



Influence de la biodégradation dans l'atténuation des pesticides sur un bassin versant viticole : potentialité des différents éléments du paysage et rôle des zones tampons

Fabrice Martin-Laurent, Marion Devers, S. Pesce

► To cite this version:

Fabrice Martin-Laurent, Marion Devers, S. Pesce. Influence de la biodégradation dans l'atténuation des pesticides sur un bassin versant viticole : potentialité des différents éléments du paysage et rôle des zones tampons. *Innovations Agronomiques*, 2013, 28, pp.35-48. hal-02641947

HAL Id: hal-02641947

<https://hal.inrae.fr/hal-02641947>

Submitted on 28 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Influence de la biodégradation dans l'atténuation des pesticides sur un bassin versant viticole : potentialité des différents éléments du paysage et rôle des zones tampons

Martin-Laurent F.¹, Devers M.¹, Pesce S.²

¹ INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, 21065 Dijon Cedex

² Irstea, UR MALY, 3bis Quai Chauveau, 69336 Lyon

Correspondance : fabrice.martin@dijon.inra.fr

Résumé

Nos travaux ont montré que les différents compartiments d'un paysage viticole du site atelier de la Morcille (sol de la parcelle, bande enherbée et sédiments) connectés le long du continuum sol-eau, présentaient une aptitude à minéraliser le diuron. La capacité épuratrice de ces différents compartiments évolue en fonction du niveau d'exposition au contaminant. Ainsi la zone tampon exposée présente une meilleure aptitude à épurer le diuron que la zone tampon témoin. Les sédiments de la Morcille situés à proximité de la zone tampon présentent également une capacité épuratrice présentant un gradient amont-aval coïncidant avec le gradient amont-aval observé également pour la qualité chimique des eaux de la Morcille.

L'importance du flux érosif de la parcelle viticole vers le cours d'eau pour l'adaptation des communautés microbiennes à la biodégradation du diuron a pu être mise en évidence. Ces résultats originaux montrent que même si la microflore des sédiments présente intrinsèquement la capacité d'adaptation à la biodégradation du diuron, cette faculté est améliorée par le flux érosif suggérant le transfert du potentiel épurateur du compartiment terrestre au compartiment aquatique. Ceci souligne la connectivité chimique et microbiologique des compartiments terrestres et aquatiques.

L'évolution de la capacité épuratrice des sédiments de la Morcille en réponse à l'interdiction d'usage du diuron a permis de mettre en évidence une diminution de leur niveau d'exposition au diuron. Ceci confirme donc l'amélioration de la qualité chimique des eaux de la Morcille. Toutefois, quatre années après son interdiction, le diuron est toujours détecté dans les stations intermédiaires et aval aux périodes printanière et estivale. Sur la période d'étude, les capacités épuratrices des sédiments ont diminué de manière significative même si elles présentent toujours un gradient amont-aval en concordance avec la qualité chimique des eaux de la Morcille.

L'étude de la communauté microbienne dégradant le diuron du sol de la bande enherbée et des sédiments de la Morcille a permis d'isoler des populations microbiennes dégradantes. Ainsi, des isolats bactériens appartenant au genre *Arthrobacter* sp. transformant le diuron en 3,4-dichloroaniline ont pu être isolés du sol de la bande enherbée et des sédiments. De plus, un isolat bactérien appartenant au genre *Achromobacter* sp. dégradant la 3,4-dichloroaniline a pu être isolé. Le consortium microbien synthétique formé d'*Arthrobacter* sp. et d'*Achromobacter* sp. est capable de minéraliser le diuron. Ces observations suggèrent que la communauté bactérienne minéralisant le diuron dans le sol de la bande enherbée et dans les sédiments repose sur la coopération métabolique de deux populations dégradantes, l'une transformant le diuron en 3,4-dichloroaniline et l'autre minéralisant cet intermédiaire métabolique.

Pour conclure, ces travaux mettent en évidence que le sol de la parcelle viticole, le sol de la bande enherbée et les sédiments de la Morcille hébergent des communautés microbiennes capables d'épurer le diuron. Les capacités épuratrices de ces différents compartiments sont variables et l'un des paramètres affectant le plus ces capacités est le niveau d'exposition à la contamination. La capacité épuratrice des sols et des sédiments repose sur l'activité de populations dégradantes développant une coopération métabolique.

Mots-clés : zone tampon, bande enherbée, capacité épuratrice, biodégradation de pesticides

Abstract: Influence of biodegradation on pesticide attenuation in a vineyard watershed: potential of different landscape compartments and role of buffer zones

This study showed that the different compartments of the landscape within the Morcille watershed (vineyard soil, grass buffer strip soil, sediments), connected along the soil-water continuum, are able to mineralize the herbicide diuron. The purifying capability of these different compartments evolved according to the level of exposure to the contaminant. Indeed, the exposed grass buffer strip showed a better ability to mineralize diuron than the control one. The sediments of the Morcille river located nearby the buffer zone showed also a purifying capability following an upstream-downstream gradient in accordance with the one observed for the chemical quality of the water in Morcille river. The importance of the surface run-off from the vineyard to the sediments of the Morcille river for the adaptation of microbial communities to diuron-mineralization was showed. These original findings showed that although the microflora of the sediments was intrinsically able to adapt to diuron degradation, this process was favoured by soil run-off suggesting the transfer of purifying capabilities from soil to aquatic microbial communities, underlining the existence of chemical and microbiological connections of terrestrial and aquatic compartments of agro-systems.

Monitoring of the evolution of the purifying capability of sediments in response to the ban of diuron uses evidenced the improvement of the chemical quality of the Morcille river. However, even four years after its ban, diuron was still detected in the river at the intermediary and downstream stations in spring and summer. Over this four-year period the purifying capability of the sediments significantly decreased. However an upstream-downstream gradient was still detectable, in accordance with the one observed for the chemical quality of the Morcille water.

The study of the diuron-degrading microbial community from the grass-buffer strip soil and from the sediments allowed isolating diuron-degrading microbial populations. Several *Arthrobacter* sp. isolates able to transform diuron to 3,4-dichloroaniline have been isolated from the soil and the sediments. Moreover, one additional bacterial isolate belonging to the *Achromobacter* genus and able to mineralize 3,4-dichloroaniline, has been isolated. A synthetic microbial consortium made of *Arthrobacter* sp. and *Achromobacter* sp. populations was shown to be able to fully mineralize diuron. These observations suggest that the microbial community able to mineralize the diuron in the soil of the buffer zone or in the sediments of the Morcille river was probably resulting from the metabolic cooperation of two bacterial populations, one transforming the diuron to 3,4-dichloroaniline while the other mineralized this intermediary metabolite.

To conclude, this study shows that vineyard and grass buffer strip soils as well as the sediments of the Morcille River frequently exposed to diuron hosted a diuron-degrading microbial community able to degrade diuron. Degradation capabilities of these different compartments are variable and the level of exposure to the contaminant was shown as a major driver of the adaptation to diuron degradation. The purifying capability of vineyard and grass buffer strip soils sediments relied on the activity of microbial degrading populations developing cooperative metabolism.

Keywords: buffer zone, grass buffer strip, degrading capability, pesticides biodegradation

Introduction

Les dernières évolutions de la directive cadre européenne sur l'eau (Directive 2000/60/CE) ont conduit à ne plus uniquement considérer la qualité de l'eau destinée à la consommation mais à aussi prendre en considération le bon statut écologique des masses d'eau. Afin d'atteindre les objectifs fixés par la Communauté Européenne, l'Etat Français, en concertation avec les partenaires de la filière agricole, s'est engagé à l'issue du Grenelle à mettre en place le plan Ecophyto. Outre la réduction de 50% du recours aux pesticides, de nombreuses mesures sont envisagées pour limiter la dispersion de la contamination à l'échelle du paysage depuis les parcelles cultivées vers les compartiments environnementaux adjacents. Parmi elles, les zones tampons sont étudiées depuis de nombreuses années, notamment par le Comité d'organisation des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement (CORPEN) en collaboration étroite avec les chercheurs de l'Irstea et de l'INRA. Ces zones sont des dispositifs reconnus pour limiter la dispersion des résidus d'engrais et de produits phytosanitaires depuis les parcelles agricoles. Une zone tampon constituée d'une bande enherbée, d'une prairie, d'un bois, ou d'un talus, forme une interface entre la parcelle cultivée et le milieu environnant. Cette interface ne recevant pas directement d'intrants chimiques constitue une barrière physique destinée à intercepter les flux de polluants chimiques provenant de la parcelle agricole. De nombreuses études ont été conduites sur l'efficacité de ces dispositifs. Elles ont conclu à leur efficacité pour limiter les transferts de matière en suspension, de pesticides et de nutriments des zones agricoles vers les eaux de surfaces (Dillaha et Inamar, 1997 ; Dorioz et al., 2006). Cependant, les processus biotiques et abiotiques impliqués dans l'écodynamique des pesticides dans ces zones tampons restent peu décrits.

Dans ce contexte, les travaux menés à la demande de l'ONEMA dans le cadre du plan Ecophyto visaient à comprendre le fonctionnement des bandes enherbées et notamment leur capacité éventuelle d'atténuation naturelle des pesticides, qui est encore mal connue. Du fait de leur exposition chronique à des flux de pesticides d'origine agricole, les bandes enherbées représentent un élément contaminé des agrosystèmes qui peut agir en source secondaire de contamination. Afin d'appréhender la connectivité des bandes enherbées avec les ressources en eau et ses conséquences sur le devenir des résidus de pesticides, nous avons étudié les capacités épuratrices des différents éléments du paysage le long du continuum sol-eau (parcelle agricole - bande enherbée - cours d'eau). La gestion des bandes enherbées par une approche d'ingénierie écologique a été évaluée pour promouvoir l'atténuation naturelle des pesticides dans les agrosystèmes.

Le projet a reposé sur le partenariat entre l'UMR 1347 Agroécologie de l'INRA de Dijon et l'UR Maly de l'Irstea de Lyon. Il a bénéficié de la collaboration scientifique développée entre ces deux partenaires dans le cadre de différents programmes de recherche conduits dans le contexte viticole du Beaujolais sur le site Atelier Ardières - Morcille (69), site participant à la Zone Atelier du Bassin du Rhône (<http://www.graie.org/zabr/>). Ce projet s'est articulé en quatre volets dont les objectifs étaient les suivants :

- évaluation des capacités épuratrices de différentes composantes du paysage viticole le long du continuum sol-eau (parcelle viticole, bande enherbée, sédiment),
- étude de la connexion des composantes du paysage et de ses conséquences sur leur capacité épuratrice,
- évolution de la capacité épuratrice des sédiments de la Morcille suite à l'interdiction d'usage du diuron,
- caractérisation des mécanismes d'atténuation naturelle au sein de la bande enherbée et isolement et caractérisation de populations microbiennes dégradant le diuron.

1. Estimation des capacités épuratrices de différents éléments du paysage.

Les capacités épuratrices de différentes composantes du paysage viticole ont été évaluées au laboratoire par radiorespirométrie (Soulas, 1993) sur des échantillons environnementaux collectés le long du continuum sol-eau sur le site Atelier Ardières - Morcille (69) (Fig.1).

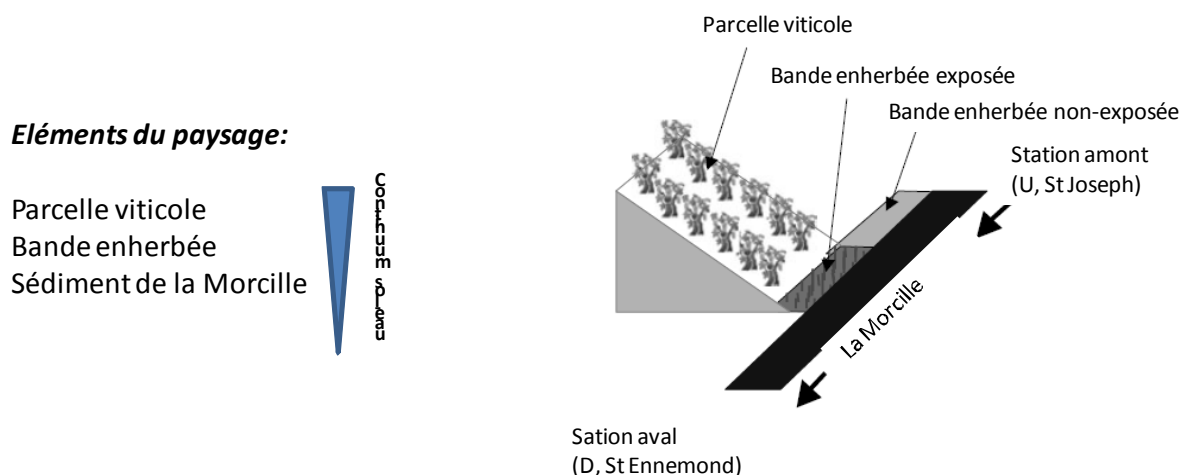


Figure 1 : Site atelier Ardières-Morcille (69) mis en place par l'Irstea.

1.1 Capacité épuratrice du sol de la parcelle viticole et de la bande enherbée

L'analyse des cinétiques de minéralisation révèle que la microflore du sol de la parcelle viticole traitée annuellement depuis plus d'une décennie avec cet herbicide est adaptée à la biodégradation du diuron. En moyenne, après 10 semaines d'incubation environ 35 ± 7 % du diuron marqué au ^{14}C initialement apporté étaient transformés en $^{14}\text{CO}_2$ (Pesce et al., 2009). Toutefois, l'activité dégradante de la microflore du sol de la parcelle viticole variait spatialement de 15 à 60 %. Une analyse plus poussée avec des outils de géostatistique conduite sur des échantillons de sol prélevés dans la parcelle selon une grille a permis de confirmer la variabilité spatiale de la capacité à minéraliser le diuron (Figure 2). Un gradient haut-bas a ainsi pu être mis en évidence au sein de la parcelle viticole, les échantillons prélevés en haut de la parcelle étant ceux qui présentaient la plus forte capacité de dégradation. Ils se caractérisaient aussi par un temps de latence (λ , exprimé en jour^{-1}) inférieur (Martin-Laurent et al., communication personnelle). Par ailleurs, de manière intéressante, les échantillons présentant les capacités de dégradation les plus élevées étaient aussi ceux qui avaient des valeurs de pH supérieures à 6,0. L'influence du pH sur la capacité de minéralisation du diuron et d'autres phénylurées substituées a déjà été rapportée (Walker et al., 2001 ; Hussain et al., 2009).

L'analyse des cinétiques de minéralisation du diuron observées au sein de la bande enherbée montre d'une part, la microflore de la bande enherbée exposée au flux de polluants issu de la parcelle viticole était adaptée à la biodégradation accélérée du diuron, minéralisant 33 ± 6 % du diuron marqué au ^{14}C en seulement 10 semaines d'incubation. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence que la microflore de la bande enherbée non exposée (c'est-à-dire exposée uniquement au ruissellement issu de la parcelle viticole) était capable de minéraliser le diuron (16 ± 4 % du diuron marqué au ^{14}C), cette capacité était statistiquement inférieure ($p < 0,05$) à celle mesurée dans la parcelle viticole (36 ± 6 % du diuron marqué au ^{14}C) ou dans la bande enherbée exposée (33 ± 5 % du diuron marqué au ^{14}C) (Pesce et al., 2009). Cette observation suggère donc que le niveau d'exposition au diuron est un facteur clef influençant la capacité épuratrice de la microflore du sol. Ce type de résultat a déjà été observé pour d'autres herbicides appartenant à la famille des urées substituées tels que l'isoproturon (El Sebai et al.,

2005) ou la famille des s-triazines tels que l'atrazine (Udikovic-Kolic et al., 2012). L'hypothèse sous-jacente est que l'exposition chronique au contaminant exerce une pression de sélection favorisant le développement et le maintien au sein de la communauté microbienne de populations capables de l'utiliser comme une source de nutriments. Par ailleurs, l'analyse du bilan de masse du ^{14}C montre qu'une plus grande quantité de ^{14}C -diuron était significativement ($p < 0.05$) accumulée dans la fraction biodisponible (extractible au méthanol) dans le sol de la bande enherbée non exposée ($46 \pm 5 \%$ ^{14}C -résidus) par comparaison aux sols de la parcelle viticole ($25 \pm 7 \%$ ^{14}C -résidus) et de la bande enherbée exposée ($31 \pm 4 \%$ ^{14}C -résidus). De manière similaire, une plus grande quantité de résidus liés marqués au ^{14}C était observée dans le sol de la bande enherbée non exposée ($37 \pm 6 \%$ ^{14}C -résidus) que dans le sol de la parcelle viticole ($25 \pm 5 \%$ ^{14}C -résidus).

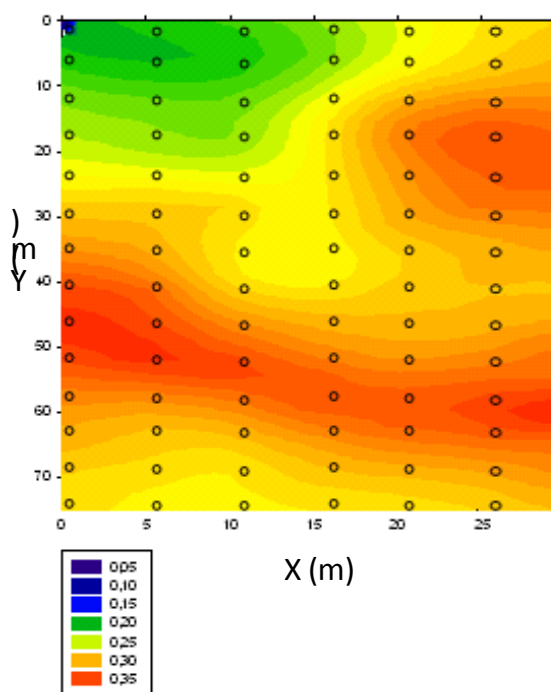


Figure 2 Carte géostatistique représentant la variabilité du temps de latence (λ , exprimé en jour^{-1}) estimée d'après la modélisation des cinétiques de minéralisation du diuron obtenues sur les échantillons de sol collectés dans la parcelle viticole du site atelier Morcille-Ardières (69).

Pour conclure, nos travaux montrent que la bande enherbée non exposée présente une faible capacité épuratrice et que le diuron restant dans le sol de la bande enherbée est biodisponible pour partie mais qu'il forme également des résidus liés. Ces résultats sont en accord avec une étude conduite par Dousset et al. (2010) sur le site Atelier Morcille-Ardières rapportant la lixiviation de diuron dans des colonnes de sol prélevées dans la bande enherbée suggérant l'implication de matières organiques solubles (MOS) dans le transfert du diuron au sein du sol de la bande enherbée. La rhizodéposition de composés solubles observée dans le système racinaire du ray-grass (Benoit, 2010), pourrait expliquer en partie ce phénomène. A contrario, l'accumulation de résidus végétaux au sein de la bande enherbée enrichit le sol en matières organiques particulaires (MOP) qui constituent des surfaces très réactives avec les pesticides contribuant à la formation de résidus liés (Benoit et al., 2003). Par conséquent, la bande enherbée non exposée constitue un puits de diuron présentant une faible capacité épuratrice, stockant le diuron sous forme de résidus liés et constituant une source potentielle de contamination secondaire. La tendance inverse est observée dans les sols de la parcelle viticole et de la bande enherbée exposée plus fortement au diuron. Ces sols présentent en effet une plus grande aptitude à minéraliser le diuron (quasiment le double) et en conséquence, ils stockent moins de diuron sous forme biodisponible et de résidus liés. La capacité épuratrice de la bande enherbée résulte donc de son niveau d'exposition au polluant. Elle contribue non seulement à la dissipation de la contamination mais également à la limitation de la dispersion secondaire du contaminant. Ces travaux soulignent

l'importance de la fonction de dégradation dans le niveau de service écosystémique rendu par les bandes enherbées qui présentent l'ambivalence d'être à la fois le réceptacle de contaminants issus des parcelles agricoles adjacentes et également la source d'une contamination secondaire des ressources environnementales auxquelles elles sont connectées.

1.2 Capacité épuratrice des sédiments et du périphyton de la Morcille

L'analyse des cinétiques de minéralisation du diuron observées dans les sédiments de la Morcille prélevés aux stations amont et aval a montré que la communauté microbienne des sédiments de la station aval, caractérisée par un niveau important de contamination au diuron, était capable de minéraliser jusqu'à 43 ± 9 % du diuron marqué au ^{14}C en seulement 6 semaines d'incubation. La communauté microbienne des sédiments collectés en amont de la Morcille, quasiment indemne de contamination, était en revanche caractérisée par une faible capacité dégradante atteignant seulement 10 ± 7 % du diuron marqué au ^{14}C après 10 semaines d'incubation (Pesce et al., 2009). Ces résultats montrent que suite à l'exposition chronique de la microflore des sédiments de la Morcille au diuron, celle-ci a acquis la faculté à dégrader l'herbicide. Ce phénomène a été observé pour d'autres pesticides tels que le MCPP, le 2,4-D, l'isoproturon ou encore l'atrazine (Larsen et al., 2000 ; Toräng et al., 2003). Il suggère que, comme cela a déjà été observé dans les sols agricoles, l'exposition répétée au pesticide conduit à la sélection au sein de la communauté microbienne de populations capables d'utiliser le contaminant comme une source de nutriments et d'énergie pour sa croissance, conduisant à la mise en place du phénomène de biodégradation accélérée (Topp et al., 2004). Il montre l'existence d'une capacité épuratrice au sein des sédiments de la Morcille présentant un potentiel d'amélioration de la qualité des masses d'eau.

De plus, l'analyse des cinétiques de minéralisation du diuron observées dans le périphyton de la Morcille prélevés aux stations amont et aval a montré que seul le périphyton de la station aval présentait une activité minéralisatrice, qui représente 20 ± 9 % du diuron marqué au ^{14}C après seulement 6 semaines d'incubation (Pesce et al., 2009). Plusieurs études ont mis en évidence l'impact écotoxicologique de différents herbicides sur les communautés microbiennes du périphyton, mais notre étude montre qu'une des facettes de cet impact conduit à l'adaptation des communautés microbiennes à la biodégradation accélérée du contaminant. L'ensemble de ces observations indique que le compartiment aquatique présente donc une capacité épuratrice tout à fait intéressante pour la résilience de la qualité chimique de la Morcille.

2. Etude de la connexion des composantes du paysage : conséquence sur leur capacité épuratrice

Dans la première partie de nos travaux nous avons pu mettre en évidence que suite à l'exposition répétée au diuron, une fraction de la communauté microbienne terrestre (parcelle viticole et bande enherbée) et aquatique (périphyton et sédiments) s'était adaptée à la biodégradation accélérée de cet herbicide. Nous avons ainsi montré que la capacité épuratrice observée dans ces différents compartiments de l'environnement était fonction de l'exposition au contaminant. Ainsi, la capacité épuratrice des sédiments situés dans la station amont quasi-indemne de contamination présentait une faible capacité épuratrice tandis que les sédiments collectés dans la station aval régulièrement contaminée avec cet herbicide présentaient une capacité épuratrice beaucoup plus élevée. Bien que ces résultats mettent en évidence la capacité d'adaptation des communautés microbiennes aquatique et terrestres à la dégradation du diuron, le processus d'adaptation n'avait pas encore été décrit. Afin d'appréhender cette question nous avons mis en place une expérimentation destinée à déterminer l'origine du processus adaptatif des communautés aquatiques. Pour ce faire nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le compartiment terrestre *via* le processus érosif, très marqué dans le

contexte viticole du Beaujolais, pouvait être à l'origine de la dispersion du potentiel dégradant au sein de la communauté microbienne aquatique.

Pour ce faire une expérience a été mise en place par l'équipe de l'Irstea dans des microcosmes aquatiques formés d'eau et de sédiments collectés à la station amont de la Morcille, supplémentés ou non par des sols prélevés sur la parcelle viticole, et traités ou non par le diuron (Fig. 3A).

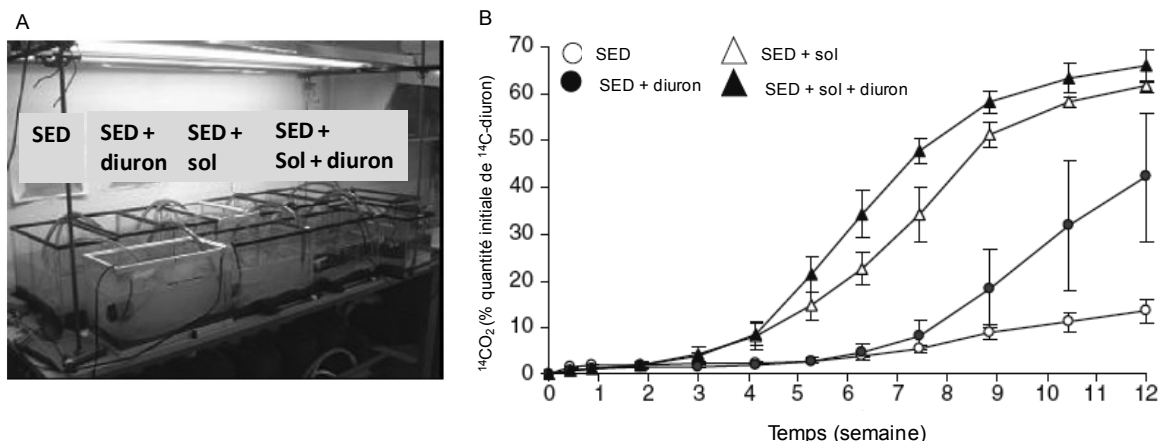


Figure 3 : A. Dispositifs expérimentaux mis en place par l'Irstea pour tester l'influence de l'apport de sol, mimant le flux érosif issu de la parcelle viticole, sur la réponse adaptative des communautés microbiennes des sédiments de la Morcille exposées au diuron. B. Cinétiques de minéralisation du diuron observées dans les sédiments de la Morcille témoins (SED), traités au diuron (SED + diuron), additionnés de sol issu de la parcelle viticole (SED + sol), additionnés de sol et traité au diuron (SED + sol + diuron). Pour chaque traitement trois microcosmes ont été utilisés ($n_{\text{tot}}=12$; d'après Pesce et al., 2010).

L'analyse des capacités épuratrices des sédiments ayant subi ces différents traitements montrent qu'intrinsèquement les sédiments de la Morcille sont capables de minéraliser en faible quantité le diuron atteignant moins de 10 % du diuron marqué au ^{14}C après 10 semaines d'incubation (Fig. 3B). Ces résultats confirment ceux d'une étude précédente (Pesce et al., 2009). Par ailleurs, l'analyse de la Fig. 3B montre que l'exposition des sédiments de la Morcille au diuron augmente d'un facteur trois sa capacité épuratrice. Elle met en évidence que les communautés microbiennes des sédiments collectés à la station amont de la Morcille sont capables de s'adapter à la biodégradation accélérée du diuron suite à une exposition chronique à cette molécule. Toutefois, la Fig. 3B montre aussi que l'ajout de sol dans les sédiments améliore de manière très significative les capacités épuratrices du sédiment, diminuant la phase de latence de trois semaines, multipliant par six la minéralisation du diuron dans les sédiments non traités au diuron et la doublant dans les sédiments traités au diuron. Ces résultats mettent en évidence que l'apport de sol contribue à améliorer les capacités épuratrices des sédiments. Ils suggèrent que les capacités épuratrices des communautés microbiennes terrestres ont été transférées aux communautés aquatiques. L'analyse de la structure globale des communautés microbiennes des sédiments (Pesce et al., 2010) a mis en évidence un effet transitoire de l'apport de sol sur les communautés microbiennes aquatiques. Toutefois, en raison de limitation méthodologique liée à cette approche qui permet d'accéder uniquement aux phylotypes dominants, il ne nous a pas été possible d'observer la colonisation des sédiments par des populations microbiennes terrestres dégradantes. Par conséquent, deux hypothèses peuvent être émises sur la base de nos résultats pour expliquer la réponse adaptative des sédiments à l'apport de sol de la parcelle viticole : (i) soit des populations microbiennes dégradant le diuron provenant du sol ont colonisé les sédiments, (ii) soit le potentiel génétique dégradant issu des populations microbiennes terrestres qui dégradent le diuron a été transféré aux populations microbiennes autochtones du sédiment (Pesce et al. 2012).

Pour conclure, cette expérimentation nous a permis de mettre en évidence que des communautés microbiennes de sédiments faiblement exposées au diuron étaient capables de s'adapter à la biodégradation de cette substance. Elle a également montré que la connectivité des compartiments terrestre et aquatique *via* le flux érosif pouvait être un processus favorisant l'adaptation des communautés microbiennes des sédiments à la biodégradation accélérée du diuron. Elle met donc en évidence la connectivité chimique et microbienne des compartiments terrestres et aquatiques dans les agrosystèmes. Elle souligne son importance dans l'évolution de la capacité épuratrice de ces compartiments environnementaux et donc des services écosystémiques qu'ils rendent.

3. Evolution de la capacité épuratrice des sédiments de la Morcille suite à l'interdiction d'usage du diuron

Sur la base des études menées sur le site de la Morcille-Ardières, nous avons montré que les capacités épuratrices de la microflore des sédiments vis-à-vis du diuron dépendaient principalement du niveau d'exposition à ce contaminant. En ce sens, la capacité épuratrice des sédiments pourrait constituer un bioindicateur d'exposition de la microflore répondant à la présence de l'herbicide dans le cours d'eau.

Afin de le vérifier, nous avons suivi l'évolution du potentiel de minéralisation du diuron sur la période 2008-2011 dans des échantillons de sédiments de la Morcille prélevés aux stations Saint-Joseph, Versauds et Saint-Ennemond. Une partie des cinétiques de minéralisation du diuron marqué uniformément au ^{14}C est présentée dans la Figure 4. L'analyse de ces cinétiques révèle que la microflore des sédiments des stations intermédiaire et aval est adaptée à la biodégradation accélérée du diuron. Elle transforme jusqu'à 60% du ^{14}C -diuron en $^{14}\text{CO}_2$ sur une période de 16 semaines d'incubation. *A contrario*, la station amont présente une faible capacité à minéraliser le diuron avec des valeurs maximales avoisinant 10% de la quantité initiale de ^{14}C -diuron initialement apportée. Sur la période 2008-2011 la capacité de la microflore des sédiments à minéraliser le diuron présente une variation saisonnière, les valeurs les plus élevées étant observées au printemps et en été.

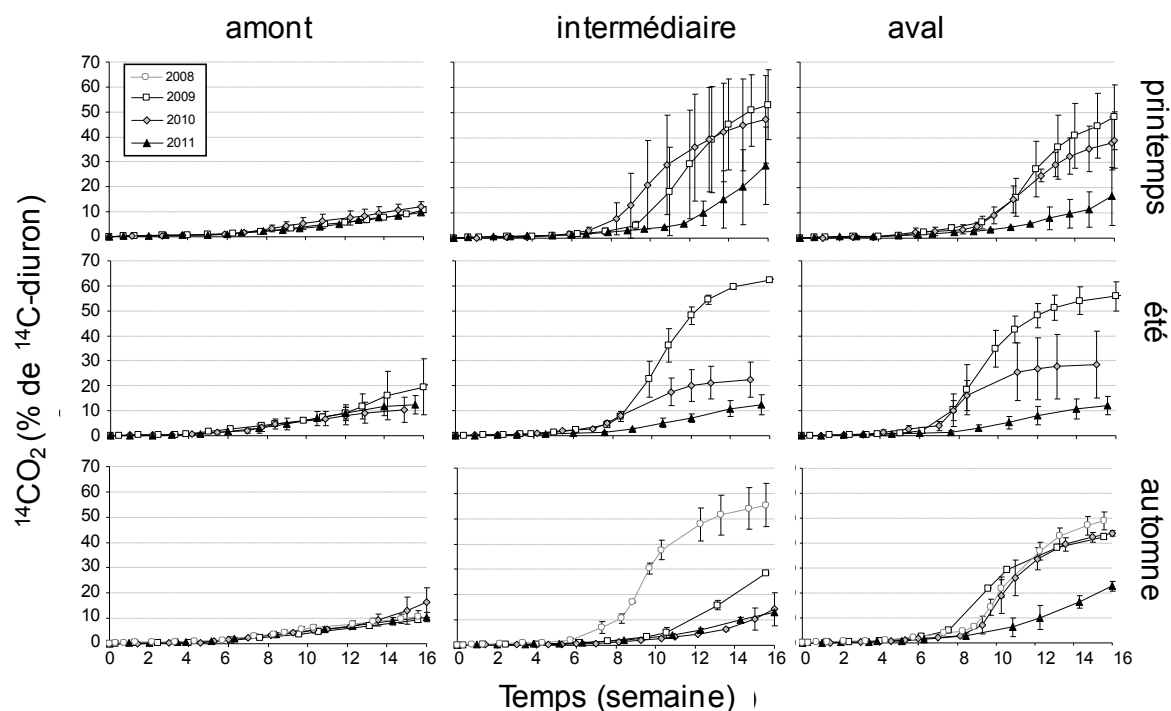


Figure 4 Suivi de l'évolution de la capacité de minéralisation des sédiments de la Morcille prélevés aux stations amont, intermédiaire et aval sur la période 2008-2011 (exprimé en % de la quantité de ^{14}C -diuron apportée initialement transformée en $^{14}\text{CO}_2$).

Ces observations sont en accord avec les données disponibles sur la qualité chimique des eaux de la Morcille, qui montrent que les communautés microbiennes du cours d'eau étaient alors exposées à ce contaminant. Sur la période 2008-2011, nous observons que la capacité de minéralisation du diuron des sédiments prélevés aux stations intermédiaires et aval diminue au cours du temps. Cette situation est particulièrement marquée dans la station intermédiaire pour la période estivale, avec un potentiel de minéralisation qui passe de 60% en 2008, à 20% en 2009 puis à 10% en 2010 et 2011.

Cette diminution de l'aptitude à minéraliser le diuron est en accord avec la diminution de l'exposition des communautés microbiennes à cet herbicide estimée par les mesures de la qualité chimique des eaux de la Morcille. Ces observations confirment donc que l'exposition au diuron conditionne la capacité de la microflore à le transformer et que par conséquent, la capacité épuratrice des sédiments constitue à la fois un marqueur d'exposition et un marqueur de résilience (Pesce *et al.*, 2013). Ceci conduit à un paradoxe avec une situation où la diminution de la contamination chimique du cours d'eau conduit à diminuer la capacité épuratrice des sédiments et en conséquence, à augmenter la persistance du contaminant. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, la persistance de la détection de ce polluant dans le cours d'eau même quatre années après son interdiction.

Afin d'évaluer l'évolution de la persistance du diuron dans les sédiments sur la période 2008-2011, nous avons estimé, à partir des cinétiques de minéralisation du diuron, le temps nécessaire à la minéralisation de 10% du ^{14}C -diuron apporté initialement. Cette analyse permet de distinguer la station amont des stations intermédiaire et aval. Pour la station amont, nous avons mesuré des temps de dissipation très élevés qui avoisinent les 120 jours et n'évoluent pas sur la période étudiée. Par opposition, pour les stations intermédiaires et aval des temps de dissipation deux fois plus faibles ont initialement été mesurés, avoisinant 60 jours en 2009. Toutefois, une augmentation de ce temps de dissipation a été observé dans ces deux stations au fil des ans pour atteindre en 2011 une valeur identique à celle mesurée pour la station amont. Dans ces deux stations, une corrélation négative significative entre le niveau d'exposition chronique au diuron et le temps de dissipation de la molécule dans les cinétiques de minéralisation a été mise en évidence (Figure 5). Cette cinétique d'évolution du temps nécessaire à minéraliser 10% du diuron confirme bien que la diminution de l'exposition des sédiments au contaminant conduit à une diminution de la capacité à le dégrader.

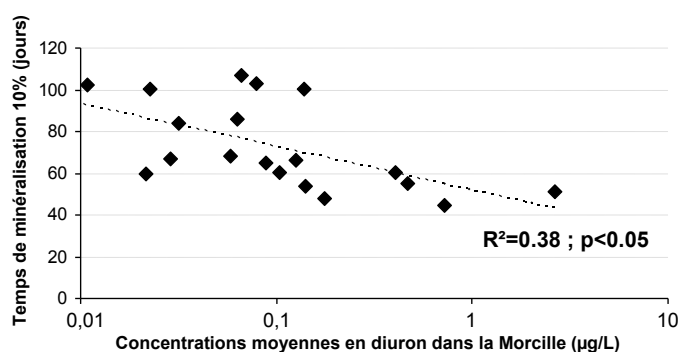


Figure 5 : Relation négative entre le niveau d'exposition chronique des sédiments de la Morcille au diuron et le temps nécessaire à la minéralisation de 10% de ^{14}C -Diuron lors des expériences de radiorespirométrie.

Pour conclure, ces travaux montrent que suite à l'interdiction de l'utilisation du diuron en 2008, le niveau de contamination des eaux de la Morcille par cette substance a fortement diminué. Malgré l'interdiction, la pression exercée par cet herbicide sur la Morcille reste notable aux stations intermédiaires et aval. De manière concomitante la capacité de la microflore des sédiments à dégrader le diuron était à la baisse sur la période 2008-2011. La capacité épuratrice de la microflore des sédiments des stations intermédiaire et aval est supérieure à celle de la station amont (située hors contexte viticole). Toutefois, au fil des ans, en réponse à la diminution de l'exposition au contaminant, la capacité épuratrice de la microflore des sédiments des stations intermédiaires et aval a diminué pour en 2011 être proche de celle observée dans la station amont. Nous pouvons donc suggérer que l'évolution du scénario d'exposition de la microflore des sédiments de la Morcille a très certainement conditionné l'évolution de

la capacité de la microflore des sédiments à minéraliser cet herbicide. Cette évolution montre que l'activité de minéralisation de la microflore des sédiments de la Morcille est un marqueur répondant à la qualité chimique des eaux, le niveau d'exposition au contaminant conditionnant son niveau de dégradation. Paradoxalement, bien que la diminution de la capacité épuratrice d'un polluant soit le signe d'une amélioration de la qualité chimique du cours d'eau, elle contribue également à diminuer la capacité de résilience du cours d'eau. La conséquence de ce paradoxe est que le résidu de pollution observé dans le cours d'eau risque de perdurer puisque la capacité épuratrice de l'environnement continuera de diminuer.

4. Caractérisation des mécanismes d'atténuation naturelle au sein de la bande enherbée : isolement et caractérisation de populations microbiennes dégradant le diuron

4.1 Isolement et caractérisation de microorganismes dégradant le diuron

Afin de mieux comprendre le fonctionnement des communautés microbiennes dégradant le diuron dans les différents compartiments de l'environnement, nous avons conduit des expérimentations afin d'isoler des souches microbiennes dégradant le diuron. Pour ce faire, des cultures par enrichissement ont été initiées à partir d'échantillons collectés dans la bande enherbée (BH), les sédiments (SED) et le périphyton (BIO) selon le mode opératoire schématisé dans la Figure 6.

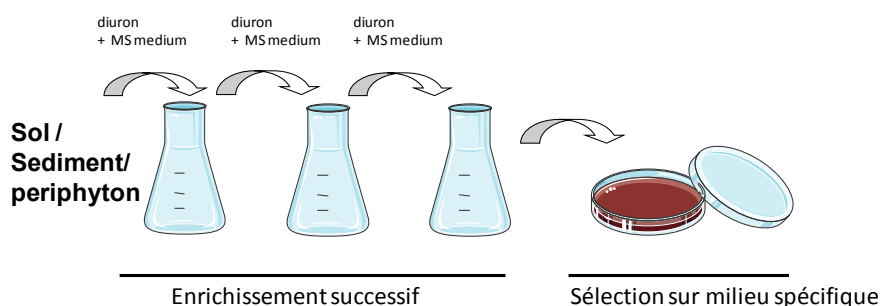


Figure 6 Dispositif expérimental de 'culture par enrichissement' mis en œuvre pour isoler des souches bactériennes dégradant le diuron à partir d'échantillons de sol prélevés dans la bande enherbée, de sédiments et de périphyton prélevés dans la Morcille.

Au cours de l'enrichissement, la capacité de dégradation du diuron de la culture microbienne a été vérifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Ainsi, 6 consortia microbiens dégradant entièrement le diuron ont été obtenus : deux provenant de la bande enherbée (BH_a et BH_b), deux des sédiments de la Morcille (SED_a et SED_b) et deux du périphyton (BIO_a et BIO_b). À partir de ces consortia, des cultures microbiennes ont été initiées pour isoler des souches microbiennes dégradant le diuron. Nous n'avons pas pu isoler de bactéries dégradant le diuron à partir des consortia microbiens ayant pour origine le périphyton. Quatre souches bactériennes transformant le diuron en 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), un intermédiaire métabolique du diuron connu pour s'accumuler dans l'environnement et pour présenter, comme la plupart des anilines, une toxicité élevée, ont été isolées. BH1 et BH2 ont été isolées des consortia BH_a et BH_b, respectivement et SED1 isolée des consortia SED_a. Ces isolats sont capables de croître dans un milieu MS contenant le diuron comme seule source de carbone et d'azote. Par ailleurs à partir des consortia, la souche bactérienne SP1 capable de dégrader la 3,4-dichloroaniline a été isolée. Cet isolat est capable de croître dans un milieu MS contenant de la 3,4-DCA comme seule source de carbone et d'azote.

L'analyse phylogénétique reposant sur le séquençage de l'ADNr 16S de l'opéron ribosomique bactérien a permis de montrer que tous les isolats bactériens capables de transformer le diuron en 3,4-dichloroaniline (voie haute) appartenaient au genre *Arthrobacter*, à la classe des *Actinobacteria*, à la

sous-classe des Actinobacteridae, à l'ordre des Actinomycetales, au sous-ordre des Micrococcineae et à la famille des Micrococcaceae. L'isolat bactérien capable de transformer la 3,4-dichloroaniline résultant de la dégradation du diuron appartient au genre *Achromobacter*, lequel fait partie de la classe des Betaproteobacteria, de l'ordre des Burkholderiales et de la famille des Alcaligenaceae.

4.2. Caractérisation des capacités dégradantes des isolats bactériens

4.2.1 Transformation du diuron en 3,4-dichloroaniline

Les caractéristiques cinétiques de la dissipation du diuron et de l'apparition de la dichloroaniline ont été déterminées avec l'isolat *Arthrobacter* sp. BH2. L'aptitude de cet isolat à dégrader le diuron a été évaluée à partir d'une suspension cellulaire incubée dans un tampon phosphate contenant 30 mg.L⁻¹ de diuron. À des intervalles de temps réguliers, des aliquotes du tampon phosphate ont été prélevées et analysées en HPLC pour mesurer les concentrations résiduelles de diuron et de dichloroaniline. L'analyse de la cinétique de disparition du diuron montre que la dégradation démarre immédiatement et que de manière concomitante la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) apparaît et s'accumule en quantité équimolaire dans le tampon phosphate. La dégradation du diuron est totale en moins de 25 heures. La modélisation de la cinétique de disparition du diuron a permis d'estimer la vitesse maximale de dégradation du diuron à 24,8 µM. h⁻¹. La vitesse maximale d'apparition de la dichloroaniline a été estimée à 24,5 µM.h⁻¹. Ces analyses confirment que les isolats bactériens SED1, BH1 et BH2 dégradent entièrement le diuron et conduisent à une accumulation de la 3,4- dichloroaniline, un composé toxique dont la dégradation est prise en charge par une autre population microbienne du consortium dégradant.

4.2.2 Transformation de la 3,4-dichloroaniline

Les caractéristiques cinétiques de la dissipation de la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) résultant de la transformation du diuron (voie haute catalysée par *Arthrobacter* sp. SED1, BH1 et BH2) ont été déterminées avec l'isolat *Achromobacter* sp. SP1. L'aptitude de cet isolat à dégrader la 3,4-DCA a été étudiée en l'incubant dans un tampon phosphate contenant 30 mg.L⁻¹ de 3,4-DCA (185 µM). Régulièrement, des aliquotes du tampon phosphate ont été prélevées et analysées en HPLC pour estimer la concentration résiduelle en 3,4-DCA. Les résultats obtenus montrent qu'*Achromobacter* sp. SP1 est capable de dégrader la totalité de la 3,4-DCA apportée en moins de 21 heures. Par ailleurs, aucun métabolite n'a été détecté au cours de la dégradation suggérant que suite à l'ouverture du cycle cette molécule est entièrement minéralisée. Ces analyses permettent de conclure qu'au sein du consortium bactérien dégradant le diuron enrichi à partir des sols viticoles, la population *Achromobacter* sp. SP1 assure la minéralisation de la 3,4-DCA résultant de la transformation du diuron catalysée par les populations *Arthrobacter* sp. Nos travaux suggèrent par conséquent que ces deux populations coopèrent au sein de la communauté dégradante pour minéraliser le diuron dans le sol de la bande enherbée et dans les sédiments.

4.2.3 Minéralisation complète du diuron au sein de la microflore des sédiments et du sol

Sur la base de ces observations, la Figure 7 présente une proposition de la voie de biodégradation du diuron.

La voie de biodégradation du diuron comporterait deux parties : la voie haute et la voie basse. La voie haute est catalysée par des isolats bactériens appartenant au genre *Arthrobacter* (isolats SED1, BH1 et BH2). Il est intéressant de noter que d'autres publications rapportent que d'autres souches bactériennes appartenant à ce genre et isolées de sols agricoles sont capables de dégrader le diuron (ex *Arthrobacter globiformis* D47, Cullington et Walker, 1999 ; *Arthrobacter* sp. N2, Widehem et al., 2002). D'autre part, la voie basse est catalysée par *Achromobacter* sp. SP1 qui présente une forte similarité avec la souche *Achromobacter* sp. CH1 isolée en Chine pour sa capacité à réduire en condition aérobie le chrome hexavalent (Ma et al., 2007). Bien que nous ne puissions pas exclure l'existence d'une

souche microbienne capable de minéraliser entièrement le diuron, nos travaux montrent que ce composé pourrait être entièrement minéralisé par l'action séquentielle de ces populations microbiennes au travers d'un processus de coopération métabolique.

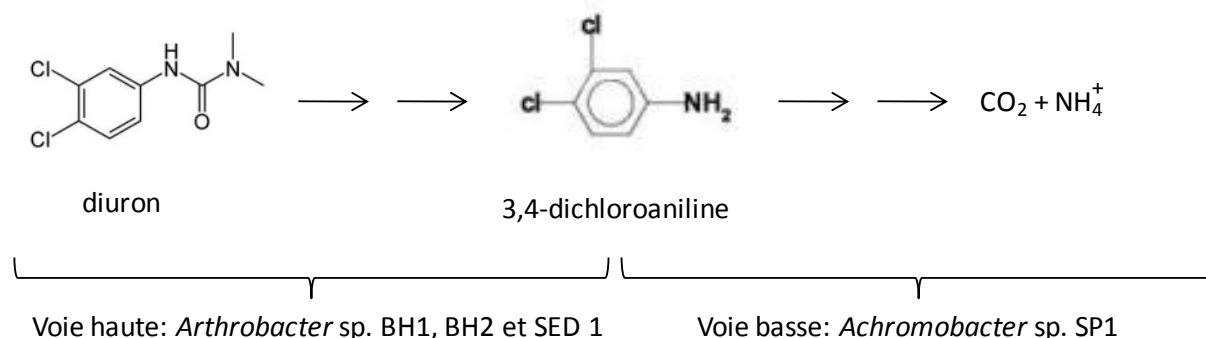


Figure 7. Voie de dégradation du diuron. Voie haute catalysée par des populations d'*Arthrobacter* sp. isolées de la bande enherbée (BH1 et BH2) ou des sédiments de la Morcille (SED1) aboutissant à l'accumulation de la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). Voie basse catalysée par *Achromobacter* sp. SP1 aboutissant à la dégradation complète de la 3,4-dichloroaniline.

Afin de tester l'hypothèse de coopération métabolique, nous avons mesuré l'aptitude d'un consortium microbien synthétique formé d'*Arthrobacter* sp. BH2 et d'*Achromobacter* sp. SP1 à minéraliser le diuron. Pour ce faire une suspension cellulaire contenant chacune de ces isolats en quantité égale a été incubée en tampon phosphate contenant 30 mg.L⁻¹ de diuron et la dégradation du diuron a été suivie par HPLC. Les résultats obtenus indiquent que le consortium synthétique formé par ces deux souches conduit à la dégradation complète du diuron en moins de 40 h d'incubation. Plus précisément, pendant les sept premières heures d'incubation, *Arthrobacter* sp. BH2 dégrade le diuron qui est alors accumulé de façon équimolaire dans le milieu, indiquant que la 3,4-DCA formée n'est pas immédiatement dégradée. Toutefois, après 23 h d'incubation, *Achromobacter* sp. SP1 a dégradé l'ensemble de la 3,4-DCA qui s'était accumulée dans le milieu. Par la suite les 30 µM de diuron restant sont dégradés par BH2 sans que de la 3,4-DCA ne soit accumulée. Cette observation indique qu'après 20 h d'incubation *Achromobacter* sp. SP1 dégrade la 3,4-DCA au fur et à mesure qu'*Arthrobacter* sp. BH2 la produit en transformant le diuron. Le temps de latence observé pour la prise en charge de la 3,4-DCA par *Achromobacter* sp. SP1 pourrait indiquer que la voie de dégradation de la 3,4-DCA est inductible et/ou qu'une concentration minimale de 3,4-DCA est requise pour que la dégradation ait lieu.

Conclusion

Ces travaux ont permis de caractériser des populations microbiennes responsables de la capacité épuratrice de la bande enherbée et des sédiments de la Morcille. Ils ont montré que la capacité épuratrice de ces compartiments environnementaux reposait sur la coopération métabolique de deux populations microbiennes partageant la voie de dégradation du diuron en deux parties. Trois populations appartenant toutes au genre *Arthrobacter* sp. (BH1, BH2 et SED1) transforment le diuron en 3,4-DCA. Une population appartenant au genre *Achromobacter* sp. (SP1) minéralise la 3,4-DCA. Par ailleurs, le consortium microbien synthétique constitué de ces deux populations microbiennes est capable de dégrader entièrement le diuron suggérant que la capacité épuratrice du sol de la bande enherbée et des sédiments résulterait de la coopération métabolique de plusieurs populations au sein de la communauté microbienne dégradante.

Remerciements

Ces travaux ont bénéficié du support financier de l'ONEMA dans le cadre du projet "Amélioration de l'efficacité des zones tampons pour les pesticides et influence de la biodégradation naturelle".

Références bibliographiques

- Audsley E., Milne A., Paveley N., 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. *Aspects of Applied Biology* 147, 161–172.
- Benoit P., Souiller C., Madrigal I., Pot V., Réal B., Coquet Y., Margoum C., Laillet B., Dutertre A., Gril J.J., Barriuso E., 2003. Fonctions environnementales des dispositifs enherbés en vue de la gestion et de la maîtrise des impacts d'origine agricole : cas des pesticides. *Etude et Gestion des Sols*, 10, 299–312.
- Benoit P., 2010. Enherbement des sols : quels effets possibles sur le devenir environnemental des pesticides ? *Fourrages* 202, 95–102.
- Cullington J.E., Walker A., 1999. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 677–686.
- Dillaha T.A., Inamar S.P., 1997. Buffer Zones as Sediment Traps or Sources. *Buffer Zones: Their Processes and Potential in Water Protection*. UK: Quest Environmental Hardfordshire, 33-42.
- Dorioz J.M., Wang D., Poulenard J., Trévisan M., 2006. The effect of grass buffer strips phosphorus dynamics - A critical review and synthesis as a basis for application in agricultural landscape in France. *Agriculture Ecosystems and Environment* 117, 4–21.
- Dousset S., Thevenot M., Schrack D., Gouy V., Carluer N., 2010. Effect of grass cover on water and pesticide transport through undisturbed soil columns, comparison with field study (Morcille watershed, Beaujolais). *Environmental Pollution* 158, 2446–2453.
- El Sebai T., Lagacherie B., Cooper J.F., Soulas G., Martin-Laurent F., 2005. Enhanced isoproturon mineralisation in a clay silt loam agricultural soil. *Agronomy and Sustainable Development* 25, 8–15.
- Hussain S., Sorensen S.R., Devers-Lamrani M., El Sebaï T., Martin-Laurent F., 2009. Characterization of an isoproturon mineralizing bacterial culture enriched from a French agricultural soil. *Chemosphere* 77, 1025–1059.
- Larsen L., Sorensen S.R., Aamand J., 2000. Mecoprop, isoproturon and atrazine in and above a sandy aquifer: vertical distribution of mineralization potential. *Environmental Science and Technology* 34, 2426–2430.
- Ma Z., Zhu W., Long H., Chai L., Wang Q., 2007. Chromate reduction by resting cells of *Achromobacter* sp. Ch-1 under aerobic conditions. *Process Biochemistry* 42, 1028–1032.
- Pesce S., Martin-Laurent F., Rouard N., Montuelle B., 2009. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: from treated plots to lotic receiver hydrosystem. *Pest Management Science* 65, 651–657.
- Pesce S., Martin-Laurent F., Rouard N., Robin A., Montuelle B., 2010. Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization: incidence of run-off and soil erosion. *Journal of Soils and Sediments* 10, 698–707.
- Pesce S., Beguet J., Rouard N., Devers-Lamrani M., Martin-Laurent F., 2012. Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* Microbiol. DOI 10.1007/s00253-012-4318-3
- Pesce S., Margoum C., Rouard N., foulquier A., Martin-Laurent F., 2013. The use of freshwater sediment biodegradation potential as an indicator to assess microbial recovery following a decrease in pesticide contamination: a case study with the herbicide diuron. *Ecological Indicators* (in press)
- Soulas G., 1993. Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 443–449.
- Toräng L., Nyholm N., Albrechtsen A.J., 2003. Shifts in biodegradation kinetics of the herbicides MCPP and 2,4-D at low concentrations in aerobic aquifer materials. *Environmental Science and Technology* 37, 3095–3103.

Topp E., Martin-Laurent F., Hartmann A., Soulas G., 2004. Bioremediation of atrazine-contaminated soil, 141-154. In "Pesticide, Decontamination and Detoxification". J.J. Gan, P.C. Zhu, S.D. Aust and A.T. Lemley, eds. American Chemical Society, Washington, DC. 266 p

Udikovic-Kolic K, Scott C., Martin-Laurent F., 2012. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* DOI 10.1007/s00253-012-4495-0.

Widehem P., Aït-Aïssa S, Tixier C., Sancelme M, Veschambre H., Truffaut N., 2002. Isolation and chracterization of diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere* 46, 527–534.

Walker A., Jurado-Exposito M., Bending G.D., Smith V.J.R., 2001. Spatial variability in the degradation rate of isoproturon in soil. *Environmental Pollution* 3, 407–415.