.E., HUNGATE, R.E., 1972.** Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25(2): 1318-1323.
- LIEBERMAN M.T. and ALEXANDER M., 1981.** Effect of organic matter and nitrification in sewage, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26(1): 554-560.
- OUATTARA C.A.T., 1994.** La biodégradation des sous produits des industries agro-alimentaires pour la protection de l'environnement: cas des tourteaux de karité des huileries de Bobo-dioulasso (Burkina Faso), thèse, université de Ouagadougou, 128 p.
- RAMADE F., 1992.** Précis d'écotoxicologie, édition MASSON, Paris, 300 p.
- RENNER G. and HOPFER C., 1987.** Subacute toxicity studies on pentachlorophenol (PCP), and the isomeric (TCH, TCC, TCR), toxicological and environmental chemistry, 14 (4): 301-312.
- SLEAT R. et ROBINSON J.P., 1984.** The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds, *J. Appl. Bacteriol.*, 157(1): 381-384.
- TRAORÉ S. A., FARDEAU M.L., HATCHIKIAN C.E., LEGALL J. and BELAICH J.P., 1983.** Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Interspecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures. *Applied and Env. Microbiol.*, 5 (1): 1152-1156.
- TRAORÉ S.A. and JACQ V.A., 1991.** A simple membrane-filter technique for the enumeration of S-reducing bacteria in soil and water samples. *J. Microbiol. Methods*, 14(1): 1-4.
- WIDDEL F., KOHRING G-W. and MAYER F., 1983.** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. Sp. Nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 134(1): 286-294.